

Effect of Immobilization Stress and Cold Exposure on Functions of the Autonomic Nervous System, the Endocrine System and Neurotransmitters in the 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/2297/7950

拘束・寒冷ストレスに対する自律神経-内分泌系および 脳内神経伝達物質の応答

金沢大学医学部公衆衛生学講座 (主任: 岡田 晃教授)

綱 島 浩 一

(昭和62年3月20日受付)

自律神経-内分泌系や脳内神経伝達物質が異なったストレスによってどのような反応を示すか明らかにすることは、ストレスによる生体反応の発現機序を理解するうえできわめて有用な手掛りを与えると考えられる。そこで著者は、拘束ストレスと寒冷暴露(寒冷ストレス)をラットに負荷し、自律神経-内分泌系における応答と脳内神経伝達物質の変化を調べ、これら二種のストレス間の差異の有無を検討した。本研究で取り上げたストレスは3時間の拘束と4°C、3時間の寒冷暴露である。拘束群の体温は時間経過とともに低下し3時間負荷の後は約4.4°C低下した。一方、対照群と寒冷ストレス群の体温は大幅な変動を示すことなく推移した。血中コルチコステロン濃度は、拘束ストレス群では1時間負荷後に著しく上昇し、3時間負荷まで高値のまま推移したが、対照群と寒冷ストレス負荷群では1時間後に上昇したものの、その後低下傾向を示した。胃潰瘍は拘束・寒冷ストレス群の全例に発現し、しかも発現部位、大きさ、重症度は両ストレス間で差異はなかった。拘束・寒冷ストレス群の全例での胃潰瘍の発生、両ストレス間でのコルチコステロン分泌反応と体温の推移の違いは、自律神経-内分泌系がストレスにより異なった反応を示すことを示唆している。脳内神経伝達物質の応答をみると、拘束ストレス負荷では前頭葉皮質、側坐核におけるホモバニリン酸(homovanillic acid, HVA)含有量の低下と側坐核、線条体でのドーパミン(dopamine, DA)代謝回転の低下、他方、寒冷ストレス負荷では線条体 HVA 含有量の増加と側坐核、線条体 DA 代謝回転の亢進傾向がみられた。この成績は、脳内 DA 系に対して拘束ストレスが抑制的に、また寒冷ストレスが賦活的に働くことを示している。また、拘束ストレス群では、前頭葉皮質のセロトニン(5-hydroxytryptamine, 5-HT)含有量の上昇と側坐核 5-HT 含有量の低下がみられたに過ぎなかった。他方、寒冷ストレス負荷では前頭葉皮質、側坐核、線条体、視床下部の 5-HT 代謝回転は亢進あるいは亢進傾向を示した。この結果は、寒冷ストレスが、脳内の広範な部位での 5-HT 系に対して長時間賦活的に作用することを示唆している。前頭葉皮質のサブスタンス P 様免疫活性(substance P-like immunoreactivity, SP-LI)は拘束・寒冷ストレスで同程度低下し、側坐核、SP-LI は拘束ストレスのみで低下していた。他の2部位での SP-LI には変化は認められなかった。この結果から、前頭葉皮質、SP-LI の低下は、情動変化を伴うストレスに特徴的な変化と考えられる、また、両部位の DA 代謝回転に関する成績から、長時間のストレス負荷による SP-LI の低下は SP-LI 生合成の抑制によるものではないかと推測された。

Key words immobilization stress, cold exposure, autonomic nervous function, endocrine function, neurotransmitters

動物は、ストレスを負荷されることによって、胃潰瘍の発生、胸腺、リンパ節の萎縮、副腎皮質の肥大などさまざまな生体反応を示すことが良く知られてい

る。ストレスによって起こるこれらの変化は自律神経系、内分泌系を介して引き起こされる¹⁾が、さらにそれらを上位で統御・調節しているのは中枢神経系であ

Abbreviations: DA, dopamine; EIA, enzyme immunoassay; 5-HIAA, 5-hydroxyindole-3-acetic acid; 5-HT, 5-hydroxytryptamine; HRP, horseradish peroxidase; HVA, homovanillic acid; OPD, o-phenylenediamine dihydrochloride; m-RNA, messenger ribonucleic

る¹⁾。したがって、ストレスに対する生体反応の中心的な役割を果たすのは中枢神経系であると言えるが、その中枢神経系が持つ複雑な機能の基盤となっているのは、化学的メッセンジャーによるニューロン間の情報伝達機構である。化学的メッセンジャーであるモノアミンは、古典的神経伝達物質として古くから知られており、ストレスとの関係でもラットを用いて数多くの研究が行なわれている。例えば、拘束ストレス負荷は、脳の広範な部位でノルエピネフリン (norepinephrine NE) やセロトニン (5-hydroxytryptamine, 5-HT) 代謝の亢進を引き起こすだけでなく²⁾⁻⁵⁾、中脳-辺縁ドーパミン (dopamine, DA) 系の機能亢進も生じる可能性が示唆されている⁶⁾。また、弱い電撃を用いた foot shock stress は、中脳-皮質 DA 系を賦活し、DA の代謝を亢進させると報告されている⁷⁾。さらに、脳内モノアミン系と密接な関連を持つものに寒冷暴露がある。ところが、寒冷暴露と脳内モノアミン系に関しては、体温調節という観点から、専ら視床下部モノアミン系との関連で研究が行なわれている。例えば、視床下部に 5-HT を投与すると、体温上昇がみられる⁸⁾⁹⁾、あるいは DA の投与は体温の低下を引き起こすという¹⁰⁾¹¹⁾。また、5-HT の体温上昇作用は DA 系を介するとの報告もあり¹²⁾、視床下部 5-HT や DA 系が体温維持機構に密接に係わっていると推測されている。しかし、寒冷暴露による体温低下も一種のストレス負荷と考えられることから、その際に生ずる脳内モノアミン系の変化は視床下部にとどまらず、他の部位にも影響を与える可能性があるが、この点に関してはこれまでほとんど検討されていない。

ところで、上述した事実は、負荷するストレスの違いによって、脳内モノアミン系が異なった反応を示すことを示唆している。したがって、異なったストレス負荷による脳内モノアミン系の変化を調べることは、ストレスに対する生体反応の理解をより一層深めるうえで、きわめて重要な手掛りを与えようと考えられる。そこで今回、拘束ストレス、寒冷暴露 (以下寒冷ストレスと呼ぶ) を選び、脳内モノアミン系に対する二種のストレス間の影響について比較・検討することにした。二種のストレスはともに脳内モノアミン系全体に影響を及ぼす可能性が高いことは上述した通りであるが、拘束ストレスと脳内 NE 系に関しては既に Tanaka ら¹³⁾¹⁴⁾ による詳細な検討があるので、今回は脳内 DA および 5-HT 系に集点を絞って検討した。なお、ストレス負荷による自律神経-内分泌系の応答の

指標として血中コルチコステロンの変化と胃潰瘍の発生頻度を調べると同時に体温の変化も調べ、二つのストレス負荷時の反応性の違いについて考察を加えた。

脳内にはモノアミンなどの古典的神経伝達物質の他に多くの種類の神経ペプチドが存在し、それらはニューロン間の情報伝達機構において、神経伝達物質または神経調節物質として働いていると推測されている¹⁵⁾。神経ペプチドの中には、DA や 5-HT の放出に影響を与えるペプチドの存在が報告されている。ラット脳内に広く分布するサブスタンス P (substance P, SP) は、DA に対して賦活作用を持っていることが示されている¹⁶⁾¹⁷⁾。この他に SP は、線条体で 5-HT 放出も促進する¹⁸⁾。さらに SP と 5-HT は縫線核で共存しているとの報告¹⁷⁾もある。これらの報告は、SP が DA や 5-HT の調節に関与することを示唆している。したがって、この神経ペプチドは、脳内 DA、5-HT の変化に伴ってその動態も変化すると想定されるが、ストレス負荷に際しての SP の動態は未だ明らかにされていない。そこで本研究では、拘束および寒冷の二種類のストレスを負荷した際の脳内各部位における SP 含有量を測定し、DA、5-HT の検討で得られた結果と合わせて、二つのストレス負荷時の生体の反応性の違いについて考察を加えた。

対象および方法

I. 実験動物

対象は第 9～10 週齢 (体重 313 ± 3.8 g) の Wistar 系雄性ラット (35 匹) である。各ラットは実験開始前 1 週間、固形飼料 (日本クレア CE-2) および水が自由に摂取可能なホームケージに入れ、12 時間周期の明暗サイクル飼育室 (室温 22 ± 2 °C、湿度 45%) で飼育した。

II. 血液採取のための手術

各ラットにペントバルビタール (60 mg/kg) 麻酔下で採血のためのカテーテル挿入手術を施した。採血用カテーテルには、Clay Adams 社製 PE-10 (内径 0.23 ml 外径 0.38 mm)、PE-50 (内径 0.28 mm 外径 0.61 mm) ポリエチレンチューブに熱を加えて接着したものをを用いた。内外径の細い PE-10 は大腿動脈内に挿入し、内外径の太い PE-50 は皮下を通してラットの頸部背側より引き出した。その後、0.1% ペパリン入り生理食塩水をカテーテルに封入し、ラットの頸部背側より引き出したカテーテル端 (PE-10) を皮膚に固定し、手術を終えた。

acid; NE, norepinephrine; SP, substance P; SP-LI, substance P-like immunoreactivity; VTA, ventral tegmental area.

