

学 位 論 文 題 名

STUDIES ON ZINC AND NEUROTRANSMITTERS IN THE BRAIN HIPPOCAMPUS
UNDER THE RESTRAINT STRESS

（拘束ストレスによる海馬中亜鉛および神経伝達物質の動態に関する研究）

学位論文内容の要旨

I 研究目的

脳内の亜鉛は海馬の苔状線維に高濃度に存在している。海馬はストレスに対して感受性が強く、ストレスにより海馬に係わる種々の神経系が興奮を示す。しかし、海馬に存在する亜鉛がストレスに対して如何なる関わりを持っているかは明らかでない。ストレスによる海馬の亜鉛の変動について、組織レベルで検討した報告はほとんどなく、神経伝達に直接関係するシナプトゾームについての検討は全く行われていない。また、亜鉛は海馬で2、3の物理化学的刺激により神経末端から放出されることが認められているが、ストレスによって亜鉛の放出がみられるかどうかは明らかでない。本研究では、海馬における亜鉛とストレスとの関係を明らかにするために、ラットに拘束ストレスを負荷したときの海馬中亜鉛の動態を(1)海馬組織中の亜鉛濃度と(2)海馬のシナプトゾーム分画中の亜鉛濃度について検討するとともに、(3)海馬における神経末端からの亜鉛の放出特性をあらかじめ確認してから、ストレスによる亜鉛の放出を経時的に検討した。さらに、亜鉛がグルタミン酸神経伝達系に関与することから、グルタミン酸を含むアミノ酸神経伝達物質の放出についても同時に分析を行い、亜鉛とこれら伝達物質との関係を検討した。(4)ストレス指標である血漿コルチコステロンの変化を測定し、海馬における亜鉛の変動との違いを比較検討した。ストレスによる脳内亜鉛の変動を経時的に検討した研究はこれまで報告がなく、この研究で初めて試みられた。

II 研究方法

実験1. 1. 拘束ストレスによるラット脳海馬組織中亜鉛濃度の変化

Wistar 系雄性ラット（270 - 340 g）をストレス群と対照群に分け、ストレス群には15分、30分および60分の拘束ストレスを負荷した。拘束には、拘束終了後直ちに断頭が出来るよう

に設計、製作したアクリル製拘束ケージを用いた。ラットはストレス群では拘束終了後、対照群では代謝ケージから取り出した後、直ちに断頭して脳を取り出し、海馬組織を分離後凍結乾燥した。凍結乾燥試料をテフロン製の分解容器中で硝酸により加熱分解し測定試料とした。亜鉛濃度は、誘導結合プラズマ質量分析装置（ICP - MS : Seiko, SPQ - 6500）を用いて測定した。

実験 1. 2. 拘束ストレスによるラット脳海馬のシナプトゾーム分画中亜鉛濃度の変化

実験対象ならびに拘束ストレス負荷は、実験 1 と同様である。シナプトゾーム試料はラット 3 匹分の海馬組織を合わせて 1 試料とし、ラージシナプトゾームおよびスモールシナプトゾームの各分画を Whittaker の方法に準じて分離した。これらの試料は一部を蛋白質、残りを亜鉛の定量に用いた。

実験 1. 3. 拘束ストレスによるラット血漿中コルチコステロン濃度の変化

実験対照は、実験 1. 2. で用いたラットから各群 10 匹ずつを任意に選び、断頭時に頸動脈血を採取し血漿を分離した。コルチコステロンの分析は、高速液体クロマトグラフィーならびに電気化学的検出器を用いて行った。

実験 2. 1. ラット脳海馬における亜鉛の細胞外への放出特性

実験は脳微小透析法（マイクロダイアリシス法）により行った。Wistar 系雄性ラット（350 - 400 g）の海馬に透析用プローブを埋め込み、ペントバルビタール麻酔下プローブにリンゲル液を灌流し、15 分毎に試料を回収した。透析液中の亜鉛濃度の変化をみるために、灌流液を高カリウム液（100mM）、無カルシウム液および 10^{-6} M テトロドトキシン（TTX）溶液にそれぞれ交換した。試料中の亜鉛はフレイムレス原子吸光分光光度計（日立 180 - 80）により測定を行った。

