

ラット海馬でのノルアドレナリン刺激性細胞内 カルシウム動員と母子分離の影響

草 加 耕 司

広島大学大学院医歯薬学総合研究科創生医科学専攻先進医療開発科学講座
精神神経医科学 (指導教官: 山脇成人教授)

受付: 平成15年11月11日

受理: 平成15年12月17日

近年, 乳幼児期の不良な母子関係は思春期, 成熟期の海馬において神経科学的, 形態学的, 機能的変化を引き起こすことが報告されている。本研究の目的は, 1) ラット海馬でのノルアドレナリン (NA) 刺激性細胞内カルシウム (Ca^{2+}) 濃度変化とそのメカニズムの検討, 2) 新生児期に母子分離ストレスを与えたラットの海馬における NA 刺激性細胞内 Ca^{2+} 動員及び α_1 -アドレナリン受容体発現の変化に対する検討, である。ラットは約7週齢の Sprague-Dawley ラットを用いた。細胞内 Ca^{2+} 測定は Ca^{2+} 感受性色素の fura-2AM を用い, α_1 -アドレナリン受容体の発現は免疫組織染色法にて検討した。前者に関する検討では歯状回顆粒細胞層と CA3 錐体細胞層において, NA 濃度依存性 ($1 \mu\text{M} \sim 10 \text{mM}$) に細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇がみられ, その機序には α_2 -, β -アドレナリン受容体の関与もあったが, α_1 -アドレナリン受容体が最も関与していた。後者に関する検討では歯状回顆粒細胞層と CA3 錐体細胞層において母子分離により NA 刺激性の細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇が減弱することを見出したが, 同部位において α_1 -アドレナリン受容体の3つのサブタイプの発現は変化しなかった。さらに離乳後に良好な環境で飼育することで, 母子分離による NA 刺激性の細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇の減弱が回復するか否かを検討したところ, 歯状回顆粒細胞層では回復しなかったが CA3 錐体細胞層では回復した。本研究の結果は母子分離や良好な飼育環境といった生後の生育環境によって, NA 刺激性の細胞内 Ca^{2+} 動員が変化し, 海馬機能が修飾される可能性を示唆している。

Key words: α_1 -Adrenergic receptor, Hippocampus, Intracellular calcium mobilization, Noradrenaline

近年, ストレスはラットや人間を含む広範囲な哺乳類の海馬において神経科学的, 形態学的, 機能的変化を引き起こすことが報告されている^{4,8-10,27,40-42})。例えば宇野らは慢性的な社会的ストレスへの暴露は, ミドリザルにおいて胃潰瘍と海馬の変性を引き起こしたと報告している⁴⁰)。MRI 研究においては心的外傷後ストレス障害 (PTSD) の患者の右海馬の容積が減少しており, その海馬容積の減少と言語記憶における機能不全に相関関係があることが報告されている³)。また, Sapolsky らは, 長期に続くストレスの結果としての血中グルココルチコイド値上昇が, 海馬の形態異常と関係していると報告している³⁴⁻³⁶)。加えてラットにおいて幼少期の不良な飼育環境は, 成熟期においてストレスに対する視床下部-下垂体-副腎皮質系の反応

を亢進させることが幾つかの研究で示され^{1,10,12,24,31})、人間においても幼少期の不良な養育環境は思春期・成人期のストレス脆弱性を形成し, うつ病などのストレス関連性の疾患の発症を促進すると報告されている^{7,30})。同様にストレス性精神障害に関する幾つかの脳画像研究から, 幼少期に不良な養育環境に曝された成人期のうつ病患者や PTSD 患者では, 幼少期に不幸な体験のない患者と比較して海馬容積が減少する可能性が報告されている^{4,41})。更に Huot らは幼弱期のラットでのストレスやグルココルチコイドへの暴露が, 成熟期の海馬の萎縮や記憶学習機能の障害に関連していることを見出している¹⁰)。

その一方で, ストレスに対する生体反応においてはカテコラミンが副腎髄質, 交感神経節だけでなく, 中

中枢神経系においても遊離され、重要な働きをしている³³⁾。母子分離ストレスにおいても、中枢神経系のカテコラミン系機能に短期¹⁴⁾または長期^{15,22,23)}の変化が起こることが知られている。例えば、母子分離は視床下部の室傍核で拘束ストレスに対するノルアドレナリン (NA) 応答を増大させる²⁰⁾。しかしながら、母子分離による内分泌機能の変化と海馬に関する研究に比較して、カテコラミン系機能の変化と海馬に関する報告は少ない。従って今回著者は母子分離ストレスのカテコラミン系シグナル伝達への影響を調べる目的で、海馬を対象に母子分離の NA 刺激性細胞内カルシウム ($[Ca^{2+}]_i$) 動員への影響やアドレナリン受容体発現への影響を測定した。また、良好な飼育環境は空間記憶と海馬における神経新生を改善し^{16,28)}、母子分離による視床下部-下垂体-副腎皮質系のストレス応答やストレスへの行動反応の変化を回復する⁶⁾と報告されている。そのため本実験においても母子分離による変化が、良好な飼育環境下で回復するか否かを検討した。