III. ストレス負荷実験

DA, 5-HT 測定のための実験は、拘束ストレス負荷実験（5匹）と寒冷ストレス負荷実験（5匹）の二回に分けて行い、各ストレス群で得られた成績は同時に行った対照群（各々ストレス負荷実験について5匹ずつ）のそれと比較した。なお、拘束ストレス負荷実験は11月、寒冷ストレス負荷実験は8月に行った。またサブスタンスP様免疫活性（substance P-Like Immunoreactivity, SP-LI）測定のための実験は、対照群（5匹）、拘束ストレス群（5匹）、寒冷ストレス群（5匹）の実験を同時に行い、得られた成績は対照群のそれと比較した。

手術後、ラットの体重が術前の体重まで回復するのを待って、ストレス負荷実験を行なった。ラットはストレス負荷開始24時間前より絶食させたが、水は自由に摂取させた。実験開始は午前10時15分～11時45分の間とした。ストレス負荷直前に、コルチコステロン測定のための採血（0.6ml）と体温の測定を行った。体温は、サーミスタ（芝浦電子製作所、Type PT）を肛門から約5cm挿入し、サーミスタ温度計（芝浦電子製作所、Model-MGA III）を用いて測定した。

1. 拘束ストレス

拘束ストレスは、Butterfieldらの方法¹⁹⁾に準じて負荷した。ラットの四肢を麻紐で縛り、木製の台面上にて左側臥位に固定し、上から網戸用の網（合成樹脂製）を被せて頭部および体幹の動きを抑制した。拘束ストレス負荷は3時間とし、負荷中は水および飼料を摂取させなかった。この間、留置したカテーテルから1時間毎に採血し（0.6ml）、コルチコステロンの測定に供した。また、採血直前に肛門にサーミスタを挿入し体温を測定した。

2. 寒冷ストレス

各ラットを床敷き用の木製チップを取除いたホームケージ中に入れて、4°C定温室に3時間放置した。その間、1時間毎に拘束ストレス群と同様に0.6mlの採血と体温の測定を行なった。拘束ストレスと同じく負荷中水および飼料は摂取させなかった。

なお、対照群の各ラットは、木製チップを入れたホームケージ中で最初の採血と体温の測定を行ない、その後、3時間室温に放置した。その間ストレス群と同様に、1時間毎の採血と体温の測定を行なった。なおストレス群と同様に、水および飼料の摂取は中止した。

IV. 屠殺方法および脳の取出し

拘束群、寒冷群、対照群ともに3時間目の採血直後にmicro波加熱装置（東京芝浦電気株式会社 TMW-6402）を使用して屠殺した。直ちに全脳（嗅球を除く）を取り出し、-70°Cで保存した。

V. 胃潰瘍

上記の方法で屠殺したラットの腹部を解剖し、胃潰瘍発生の有無を調べた。胃潰瘍の評価には、Bhargavaら¹⁹⁾のulcer indexを用いた。

IV. 脳の分割方法

-70°Cで凍結保存した脳を解凍し、氷上で1mmの厚さの全額断の切片を作製したのち、視床下部、線条体、側坐核をMarleyらの方法²⁰⁾に従って直視下で内径2mmのパンチアウト用の針を使用してパンチアウトした。前頭葉皮質は、前頭葉先端から2mmの切片で、嗅索を除いた部位を用いた。

VII. ドーパミン (DA) およびセロトニン (5-HT) とそれらの代謝産物の測定

同一の脳組織から、DAおよび5-HTと、DAの代謝産物であるホモバニリン酸 (homovanillic acid, HVA)、5-HTの代謝産物である5-hydroxyindole-3-acetic acid (5-HIAA) を測定した。測定には電気化学検出器付高速液体クロマトグラフ (HPLC-ECD) を使用した。なお、DAと5-HTの測定にはYanaco L-5000 (柳本製作所; 検出器 VMD-501)、HVA、5-HIAAの測定にはYanaco L-2000 (柳本製作所製; 検出器 VMD-101) を使用した。

1. DA, 5-HTの測定

1) イオン交換樹脂の調整

陽イオン交換樹脂として、Amberlite CG-50 (type II) を用いた。Amberliteを2N NaOH, 2N HClで交互に2回洗浄し、水洗後、0.1Mリン酸緩衝液 (pH 6.1) 中に4°Cで平衡化した。Amberlite約100mgは先端にポリプロピレン綿を詰めたガラスカラム (内径約2mm) に入れ、DA, 5-HTの分離・精製に使用した。

2) DA, 5-HTの測定

脳組織に0.4N過塩素酸 (PCA) (0.1mM EDTAを含む) 2mlとDA, 5-HTおよびHVA, 5-HIAAの内部標準としてそれぞれdihydroxybenzylamine (DHBA) 4.9ng, p-hydroxyphenylacetic acid (PHPA) 750ngを加えた。その後、超音波破砕を行ない、遠心分離 (4°C, 13000rpm, 20min) した。沈渣は組織蛋白量の測定に供した。上清には、1.5mlの0.4M K₂CO₃ (0.1mM EDTAを含む) を加えてpHを6.5に調整し、再び遠心分離 (4°C, 3000rpm, 5min) を行ない、その上清全量をAmberliteカラムに通し、DA, 5-HTを吸着させた。通過液はHVA, 5-HIAAの測定に供した。翌日、0.6M HCl (0.1mM EDTAを含む) 0.8mlでDA, 5-HTを溶出し、60μlをHPLC-ECDに注入した。それぞれの回収率は約95%であった。なお、DA, 5-HTの分離・精製・溶出の全操作は、

4°Cの定温室で行なった。

1. HVA, 5-HIAAの測定

1) Neopack elute (C18)の前処理

HVA, 5-HIAAの分離・精製には Neopack elute (C-18) (西尾工業製) を使用した。Neopack elute (C-18) はメタノールで2回、その後蒸留水で3回洗浄してから用いた。

2) HVA, 5-HIAAの精製および測定

Neopack elute に Amberlite 通過液全量を通し、HVA, 5-HIAA を吸着させたのち、50%メタノール溶液 (0.1 mM EDTA を含む) 1 ml で溶出し、その後蒸留水 (0.1 mM EDTA を含む) 1 ml で洗浄した。HVA, HIAA を含む 50%メタノール溶出液と洗浄した水の全量を混合して凍結乾燥したのち、0.4 N PCA (0.1 mM EDTA を含む) 0.3 ml で溶解して遠心分離 (4°C, 3000 rpm, 5 min) し、上清 60 μ l を HPLC-ECD に注入した。それぞれの回収率は約 95%であった。

3) HPLC-ECDの条件

DA, 5-HT 測定は、移動相に 0.05 M KH_2PO_4 , 17% メタノール, 1 mM $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{SO}_3\text{Na}$, 0.1 mM EDTA, pH 3.6 を用いて、流速 0.6 ml/min, 荷電圧 0.8 V, カラム温度 25°C で行った。

HVA, 5-HIAA 測定は、移動相に 0.1 M KH_2PO_4 , 10%メタノール, 0.1 mM EDTA, pH 4.5 を用いて、流速 1.0 ml/min, 荷電圧 0.8 V, カラム温度 30°C で行った。

なお、DA, 5-HT, および HVA, 5-HIAA の測定に用いたカラムは Yanapac ODS-T (4 mm \times 25 mm) である。

Ⅷ. サブスタンス P 様免疫活性 (SP-LI) の測定

測定は、2抗体固相法による酵素免疫測定法 (EIA 法) を用いる Arai らの方法²¹⁾に従った。

1. 使用薬品および器具

使用した薬品・器具は以下の通りである：合成 substance P (SP) は Sigma Chemical Company (S-0880) を使用し、substance P 抗体 (第1抗体) は UCB-Bioproducts (1675 LOT No. 2867-4-1A), 抗 rabbit IgG (第2抗体) は Miles-Yeda (65159 LOT No. E108) をそれぞれ使用した。O-phenylenediamine dihydrochloride (OPD) と牛血清アルブミンは Sigma Chemical Company から購入した。Horse-radish peroxidase (HRP) は東洋紡、Tween 20 は和光純薬のものを使用した。Microplate は Dynatech Laboratories (flat bottom microelizaplate 96 well/plate), Washer には Titertek Microplate Washer, 吸光度の測定には Corona 社製 Microplate Photometer (MTP-22) を使用した。

2. サブスタンス P 様免疫活性 (SP-LI) の測定

脳組織は、氷冷した 0.1 N 酢酸 1 ml 中で超音波破碎し、5分間の煮沸後に2回遠心分離 (4°C, 3000 rpm, 20 min) を行ない、上清を凍結乾燥した。遠心分離で得られた沈渣は組織蛋白量の測定に供した。凍結乾燥後の試料は、測定用緩衝液 (0.14 M リン酸緩衝液 pH 7.4, 25 mM EDTA, 0.5% 牛血清アルブミン, 0.05% Tween20 を含む；以下 A 液とする) 0.4 ml に溶解した後、再び適当な倍率に A 液で希釈し、SP-LI 測定に使用した。

SP 抗体は 1 ml の A 液に溶解したのち、0.2 ml ずつ分注して -70°C に保存した。使用に際して、A 液で分注した抗体を 100 倍に希釈して用いた。

A 液 100 μ l, 標準もしくは検体 50 μ l, SP 抗体 50 μ l を含む反応液を前もって Arai らの方法²¹⁾で第2抗体を吸着させた microplate に入れ、4°C 一夜反応させた。翌日、標識抗原 (HRP-SP conjugate: 125 倍希釈したもの) 100 μ l を加えて、2時間反応させたあと、Arai らと同じ方法²¹⁾で microplate を洗浄した。第2抗体と結合した標識抗原の酵素活性を測定するために、OPD 736 ng/ml, 0.88 mM H_2O_2 を含むリン酸クエン酸緩衝液 (0.1 M citric acid, 0.2 M NaH_2PO_4 , pH 5.2) を microplate 中で室温で 40 分間反応させて、492 nm の吸光度を測定した。試料の濃度は作成した標準曲線より求めた。

