

研究論文

ラットにおける脳内ノルアドレナリン分泌動態からみた心理的ストレスの評価
— 孤独時と他個体介入時の比較 —

松下 弘 二*

Psychological Stress-Induced Increases in Rat Brain Noradrenaline Turnover.

Koji MATSUSHITA

【要 約】

本研究では、集団飼育された他個体の介入がストレスを軽減することが可能か否かを検討した。心理的ストレス時に集団飼育された他個体を介入させると、前視床下部のノルアドレナリン放出量が減少した。この減少はストレス負荷後に、より顕著に認められた。ストレス負荷時の行動観察で、集団飼育された他個体を介入させることにより、休息行動が促進した。ストレス負荷時の集団飼育された他個体の介入は、休息行動を促進し、前視床下部のノルアドレナリン神経活動を低下させることから、ストレスを軽減させることが示唆された。

* 兵庫県立飾磨工業高等学校 多部制

1 はじめに

現代はストレス社会である。現代社会のストレスが一つの要因となり得る精神疾患として、心身症、神経症、うつ病等があげられる。このような精神疾患に悩まされる人は多く、その数は年々増加の傾向にある。学校現場においても、教師、生徒ともにこれらの疾患が増加しており、早急なストレスの軽減策を講じる必要があるとされている。ストレスの軽減法は様々であるが、その一つとして良好な仲間関係の形成が考えられる。しかし、良好な仲間関係の形成がストレスの軽減策として有効であることを、心理的側面以外から実証している報告は少ない。

ストレスが脳内神経機構に影響を与えることはよく知られている。ストレスは、神経の活動、特に自律神経活動の異変を引き起こし、内分泌調節系にも影響を与える。強いストレスが長時間負荷された場合、神経細胞の形態変化や細胞死を招くこともある。

ストレスと密接な関係を持ついくつかの脳内神経系が知られている。ストレスの影響や、ストレスからの回避効果を調べるためには、これらの神経系の活動を検討することが重要である。しかし、*in vivo*において、特定の神経活動を電気生理学的にとらえるのは容易ではない。一般的に、神経活動は、軸索末端あるいは樹状突起のシナプスにおいて放出される神経伝達物質の量的変化に反映される。従って、ストレス負荷による神経伝達物質量の動態を調べることで、ストレスに関係する神経系が同定でき、かつその生理的役割を考察することが可能である。

前視床下部域 (AHA) は、恐怖や不安に関連していることが知られている。様々なストレス負荷により AHA のノルアドレナリン (NA) の放出が増加することが示されている^{1,2,3)}。このストレス負荷による NA 放出上昇は、ストレスを軽減することで抑制される。例えば、板に固定されたラットが傍にある棒に噛みつくことで⁴⁾、あるいは、電気ショックをうけた二匹のラットが闘争できる状況にすると、NA の放出が減少する⁵⁾ことが知られている。

2 ラットにおけるストレス負荷実験

ラットのストレス負荷実験において、ストレッサーは身体的要因と心理的要因の二つに分類することができる。従来のストレス負荷実験で用いられている、拘束ストレス、電撃ショック、寒冷暴露、強制水泳など（以下、身体的ストレス）は、動物にとって二つの要因が等価的に関与しているか、あるいは、心理的要因にくらべて、身体的要因の関与が大きな比重を占めていると考えられる。通常、人間が感じるストレスは、心理的要因によるものが大きいものと思われる。心理的なストレスは、それ自体が直接ストレス反応を引き起こすのではなく、刺激状況の認知、処理により有害あるいは不快なものであると評価されると、情動変化が起これ、神経系および内分泌系の変化が生じて、身体的ストレス反応の引き金となる。ラットにおいて心理的要因のストレスを負荷する 1 つの方法として、周囲のラットが感電を受けるたびに示す鳴き声、跳び上がり、脱糞、排尿などの情動反応を目撃させる方法（以下、心理的ストレス）がある。

ストレスが負荷された場合、脳内では神経伝達物質のひとつであるノルアドレナリン

(noradrenaline : NA, 以下, NA) の分泌が変化する。ラットに身体的ストレスを負荷すると、視床下部、扁桃核、青斑核部、大脳皮質、海馬、中脳などを含む広範な脳部位において、NA の放出が亢進される。心理的ストレスを負荷した場合においても、視床下部と扁桃核において NA の放出が亢進することが知られている。