方 法

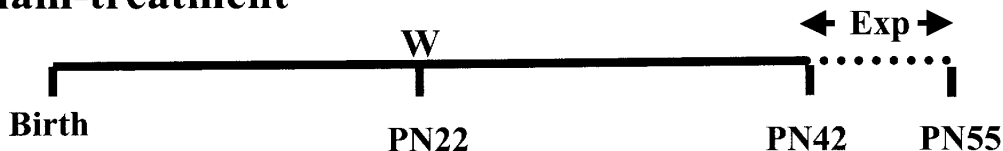
動物

妊娠後期 Sprague-Dawley ラットを日本チャールズリバーから購入した。ラットは個々に飼育し、 23 ± 2 °C の室温下、60% の湿度、12時間毎の明期と暗期の環境下に置き、餌と水は自由に与えた。1匹の妊娠ラットから産まれた子ラットの数¹³⁾が13匹以上の場合は12匹のみ実験に使用し、11匹以下の場合は実験に使用しなかった。

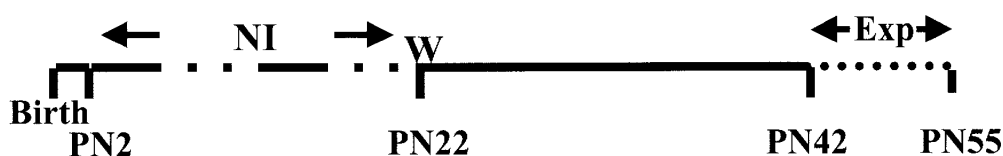
離乳前の飼育環境

母子分離ストレスを受けていない母ラットと仔ラットには、離乳以外の処置は行わなかった。母子分離ストレスは Kehoe らの方法に従って行った¹³⁾。仔ラットは生後2日から22日目まで1日1時間、母親、同胞の仔ラット、飼育ケージから離し、個々の円筒形容器においた。全ての実験群において母親と12匹の仔ラットは $38 \times 23 \times 20$ cm の半透明なプラスチックの飼育ケージの中で離乳時まで飼育した。

A. Sham-treatment



B. Neonatal isolation (NI)



C. Neonatal isolation + Environmental enrichment (EE)

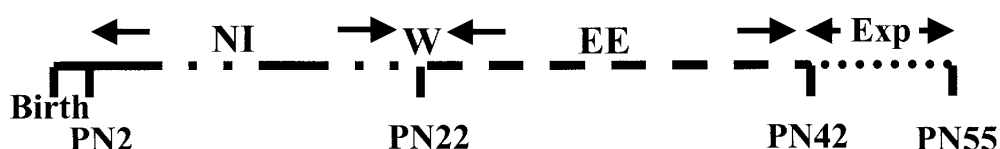


Fig. 1. Animal treatment procedures.

(A) Sham-treated animals were left entirely untreated and sacrificed on post-natal (PN) Days 42-55. (B) Pups were isolated from the dam, nest, and siblings for one hour per day on PN Days 2-22 and sacrificed on PN Days 42-55. (C) After the isolation, animals were placed under the condition of environmental enrichment (EE) on PN Days 22-42 and sacrificed on PN Days 42-55. W: weaning, Exp: experiment.

離乳後の飼育環境

離乳後（生後22日目）、雄ラットのみを選んだ。全ての雄ラットは3匹ずつ分け、38×23×20 cmの半透明なプラスチックのケージで飼育した。非母子分離群には離乳後も、何らの処置をしなかった（Fig. 1A）。母子分離ストレスを処置した群はランダムに2つの群に振り分けた。1つの群は離乳後、無処置とした（Fig. 1B）。もう1つの群は離乳後、良好な環境下で飼育した（Fig. 1C）。良好な飼育環境下では回し車やチューブ等の玩具を数個設置し、玩具は定期的に取り替えた。良好な飼育環境下のケージの大きさや食物等の条件は、他の群と同一とした。ラットは生後、42日目から55日目に断頭した。全ての群で断頭の平均は生後49日目であった。全ての研究は広島大学動物実験指針に基づき行った。

細胞内カルシウム濃度測定

細胞内カルシウム濃度測定は工藤らの方法によって行った¹⁹⁾。ラット断頭後、両側海馬を取り出し、氷冷した人工脳脊髄液に浸し、10分間保持した。人工脳脊髄液の組成は（in mM）塩化ナトリウム：124.0、塩化カリウム：2.5、塩化カルシウム：2.0、塩化マグネシウム：1.0、リン酸二水素ナトリウム：1.25、重炭酸ナトリウム：26.0、グルコース：10.0であり、O₂ 95%、CO₂ 5%の混合ガスで常に通気した。次に摘出した海馬を300 μmの厚さに切り、37°Cの人工脳脊髄液に30分間保持した後、10 μMのカルシウム蛍光色素のfura-2AMと1 μMのCremophoreELを溶解した37°Cの人工脳脊髄液で60分間処置した。その後スライスを2回人工脳脊髄液で洗浄し、再度30分間37°Cの人工脳脊髄液に保持した。細胞内カルシウム濃度の測定時は薄いカバーガラスとプラスチック壁で作成したチャンバーにスライスを載せ、ネットを張った白金で固定、チャンバー内は絶えず人工脳脊髄液（37°C、3 ml/min）で還流した。NAは人工脳脊髄液に溶解、チャンバーに還流した。細胞内カルシウム濃度の測定（F₃₄₀/F₃₈₀）はニコンの倒立蛍光顕微鏡で20×10倍の倍率で行った。CCDカメラは浜松ホトニクス社のC-2000、イメージプロセッサは浜松ホトニクス社のArgus 50を用いた。