3. 酵素免疫測定法 (EIA 法) の検討

1) Gel chromatography

Arai らの方法²¹⁾に準拠して測定した EIA 法の特異性を確認するために、Sephadex G-50 カラム (1 \times 46 cm) を用いて SP について gel chromatography を行なった。溶媒に 1 N 酢酸 (0.1% 牛血清アルブミンを含む) を用いた。SP-LI の検討は前頭葉皮質を使用した。脳組織に含まれる SP-LI を上述した手順で抽出し、凍結乾燥した。その試料を 0.5 ml の溶媒に溶かし、全量をカラムに通し、フラクションコレクターで 1 ml ずつ採取した。採取した試料は再び凍結乾燥し、A 液 0.5 ml に溶解したのち、EIA 法で各分画中の SP-LI 濃度を測定した。また、標準として合成 SP 3 ng/ml を含む溶媒 0.5 ml をカラムに通し、試料と同じ手順で各分画中に含まれる SP-LI 濃度を測定し、試料で得られた結果と比較・検討した。

2) 測定した試料についての検討

SP-LI 測定に使用した凍結乾燥試料の一部を A 液で適当な濃度に希釈し、SP 抗体を用いて EIA 法で測定し希釈曲線を作った。得られた希釈曲線と SP の標準曲線を比較した。

Ⅸ. 血中コルチコステロンの測定

採取した血液は、直ちに遠心分離 (3000 rpm, 20 min) 後、血清を分離したのち、 -20°C で凍結保存した。測定は protein binding assay 法を用いた Honma らの方法²²⁾²³⁾に従って行なった。

X. 蛋白測定

組織蛋白の定量は、Lowry らの方法²⁴⁾に従った。標準として、1 N NaOH に溶解した牛血清アルブミンを用いた。

X I. 統計処理

組織中の DA, HVA, 5-HT, 5-HIAA および SP-LI 含有量の各群間の比較は、Pitman の置換検定を使用した²⁵⁾。血中コルチコステロン濃度および体温の各群間の比較は、単一要因分散分析によった。Pitman の置換検定は両側検定で行い、単一要因分散分析は片側検定で行った。なお、危険率 5% 以下を有意とした。

成 績

I. 体温の変化

各群ともに実験開始直前の体温を基準値として比較

した。対照群では測定開始 1 時間後で約 1°C の上昇がみられ、2 時間までそのまま推移したが、その後低下し 3 時間後の体温は基準値に比べて約 0.5°C の高値を示した。拘束ストレス群ではストレス負荷後時間経過とともに体温は低下し、3 時間後では約 4.4°C の低下がみられた (図 1 A)。

寒冷ストレス負荷実験では、寒冷ストレス負荷開始 1 時間後の測定値と基準値の間に差異はみられなかったが、2 時間後に軽度低下し 3 時間後では基準値に比べて約 0.9°C の体温低下がみられた。なお、この実験での対照群の体温の時間的推移と変動幅は、拘束ストレス負荷実験における対照群で得られた結果 (図 1A) とほぼ一致していた (図 1B)。

II. ストレス負荷と血中コルチコステロン濃度の推移

各群ともに実験開始直前の測定値を基準として比較した。拘束ストレス群では、ストレス負荷開始 1 時間後で血中コルチコステロン濃度は著しく上昇し、3 時間のストレス負荷実験が終了するまで高値のまま推移

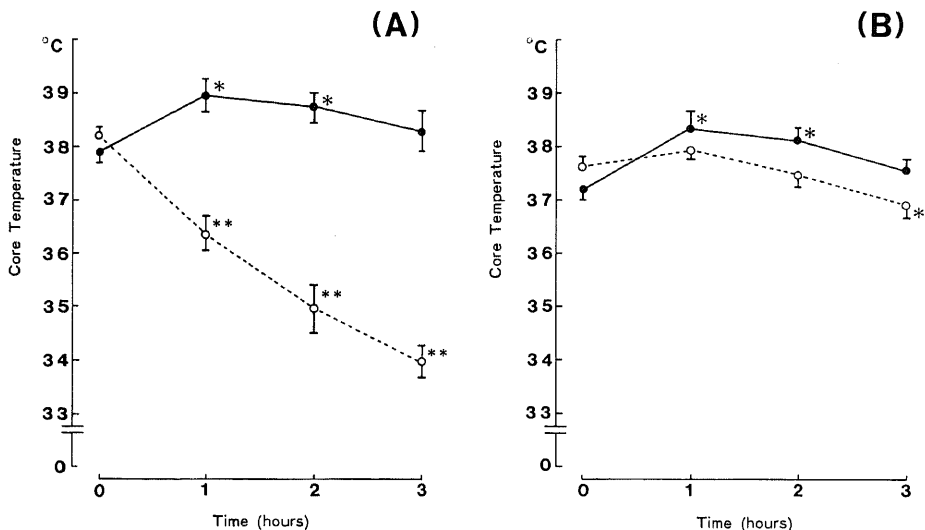


Fig. 1. The effect of immobilization stress and cold exposure on core temperature of the rat.

All rats were starved for 24 hours prior to the experiments, but water was available *ad libitum* during the period of starvation. Control rats remained housed in individual cages at room temperature. (A) The rats were restrained according to the method of Butterfield and Rasche for 3 hours at room temperature (broken line) (B) The rats were housed in individual cages and were kept in a cold room (4°C) for 3 hours (broken line). Solid line indicates the core temperature of the control rats on each experiment. Each value represents the mean \pm standard error obtained from 5 rats.

Statistical analysis was performed using one way ANOVA. Statistically significant as compared to the value just before start of the experiment. *, $p < 0.05$;

** , $p < 0.01$.

した。対照群では、実験開始1時間後に軽度の上昇がみられたが、全経過を通して大きな変動は認められなかった(表1A)。

寒冷ストレス群では、血中コルチコステロン濃度はストレス負荷開始1時間後に上昇したものの有意差はなく、その後低下傾向を示した。同時に行った対照群の血中コルチコステロン濃度の推移はストレス負荷群とはほぼ一致したパターンを示した(表1B)。

III. 拘束ストレスおよび寒冷ストレス負荷による胃潰瘍の発現

対照群では、胃潰瘍は全く見られなかった。しかし、拘束ストレス群、寒冷ストレス群の全例で小出血を伴った直径1mm以下の小さな潰瘍が主として小彎側に1~2個認められた。ところが、拘束あるいは寒冷と負荷したストレスに違いがあるものの、潰瘍の発現部位、大きさ、発生した数に差異はなかった。また、潰瘍の重症度を考慮したulcer index¹⁹⁾を用いる評価法による評価でも、その値は拘束ストレス群は19、寒冷ストレス群は23で違いは認められなかった。

IV. 脳内モノアミンおよびその代謝産物

1. DA と HVA

DA含有量には測定したどの部位においても、対照群と拘束ストレス群との間に差異は認められなかった。しかし、DAの代謝産物であるHVA含有量は、対照群に比べて拘束ストレス群では前頭葉皮質および側

坐核で有意な減少を示した。DAの代謝回転率をHVA/DA比で検討すると、対照群に比べて拘束ストレス群では中脳-辺縁DA系、黒質-線条体DA系の夫々の神経終末がある側坐核、線条体においてDAの代謝回転の低下がみられた。前頭葉皮質においては、対照群に比べて拘束ストレス群ではHVA/DA比の有意な低下は認められなかった(表2)。

寒冷ストレス群では対照群に比べて、視床下部DA含有量の減少、線条体HVA含有量の増加がみられた。しかし、HVA/DA比には各部位で寒冷ストレス群と対照群の間では有意差はなかった(表3)。

2. 5-HT と 5-HIAA

5-HT含有量は拘束ストレスによって前頭葉皮質および側坐核において減少したが、その代謝産物である5-HIAA含有量はいずれの部位においても拘束ストレス群と対照群の間で有意な変化を示さなかった。また、DAの場合と同様に5-HIAA/5-HT比を調べたが、拘束ストレス群で有意な変化はみられなかった(表4)。

寒冷ストレスでは、対照群に比べて5-HT含有量はどの部位においても有意差は認められず、5-HIAA含有量は前頭葉皮質でのみ増加していた。ところが、5-HIAA/5-HT比は線条体を除く、各部位において寒冷ストレス群で有意な高値を示した。このことは、寒冷ストレス群では脳の広範な部位で5-HT系の代謝回転が亢進していることを示唆している(表5)。

Table 1. Effect of immobilization stress and cold exposure on serum corticosterone levels of the rat.
(A)

	Serum Corticosterone Concentration ($\mu\text{g}/\text{dl}$)			
	0	1	2	3(hr)
Control	26.1 \pm 2.3	34.2 \pm 2.2	32.1 \pm 5.8	25.5 \pm 4.8
Immobilization	36.1 \pm 2.4	48.4 \pm 5.6	48.1 \pm 1.6*	44.0 \pm 4.8

(B)

	Serum Corticosterone Concentration ($\mu\text{g}/\text{dl}$)			
	0	1	2	3(hr)
Control	21.6 \pm 2.9	29.7 \pm 4.7	23.7 \pm 5.3	16.5 \pm 3.3*
Cold Exposure	24.3 \pm 2.2	28.5 \pm 2.6	25.0 \pm 3.6	20.0 \pm 5.8

Each value represents the mean \pm standard error obtained from 5 rats. Statistical analysis was performed using one way ANOVA.

Statistically significant as compared to the values just before starting the experiment.
*, $p<0.05$.

Table 2. Effects of immobilization stress on levels of dopamine and homovanillic acid in 4 discrete regions of the rat brain

	Dopamine (DA) (ng/mg protein)		Homovanillic Acid(HVA) (ng/mg protein)		HVA/DA	
	Control	Immobilization	Control	Immobilization	Control	Immobilization
Frontal Cortex	4.66±0.46	3.68±0.69	1.77±0.14	1.04±0.14*	0.39±0.04	0.31±0.05
N. Accumbens	57.89±6.35	49.84±8.42	6.05±0.62	N. D**	0.11±0.02	N. D**
Caudate-Putamen	57.69±4.45	63.39±4.39	6.42±0.74	4.64±0.41*	0.11±0.01	0.07±0.01*
Hypothalamus	8.52±0.83	11.97±2.11	0.82±0.11	1.01±0.20	0.10±0.01	0.08±0.01

Each value represents the mean±standard error obtained from 5 rats. Statistical comparisons between control and immobilization group were based on Pitman's permutation test(two-tailed).