脳内で放出された NA は代謝され、最終的に 3-methoxy-4-hydroxy- phenylethyleneglycol sulfate (MHPG-SO₄) となる。脳内で放出される NA が急激に増加した場合、MHPG-SO₄ は増加する。ひとたび NA の大量放出が起こると、NA の合成には時間を要するため、NA の放出量は安静状態に比べて減少する。逆に MHPG-SO₄ 量は増加する。このように NA 量と MHPG-SO₄ 量を測定することで、NA 神経の活動を知ることができる。

NA 神経終末から放出された NA 量を測定する方法として、マイクロダイアリシス (微小透析) 法がある。この方法は、先端部が半透膜からなる細い管 (透析プローブ) を一定の脳部位に植込み、その脳部位を微量灌流し、NA やその他の神経伝達物質や代謝産物を採取する方法である。透析液中の物質の定量は、電気化学検出器を備えた高速液体クロマトグラフィを用いて行われる。

視床下部は、多数の神経核と線維連絡系が存在し、中枢神経系による内臓、内分泌、自律神経および情動反応の調節に関与している。また、体温調節や交感神経、副交感神経、性行動、飲食行動、攻撃行動を制御している。前視床下部域 (anterior hypothalamic area : AHA, 以下, AHA) は、恐怖に関連していることが知られている。脳内マイクロダイアリシス法を用いた研究において、身体的ストレス負荷時や心理的ストレス負荷時に AHA で NA の放出が増加する。

3 本研究の目的

本研究では、心理的ストレスに対する行動を分析し、また、神経伝達物質の放出状態を調べ得ることが可能なマイクロダイアリシス法を用いて、心理的ストレス負荷時のラットの脳内神経伝達物質の動態を検討する。これにより、仲間の存在がストレスの軽減に有効であるか否かを明らかにしていきたいと考える。

4 方法

1) 被験動物

被験体として、日本クレア社 (静岡県富士郡) より購入した、生後 5 週齢の Wistar 系雄ラットを用いた。ラットは鳴門教育大学人文棟動物飼育室 (A723) において、1 つのケージ (縦 330 mm, 横 380 mm, 高さ 170 mm) に、同飼育群と他飼育群は 5 匹を一群とし、隔離飼育群は 1 匹で、室温 22 ± 2 °C, 湿度 50 %, 1 日の照明時間 12 時間 (8:00 ~ 20:00) の条件下で飼育した。飼育用飼料である固定ペレット (実験動物用固形飼料 MF, オリエンタル酵母社) および水は自由摂取とした。60 日間以上、集団飼育と隔離飼育を行なった。本実験では、各群 2 匹を観察の対象とした。

2) 刺激装置

刺激装置には、シャトルケージ（縦 210 mm，横 560 mm，高さ 250 mm），パーソナルコンピュータ（NEC 9801），アボイダンスコントローラ（MAC-001，MATYS 製），ショックジェネレータ（MSG-001，MATYS 製），シャトルインターフェース（MSI-001，MATYS 製），およびシャトルケージ（MBX-001）を備えたシャトルアボイダンスシステム（MATYS 製）を使用した。

3) ストレス負荷

中央を透明の亚克力板でしきり，電撃ショックによる反応が見えるようにシャトルケージ内を改造した。電撃ショックが与えられる部屋に 1 匹のラットを，一方の部屋に観察の対象となるラットを入れた。2.5 mA，5 秒間の電撃を 30 秒間隔で 60 分行ない，感電による鳴き声，跳び上がり，脱糞，排尿などの反応を目撃させ，心理的ストレスを負荷した。実験の様子を図 1 に示す。