実験 2. 2. 拘束ストレスによるラット脳海馬の細胞外亜鉛濃度およびアミノ酸濃度の変化

実験 2. 1. と同様にマイクロダイアリシス法を用いて検討した。海馬に透析プローブを埋め込んだ Wistar 雄性ラット（270 - 340 g）に拘束ストレスを 1 時間負荷した。実験中リンゲル液を灌流し続け、15 分おきに透析液を回収した。試料中の亜鉛は、フレイムレス原子吸光分光光度計（日立 180 - 80）により測定を行い、グルタミン酸を含むアミノ酸は、高速液体クロマトグラフィーおよび電気化学的検出器を用いて測定した。

Ⅲ 結果および考察

実験 1. 拘束ストレス負荷によるラット脳海馬組織中の亜鉛濃度は、拘束 15 分後で対照群に比べて有意な減少を示し（ $P < 0.01$ ）、この低下は他のストレス群にも見られた。すなわち、海馬組織中の亜鉛は拘束ストレス負荷の早い時間で変化する事が明らかになった。

ラージシナプトゾームは、海馬の神経伝達に亜鉛が直接関与する場であるが、この分画中の亜鉛濃度は拘束ストレス負荷により低下する傾向を示し、この傾向は海馬組織中亜鉛の変動と同様であった。亜鉛が海馬に高濃度であることや刺激により細胞外へ放出されることから、ストレスにおけるこれらの変動は共通の原因により生じるものと考えられた。一方、スモールシナプトゾーム分画の亜鉛濃度は、ストレスにより増加する傾向を示した。これらの結果から、ラージシナプトゾームとスモールシナプトゾームとでは亜鉛の神経伝達に果たす役割が異なるものと考えられた。

血漿コルチコステロンは、ストレスにより副腎皮質から血液中に放出されるが、拘束ストレスによりこの濃度は、ストレス負荷15分および30分で対照群に比べて約2倍に、60分では4倍に増加した。対照群、15分および30分の群では、各測定値のばらつきがかなり大きかったのに対し、ストレス負荷60分では一様に濃度上昇が認められることから、血漿コルチコステロンは海馬中亜鉛の変動に比べ、ストレスの影響が強く現れるのに時間を要することが明らかになった。

実験2. 海馬からの亜鉛放出特性に関して、細胞間隙に放出された亜鉛がどの程度神経伝達に関与するかは明らかにされていない。細胞外の亜鉛濃度は、高カリウム刺激により有意に上昇し、カルシウムを取り除くと基底値の約70%に低下した。これに対しTTX液では、亜鉛濃度は低下する傾向を示したものの、基底値との有意差は認められなかった。この結果から、細胞外へ放出される亜鉛は、神経活動によるもの以外に細胞の代謝に伴って放出されるものも存在することが示唆された。

拘束ストレスによる細胞外への亜鉛放出に関して、細胞外の亜鉛濃度はストレス負荷15分では有意な上昇を示すが、30分以後では拘束負荷前の値と同じレベルに戻る。さらに、この変化はグルタミン酸とほぼ同じ放出パターンを示すことから、海馬における亜鉛の放出が神経末端からグルタミン酸とともに生じる可能性が明らかにされた。

IV 結語

中枢神経系における亜鉛とストレスとの関係を明らかにするために、ラットに拘束ストレスを負荷し、海馬中亜鉛の変化を検討した。

その結果、海馬組織中亜鉛の低下、巨大シナプトゾーム分画での低下傾向および細胞外亜鉛濃度の上昇が認められたことから、海馬の亜鉛はストレス負荷により神経末端から放出されることが明らかとなった。さらに、亜鉛の放出はストレス負荷の早い時期に現れ、その放出は海馬の神経伝達物質であるグルタミン酸と同じ挙動を示すことが明らかとなった。

以上より、亜鉛は脳内でストレスによりその挙動が変化するとともに、海馬での神経伝達に重要な役割を果たしていることが認められた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 斎 藤 和 雄
副 査 教 授 小 島 豊
副 査 教 授 黒 柳 俊 雄
副 査 教 授 保 原 喜志夫