*,p<0.1; **,p<0.05; ***,p<0.01.

Table 3. Effects of cold exposure on levels of dopamine and homovanillic acid in 4 discrete regions of the rat brain.

	Dopamine(DA) (ng/mg protein)		Homovanillic Acid(HVA) (ng/mg protein)		HVA/DA	
	Control	Cold Exposure	Control	Cold Exposure	Control	Cold Exposure
Frontal Cortex	2.22±0.57	2.90±1.03	0.56±0.09	0.68±0.10	0.26±0.03	0.30±0.06
N. Accumbens	40.26±4.06	40.90±5.54	2.90±0.36	3.87±0.62	0.07±0.00	0.10±0.01*
Caudate-Putamen	68.84±2.80	66.45±2.47	5.76±0.28	7.04±0.43*	0.08±0.01	0.11±0.01*
Hypothalamus	11.75±2.60	3.98±0.46*	0.85±0.15	0.69±0.11	0.10±0.03	0.18±0.03

Each value represents the mean±standard error obtained from 5 rats. Statistical comparisons between control and immobilization group were based on Pitman's permutation test(two-tailed).

*,p<0.1; *,p<0.05.

Table 4. Effects of immobilization stress on levels of 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxyindole-3-acetic acid in 4 discrete regions of the rat brain.

	5-hydroxytryptamine (5-HT) (ng/mg protein)		5-hydroxyindole-3- Acetic Acid(5-HIAA) (ng/mg protein)		5-HIAA/5-HT	
	Control	Immobilization	Control	Immobilization	Control	Immobilization
Frontal Cortex	6.89±0.27	10.12±0.60**	6.71±0.32	7.61±0.48	0.99±0.08	0.76±0.06*
N. Accumbens	7.00±0.62	3.93±0.95*	9.64±1.36	7.27±1.99	1.34±0.19	1.60±0.43
Caudate-Putamen	5.56±0.16	5.77±0.29	10.59±0.46	10.50±0.66	1.93±0.11	1.91±0.14
Hypothalamus	7.30±1.01	7.22±0.61	5.67±0.74	5.83±0.49	0.79±0.04	0.81±0.03

Each value represents the mean±standard error obtained from 5 rats. Statistical comparisons between control and immobilization group were based on Pitman's permutation test(two-tailed).

*,p<0.1; **,p<0.05; ***,p<0.01.

V. 脳内神経ペプチド

1. 酵素免疫測定法 (EIA 法) の検討

SP の典型的な標準曲線は図 2 に示した通りである。SP の nonspecific binding (NSB) は約 5%, plate

間および plate 内変動はそれぞれ約 9% と約 4% であった。

2. Gel chromatography

標準とした SP の各分画濃度のピークは、脳組織か

Table 5. Effects of cold exposure on levels of 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxyindole-3-acetic acid in 4 discrete regions of the rat brain.

	5-hydroxytryptamine (5-HT) (ng/mg protein)		5-hydroxyindole-3- Acetic Acid(5-HIAA) (ng/mg protein)		5-HIAA/5-HT	
	Control	Cold Exposure	Control	Cold Exposure	Control	Cold Exposure
Frontal Cortex	5.78±0.88	4.74±0.35	2.93±0.35	4.18±0.22**	0.53±0.04	0.90±0.07**
N. Accumbens	3.27±0.97	2.12±0.66	3.40±0.87	5.78±0.82	1.23±0.23	2.20±0.27*
Caudate-Putamen	4.56±0.46	3.99±0.25	6.39±0.50	7.14±0.63	1.45±0.15	1.78±0.08*
Hypothalamus	9.28±0.44	7.54±0.70	11.60±0.39	12.86±0.93	1.26±0.06	1.75±0.17*

Each value represents the mean ± standard error obtained from 5 rats. Statistical comparisons between control and immobilization group were based on Pitman's permutation test (two-tailed).
*, p < 0.1; **, p < 0.05; ***, p < 0.01.

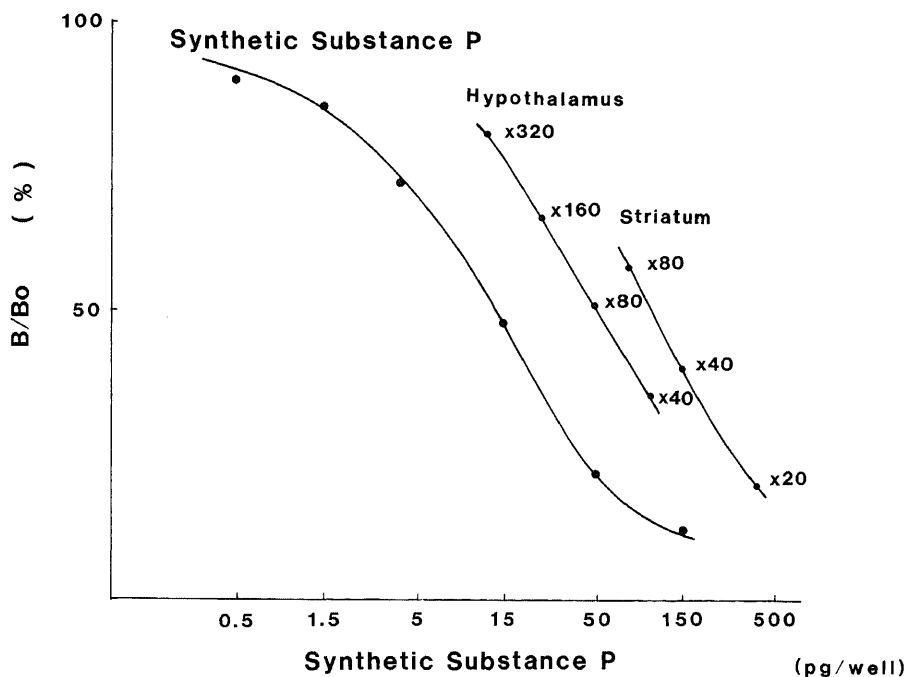


Fig. 2. Competitive inhibition curve of antibody-bound HRP conjugated substance P by synthetic substance P (standard curve), crude hypothalamus and crude striatum extract.

Each microplate contained the diluted synthetic substance P (standard, B), the enzyme blanks (nonspecific binding, NSB), and the well without free antigen (B₀). B/B₀ (%) express (B-NSB)/(B₀-NSB) ratio. Hypothalamus extract was diluted 40, 80, 160 and 320 times. Striatum extract was diluted 20, 40, 80 and 160 times.

ら抽出した試料の各分画濃度のピークと一致していた。前頭葉皮質抽出試料の全 SP-LI のうち、合成 SP と一致したピークが占める割合は 100%であった (図 3)。

3. 測定した試料の検討

視床下部および線条体からの抽出試料を用いて検討した SP-LI の稀釈曲線は、標準物質として用いた合成 SP の標準曲線にそれぞれ平行であった (図 2)。

4. サブスタンス P 様免疫活性 (SP-LI)

SP-LI 含有量は、拘束ストレス群および寒冷ストレス群では対照群に比べて前頭葉皮質で有意に減少して

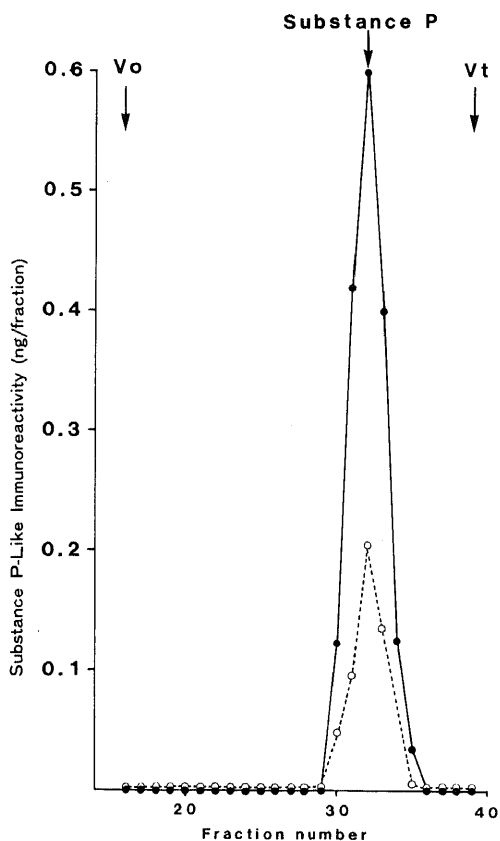


Fig. 3. Elution profile of the substance P-like immunoreactivity (SP-LI) in the frontal cortex extract (broken line)

The pooled extract and the synthetic substance P were applied onto Sephadex G-50 column (1×46 cm) and eluted with 1N acetic acid (containing 0.1% bovine serum albumin). 1-ml fraction were collected and lyophilized. Each fraction reconstituted with the assay buffer was subjected to the assay for SP-LI. The column was calibrated with blue dextran (void volume, V_0), synthetic substance P (solid line), and methylene blue (total volume, V_t).