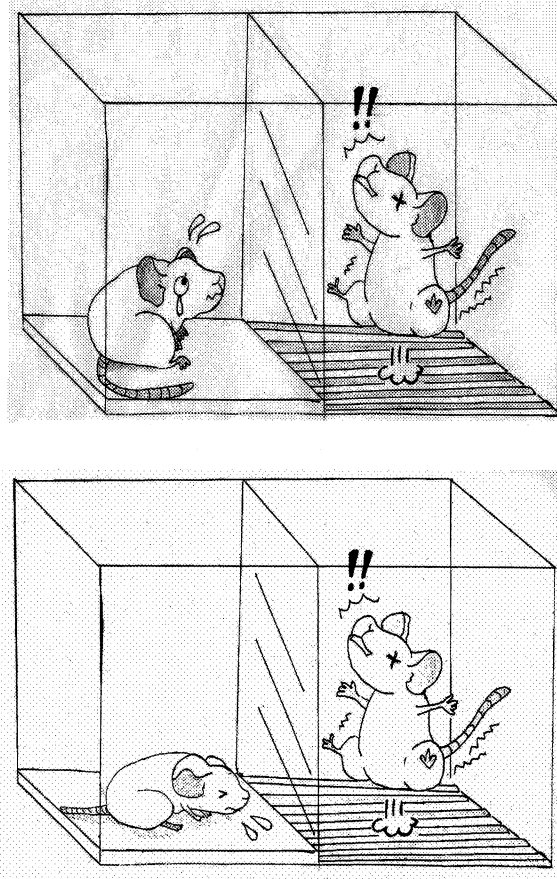


図 1 心理的ストレス負荷（上と下）と他個体介入（下）の様子

4) 手続き

飼育を開始してから 56 日目以降に、ラットの脳内にガイドカニューレの植込み手術を行なった。手術から 3 日目以降に透析プローブを装着し、プローブ内をリンゲル液で灌流した。4 日目以降、マイクロダイアリシス法により試料（透析液）の採取を行なった。実験は、ストレス負荷中に 1 匹の仲間を介入させた群（心理的ストレス負荷中仲間 1 匹介入群, 8 匹）を設定した。

アクリルケージにおいて、試料採取 1 日目の前日より透析を行なったラットを、電撃刺激が与えられるラットの部屋の隣の部屋に入れ、試料を 1 時間採取した。電撃刺激を負荷した 1 時間および刺激後 2 時間連続して試料の採取を行なった。実験群では、同じケージで飼育された仲間ラットをストレス負荷中に 1 匹を介入させた。実験終了後は元のアクリルケージに戻した。

5) 脳手術

ラットにネンプタール（ペントバルビタールナトリウム）溶液（大日本製薬）を腹腔内投与（体重 1 kg 当たり 50 mg 以上）し、麻酔した。頭部を脳定位固定装置（SR-6, 成茂科学器械）に固定し、脳地図（Paxinos and Watson, 1986）に従って、AHA（外耳道より吻側 7.2 mm, 正中線より左側に 0.7 mm, 大脳皮質表面からの深さ 7.8 mm）にステンレス製ガイドカニューレ（AG-12, Eicom）を刺入した。デンタルセメント（Repairsin, GC）とステンレス製アンカービス（AN-5, Eicom）を用いてガイドカニューレを頭蓋骨に固定した。術後、透析プローブ刺入までの間は、ガイドカニューレ内にダミーガイドカニューレ（AD-12, Eicom）を入れて、キャップナット（AC-12, Eicom）を用いて密栓した。

6) マイクロダイアリシス

ガイドカニューレの植込み 3 日目以降より、AHA の透析を行なった。透析には、透析膜（再生セルロース）1 mm が突出するように作られている直管型の透析プローブ（A-1-12-01, Eicom）を用いた。透析プローブにコイル状テフロンチューブ（CT-20, Eicom）を接続し、注入ポンプ（EP-60, Eicom）を用いて、透析プローブ内をリンゲル液（電解質組成 mEq/l; Na : 147, K : 4, Ca : 45, Cl : 155.5; pH 6.4; 大塚製薬）で灌流した。灌流は 2 μ l/分で行なった。この透析システムでは安定したモノアミン量の回収が得られるまでに 5-6 時間を要することから、本実験では試料採取前日より灌流を行なった。

1 試料の採取時間は 20 分間とし、ストレス負荷前に 3 試料、ストレス負荷中に 3 試料、ストレス負荷後に 6 試料、合計 12 試料を採取した。すべての試料採取は、シャトルアボイダンスシステムのシャトルケージ内で行なった。採取した試料は、直ちに -30 $^{\circ}$ C のフリーザー内（HF-22UCH, 三洋電機）に入れ、冷凍保存した。

7) NA の測定

採取した試料中の NA の測定は、電気化学検出器付きの高速液体クロマトグラフィ（Eicom 社製, ECD-300）を用いて測定した。

分析にはクエン酸・酢酸緩衝液（組成：0.1 M クエン酸, 0.1 M 酢酸ナトリウム, 170 mg/l オ

クタンスルホン酸ソーダ, 50 mg/l EDTA-2Na, 21% メチルアルコール) を用い, 流量 0.5 ml/min で溶出した。検出カラムには, プレカラム付き Eicompack SC-30DS (3.6 × 100 mm) を用いた。電気化学検出器の作用電極として, グラファイト標準電極を, 参照電極には銀-塩化銀電極を用い, 加電圧 +750 mV で測定した。