免疫組織染色

断頭後、細胞内カルシウム濃度測定時のスライスの状態を再現するために、氷冷した人工脳脊髄液に脳を10分間浸し、人工脳脊髄液に90分間保持した後、-80°Cで凍結した。クリオスタットで15 μmの脳切片を作成、スライド上で解凍し、4%パラホルムアルデヒドで5分間固定した。切片はPBT（Phosphate buff-

ered saline, 0.1% TritonX-100）で2回洗浄し、3% H₂O₂に浸漬して、内因性ペルオキシダーゼを失活させ、更にPBTで2回洗浄した。10% sheep serumを添加したPBTを切片に室温で60分間反応させてブロッキングした後、ゴート抗アドレナリン受容体抗体（抗α_{1A}-、抗α_{1B}-、抗α_{1D}-アドレナリン受容体抗体）の希釈抗体（1：1000）と4°Cで一晩反応させた。翌日、PBTで4回洗浄した後、1：1000で希釈した抗ゴートIgG抗体と室温で180分間反応させた。切片をPBTで4回洗浄し、発色基質溶液のDAB（3,3'-diaminobenzidine）を反応させ、ニコンデジタルビデオアナライザーを用いて抗α_{1A}-、抗α_{1B}-、抗α_{1D}-アドレナリン受容体の免疫組織染色のシグナルを観察した。定量分析のため、1切片あたり、100×50 μmのフィールドを7個設定し、抗α_{1A}-、抗α_{1B}-、抗α_{1D}-アドレナリン抗体陽性の神経細胞数をカウントし、7個のフィールドの平均値を個々のラットの代表値として用いた。

データ解析

統計学的検討は各群間でマン-ホイットニーのU検定を用いて行った。有意水準はp < 0.05とした。

結 果

Fig. 2にラット海馬スライスの模式図を示した。Fig. 2Aは海馬CA（Cornu Ammonis）3錐体細胞層において100 μM NA投与前の細胞内カルシウム濃度と、投与中、細胞内カルシウム濃度がピークに達した時点での擬似イメージ表示を示した。同様にFig. 2Bは海馬歯状回顆粒細胞層における擬似イメージ表示を示した。NAをチャンバーに還流させた後、海馬歯状回顆粒細胞層において細胞内カルシウム濃度は急速に上昇し、約70秒後にピーク値に達し、その後、NA還流前の状態へと戻った（Fig. 3A）。更に海馬歯状回顆粒細胞層において1 μM ~ 10 mMの濃度のNAで刺激を行ったところ、ほぼ100 μMで細胞内カルシウム濃度増加は飽和状態に達していた（Fig. 3B）。このため以後の実験はNA 100 μMの濃度で行った。NAによる細胞内カルシウム濃度増加に関するアドレナリンレセプター

海馬でのNA刺激に関与しているアドレナリンレセプターを明らかにする目的で、アドレナリン受容体拮抗薬のNAの細胞内カルシウム上昇作用に対する影響（Table 1）とアドレナリン受容体作動薬の効果（Table 2）を調べた。小林ら¹⁸⁾や岡本ら²⁹⁾のラット脳スライスを用いた文献に基づき、至適濃度を考慮したうえで全ての拮抗薬、作動薬の実験は全て100 μMの濃度で行った。拮抗薬の実験では100 μMのアドレ