いた。側坐核における SP-LI 含有量は対照群に比べて拘束ストレス群で減少していたが、寒冷ストレス群では同様の変化は認められなかった。その他の部位の SP-LI 含有量は、拘束ストレス群および寒冷ストレス群では対照群と比べて有意な変化を示さなかった (表 6)。

考 察

I. ストレス負荷と自律神経-内分泌系の変化

拘束ストレス負荷によって体温は時間経過とともに低下した (図 1A)。Tanaka ら²⁰⁾も同様の成績を報告している。拘束ストレスによる体温低下の機序について、Tanaka ら²⁰⁾は、5-HT 合成阻害剤 p-chlorophenylalanine の腹腔内投与が拘束ストレス負荷時の体温低下を阻止すると報告し、5-HT の関与を示唆している。しかし、5-HT は体温を上昇させる作用を持つとの報告⁶⁾⁹⁾もあり、Tanaka ら²⁰⁾も指摘しているように、拘束ストレスによる体温低下を 5-HT のみで一次的に説明することは困難である。また、後の項で述べる拘束ストレス負荷時の脳内 DA 系や 5-HT 系の変化を考慮しても、拘束ストレス負荷による体温低下を説明することはできず、その機序は現在のところ明らかでない。

寒冷ストレス負荷では、ストレス負荷開始後 3 時間ではじめて体温の低下がみられたが、この体温低下は基準値と比べて約 1°C に過ぎなかった (図 1 B)。体温が寒冷ストレス負荷の全経過を通じてほぼ一定の値で推移するのは、寒冷暴露に対して視床下部に存在するサーモスタット機能 (後述) が作動したためと推測される。

コルチコステロン分泌反応について拘束ストレスでは、血中コルチコステロン濃度はストレス負荷後 1 時間で最高値に達し、その後高値のまま推移した。このような血中コルチコステロンの時間的推移は Tanaka ら²¹⁾の成績と一致している。寒冷ストレスでは、血中コルチコステロン濃度は拘束ストレスと同じくストレス負荷開始 1 時間後に上昇したが、その後低下傾向をたどるという反応パターンを示した (表 1)。この反応パターンは対照群のそれとほぼ一致していた。寒冷暴露と血中コルチコステロン濃度の変化については、Takeuchi ら²⁷⁾と Jobin ら²⁸⁾の報告がある。彼らの報告によると、寒冷暴露開始後短時間に血中コルチコステロン濃度の有意な上昇がみられ、その後低下傾向を示すが、寒冷暴露開始 3 時間後にも有意に高値を示していたという。寒冷暴露後の早い時間に一過性に上昇し、その後低下傾向を示すという Takeuchi ら²⁷⁾および Jobin ら²⁸⁾の成績は、今回の実験結果とほぼ一致し

Table 6. Effects of immobilization stress and cold exposure on levels of substance P-like immunoreactivity in 4 discrete regions of the rat brain.

	Substance P-Like Immunoreactivity(SP-LI) (ng/mg protein)		
	control	Immobilization	cold Exposure
Frontal Cortex	0.66±0.07	0.43±0.01**	0.43±0.04*
N. Accumbens	4.70±0.49	2.66±0.52*	4.39±0.75
Caudate-Putamen	7.13±0.74	9.37±1.30	8.00±0.57
Hypothalamus	7.94±1.65	6.62±1.16	8.88±1.11

Each value represents the mean±standard error obtained from 5 rats. Statistical comparisons between control and immobilization or cold exposure group were based on Pitman's permutation test (two-tailed). *, $p<0.05$; **, $p<0.01$.

ているが、今回の実験結果と異なるのは、彼ら²⁷⁾²⁸⁾の実験ではいずれの時点でも有意な上昇がみられていることである。その理由として、寒冷暴露の温度条件や採血方法の違いが挙げられる。すなわち、Takeuchiら²⁷⁾は同一のラットで留置したカテーテルから採血しているが、2°Cで寒冷暴露を行っており、Jobinら²⁸⁾は5°Cの寒冷暴露ではあるが、断頭採血を行っている。なお、ストレス負荷におけるコルチコステロン分泌反応の機序に関する考察は後の項で行う。

ストレス負荷によって胃潰瘍の出現をみるのは、良く知られた事実である。今回の実験でも、拘束・寒冷のいずれのストレス負荷によっても全例で胃潰瘍の発生をみた。しかし、潰瘍の数や重症度を考慮して作成された ulcer index¹⁹⁾による評価では、両ストレスの間で違いは認められていない。最近、Glavinらは仰臥位での拘束と金網による拘束をラットに施し、胃潰瘍の発現頻度と血中コルチコステロン濃度の測定を行っている。その結果、より強い拘束と考えられている仰臥位拘束で胃潰瘍の発現頻度と血中コルチコステロン濃度の上昇率がともに高かったという。また、田中ら²⁹⁾によると拘束時間が長くなるに従い、胃粘膜損傷を生ずるラットの数が増えるという。これらの知見は、負荷するストレスの強度が胃潰瘍の発現率や血中コルチコステロンの上昇率に反映されることを示している。ところが、今回の実験では、拘束ストレスと寒冷ストレスの間で胃潰瘍の数が重症度に違いがないにもかかわらず、両ストレスに対するコルチコステロンの分泌反応に大幅な差異が認められている。この実験結果は、胃潰瘍の発現に関与する生体の反応系では、視床下部-下垂体-副腎皮質系に比べてストレスに対する閾値が

低く、しかも前者の反応が悉無律に従った反応を示すことを示唆しているといえるが、むしろ自律神経系と内分泌系がストレスの違いによってそれぞれ異なった反応を示すと考えると理解しやすい。すなわち、負荷されるストレスの種類や強度によって自律神経-内分泌系に反映される中枢神経系での情報処理が異なるのではないかと想定できる。この推論は、次の項で考察する拘束ストレスと寒冷ストレスに対する脳内DA系と5-HT系の反応あるいは脳内SP-LIの変動の違いからも支持される。

II. ストレス負荷と脳内ドーパミン (DA)

拘束ストレス負荷により、前頭葉皮質と側坐核におけるHVA含有量は低下し、また側坐核と線条体ではDAの代謝回転が低下していた(表2)。前頭葉皮質または側坐核・嗅結節に神経線維を送るDA細胞群は腹側被蓋野(ventral tegmental area, VTA)に位置し、前者は中脳-皮質路、後者は中脳-辺縁路と呼ばれ、情動との関連で注目されている経路である。また、線条体に投射するDA経路は黒質-線条体路と呼ばれ、その神経線維は黒質緻密体に存在するDA細胞群より発している³⁰⁾³¹⁾。Watanabe⁹⁾はラットに拘束ストレスを負荷すると、中脳-辺縁DA系が特異的に賦活されることを示唆した。また、Saavedra³²⁾は拘束ストレス負荷により中隔野諸核で(septic nuclei)でDA含有量が増加すると報告している。これらの知見は、拘束ストレスがDAニューロンを介して辺縁系に何らかの影響を及ぼす可能性を示唆している。今回の実験においても、拘束ストレス負荷の際に中脳-辺縁DA経路の神経終末がある側坐核でHVAは検出限界以下と著しく低下していただけでなく、前頭葉皮質でも

HVA 含有量の低下が認められた。さらに、明らかな DA 代謝回転の低下が線条体でみられた (表 2)。このことは、拘束ストレスの影響が中脳-辺縁 DA 系にとどまらず、中脳-皮質 DA 系や黒質-線条体 DA 系にも及ぶことを示唆しており、また今回の実験で用いた 3 時間の拘束ストレス負荷で従来の報告⁹⁾と異なり拘束ストレスが中脳-辺縁 DA 系や中脳-皮質 DA 系さらに黒質-線条体 DA 系に対してむしろ抑制的に働くことを示している。

ところで、脳内に DA または agonist である apomorphine を投与すると、体温が低下する¹⁰⁾¹¹⁾³³⁾が、その作用部位は視床下部視索前野と推測されている¹⁰⁾¹¹⁾。今回の実験では、視床下部 DA 含有量は寒冷ストレス負荷によって低下していたが、HVA/DA 比で調べた DA 代謝回転に有意な変化はみられなかった (表 3)。寒冷暴露中に生ずる体温低下に対しては、5-HT が関与する体熱産成機構が体温を維持するために働くことが知られている³⁴⁾が、今回の実験でも寒冷暴露中に視床下部 5-HT 代謝回転の亢進が認められ、また体温もほぼ一定に維持されていた。したがって明瞭な DA 代謝回転の変化がみられなかったのではないかと考えられる。一方、寒冷暴露によって線条体の HVA 含有量は増加し、また側坐核、線条体での DA 代謝回転は有意差はなかったが亢進する傾向にあった。この成績は、寒冷ストレスが中脳-辺縁 DA 系や黒質-線条体 DA 系に対して拘束ストレスとは反対の方向へ働くことを示唆している。

拘束ストレスと寒冷ストレスを比較すると、拘束ストレス負荷では側坐核の DA 代謝回転は低下していたが、寒冷ストレス負荷ではむしろ DA 代謝回転の上昇傾向が認められた。同様の現象は線条体においてもみられている。このことは、拘束ストレスと寒冷ストレスが中脳-辺縁 DA 系および黒質-線条体 DA 系に対して互いに反対の方向に働くことを示唆しているだけでなく、脳内 DA 系が負荷するストレスによって異なった反応を示すことを物語っている。

ところで、拘束ストレスは情動が大きく関与したストレスと考えられている¹⁾。したがって、拘束ストレスでみられた中脳-辺縁 DA 系の動きは情動と結びついた変化と考えることができる。ところが、今回の拘束実験では DA 系代謝回転の低下がみとめられたに過ぎない。ラットに拘束ストレスを負荷した際、観察される最も激しい身体の動きは、ストレス負荷の早い時期にみられ、この時期に不安、怯えなどの情動面での変化が大きいと言われている¹⁾³⁵⁾。Ushijima ら³⁶⁾は、ラットに GABA および diazepam を皮下投与することで、それらの動きが抑制されたと報告している。

Diazepam は foot shock stress による前頭葉皮質と側坐核での DA の代謝回転の亢進を抑制することが既に報告されており³⁷⁾、今回の実験でみられた 3 時間拘束ストレス負荷後の前頭葉皮質と側坐核での DA 代謝回転の低下に、GABA ニューロンが関与していた可能性がある。いずれにしても、中脳-辺縁 DA 系の動きと情動変化との結びつきは、ストレス負荷後の時間経過を追って中脳-辺縁 DA 系の代謝回転の変化を調べることによってより明確になると考えられる。