定量に際し標準物質として NA の物質を混合した標準溶液 (Eicom 社製) を用いた。NA の定量は, 電気化学検出器より出力されたアナログ信号をデータプロセッサを介してデジタル信号に変換し, パーソナルコンピュータ (Performa 630, Macintosh) に入力した。その信号を分析ソフトを用いて解析した。標準溶液 (Eicom 社製) に含まれている NA について, 1 ng のピーク面積を求め, これらに対する試料中の各物質のピーク面積の割合を算出することで含有量を測定した。

8) 透析プローブの位置確認

実験終了後, ラットにネンブタールの大量投与 (100-200 mg/kg) を行なった。透析部位の確認を的確に行なうため, 透析プローブ内を生理食塩水に溶解した 2% ポンタミンスカイブルー (Pontamine Sky Blue, Merck) 色素溶液で灌流することにより, 透析部位を青色に染色した。その直後に, 心臓より 10% ホルマリン (formalin, Wako) 溶液を注入し, 灌流した。脳を摘出した後, 同ホルマリン溶液中で固定, 保存した。-20℃ のクリオスタット (CRYOCUT 1800, Reichert-Jung) 内で脳を凍結し, 50 μm 間隔でプローブ痕が存在する部位まで連続的に薄切りにした。脳組織断面を脳地図と対比させて, プローブの刺入部が AHA に位置していることを確認した。

9) 統計処理

NA 量については, 一元配置分散分析と t 検定を用いた。統制群または実験群に伴う NA 量の変化の比較には, 群 (統制群, 実験群) × 時間 (負荷前, 負荷中, 負荷後 1, 負荷後 2) の二元配置分散分析を用いた。前者の要因は被験者間要因, 後者の要因は被験者内要因である。5% 水準以下を有意水準とした。下位検定には Tukey-HSD 法を用いた。

