

# Brain Mapping Analyzer による肉体的及び 心理的ストレス下での神経化学的变化の解析

人間総合高等教育研究支援室 秋山佳代、須藤伝悦

私共が開発したBrain Mapping Analyzer<sup>5, 15)</sup>は、国内外の大学等で新たな分析装置として様々な研究に使用されている。昨年は、この方法の原理や特徴と、本装置を用いて行った人脳の機能分布解析<sup>11, 16-18)</sup>、てんかん発作の発症機序解明<sup>9)</sup>、さらに肉体疲労の解析に関する研究<sup>12)</sup>と、それを基にした新薬の開発<sup>2)</sup>に関して報告した。今回は、モデル動物を用いて行った肉体的ストレス<sup>7, 19)</sup>と心理的ストレス<sup>19)</sup>下での神経化学的な変化に関する分析例について報告する。

近年の急激な社会環境の変化は、人々に多大な肉体的そして心理的ストレスを与え、疲労と不安を蔓延させ、引いては鬱病患者や自殺者、アルコールや麻薬依存症患者などを増加させている。これらは、現代人が避けて通れない問題の一つである。私共は先に、行動学的方法、生化学的方法及び薬理学的方法を用いて、カルシウムがカルモジュリン依存系を介して脳内ドーパミン(古典的な神経伝達物質、カテコラミンの一つ)の合成を賦活化し、様々な中枢機能を調節していることを他に先駆けて明らかにしてきた<sup>3)</sup>。さらに、このメカニズムを幾つかの疾病発症の機序解明に応用してきた<sup>9, 10, 13)</sup>。その一環として、肉体的ストレスと心理的ストレス誘発性の神経化学的な変化をこのメカニズムを基に解析してみる。

## カルシウムによるドーパミンの合成調節

はじめに、カルシウムによる脳内ドーパミンの合成調節のメカニズムに関して簡単に述べる。マウスの腹腔内にエタノールを投与すると、行動の上で睡眠と同じ状況に陥る。このエタノール誘発性の睡眠時間の長さは、脳内の生体アミン(カテコラミンの他、セロトニン等も含めたもの)の濃度によって調節されているが、カルシウムの脳室内投与によっても濃度依存的に増加する。このカルシウムの効果は、カテコラミンの合成酵素阻害剤やカルモジュリン拮抗剤によって抑えられる。この結果から、カルシウムがカルモジュリン系を介してカテコラミンの合成酵素を賦活化し、濃度の高くなったカテコラミンが睡眠時間を延長させたと示唆される<sup>3)</sup>。高速液体クロマトグラフィーによって確認すると、カルシウムの投与によって大脳全体で約25%のドーパミンが増加していた。しかし、この方法ではドーパミンの合成が高められた部位の詳細な同定はできなかった。

Brain Mapping Analyzerを開発したのは、この部位を同定するのが最初の目的であった。開発初期の装置を用いて、脳組織切片内に分布する生体アミン由来の蛍光量を測光した。この染色方法は、北欧のカロリンスカ研究所で開発されたものであるが、原始的なもので幾つかの生体アミンを識別することができなかった。しかも、分析装置も未完成なものであったが、この方法で脳内の幾つかの部位において、生体アミンの濃度がカルシウムによって増加することを確認した<sup>4)</sup>(図1)。この実績をもとに、さらに詳細な分析法の開発を行った。その一つは、高精度、高感度、高速の装置を作ることである。ニコン光機事業部の協力を受けて、苦戦の末、二号機が完成した。二つめとして、ドーパミンを選択的に検出する方法の開発である。丁度この時期、フランスのボルドー大学でGeffard教授らが、ドーパミンを含めた多くの低分子化合物に対する特異性の高い抗体を作るための画期的な方法を開発した<sup>1)</sup>。彼に連絡を取り、共同研究を行うためにGeffard教授本人に来日して頂いた。彼の方法と私共の装置を用いて、線条体外側部と側坐核において、カ