III. ストレス負荷と脳内セロトニン (5-HT)

ラットに拘束ストレスを負荷すると、5-HT の前駆物質であるトリプトファンが増加することから、5-HT 代謝回転の亢進が推測されていたが³⁸⁾³⁹⁾、その後 Morgan ら⁴⁰⁾は、probenecid で前処置したラットを用いて脳内各部位での 5-HIAA を測定し、拘束ストレスによって 5-HT 代謝回転が高まるとの結果を得ている。Tanaka ら⁴¹⁾は、同様の方法で 5-HT 代謝回転を調べ、皮質、海馬、視床下部を含めた広範な部位において拘束ストレス中の 5-HT 代謝回転の亢進を報告している。しかし、彼らはこのような 5-HT 代謝回転の亢進はストレス負荷開始後 30~60 分の早い時期に観察されると述べている。ところが、今回の実験では、先に引用した諸家^{38)~41)}の成績と異なり、拘束ストレス負荷中に前頭葉皮質の 5-HT 含有量の増加および側坐核での 5-HT 含有量の低下がみられたのみで、代謝産物の 5-HT 含有量や 5-HIAA/5-HT 比は測定したどの部位でも対照群との間に有意差は認められなかった (表 4)。特に、拘束ストレス負荷開始後 3 時間で 5-HT 代謝回転の指標としている 5-HIAA/5-HT 比に差異がみられなかったのは、5-HT の代謝回転が拘束ストレスの早い時期に亢進するという Tanaka ら⁴¹⁾の報告を考慮すると良く理解できる。しかし、拘束ストレス負荷開始後 3 時間においても前頭葉皮質や側坐核での 5-HT 含有量に対照群との間に差異が認められていたことは、拘束ストレスに対する脳内 5-HT 系の反応性が部位によって異なることを示唆しており、注目される所見である。

5-HT 視床下部視索前野に投与すると、体温上昇がみられることは既に述べた通りである³¹⁾³²⁾。また、DA による体温低下は 5-HT 受容体の antagonist である LSD によって阻止されるとの報告もある⁴²⁾⁴³⁾。これらの事実は、5-HT が視床下部のサーモスタット機能⁹⁾と深いかわりを持つことを示している。今回の寒冷負荷実験では、5-HT や 5-HIAA 含有量に変化は認められなかったが、5-HT 代謝回転の亢進を示唆する 5-HIAA/5-HT 比が寒冷ストレス負荷によって視床下部で上昇した。この結果は寒冷暴露による体温調節を

阻止しようとして作用する体温調節機構と密接に関連した変化として理解できる。ところが、5-HT 代謝回転の亢進は視床下部にとどまらず、前頭葉皮質、側坐核でも観察され、さらに線条体でも亢進傾向がみられていた。視床下部以外の部位での 5-HT 代謝回転の亢進あるいは亢進傾向 (表 5) は、きわめて注目すべき所見と考えられるが、それを体温調節機構と直接関係づけることは困難と考えられる。しかし、それが何に起因するかは現時点では言及できない。

拘束ストレスと寒冷ストレスの比較について、拘束ストレスでは前頭葉皮質の 5-HT 含有量の上昇と側坐核の 5-HT 含有量の低下および前頭葉皮質の 5-HT 代謝回転の亢進傾向がみられたに過ぎない (表 4)。一方、寒冷ストレスでは前頭葉皮質における 5-HIAA 含有量の上昇がみられ、5-HT 代謝回転は検討した 4 部位で亢進あるいは亢進傾向を示した (表 5)。

今回の拘束ストレス負荷実験で得られた成績と、拘束ストレスによる脳の広範な部位の 5-HT 代謝回転の亢進はストレス負荷後の早い時期に観察されたという Tanaka ら⁴¹⁾の報告を考え合せると、拘束ストレスと寒冷ストレスとの間で認められた違いは、それぞれのストレス負荷による脳の各部位における 5-HT 代謝回転の亢進発現時期や持続時間が異なっていることを示唆している。言い換えれば、拘束ストレスと寒冷ストレス負荷による脳内 5-HT 系の反応性の違いが、負荷したストレスの強弱によるのではなく、異なった機序によって発現すると考えることができる。この推論は拘束ストレスと寒冷ストレス負荷に際してみられたコルチコステロンの分泌反応や脳内 DA 系の反応の違いからも支持される。

ところで、5-HT およびその前駆物質である 5-hydroxytryptophan は、corticotropin-releasing factor (CRF), adrenocorticotropin hormone (ACTH) の放出を高め、血中コルチコステロン濃度を上昇させると言われている^{40)~46)}。今回の実験では、3 時間の拘束ストレス負荷の全経過を通じて血中コルチコステロン濃度は高値で推移していた。Tanaka ら⁴¹⁾の成績から脳内 5-HT 系がストレス負荷後の早い時期にみられる血中コルチコステロン値の上昇に関与していたと想定することは可能である。しかし、ストレス負荷開始後 3 時間で測定した視床下部 5-HT、5-HIAA 含有量および 5-HT 代謝回転には変化が認められなかった。したがって視床下部 5-HT 系がストレス負荷開始後 3 時間で観察された血中コルチコステロン濃度の高値の発現に関与していたとは考え難い。

下垂体からの ACTH の放出が種々のホルモンによってコントロールされていることは周知の通りであ

る (multihormonal control)。ストレス負荷の際にみられる血清 ACTH 値の上昇は、視床下部の CRF 放出増加によって引き起こされると考えられていたが、血中カテコールアミンが関与していることも明らかにされている⁴⁶⁾。ごく最近 Moldow ら⁴⁷⁾は、ラットに拘束ストレスを 2 時間負荷して視床下部 CRF-like immunoreactivity (CRF-LI)、血清 ACTH およびコルチコステロンを測定し、ストレス負荷時にみられる血清 ACTH とコルチコステロンの上昇が視床下部 CRF-LI の放出・産生によることを明らかにした。ところが、多くの内分泌系では、標的臓器が当該ホルモンに慢性暴露されるとその受容体の感受性が低下し、ホルモン刺激に対する反応性が時間経過とともに減弱することが知られている (desensitization あるいは down-regulation)。したがって長時間のストレス負荷の際にも CRF 受容体やアドレナリン受容体の感受性が減弱し、下垂体からの ACTH 放出が低下することは想像に難くない。最近、in vitro の実験でこのような down-regulation が β -アドレナリン受容体を介する ACTH の放出機構で生ずると報告されている。また、同じような実験系で下垂体 CRF 受容体も CRF 濃度や暴露時間依存性に down-regulation を受けることを示唆する成績が報告されている。さらにごく最近、CRF 受容体が down-regulation を受けた際には視床下部灰白隆起に存在する cholecystokinin octapeptide (CCK-8) あるいはパソプレッシンが代謝的に直接下垂体に働いて ACTH の放出を促す可能性のあることも指摘されている。したがって、3 時間という比較的長時間の拘束ストレス負荷のみでみられた一元的説明が困難な血中コルチコステロンの高値の発現機序についてはこのような最新の知見を取り入れると、説明が容易になるが、それより確かなものにするには、上述した知見を踏まえた in vivo での検討が必要である。

寒冷ストレス負荷時の血中コルチコステロンの推移は、変動幅に違いがみられているものの、対照群のそれとほぼ一致していた (表 1)。この結果は、視床下部-下垂体-副腎皮質系が 4°C、3 時間という今回の寒冷暴露そのものによって、ほとんど影響されなかったことを示唆している。ところが、第 1 回の血中コルチコステロン濃度は、拘束ストレス群で対照群に比べて高値を示していただけではなく、いずれの群でもコルチコステロン分泌の概日リズムの検討のためにほぼ同時刻に採血して測定した値²²⁾より高くなっており、またその後の測定値も高値で推移していた。このことから、今回の実験操作がストレスとして働き、それが血中コルチコステロンの高値として反映されていた可能性も否定できない。しかし、視床下部で 5-HT 代謝

回転が対照群に比べて亢進していたことを考えると、実験操作のために寒冷暴露に対する視床下部-下垂体-副腎皮質系の反応が隠蔽されていたとは考え難い。なお、この寒冷暴露3時間後における視床下部5-HT代謝回転の亢進と血中コルチコステロン濃度の低下傾向の関係については、先に述べた複雑なACTH分泌機序を考慮しても、なお説明は困難である。

ところで、拘束ストレスの対照群と寒冷ストレスの対照群のDA、5-HTおよびそれぞれの代謝物の測定値、さらに代謝回転の指標としたHVA/DAおよび5-HIAA/5-HTの値が部位によって異なっていた。このような差異は、両ストレス実験の実施時期が初冬と夏といったように全く異なっていたことに起因する可能性が大きいと考えられる。しかし、現在までのところ脳内モノアミン代謝の季節変動を詳細に検討した報告はない、したがって、両ストレス実験間で認められた対照群の測定値の違いを、立入って論ずることは困難であるが、きわめて興味ある所見といえる。

IV. ストレス負荷と脳内サブスタンスP様免疫活性(SP-LI)

Gel chromatographyの結果では前頭葉皮質から抽出したSP-LIの100%が合成SPのピークに一致していた(図3)。このことは、測定した全てのSP-LIがSPであったことを示している。線条体および視床下部から抽出したSP-LIの稀釈曲線は、合成SPの標準曲線と平行関係にあった(図2)。したがって、本研究で用いたEIA法で測定したSP-LIは組織中のSPを反映しているといえる。

今回測定したSP-LIは、拘束ストレス負荷開始後3時間の前頭葉皮質と側坐核で低下していた。一方、寒冷ストレス負荷では、前頭葉皮質でのSP-LIの低下がみられたにすぎない。ところが興味あることに、両ストレス負荷で認められた前頭葉皮質のSP-LIの低下は全く同程度であった(表6)。このことから、前頭葉皮質のSP-LIの低下は、ストレスの種類や強度の如何を問わず共通してみられる変化であり、他方、側坐核でのSP-LIの低下は、情動変化を伴うストレスに特徴的な変化とも考えられる。Lisoprawskiら⁵¹⁾は、情動との関連で注目されているVTAでのSP-LIがfoot shock stressによって低下したと報告している。彼らの成績は、間接的ではあるが上述した推論を支持するものといえる。しかし、このように結論するにはさらに多くの異なったストレスと脳内各部位のSP-LIとの関係について検討をすすめる必要がある。