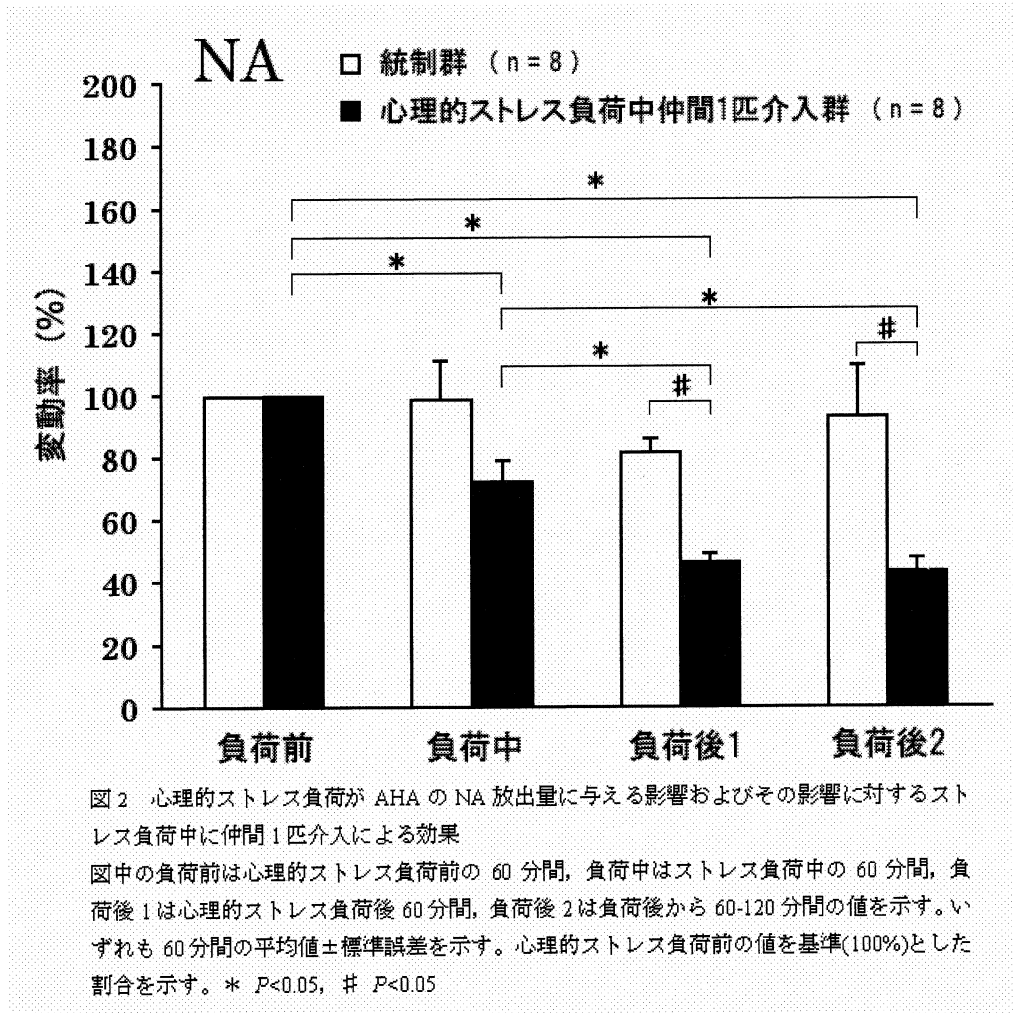
5 結果

ガイドカニューレの先端が, AHA の真上あるいは内部に位置しており, ポンタミンスカイブルー色素で染色されているラット (16 匹) についてのみ解析を行った。

統制群の AHA の NA 量は, 負荷前に比べ負荷後 1 でやや減少を示したが, 大きな変動は見られなかった。一方, ストレス負荷により次第に減少していった (図 2)。

負荷後 1 と負荷後 2 において, NA 量は統制群より心理的ストレス負荷中仲間 1 匹介入群が有意に低かった ($P < 0.05$) が, その他の区では差は認められなかった。また, 心理的ストレス負荷中仲間 1 匹介入群において負荷前と比較して, 負荷中, 負荷後 1 および負荷後 2 ($P < 0.05$) で NA 量に有意な減少が確認された。また, 負荷中と比較して, 負荷後 1 および負荷後 2 ($P < 0.05$)

で NA 量に有意な減少が認められた。統制群では NA 量に有意な減少はみられなかった。



6 考察

ストレス状態を評価するために様々な手法が用いられている。近年、ストレスが脳内神経機構におよぼす影響に関して多くの報告がなされている。身体的ストレス時に AHA の NA 放出量が増加することが明らかにされている。従って、AHA の NA 放出量を測定することで、ストレス状況を評価できるものと考えられる。身体的ストレス時における行動は、継続的な Freezing 状態が見られるだけでなく、悲鳴、跳び上がり、脱糞、排尿などを伴っている。心理的ストレ

ス時においても、NA 放出量が増加することが述べられている。

心理的ストレス負荷時の AHA の NA 放出量を測定した結果、仲間が介入しなかった群では、心理的ストレスによる有意な変化は見られなかった。一方、仲間を介入させた群では、NA 放出量はストレス負荷前に比べ負荷中および負荷後は減少した。

心理的ストレスによる NA 放出量に変化が見られなかった一要因として、先行研究と実験方法が異なることが考えられる。従来の心理的ストレス負荷実験は、コミュニケーションボックスが使用されることが多い。しかし、コミュニケーションボックスは 25 の部屋に仕切られ、その 1 区画に 1 匹のラットを入れて実験が行なわれる。その 1 区画の大きさが 18 cm × 19 cm である。1 区画に 3 匹のラットを介入させると、狭くなり行動が観察できないため、本実験では、シャトルケージを改造して実験を行なった。そのため、心理的ストレスによる NA 放出量の増加に有意な差が認められなかった可能性がうかがえる。それに加えて、ケージ移動によるストレスの影響が考えられる。ラットは新規な場所に置かれると、周囲を嗅ぎ回るなど、活動量が増加する。それに伴い、副腎皮質ホルモンの分泌などの内分泌性の反応も起こることが示されている。

前述したが、先行研究においてストレス負荷により NA 放出量の上昇が示されているが、本研究では AHA の NA 放出量は減少した。NA 放出量の減少は、活動時と比べて休息時や睡眠時に NA 放出量が減少することが示されていることから、NA 放出量の減少は、休息行動の影響を受けているものと考えられる^{6,7)}。ストレス負荷後において負荷中よりも NA 放出量が有意に減少を示したのは、仲間除去後にも休息行動が継続していたと考えられる。このことから、ストレス負荷中の仲間の介入は、仲間が介入しなかった群と比較して、休息行動を促進し、NA 放出量を減少すると考えられる。このことから、ストレス負荷中の仲間の介入は、孤独時と比較して休息行動を発現させやすく、NA 放出量を減少すると考えられる。