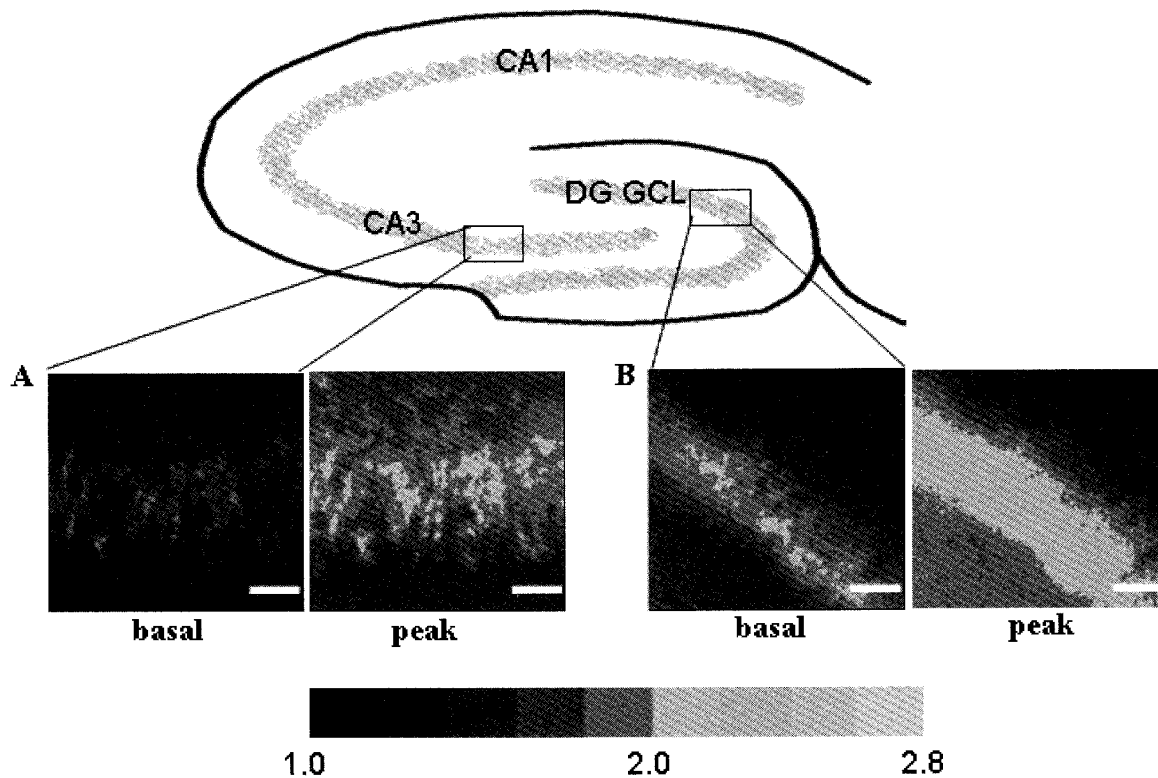


Fig. 2. An illustration of a rat hippocampal slice.

Alterations in $[Ca^{2+}]_i$ in the dentate gyrus granule cell layer (DG GCL) and the CA3 pyramidal cell layer were measured. The pseudo-color coding represents F_{340}/F_{380} ratio. (A) Pseudo-color coding of the basal and peak $[Ca^{2+}]_i$ induced by the administration of $100 \mu M$ noradrenaline (NA) to the CA3 pyramidal cell layer. (B) Similarly, the basal and peak $[Ca^{2+}]_i$ induced by the administration of $100 \mu M$ NA to the DG GCL. The scale bars represent $100 \mu m$.

Table 1. Effect of antagonists of adrenergic receptors on the $[Ca^{2+}]_i$ response in the dentate gyrus granule and CA3 pyramidal cell layers

	DG GCL (% of noradrenaline)		CA3 PCL (% of noradrenaline)	
<i>Noradrenaline</i>	100.0 ± 7.1		100.0 ± 4.6	
<i>Prazosin</i>	33.7 ± 2.5*		25.9 ± 2.3*	
<i>Yohimbine</i>	56.6 ± 10.1		71.5 ± 12.9	
<i>Propranolol</i>	71.9 ± 1.4		76.2 ± 14.1	

$100 \mu M$ of noradrenaline was applied in the presence of $100 \mu M$ of α_1 -, α_2 - and β -adrenergic antagonists. Data were collected from 3-6 animals per group, and expressed as means ± SEMs.

* $p < 0.05$, compared to noradrenaline (Mann-Whitney U test).

DG GCL: Dentate gyrus granule cell layer, CA3 PCL: CA3 pyramidal cell layer.

Table 2. Effect of agonists of adrenergic receptors on the $[Ca^{2+}]_i$ response in the dentate gyrus granule and CA3 pyramidal cell layers

	DG GCL (% of noradrenaline)		CA3 PCL (% of noradrenaline)	
<i>Noradrenaline</i>	100.0 ± 7.1		100.0 ± 4.6	
<i>Phenylephrine</i>	64.8 ± 4.1*		65.0 ± 3.7*	
<i>Clonidine</i>	30.7 ± 1.4*		43.9 ± 4.8*	
<i>Isoproterenol</i>	41.1 ± 6.0*		43.8 ± 10.2*	

The effects of $100 \mu M$ of α_1 -, α_2 - and β -adrenergic agonists on $[Ca^{2+}]_i$ were examined in the DG GCL and CA3 PCLs. Data were collected from 3-6 animals per group, and expressed as means ± SEMs.

* $p < 0.05$, compared to noradrenaline (Mann-Whitney U test).
DG GCL: Dentate gyrus granule cell layer, CA3 PCL: CA3 pyramidal cell layer.

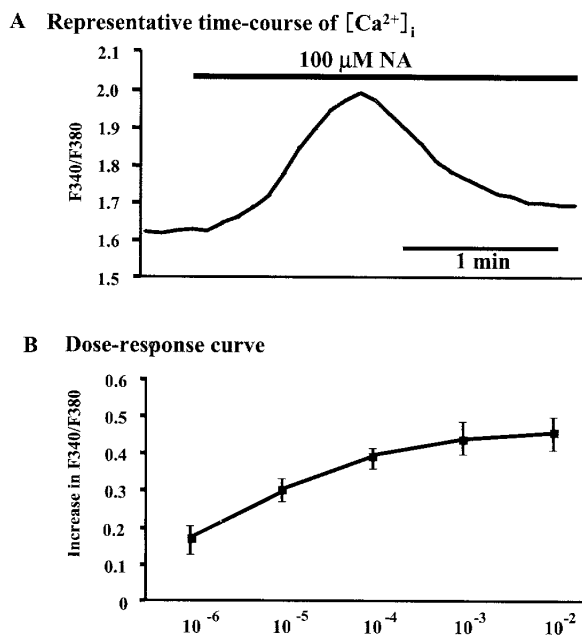


Fig. 3. (A) The representative time-course of the $[Ca^{2+}]_i$ induced by the administration of $100 \mu M$ noradrenaline (NA) in the dentate gyrus granule cell layer. (B) The influence of various concentrations of NA on $[Ca^{2+}]_i$ in the dentate gyrus granule cell layer. The $[Ca^{2+}]_i$ increment induced by the administration of NA altered in a concentration-dependent manner. The results show the means \pm SEMs from 6 rats per group.