ところで、Lisoprawskiら⁵¹⁾はfoot shock stressによって中脳-皮質DA系が賦活されることから、foot shock stress時に認められたSP-LIの低下は、SP-LI

の放出亢進によって起こるのではないかと想定している。また、Kalivasら⁵²⁾は、SPを側坐核に注入すると、30分後に同部位でのDA代謝回転が亢進することを見出している。彼らの報告を踏まえると、拘束・寒冷ストレス負荷時の前頭葉皮質SP-LIは低下し、さらに拘束ストレスでは側坐核のSP-LIも低下していたにもかかわらず、これらの部位でのDA代謝回転に変化が認められていないか、あるいはむしろ低下していた、という今回の実験結果(表6)は、3時間という比較的長時間のストレス負荷ではSP-LIの生合成が抑制されることを示唆しているといえる。しかし、このように推論するには、ストレス負荷後のDA代謝回転、SP-LI、ストレスと脳内ペプチドに関する研究は未だ端緒についたばかりである。したがって、今後これらの関係についての知見が集積されれば、ストレスによる生体反応の理解がより一層深まると考えられる。

V. まとめ

今回の実験で得られた成績から、以下の考察を行った。体温が寒冷ストレス負荷にもかかわらずほぼ一定の値に推移するのは、体温維持のため視床下部のサーモスタット機能が働いたためと推測された。負荷したストレスに対するコルチコステロン分泌反応の違いと全例での胃潰瘍の発生は、両ストレス負荷時における体温の推移を考慮すると、自律神経系、内分泌系がストレスの違いによってそれぞれ異なった反応を示すことを示唆している。さらに、脳内DA系に対して3時間の拘束ストレスは抑制的に、3時間の寒冷ストレスは賦活的に、お互いに反対の方向へ作用する事が示された。また、脳内各部位の5-HT系に対しても、拘束ストレスと寒冷ストレスの影響の発現時期や持続時間がストレスによって異なっていると考えられた。SP-LIの成績では、側坐核SP-LI含有量の低下は情動変化を伴うストレスに特徴的な変化であり、前頭葉皮質でのSP-LIの低下はストレスの種類や強度に関係なく、共通してみられる変化であると考えられた。また、上述したこれらの両部位でのDA代謝回転に関する成績から、長時間のストレス負荷によってSP-LIが抑制されているのではないかと推測された。

結 論

負荷するストレスの種類や強度の違いによって生体がどのような反応をするかを明らかにすることは、ストレスに対する生体の反応を理解するうえできわめて重要である。そこで、3時間の拘束ストレスと4℃、3時間の寒冷暴露をラットに負荷し、ストレス負荷時の体温と血中コルチコステロン濃度の推移、3時間後の胃潰瘍の発生の有無を調べ、さらに脳内各部位のDA

と5-HTおよびそれぞれの代謝物HVAと5-HIAA含有量, 脳内各部位のサブスタンスP様免疫活性(SP-LI)含有量を測定し, これら二つのストレス間での差異の有無を検討し以下の結論を得た。

1) 実験開始直前の体温を基準値としてその後の測定値を比較すると, 拘束ストレス群の体温は, その機序は明らかではないが時間経過とともに低下し, 拘束ストレス負荷開始3時間後には約4.4°Cの低下がみられた。他方, 対照群と寒冷ストレス群の体温は大幅な変動を示さず推移した。

2) 拘束ストレス群の血中コルチコステロン濃度はストレス負荷開始1時間後に著しく上昇し, ストレス負荷が終了した3時間後まで高値のまま推移した。他方, 対照群と寒冷ストレス群の血中コルチコステロン濃度は, ともに実験開始1時間後に上昇したものの前値との間に有意差はなく, その後低下傾向を示した。胃潰瘍は, 寒冷・拘束ストレス群の全例に出現し, しかも発現部位, 大きさ, 重症度は両ストレス間で差異はなかった。

3) 拘束ストレス負荷では, 対照群と比べて前頭葉皮質, 側坐核のHVA含有量の低下と側坐核, 線条体でのDA代謝回転の低下がみられた。他方, 寒冷ストレス群では, 対照群と比べて線条体HVA含有量は増加し, 側坐核, 線条体のDA代謝回転は亢進傾向を示した。

4) 拘束ストレス負荷では対照群と比べて前頭葉皮質5-HT含有量の上昇, 側坐核5-HT含有量の低下がみられたに過ぎないが, 寒冷ストレス群では, 対照群と比べて前頭葉皮質5-HIAA含有量が増加し, また5-HT代謝回転は前頭葉皮質, 側坐核, 線条体, 視床下部では亢進あるいは亢進傾向を示した。

5) 対照群と比べて, 拘束ストレス負荷では前頭葉皮質と側坐核で, 他方, 寒冷ストレスでは前頭葉皮質でSP-LIは低下していた。しかも, 両ストレス負荷で認められた前頭葉皮質SP-LIの低下は全く同程度であった。

以上の成績から負荷するストレスの種類, 強度, 負荷時間の違いによって自律神経-内分泌系を介する生体反応が異なること, そしてこの違いはストレスが, 生体反応として反映される際に中心的な役割を果たす中枢神経系における処理過程の差異によると推測された。

謝 辞

稿を終えるにあたり, 直接御指導, 御校閲戴いた恩師岡田晃教授並びに諸治隆嗣博士(東京都精神医学総合研究所精神薬理研究室)に心からお礼申し上げます。また, コルチコ

ステロンを測定していただいた北大医学部生理学教室本間研一助教授並びにモノアミン測定に協力いただいた高松幸雄氏(東京都精神医学総合研究所精神薬理研究室)にお礼申し上げます。

文 献

- 1) 田中正敏, 井田能生, 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).
- 2) Tanaka, M., Kohno, Y., Nakagawa, R., Ida, Y., Takeda, S., & Nagasaki, N.: Time-related differences in noradrenaline turnover in rat brain. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **16**, 315-319 (1982).
- 3) Glavin, G. B., Tanaka, M., Tsuda, A., Kohno, Y., Hoaki, Y., & Nagasaki, N.: Regional rat brain noradrenaline turnover in response to restraint stress. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **19**, 287-290 (1983).
- 4) Tanaka, M., Kohno, Y., Nakagawa, R., Ida, Y., Takeda, S., Nagasaki, N., & Noda, Y.: Regional characteristics of stress-induced increase in brain noradrenaline release in rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **19**, 543-547 (1983).
- 5) Tanaka, M., Kohno, Y., Nakagawa, R., Nishikawa, T., Tsuda, A., & Nagasaki, N.: Immobilization stress increase serotonin turnover in the extended brain region in the rat. *Kurume Med. J.*, **30**, 35-43 (1983).
- 6) Watanabe, H.: Activation of dopamine synthesis in mesolimbic dopamine neurons by immobilization stress in the rat. *Neuropharmacology*, **23**, 1335-1338 (1984).
- 7) Thierry, A. M., Tassin, J. P., Blanc, G., & Glowinski, J.: Selective activation of the mesocortical DA system by stress. *Nature*, **263**, 242-244 (1976).
- 8) Myers, R. D.: Impairment of thermoregulation, food and water intakes in the rat after hypothalamic injections of 5, 6-dihydroxytryptamine. *Brain Res.*, **94**, 491-506 (1975).
- 9) Myers, R. D.: Serotonin and thermoregulation: old and new views. *J. Physiol.*, **77**, 505-513 (1980).
- 10) Ruwe, W. D. & Myers, R. D.: Dopamine in the hypothalamus of the cat: pharmacological characterization and push-pull perfusion analysis of sites mediating hypothermia. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **9**, 65-80 (1978).
- 11) Cox, B. & Lee, T. F.: Do central dopamine