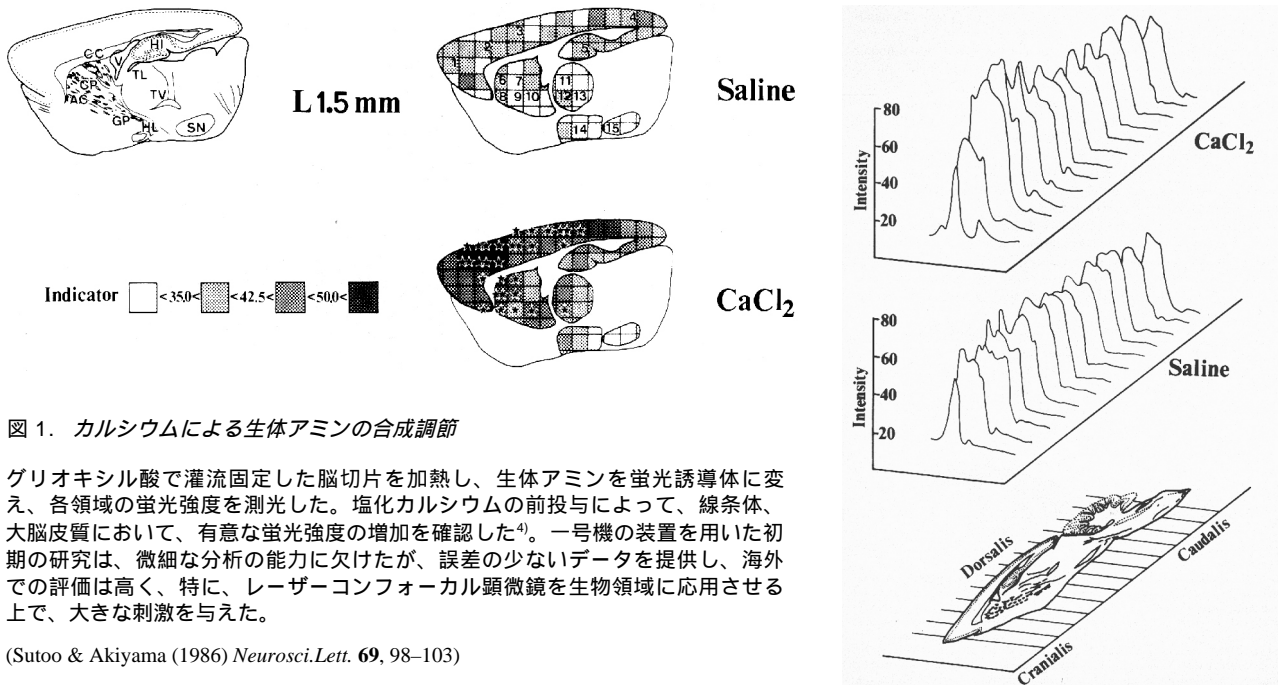


図 1. カルシウムによる生体アミンの合成調節

グリオキシル酸で灌流固定した脳切片を加熱し、生体アミンを蛍光誘導体に変え、各領域の蛍光強度を測光した。塩化カルシウムの前投与によって、線条体、大脳皮質において、有意な蛍光強度の増加を確認した<sup>4)</sup>。一号機の装置を用いた初期の研究は、微細な分析の能力に欠けたが、誤差の少ないデータを提供し、海外での評価は高く、特に、レーザーコンフォーカル顕微鏡を生物領域に応用させる上で、大きな刺激を与えた。

(Sutoo & Akiyama (1986) *Neurosci.Lett.* **69**, 98–103)