ナリンレセプター拮抗薬の存在下に $100 \mu M$ の NA を還流した。 α_1 -アドレナリン受容体拮抗薬である $100 \mu M$ のプラゾシンの前処置により、歯状回顆粒細胞層と CA3 錐体細胞層において、NA に対する細胞内カルシウム濃度の上昇が有意に減少した。 α_2 -アドレナリン受容体拮抗薬である $100 \mu M$ のヨヒンビン、また β -アドレナリン受容体拮抗薬である $100 \mu M$ のプロ

プラノロールの前処置により、歯状回顆粒細胞層と CA3 錐体細胞層において NA に対する細胞内カルシウム濃度の上昇は軽度であるが減少した。

次に歯状回顆粒細胞層と CA3 錐体細胞層において、 α_1 -、 α_2 -、 β -アドレナリン受容体作動薬の細胞内カルシウム濃度に対する影響を調べた。 α_1 -アドレナリン受容体作動薬である $100 \mu M$ のフェニレフリンは、歯状回顆粒細胞層と CA3 錐体細胞層において著しく細胞内カルシウム濃度を上昇させた。フェニレフリンよりも上昇作用は弱かったが、 α_2 -アドレナリン受容体作動薬である $100 \mu M$ のクロニジンと、 β -アドレナリン受容体作動薬である $100 \mu M$ のイソプロテレノールも、歯状回顆粒細胞層と CA3 錐体細胞層において細胞内カルシウム濃度を上昇させた。ここで用いられた3つの作動薬による細胞内カルシウム濃度上昇作用は、 $100 \mu M$ の NA による上昇作用より有意に低かった。

これらの結果は α_1 -、 α_2 -、 β -アドレナリン受容体は全て NA によって引き起こされる細胞内カルシウム濃度上昇の機序に関与しているが、 α_1 -アドレナリン受容体の活性化がこの機序に最も関わっていることを示している。

NA 刺激性の細胞内カルシウム濃度上昇に与える母子分離の影響

歯状回顆粒細胞層において NA 刺激性の細胞内カルシウム濃度上昇のピーク値は母子分離を受けたラットの海馬スライスで、非母子分離群に比べ有意に減少していた。同様に、CA3 錐体細胞層において NA 刺激性の細胞内カルシウム濃度上昇のピーク値は母子分離を受けたラットの海馬スライスで、非母子分離群に比べ有意に減少していた。CA1 錐体細胞層では両群間で、有意な差は認められなかった (Table 3)。

Table 3. Influence of neonatal isolation and neonatal isolation + environmental enrichment on the noradrenaline-stimulated $[Ca^{2+}]_i$ increase in hippocampus

	Sham (F340/F380 ratio)	NI (F340/F380 ratio)	NI + EE (F340/F380 ratio)
DG Granule cell layer	0.389 \pm 0.027	0.290 \pm 0.027*	0.292 \pm 0.010*
CA1 pyramidal cell layer	0.235 \pm 0.014	0.239 \pm 0.019	0.236 \pm 0.018
CA3 pyramidal cell layer	0.269 \pm 0.012	0.212 \pm 0.011*	0.264 \pm 0.019

The increments of $100 \mu M$ NA-stimulated $[Ca^{2+}]_i$ in the DG granule and CA3 pyramidal cell layers from rats with NI were significantly lower than those from sham-treated rats. The NI-induced decrease was significantly alleviated by EE only in the CA3 pyramidal cell layer. Data were collected from 6 animals per group, and expressed as means \pm SEMs. * $p < 0.05$, compared to Sham (Mann-Whitney U test). NI: neonatal isolation, EE: environmental enrichment.

母子分離ストレスによって減弱した細胞内カルシウム濃度上昇に対する良好な飼育環境の影響

著者は母子分離の影響がその後の良好な飼育環境下で回復するか否かを検討した (Table 3)。母子分離により減弱した NA 刺激性の細胞内カルシウム濃度増加は CA3 錐体細胞層では良好な飼育環境下で回復したが、歯状回顆粒細胞層では回復しなかった。NA 刺激性の細胞内カルシウム濃度増加は、CA1 錐体細胞層では母子分離後の良好な飼育環境によって変化しなかった。