本研究において、心理的ストレス負荷中の仲間の介入により、休息行動が促進され、AHA の NA 神経活動を抑制され、ストレスの軽減に繋がることを見出すことができた。

7 本研究と教育との関わり

先行きが見えない暗い現代社会において、学校現場における、いじめや自殺など昔からある問題のみならず、若者の派遣労働者切りや採用者の就職の取り止めの問題など昔では考えられない現代の風潮を表した問題も顕在化してきた。そのため、教師、生徒ともにストレスが増加する傾向にあり、多くの人々がストレス性の精神疾患に悩まされる現状である。この現状を打破するため、ストレスの軽減策を講じなければならない。ストレスの軽減法は様々だが、良好な仲間関係の形成が、ストレスの軽減策として有効であることが明らかにされつつある。

本研究では、ラットにおいて、個体を認識している可能性は高く、集団飼育の中で仲間関係が存在する可能性を見出すことができた。また、心理的ストレス負荷中の仲間介入が、ストレスの軽減に大きな役割を持つことが明らかにできたように思われる。

これらの結果は、直接的に学校現場に生かせるものではない。しかし、ラットという下等動物

物においても仲間関係の重要性を示している本研究の結果は、生徒に対してはクラスメイトとの関わり、部活動での先輩や後輩との関わり、文化祭や体育祭における生徒全体との関わりなどの重要性を伝えるものである。教師に対しては同僚や上司とのコミュニケーションの大切さを見直すきっかけとなると思われる。

また、現在、学校現場において個に応じた教育が重視されている。個に応じた教育は理想とすべき教育方法であることはいままでもない。しかし、個に応じた教育が、学級という集団を無視し、一人ひとり別々に教育するものと解釈すると話は別である。あくまでも、個に応じた教育は、集団の中での個であり、決して個々に教育されることを目的としていない。集団の中で失敗をし、ストレスを感じても、仲間が助けてくれるといった相互作用が教育には必要だと感じる。そのため、本研究の結果は仲間の大切さを伝えている。

今後、AHAにおけるNA以外のドーパミンやセロトニンなどのモノアミン動態を検討していくことにより、仲間による脳内伝達物質動態が解明されていくと考えられる。また、他の脳部位を検討することが必要である。特に、他個体の認識や情動反応に影響をおよぼすとされる、扁桃体におけるNAやモノアミン動態を検討していくことにより、より一層、仲間介入の効果が、言い換えるなら仲間の重要性が解明されていくと考えられる。

今後、仲間の存在の解明はますます重要視されてくるだろう。学校現場にとどまらず、現代社会を明るくするために、良好な仲間関係の形成は必要であるだろう。その一つの手がかりとして、本研究の結果が少しでも貢献できることを願ってやまない。

8 参考・引用文献

- 1) Wu LY, Tanaka M, et al.: Effect of aging on psychological stress-induced increases in noradrenaline release in the rat anterior hypothalamus: an in vivo microdialysis study. *Brain Res* **77**: 347-350 1997
- 2) Yokoo H, Tanaka M, et al.: Stress-induced increases in noradrenaline Release in the rat hypothalamus assessed by intracranial microdialysis. *Cell Mol Life Sci* **46**: 290-292 1990
- 3) Yokoo H, Tanaka M, et al.: Direct evidence of conditioned fear-elicited enhancement of noradrenaline release in the rat hypothalamus assessed by intracranial microdialysis. *Brain Res* **536**: 305-308 1990
- 4) Tsuda A, Tanaka M, et al.: Expression of aggression attenuates stress-induced increases in rat brain noradrenaline turnover. *Brain Res* **474**: 174-180 1988
- 5) Stolk JM, Conner RL, et al.: Brain norepinephrine metabolism and shock-induced fighting behavior in rats: differential effects of shock and fighting on the neurochemical response to a common footshock stimulus. *J Pharmacol Exp Ther* **190**: 193-209 1974
- 6) Lena I, Parrot S, et al.: Variations in extracellular levels of dopamine, noradrenaline, glutamate, and aspartate across the sleep-wake cycle in the medial prefrontal cortex and nucleus accumbens of freely moving rats. *J Neurosci Res* **81**: 891-899 2005
- 7) Sung PP, In vivo microdialysis measures of extracellular norepinephrine in the rat amygdala during sleep-wakefulness. *J Korean Med Sci*. **17**: 395-399 2002