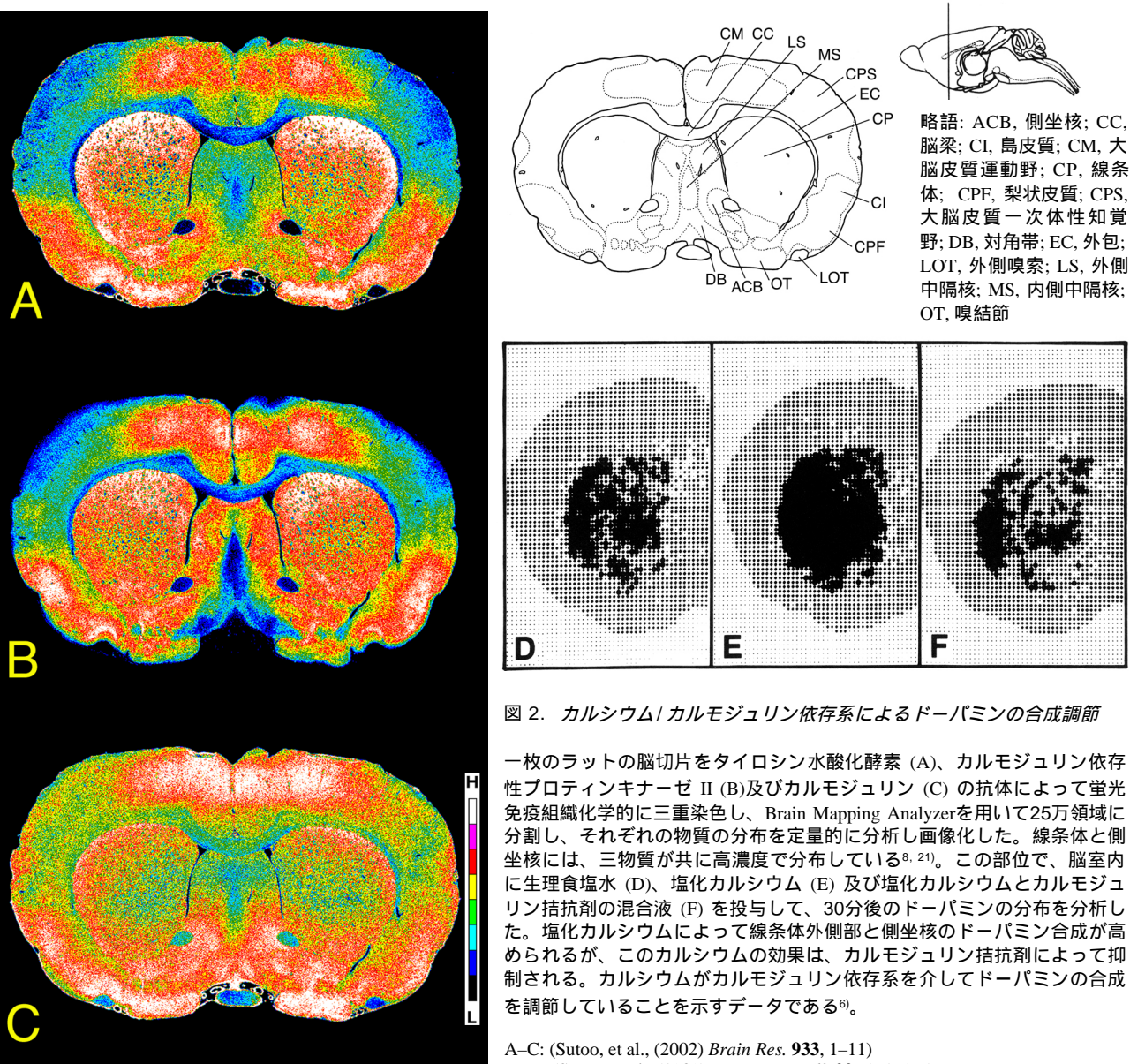


図 2. カルシウム/カルモジュリン依存系によるドーパミンの合成調節

一枚のラットの脳切片をタイロシン水酸化酵素 (A)、カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II (B) 及びカルモジュリン (C) の抗体によって蛍光免疫組織化学的に三重染色し、Brain Mapping Analyzer を用いて 25 万領域に分割し、それぞれの物質の分布を定量的に分析し画像化した。線条体と側坐核には、三物質が共に高濃度で分布している<sup>8, 21)</sup>。この部位で、脳室内に生理食塩水 (D)、塩化カルシウム (E) 及び塩化カルシウムとカルモジュリン拮抗剤の混合液 (F) を投与して、30 分後のドーパミンの分布を分析した。塩化カルシウムによって線条体外側部と側坐核のドーパミン合成が高められるが、このカルシウムの効果は、カルモジュリン拮抗剤によって抑制される。カルシウムがカルモジュリン依存系を介してドーパミンの合成を調節していることを示すデータである<sup>6)</sup>。

A–C: (Sutoo, et al., (2002) *Brain Res.* **933**, 1–11)

D–F: (Sutoo, et al., (1989) *Brain Res. Bull.* **22**, 565–569)

ルシウムがカルモジュリン系を介してドーパミンの合成を調節していることを確認した<sup>6)</sup>。その後、さらに装置を改良し、一枚の脳切片から細胞レベルで複数の物質の分布を同時に定量するなど、かつてない性能を持ったBrain Mapping Analyzer を完成した<sup>15,20)</sup>。これを用いて、かつて Geffard 教授とドーパミンの合成が亢進していることを見出した領域に、タイロシン水酸化酵素 (カテコルアミン合成の律速酵素)、カルモジュリン及びカルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II が共に多く分布している事を同一の組織片上で確認した<sup>21)</sup> (図2)。