母子分離の α_1 -アドレナリン受容体発現への影響

次に著者は NA による細胞内カルシウム濃度増加

が母子分離ストレスによって減弱された機序を調べるため、免疫組織染色法を用いて3種類の α_1 -アドレナリンサブタイプの発現の母子分離による変化を検討した。代表的な α_{1A} -アドレナリン受容体の免疫組織染色像を、歯状回顆粒細胞層 (Fig. 4) と CA3 錐体細胞層 (Fig. 5) について示した。また、 α_{1A} -, α_{1B} -, α_{1D} -アドレナリン受容体の発現に関する定量的データを Table 4 に示した。母子分離ストレスは歯状回顆粒細胞と CA3 錐体細胞層において、 α_{1A} -, α_{1B} -, α_{1D} -の3つのアドレナリン受容体のどのサブタイプ発現にも影響しなかった。

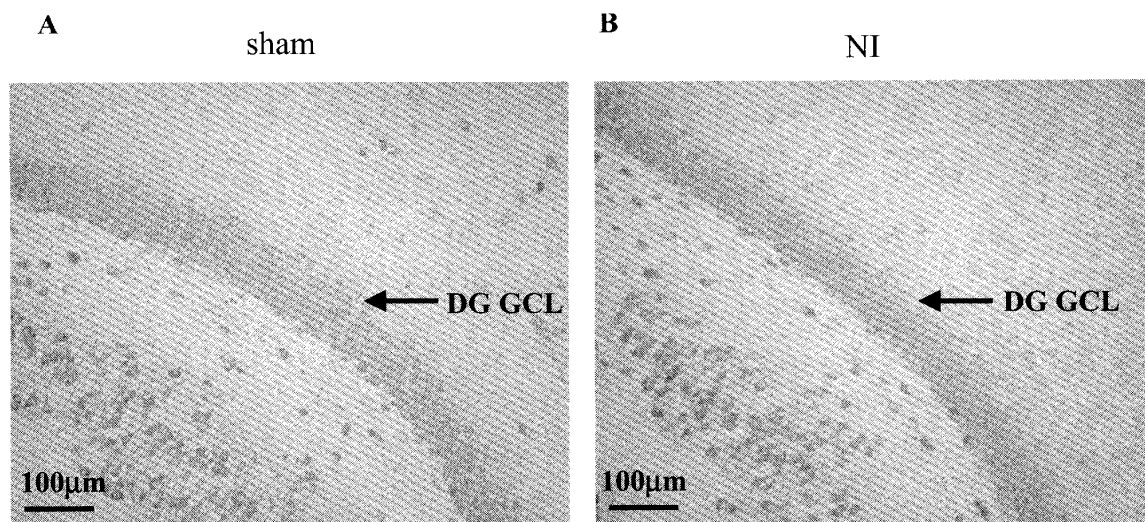


Fig. 4. Influence of neonatal isolation on the expression of α_1 -AR in the dentate gyrus granule cell layer (DG GCL) by immunohistochemical analysis.

Representative immunohistochemical stains of α_{1A} -AR in the DG GCL are shown; A: sham. B: NI.

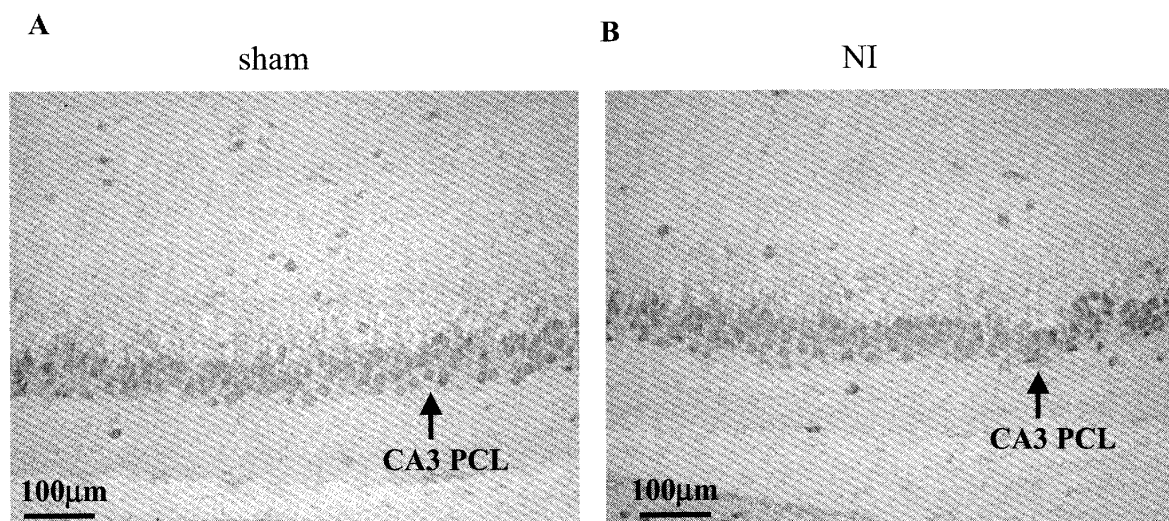


Fig. 5. Influence of neonatal isolation on the expression of α_1 -AR in the CA3 pyramidal cell layer (CA3 PCL) by immunohistochemical analysis.

Representative immunohistochemical stains of α_{1A} -AR in the CA3 PCL are shown; A: sham. B: NI.