本研究は、海馬におけるストレスと亜鉛との関係を明らかにする目的で、ラットに拘束ストレスを負荷し海馬中亜鉛の動態を(1)海馬の組織中およびシナプトゾーム分画中の亜鉛濃度の変化について検討するとともに、(2)海馬における神経末端からの亜鉛の放出特性をストレスとの関係において経時的に検討した。また、(3)亜鉛がグルタミン酸神経伝達系に関与することから、グルタミン酸を含むアミノ酸神経伝達物質の放出についても同時に追求した。さらに、(4)亜鉛とこれら伝達物質との関係をストレス指標である血漿コルチコステロンの変化と海馬における亜鉛の変動との違いについて検討した。この様なストレスによる脳内亜鉛の変動を経時的に検討し、その機序を明らかにした研究はこれまでになくこの研究で初めて試みられた。

1. 拘束ストレスによるラット脳海馬組織およびシナプトゾーム中亜鉛濃度

Wistar 系雄性ラット (270 - 340 g) の拘束終了後直ちに断頭が出来るように設計、製作したアクリル製拘束ケージを用いて、15分、30分および60分の拘束ストレスを負荷し、拘束終了後、海馬組織中の亜鉛濃度を誘導結合プラズマ質量分析装置 (ICP - MS : Seiko, SPQ - 6500) を用いて測定した。その結果、拘束ストレス負荷によるラット脳海馬組織中の亜鉛濃度は、拘束15分後で対照群に比べて有意な減少を示し ($P < 0.01$)、この低下は30分、60分負荷群にも見られた。すなわち、海馬組織中の亜鉛は拘束ストレス負荷の早い時間で変化する事が明らかになった。シナプトゾームのうち、ラージシナプトゾーム分画中の亜鉛濃度は拘束ストレス負荷により低下する傾向を示し、この傾向は海馬組織中亜鉛の変動と同様であった。亜鉛が海馬に高濃度であることや刺激により細胞外へ放出されることから、ストレスにおけるこれらの変動は共通の原因により生じたものと考えられる。一方、スモールシナプトゾーム分画中亜鉛濃度は、ストレスによ

り増加する傾向を示し、このちがいからラージシナプトゾームとスモールシナプトゾームの神経伝達に果たす役割が異なることが示唆された。

2. 拘束ストレスラットの血漿中コルチコステロン濃度および透析液中のアミノ酸濃度

測定は拘束液体クロマトグラフィーならびに電気化学的検出器を用いて行われた。その結果、血漿コルチコステロン濃度は、ストレス負荷15分および30分で対照群に比べて約2倍に、60分では4倍に増加した。対照群、15分および30分の群では、各測定値のばらつきがかなり大きかったのに対し、ストレス負荷60分では一様に濃度上昇が認められることから、血漿コルチコステロンは海馬中亜鉛の変動に比べ、ストレスの影響が強く現れるのに時間を要することが明らかになった。

3. ラット脳海馬における亜鉛の細胞外への放出特性

脳微小透析法（マイクロダイアリシス法）によりラットの海馬から15分毎に回収された透析液中の亜鉛濃度をフレイムレス原子吸光法で測定した。その結果、細胞外亜鉛濃度は、高カリウム刺激により有意に上昇し、カルシウムを取り除くと基底値の約70%に低下した。これに対しTTX液では、亜鉛濃度は低下の傾向を示したものの、基底値との間に有意差は認められなかった。この事実から、細胞外へ放出される亜鉛は、神経活動によるもの以外に細胞の代謝に伴って放出されるものも存在することが明らかとなった。また拘束ストレスによる細胞外への亜鉛放出に関して、細胞外の亜鉛濃度はストレス負荷15分では有意な上昇を示すが、30分以後では拘束負荷前の値と同じレベルに戻る。さらに、この変化はグルタミン酸とほぼ同じ放出パターンを示すことから、海馬における亜鉛の放出が神経末端からグルタミン酸とともに生じる可能性が明らかにされた。

以上、海馬組織中亜鉛の低下、巨大シナプトゾーム分画での低下傾向および細胞外亜鉛濃度の上昇が認められたことから、海馬の亜鉛はストレス負荷により神経末端から放出されることが明らかとなった。さらに、亜鉛の放出はストレス負荷の早い時期に現れ、その放出は海馬の神経伝達物質であるグルタミン酸と同じ挙動を示すことが明らかとなった。

本研究で得られた知見は、ストレスによる脳海馬の亜鉛の動態と機序を細胞内および細胞外のレベルで明らかにし、亜鉛が海馬の神経伝達に重要な役割を果たしていることを証明したものであり、申請者は博士（環境科学）の学位を受けるのにふさわしいものと判断した。