## ストレスによるドーパミン作動系の変化

### ストレスのモデルマウス

以下の方法で三種類のストレスのモデルマウスを作り、カルシウム/カルモジュリン依存性の脳内ドーパミン合成の変化と、それに由来する生理的、行動的变化を分析した。(1) 低温ストレス: ホルダーで固定したマウスを 4 で 2 時間拘束し、低温ストレスを与えた。対照群は室温で 2 時間拘束した。(2) 電気ショックストレス: コミュニケーション箱 [透明なプラスチックで分割された 48 の部屋 (10x10x45 cm) からなり、互い違いに床に電極をセットし感電設備を持つ装置] にマウスを入れ、電気ショック (2 mA、30 秒間隔で 5 秒間) を与えた。(3) 心理ストレス: コミュニケーション箱内で、電気的ショックを与えないが、視覚、聴覚及び嗅覚を通して隣接する電気ショック刺激マウス群より心理的ストレスを与えられた。2 と 3 番目のストレスの対照群として、コミュニケーション箱内で全くストレスを与えない動物を準備した。

### 血中・脳内のカルシウム濃度

ストレス解除後、速やかに採血し、さらに脳をホモジナイズし、血清中及び脳内のカルシウム濃度を分析した。何れのストレスマウスとも、出現時間や現象の大きさに程度の差はあるが、ストレス開始後 15-30 分に、一過性に血中のカルシウム濃度が上昇した。このカルシウムが脳に移動することにより、時間差を置いて脳内のカルシウムも増加した。図 3、4 に、電気ショックストレスと心理ストレスによる血中及び脳内のカルシウムの変化を示した<sup>19)</sup>。

### 脳内のドーパミン濃度

ストレス解除後、直ちに麻酔し、心臓から固定液を灌流した。ドーパミンなどの低分子物質に対しては抗体ができにくいので、高分子のドーパミン誘導体を通して抗原抗体反応を行っている。そのため、灌流時にドーパミンを誘導体に換えるための薬剤を加えている。固定後、脳を取り出し 20  $\mu$ m の凍結切片を作製し、二抗体法による FITC ラベルの蛍光免疫組織化学染色を行った。染色後、Brain Mapping Analyzer を用いて組織切片上の蛍光強度を分析し、ドーパミンの分布を解析した。三種類のストレスとも、線条体と側坐核のドーパミンレベルが有意に高いことが確認された。これは、カルシウムの脳室内投与と同じ効果である。図 5 に電気ショックストレスと心理ストレスによる脳内ドーパミンの変化を示した<sup>19)</sup>。

### 生理的・行動的变化

ストレスの暴露による線条体や側坐核のドーパミンの増加は、自発運動量やアルコールに対する感受性に有意な変化を与え<sup>7,19)</sup>、胃粘膜の損傷を引き起こした<sup>14)</sup>。これらのストレスによる生理的・行動的な変化は、カルシウムキレート剤やタイロシン水酸化酵素阻害剤、カルモジュリン拮抗剤の投与によって抑えられた。この点を具体的に述べる。(1) 自発運動量: 低温ストレスを与えたマウスは抑鬱状態となり、床にうずくまって動かないが、対照群のマウスはせわしなく動く。低温ストレスマウスの 1 時間の総自発運動量は、対照群と比べて約 60% 減少していた (図 6-1)。ストレスによる自発運動量の低下は、カルシウムキレート剤で



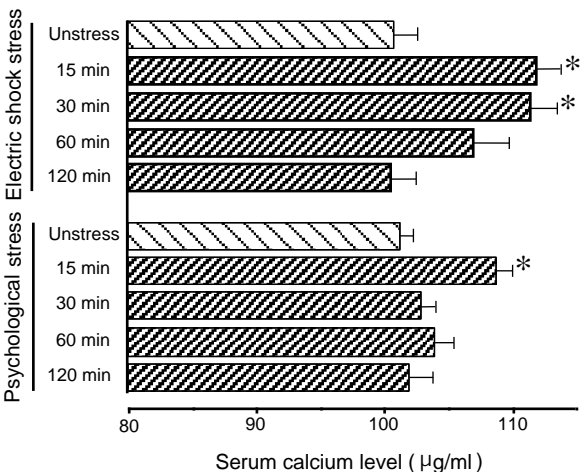


図3. 血清カルシウムレベルに対する電気ショックストレス及び心理ストレスの効果

ストレスによってカルシウム代謝ホルモンが賦活化され、骨に保存されているカルシウムが血液に移動する。15分及び30分間の電気ショックストレス或いは15分間の心理ストレスの負荷により、対照群と比べて、それぞれ 11% 及び 7% 血清カルシウムレベルが有意に増加した。この変化は一過性のもので、間もなく正常値に戻る。