Table 4. Influence of neonatal isolation on the expression of α_1 -adrenergic receptors by immunohistochemical analysis

	Sham (No. of cells/ 100 × 50 μ m)	Neonatal isolation (No. of cells/ 100 × 50 μ m)
<i>α_{1A}-adrenergic receptor</i>		
DG Granule cell layer	23.8 ± 1.2	25.6 ± 1.6
CA3 pyramidal cell layer	6.8 ± 0.3	7.7 ± 0.4
<i>α_{1B}-adrenergic receptor</i>		
DG Granule cell layer	24.5 ± 2.0	26.3 ± 1.9
CA3 pyramidal cell layer	6.9 ± 0.4	7.4 ± 0.3
<i>α_{1D}-adrenergic receptor</i>		
DG Granule cell layer	23.0 ± 1.2	24.7 ± 1.2
CA3 pyramidal cell layer	8.4 ± 0.6	8.3 ± 0.6

The number of immunoreactive neurons detected by the anti- α_{1A} , α_{1B} and α_{1D} -AR antibodies was counted in a series of 7 consecutive 100 × 50 μ m fields per section. The mean values were taken as the representative values from each animal. Values are means ± SEMs from 6 animals per group.

考 察

NA 刺激による細胞内カルシウム濃度亢進の機序

アドレナリン受容体拮抗薬、作動薬を用いた検討で NA による細胞内カルシウム濃度の上昇には α_2 -, β - アドレナリン受容体の関与も一部あるが、 α_1 - アドレナリン受容体が主として関わっていた。これらの結果は以前の報告と一致している^{18,29)}。

α_1 -アドレナリン受容体を介した細胞内カルシウム濃度の上昇は小胞体等の細胞内のコンパートメントからの放出だけではなく、細胞外からのカルシウムの流入促進も関与している²⁵⁾。 α_1 -アドレナリン受容体を刺激すると G-プロテインを介してホスホリパーゼ C (PLC) の活性化を引き起こし、更に PLC はフォスファチジルイノシトール (4, 5) ニリン酸 (PIP₂) を加水分解し、イノシトール (1, 4, 5) 三リン酸 (IP₃) を産生する²⁶⁾。IP₃ は小胞体の特異的受容体に結合し、IP₃ 受容体を通して細胞内カルシウム濃度を上昇させる²⁾。また、 α_1 -アドレナリン受容体を介した細胞外からのカルシウム流入は電位依存性と電位非依存性カルシウムチャネルを介していることが示唆されている²⁵⁾。このように NA による細胞内カルシウム上昇には α_1 -アドレナリン受容体を介した 2 つの異なったシグナル伝達機構が関わっているため、今後は、NA による細胞内カルシウム上昇に対して細胞内小胞体に貯蔵されているカルシウムと細胞外のカルシウムがどの程度の割合で関わっているかを明らかにすることが必要である。

今回の実験で、 α_2 -, β - アドレナリン受容体刺激により細胞内カルシウム濃度が上昇した。機序としては α_2 -, β - アドレナリン受容体の活性化により電位依存性カルシウムチャネルの開閉を促進し、細胞外からカルシウムが流入すること^{5,21)} が考えられる。また、 β - アドレナリン受容体刺激によりサイクリック AMP、プロテインキナーゼ A (PKA) が活性化し、IP₃ 受容体をリン酸化することで α_1 - アドレナリン受容体—PLC—IP₃ 系との相乗的なクロストークが生じ、 α_1 - アドレナリン受容体活性化に伴う細胞内のコンパートメントからのカルシウム放出を促進する³⁹⁾ ことが報告されている。

母子分離ストレスが NA 刺激性細胞内カルシウム濃度上昇を減弱させる機序と意義

今回の検討で歯状回顆粒細胞層と CA3 錐体細胞層において NA 刺激性の細胞内カルシウム濃度上昇は母子分離により減弱された。すでに考察したように NA 刺激性の細胞内カルシウム濃度上昇には α_2 -, β - アドレナリン受容体も関与しているが α_1 - アドレナリン受容体が中心的な役割を担っている。したがって本研究において著者は母子分離ストレスが NA 刺激性細胞内カルシウム濃度上昇を減弱させる機序が α_1 -アドレナリン受容体発現のダウンレギュレーションであるという仮説を立てた。従来はラジオリガンド (³H]-プラゾシンや ³H]-WB 4101 など) が、 α_1 - アドレナリン受容体の分布を推定するのに用いられてきた⁴³⁾。しかしラジオリガンドは 3 つの α_1 - アドレナリン受容体サブタイプに特異的ではなく、また、これらのサブ

タイプの発現はストレスによって個々に制御される可能性がある。現在は3つの α_1 -アドレナリン受容体サブタイプに対する特異的抗体が入手可能なので、今回著者はこれらの抗体を用いて免疫組織染色を行った。結果、母子分離ストレスにより歯状回顆粒細胞とCA3錐体細胞層において α_{1A} -, α_{1B} -, α_{1D} -の3つのアドレナリン受容体のいずれのサブタイプ発現も変化しなかった。従って、母子分離によって α_1 -アドレナリン受容体発現のダウンレギュレーションが起こり、NA刺激性の細胞内カルシウム濃度上昇が減弱するという仮説は否定的である。しかしながら電位依存性カルシウムチャンネルや細胞内小胞体のIP₃受容体等の、 α_1 -アドレナリン受容体以後の経路やその他の経路のダウンレギュレーションが母子分離によるNA刺激性の細胞内カルシウム濃度上昇の減弱に関与している可能性は否定できず、今後の検討が必要である。