- receptors have a physiological role in thermo-regulation? *Br. J. Pharmacol.*, **61**, 83-86 (1977).
- 12) **Yamawaki, S., Lai, H., & Horita, A.**: Dopaminergic and serotonergic mechanisms of thermoregulation: mediation of thermal effects of apomorphine and dopamine. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, **227**, 383-388 (1983).
- 13) **伊藤正男, 大塚正徳, 小幡邦彦, 松尾 裕**: 脳の統御機能 5 活性物質と神経回路網. 医歯薬出版株式会社, 東京, 1980.
- 14) **Kelley, A. E., & Iversen, S. D.**: Increased spontaneous activity following substance P infusion into A-10 dopaminergic area. *Nature*, **276**, 616-617 (1978).
- 15) **Michelot, R., Leviel, V., Giorguief-chesselet, M. F., Cheramy, A., & Glowinski, J.**: Effect of the unilateral nigral modulation of substance P transmission on the activity of the two nigro-striatal dopaminergic pathway. *Life Science*, **24**, 715-724 (1979).
- 16) **Raisin, T., Soubrie, P., Artaud, F., & Glowinski, J.**: Application of L-glutamic acid and substance P to the substantia nigra modulates in vivo [H^3] serotonin release in the basal ganglia of the cat. *Brain Res.*, **236**, 317-327 (1982).
- 17) **Bjorkund, A. J., Emson, P. C., Gilbert, R. F. T., & Skagerberg, G.**: Further evidence for the possible coexistence of 5-hydroxytryptamine and substance P in medullary raphe neurons of rat brain. *Br. J. Pharmacol.*, **66**, 112-113 (1979).
- 18) **Butterfield, W. C., & Rasche, R.**: An improved inexpensive method of restraint for the formation of stress ulcers in the rat. *Rev. Surg.*, **32**, 75-76 (1975).
- 19) **Bhargava, K. P., Daas, M., Gupta, G. P., & Gupta, M. B.**: Study of central neurotransmitters in stress-induced gastric ulceration in albino rats. *J. Pharmacol.*, **68**, 765-772 (1980).
- 20) **Marley, P. D., Rehfeld, J. F., & Emson, P. C.**: Distribution and chromatographic characterization of gastrin and cholecystokinin in the rat central nervous system. *J. Neurochem.*, **42**, 1523-1543 (1984).
- 21) **Arai, H., Moroji, T., Kosaka, K., & Iizuka, R.**: Extrahypophysial distribution of α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH)-like immunoreactivity in postmortem brains from normal subjects and Alzheimer-type dementia patient. *Brain Res.*, **377**, 305-310 (1986).
- 22) **Honma, S., Honma, K., Shirakawa, T., & Hiroshige, T.**: Effects of elimination of maternal circadian rhythms during pregnancy on the postnatal development of circadian corticosterone rhythm in blinded infantile rats. *Endocrinology*, **114**, 44-50 (1983).
- 23) **Murphy, B. E. P.**: Some studies of the protein-binding of steroids and their application to the routine micro and ultramicro measurement of various steroids in body fluids by competitive protein-binding radioassay. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **27**, 973-990 (1967).
- 24) **Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J.**: Protein measurements with phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951).
- 25) **鈴木義一郎**: 例解統計入門. 実教理工学全書, 実教出版株式会社, 東京, 1975.
- 26) **Tanaka, M., Nishikawa, T., Kohno, Y., Nagasaki, N., Noda, Y., & Inanaga, K.**: Hypothermic and gastric lesion in rat exposed to immobilization stress. *Kurume Med. T.*, **28**, 247-253 (1981).
- 27) **Takeuchi, A., Kajiwara, A. & Suzuki, M.**: Effect of acute exposure to cold on the levels of corticosterone and pituitary hormones in plasma collected from free conscious cannulated rats. *Endocrinol. Japon.*, **24**, 109-114 (1977).
- 28) **Jobin, M. L. F., Cote, J. & Labrie, F.**: Effect of exposure to cold on hypothalamic TRH activity and plasma level of TSH and prolactin in the rat. *Neuroendocrinol.*, **18**, 204-212 (1975).
- 29) **田中正敏, 河野康子, 中川良一, 津田 彰, 井田能生, 帆秋善生, 飯盛健一郎, 長崎信行**: ストレスと神経伝達物質-noradrenaline を中心にして. *医学のあゆみ*, **125**, 369-379 (1983).
- 30) **福田正人, 斉藤 治**: 中脳皮質 DA 系と精神分裂病—第 1 回—. *精神医学*, **27**, 1104-1112 (1985).
- 31) **Bannon, M. J., & Roth, R. H.**: Pharmacology of mesocortical dopamine neurons. *Pharmacol. Rev.*, **35**, 53-68 (1983).
- 32) **Saavedra, J. M.**: Changes in dopamine, noradrenaline and adrenaline in specific septal and preoptic nuclei after acute immobilization stress. *Neuroendocrinology*, **35**, 396-401 (1982).
- 33) **Cox, B., Ennis, C., & Lee, T. F.**: The func-

- tion of dopamine receptors in the central thermoregulatory pathways of the rat. *Neuropharmacology*, **20**, 1047-1051 (1981).
- 34) **Myers, R. D., & Beleslin, D. B.** : Changes in serotonin release in hypothalamus during cooling or warming of the monkey. *Am. J. Physiol.*, **220**, 1746-1754 (1971).
- 35) **Tanaka, M., Kohno, Y., Tsuda, A., Nakagawa, R., Ida, Y., Iimori, K., Hoaki, Y., & Nagasaki, N.** : Differential effects of morphine on noradrenaline release in brain regions of stressed and nonstressed rats. *Brain Res.*, **275**, 105-115 (1983).
- 36) **Ushijima, I., Mizuki, Y., Hara, T., Kudo, R., Watanabe, K., & Yamada, M.** : The role of adenosinergic, GABAergic and benzodiazepine systems in hyperemotionality and ulcer formation in stressed rats. *Psychopharmacology*, **89**, 472-476 (1986).
- 37) **Feeda, Argioras, A., Melis, M. R., Tissari, A. H., Onali, P. L., & Gessa, G. L.** : Stress-induced increase in 3, 4-hydroxyphenylacetic acid (DOPAC) level in the cerebral cortex and in N. accumbens: reversal by diazepam. *Life Science*, **23**, 2219-2224 (1978).
- 38) **Curzon, G., Joseph, M. H., & Knott, P. J.** : Effect of immobilization and food deprivation on rat brain tryptophan metabolism. *J. Neurochem.*, **19**, 1967-1974 (1972).
- 39) **Kannett, G. A., & Joseph, M. H.** : The functional importance of increased brain tryptophan in the serotonergic response to restraint stress. *Neuropharmacology*, **20**, 39-43 (1981).
- 40) **Morgan, W. W., Rudden, P. K., & Pfeil, K. A.** : Effect of immobilization stress on serotonin content and turnover in regions of the rat. *Life Science*, **17**, 143-150 (1975).
- 41) **Tanaka, M., Kohno, Y., Nakagawa, R., Nishikawa, T., Tsuda, A., & Nagasaki, N.** : Immobilization stress increases serotonin turnover in the extended brain regions in the rat. *Kurume Med. J.*, **30**, 35-43 (1983).
- 42) **Grabowska, M., Michaluc, J., & Antkiewicz, L.** : Possible involvement of brain serotonin in apomorphine-induced hypothermia. *Eur. J. Pharmacol.*, **23**, 82-89 (1972).
- 43) **Menon, M. K., & Vivina, C. A.** : Modification of apomorphine hypothermia by drugs affecting brain 5-hydroxytryptamine function. *Eur. J. Pharmacol.*, 223-227 (1981).
- 44) **Steiner, J. A., & Grahame-Smith.** : Central pharmacological control of corticosterone secretion in the intact rat. Demonstration of cholinergic and serotonergic facilitatory and α -adrenergic inhibitory mechanisms. *Psychopharmacology*, **71**, 213-217 (1980).
- 45) **Kruger, T. D.** : Serotonin regulation of ACTH secretion. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **297**, 527-535 (1977).
- 46) **Jones, M. T., & Hillhouse, E. W.** : Neurotransmitter regulation of corticotropin-releasing factor in vitro. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **297**, 536-560 (1977).
- 47) **Moldow, R. L., Kastin, A. J., Graf, G., & Fischman.** : stress mediated change in hypothalamic corticotropin releasing factor-like immunoreactivity. *Life Science*, **40**, 413-418 (1987).
- 48) **Heisler, S., Reisine, T., & Axelrod, J.** : Desensitization of beta -adrenergic receptors and adrenocorticotropin release. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **111**, 112-119 (1983).
- 49) **Reisine, T., & Hoffman, A.** : Desensitization of corticotropin-releasing factor receptors. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **111**, 919-925 (1983).
- 50) **Mezey, E., Reisine, T. D., Skirboll, L., Beinfeld, M., & Kiss, J. Z.** : Role of cholecystokinin in corticotropin release: Coexistence with vasopressin and corticotropin-releasing factors in cell of the rat hypothalamic paraventricular nucleus. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **83**, 3510-3512 (1986).
- 51) **Lisoprawski, A., Blanc, G., & Glowinski, J.** : Activation by stress of the habenulo-interpeduncular substance P neurons in the rat. *Neurosci. Lett.*, **25**, 47-51 (1981).
- 52) **Kalivas, P. W., & Miller, J. S.** : Substance P modulation of dopamine in nucleus accumbens. *Neurosci. Lett.*, **48**, 55-59 (1984).

Effect of Immobilization Stress and Cold Exposure on Functions of the Autonomic Nervous System, the Endocrine System and Neurotransmitters in the Rat Brain
Koichi Tsunashima, Department of Public Health, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med. Soc., 96, 520—536 (1987)

Key words: immobilization stress, cold exposure, autonomic nervous system, endocrine system, neurotransmitters

Abstract

In order to clarify the responses of organisms to stress, it would be of interest to investigate whether responses of the autonomic nervous system, the endocrine system and neurochemical processes which may mediate these responses are stresser-specific. In the present study, responses of the autonomic system, the endocrine system and changes in levels of neurotransmitters in the brain were investigated in rats subjected to immobilization (3hr at room temperature) and cold exposure (3hr at 4°C). The core temperature of immobilized rats decreased in course of time and decreased by 4.4°C, as compared to the control value after 3hr immobilization. In contrast, there was no remarkable change in the core temperature of both control rats and those subjected to cold. The serum corticosterone levels increased within 1hr immobilization and were still elevated after immobilization of 3hrs. The serum corticosterone levels of both the cold exposure group and the control group also increased within 1hr, but decreased there after. Gastric ulcers occurred in all rats subjected to immobilization and cold. Both the number and severity of ulcers did not differ between immobilization and cold exposure. These findings suggest that the responses to immobilization may be different from those to cold exposure. Immobilization caused a decrease in homovanillic acid (HVA) levels in the frontal cortex (FC) and the nucleus accumbens (NS). Dopamine (DA) turnover in the striatum decreased significantly. Cold exposure increased HVA level in the striatum. DA turnover tended to increase in both NA and striatum. Consequently, the author postulates that immobilization has an inhibitory effect on dopaminergic systems, while cold exposure activates these systems. Immobilization caused an increase in 5-hydroxytryptamine (5-HT) level in the FC and a depletion in 5-HT level in the NA. No significant changes in levels of 5-HT and 5-hydroxyindole-3-acetic acid were observed in all regions after 3hr cold exposure. Cold exposure significantly increased 5-HIAA/5-HT ratio (5-HT turnover) in the 3-regions except the striatum, in which 5-HT turnover also increased, but not significantly. Thus, it seems likely that cold exposure has a long-lasting activating effect on 5-HT system. Substance P-like immunoreactivity (SP-LI) in the FC was reduced in the rats subjected to immobilization and cold in approximately same degree. A significant reduction in SP-LI was also observed in the NS of immobilized rats. These findings suggest that SP-LI reduction in the NS is associated with stress-induced emotional changes, while a reduction in frontal SP-LI is common to most stress.