\* $P < 0.01$  (Dunnett's *t*-test により、対照群と比較)

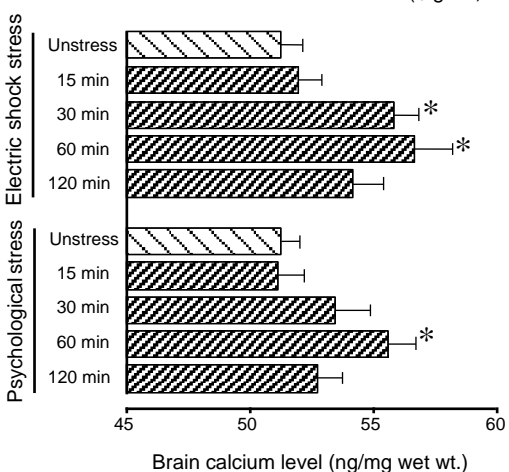


図4. 脳内カルシウムレベルに対する電気ショックストレス及び心理ストレスの効果

カルシウムレベルの高くなった血液が全身を循環することにより、脳内のカルシウムレベルも高められる。30分及び60分間の電気ショックストレス、或いは60分間の心理ストレスを負荷したマウスの脳内カルシウムレベルは、対照群と比べて、それぞれ 9-11% 及び 9% 増加した。

\* $P < 0.05$  (Dunnett's *t*-test)

図5. 脳内ドーパミンレベルに対する電気ショックストレス及び心理ストレスの効果

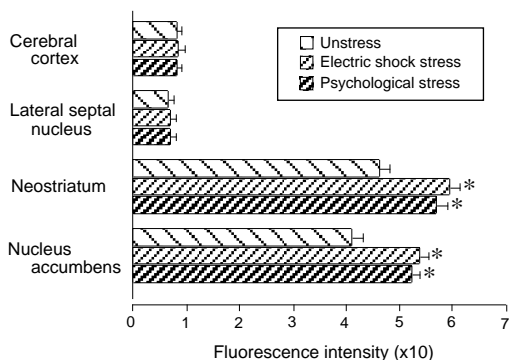
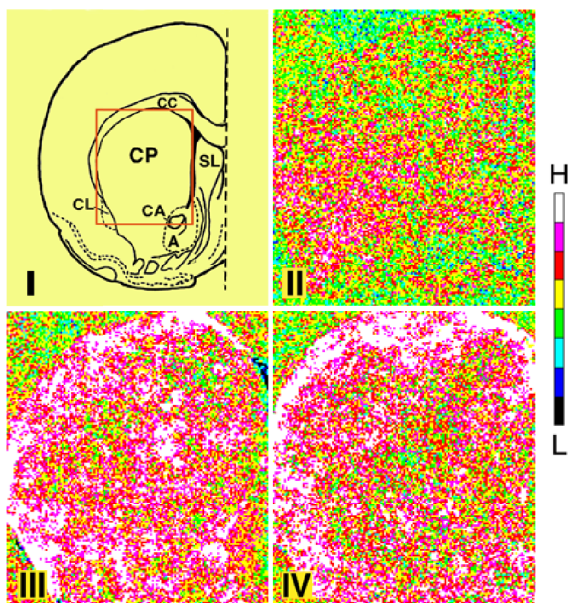
脳内のカルシウムレベルが高くなるとカルモジュリンを活性化し、引き続きカルモジュリン依存性のプロテインキナーゼを活性化し、カテコラミンの律速酵素であるタイロシン水酸化酵素をリン酸化することによって賦活化する。その結果、脳内ドーパミンレベルが高められる。

上：ストレスを負荷しないコントロールマウス (II) 及び 60分間の電気ショックストレス (III) 或いは心理ストレス (IV) を負荷したマウス脳の免疫組織化学的ドーパミンレベルを、Brain Mapping Analyzer を用いて 20 µm 間隔で定量した。白色から黒色にかけて、ドーパミンのレベルが低くなる。

略語：A, 側坐核；CA, 前交連；CC, 脳梁；CL, 前障；CP, 線条体；SL, 外側中隔核

下：上の切片の各領域から無作為的に測光データを取り出し、ドーパミンレベルに対するストレスの効果を検査した。電気ショックストレス或いは心理ストレスを負荷したマウスの線条体 (neostriatum) と側坐核 (nucleus accumbens) におけるドーパミンレベルは、対照マウスと比べて、23-31% 有意に増加していた。同様な結果は、低温ストレスでも確認された。

\* $P < 0.01$  (Dunnett's *t*-test により、対照群と比較)





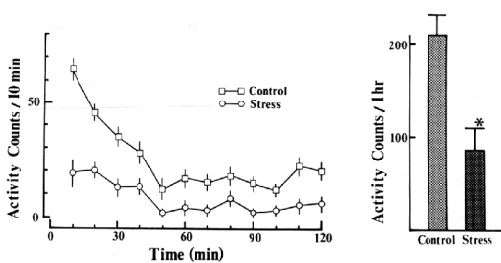


図 6-1. 自発運動量に対する低温ストレスの効果

4°Cの低温下でマウスを2時間拘束すると、電気ショックストレスや心理ストレスと同様に、カルシウム依存性の脳内ドーパミンの合成が亢進する。拘束解除後、自発運動量を分析すると、室温で拘束したマウス(図中、Control)は、直ちに探索行動を始めるのに対し、低温下で拘束したマウス(Stress)は、鬱状態になり床にへばり付き動きが少ない。1時間の総運動量は、低温ストレスで約6割減少している。

\* $P < 0.01$  (Student's *t*-test)

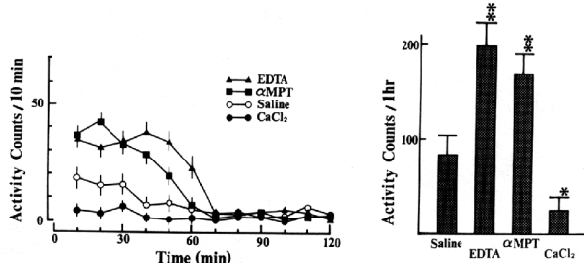


図 6-2. ストレス依存性の運動量の減少に対する薬物の効果

低温ストレスで減少した自発運動量は、カルシウムキレート剤 (EDTA) やカテコラミン合成酵素阻害剤 (MPT) の前投与によって改善され、カルシウム (CaCl<sub>2</sub>) の前投与によってさらに減少する。ストレスによる中枢カルシウム依存性のドーパミン合成の異常な亢進が運動量の減少や鬱状態の発現に関わっていると示唆される。

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  (Dunnett's *t*-test)

(Sutoo et al. (1991) *Pharmacol. Biochem. Behav.* **40**, 423-428)

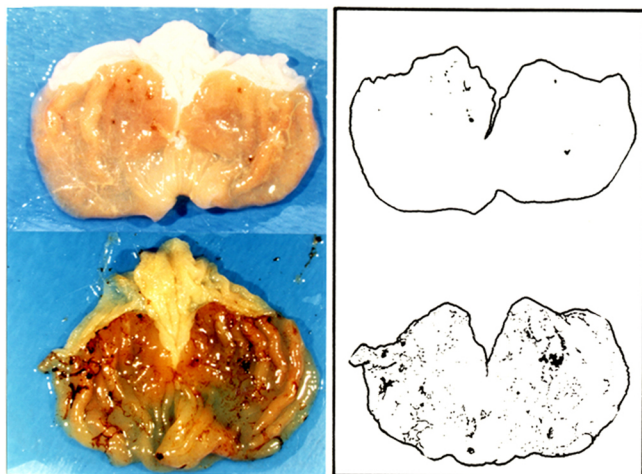
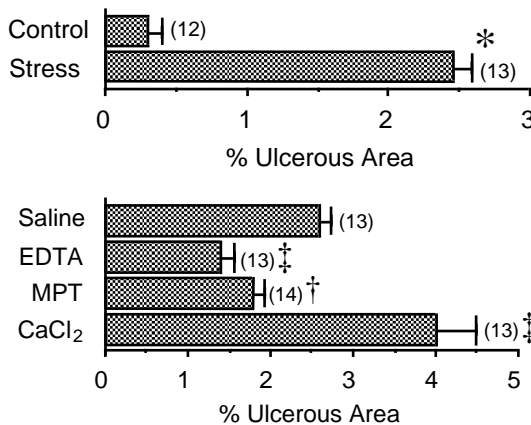


図 7. 胃粘膜損傷に対する低温ストレスの効果

左: 室温で2時間拘束したマウス(上)と4°Cで拘束したマウス(下)の胃を切開し、内容物を1%ホルマリン緩衝液で軽く洗い流した後、顕微鏡下で撮影した。右: 左の写真から画像解析装置で潰瘍部分を抽出し、粘膜内での潰瘍の占める割合を求めた。



低温下で2時間拘束したマウスは、胃粘膜内で有意に潰瘍の面積が増加している(上図)。\* $P < 0.001$  (Student's *t*-test)

低温ストレスに由来する潰瘍の面積は、カルシウムキレート剤 (EDTA) やカテコラミン合成酵素阻害剤 (MPT) の前投与で減少し、カルシウムの前投与でさらに増加する(下図)。潰瘍の形成機序にも、カルシウム依存性のドーパミン合成の異常な亢進が関与していると示唆される。† $P < 0.05$ , ‡ $P < 0.01$  (Dunnett's *t*-test)

(Sutoo et al. (1998) *Neurosci. Lett.* **249**, 9-12)

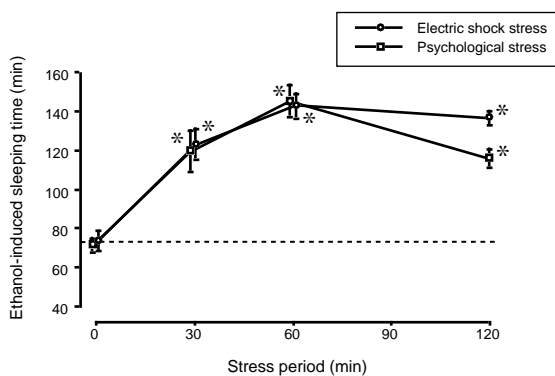


図 8-1. エタノール誘発性の睡眠時間に対する電気ショックストレス及び心理ストレスの効果

マウスの腹腔内にエタノールを投与すると行動の上で睡眠状態に陥る。このエタノール誘発性の睡眠時間の長さは、脳内ドーパミンの増加によって延長する。電気ショックストレス及び心理ストレスで、脳内のドーパミンが増加するため、ストレスを与えるとマウスのエタノール誘発性の睡眠時間が長くなる。

\* $P < 0.01$  (Dunnett's *t*-test)

(Sutoo & Akiyama (2002) *Behav. Brain Res.* **134**, 347-354)

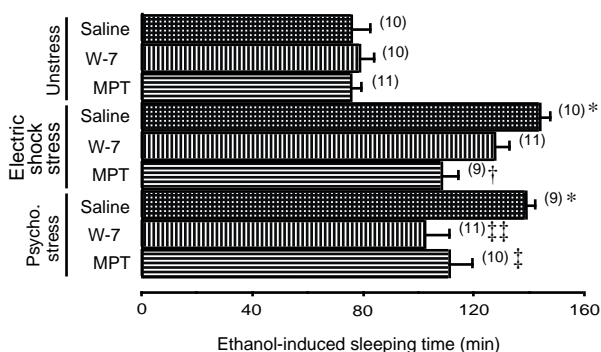


図 8-2. 電気ショックストレス及び心理ストレスによって延長したエタノール誘発性の睡眠時間に対する薬物の効果

各ストレスを60分間負荷して延長したエタノール誘発性睡眠時間は、カルモジュリン拮抗剤 (W-7) 或いはカテコラミン合成酵素阻害剤 (MPT) の脳室内前投与により減少した。ストレス時のアルコールに対する感受性の変化にカルシウム依存性のドーパミン合成系が関与していると示唆される。

\* $P < 0.01$  (生理食塩水を投与したコントロール群との比較)

† $P < 0.01$  (生理食塩水を投与した電気ショックストレス群との比較)

‡ $P < 0.05$ , †† $P < 0.01$  (生理食塩水を投与した心理ストレス群との比較)

ある EDTA やタイロシン水酸化酵素阻害剤である *-methyltyrosine* ( MPT) の腹腔内投与により有意に抑制され、塩化カルシウムの投与によって逆に亢進した (図 6-2)。 (2) *胃の粘膜損傷* : 低温ストレスを負荷したマウスは、胃粘膜に激しい出血性の潰瘍がみられた。低温ストレスによる潰瘍の面積は、EDTA や MPT の腹腔内投与によって45%及び 30%減少し、塩化カルシウムの投与によって55%増加した (図 7)。 (3) *アルコールに対する感受性* : エタノール誘発性睡眠時間は、30-120 分間の電気ショックストレス或いは心理ストレスの負荷により、60-100%延長した (図 8-1)。エタノール誘発性睡眠時間を延長させるストレスの効果は、カルモジュリン拮抗剤である W-7 や MPT の脳室内投与により抑制された (図 8-2)。

## 結論

カルシウム/カルモジュリン依存性のドーパミンの合成能に対する肉体的及び心理的ストレスの効果を分析した。何れのストレスとも、血中及び脳内カルシウムレベルを増加させ、引き続き線条体と側坐核領域のドーパミンの合成を賦活化した。増加した中枢ドーパミンが、生理的・行動的变化を引き起こすことが示唆される。日常の軽いストレスは、ドーパミン作動性神経系を亢進させ適度な覚醒作用として働く。カルシウム依存性のドーパミンの合成はストレスに対する防御機能に関与しているが、慢性的な過度のストレスはドーパミン作動性神経系を異常に亢進させ、様々な症状を引き起こすと考えられる<sup>7, 14, 19)</sup>。

## 参考文献

1. Geffard, M., Buijs, R. M., Seguela, P., Pool, C. W. and Le Moal, M. (1984) *Brain Res.* 294: 161-165.
2. Hanawa, M., Asano, T., Akiyama, K., Yabe, K., Tsunoda, K., Tadano, T. and Sutoo, D. (2000) *Pharmacol. Biochem. Behav.* 66: 771-778.
3. Sutoo, D., Akiyama, K. and Iimura, K. (1985) *Pharmacol. Biochem. Behav.* 23: 627-631.
4. Sutoo, D. and Akiyama, K. (1986) *Neurosci. Lett.* 69: 98-103.
5. 須藤伝悦、秋山佳代、前田一郎 (1988) 日本薬理学雑誌 91: 173-180.
6. Sutoo, D., Akiyama, K. and Geffard, M. (1989) *Brain Res. Bull.* 22: 565-569.
7. Sutoo, D., Akiyama, K. and Takita, H. (1991) *Pharmacol. Biochem. Behav.* 40: 423-428.
8. Sutoo, D., Akiyama, K., Yabe, K. and Kohno, K. (1991) *Brain Res. Bull.* 26: 973-982.
9. Sutoo, D., Akiyama, K. and Takita, H. (1992) *Physiol. Behav.* 52: 865-872.
10. Sutoo, D. (1994) In: *The Vulnerable Brain and Environmental Risks, Vol. 3: Toxins in Air and Water*, Plenum, New York, pp. 281-300.
11. Sutoo, D., Akiyama, K., Yabe, K. and Kohno, K. (1994) *Neuroscience* 58: 227-234.
12. Sutoo, D. and Akiyama, K. (1996) *Physiol. Behav.* 60: 177-181.
13. Sutoo, D. and Akiyama, K. (1997) *Brain Res. Rev.* 25: 1-26.
14. Sutoo, D., Akiyama, K. and Matsui, A. (1998) *Neurosci. Lett.* 249: 9-12.
15. Sutoo, D., Akiyama, K. and Yabe, K. (1998) *J. Neurosci. Methods* 85: 161-173.
16. Sutoo, D., Yabe, K. and Akiyama, K. (1999) *Neurosci. Res.* 35: 339-346.
17. Sutoo, D., Akiyama, K. and Yabe, K. (2000) *Human Brain Mapping* 11: 93-103.
18. Sutoo, D., Akiyama, K. and Yabe, K. (2001) *J. Neurosci. Res.* 63: 369-376.
19. Sutoo, D. and Akiyama, K. (2002) *Behav. Brain Res.* 134: 347-354.
20. Sutoo, D., Akiyama, K. and Yabe, K. (2002) *J. Neurosci. Methods* 118: 41-50.
21. Sutoo, D., Akiyama, K. and Yabe, K. (2002) *Brain Res.* 933: 1-11.



ここでのストレスに関する研究は、大正製薬株式会社からの奨学寄付金によって援助されたものである。  
現在、この研究を基にストレスによる諸症状を和らげるための新薬の開発が進められている。