NAはラット海馬において長期増強を促進し¹¹⁾、 α_1 -アドレナリン受容体刺激はラットの空間学習を促進する³²⁾。また、細胞内カルシウム濃度の調節は記憶形成などに関与しているカルシウム/カルモジュリン依存性蛋白キナーゼ (CaMK) II やサイクリックAMP反応性エレメント結合蛋白 (CREB)^{17,37,38)}のリン酸化に関与している。従って海馬においてNA刺激性の細胞内カルシウム濃度上昇が減弱されたという今回の結果は、母子分離によりラットの空間学習機能の障害が引き起こされる¹⁰⁾ 機序に関係しているのかもしれない。他方、Nメチル-D-アスパルギン酸 (NMDA) 受容体が長期増強を引き起こすのに不可欠な細胞内カルシウム濃度を調整することはよく知られており、今後、母子分離による記憶機能の障害のメカニズムを明らかにしていく上で、NMDA受容体を介した細胞内カルシウム濃度への母子分離の影響を検討する必要がある。

母子分離によるNA刺激性の細胞内カルシウム濃度上昇の減弱への良好な飼育環境の影響

Francisらは母子分離によるラットの視床下部-下垂体-副腎皮質系のストレス応答やストレスへの行動反応の変化が、母子分離後に良好な環境下で飼育することで回復することを見出した⁶⁾。著者もまた、母子分離により減弱したNA刺激性の細胞内カルシウム濃度増加が、良好な飼育環境によって回復するか否かを海馬で調べた。母子分離により減弱したNA刺激性の細胞内カルシウム濃度上昇はCA3錐体細胞層では良好な飼育環境によって回復したが、歯状回顆粒細胞層では回復しなかった。良好な飼育環境が母子分離による変化にどのような機序で影響を与えるのかまだ報告がなく、今回の結果に関しても今後の検討が必要である。

飼育環境がNA刺激性細胞内カルシウム情報系に及ぼす海馬での部位的差異に関する考察

今回の研究では、飼育環境の変化によるNA刺激性細胞内カルシウム情報系の変化に関する海馬での部位的差異が明らかになった。具体的には、CA1錐体細胞層ではNA刺激性の細胞内カルシウム濃度上昇は母子分離により変化しなかった。CA3錐体細胞層において、NA刺激性の細胞内カルシウム濃度上昇は母子分離により減弱したが、良好な環境下で飼育することでこの減弱は回復した。歯状回顆粒細胞層において、NA刺激性の細胞内カルシウム濃度上昇は母子分離により減弱し、良好な環境下で飼育した後もこの減弱は回復しなかった (Table 5)。本研究の結果はNAを介した細胞内カルシウム依存性のシグナル、例えばCaMK等の活動が1) CA1錐体細胞層では飼育環境 (母子分離-良好な環境) の変化を受けにくい、2) 母子分離により抑制されやすい部位は歯状回顆粒細胞層とCA3錐体細胞層である、3) 母子分離後の良好な環境下で歯状回顆粒細胞層では回復しないが、CA3錐体

Table 5. Summary of the influence of neonatal isolation and neonatal isolation + environmental enrichment on the noradrenaline-stimulated $[Ca^{2+}]_i$ increase in different hippocampal regions

	NI	NI + EE
DG Granule cell layer	↓	➡
CA1 pyramidal cell layer	➡	➡
CA3 pyramidal cell layer	↓	↑

NI: neonatal isolation, EE: environmental enrichment.

↑: the significant increment in the noradrenaline-stimulated $[Ca^{2+}]_i$ increase.

↓: the significant decrease in the noradrenaline-stimulated $[Ca^{2+}]_i$ increase.

➡: the no-significant alteration in the noradrenaline-stimulated $[Ca^{2+}]_i$ increase.

細胞層では回復する，等のことを示唆している。

ま と め

歯状回顆粒細胞層と CA3 錐体細胞層において，NA 刺激性の細胞内カルシウム濃度上昇は母子分離により減弱した。また，良好な環境下で飼育することでこの減弱は CA3 錐体細胞層では回復したが，歯状回顆粒細胞層では回復しなかった。本研究の結果は母子分離や良好な飼育環境といった生後の生育環境によって NA 刺激性の細胞内カルシウム動員が変化し，海馬機能が修飾される可能性を示唆している。

謝 辞

稿を終えるにあたり，ご指導，御高閲を賜りました山脇成人教授に深甚なる謝意を捧げます。また，直接懇意なる御指導を賜った森信繁助教授に深謝いたします。更に本研究に当たりご協力，ご援助頂きました長寿科学振興財団リサーチレジデントの川野樹一朗先生，広島国際大学医療福祉学部医療福祉学科加賀谷有行教授，広島市民病院精神科日域広昭先生，瀬野川病院倉田健一先生に心より感謝いたします。

参 考 文 献

1. **Anisman, H., Zaharia, M.D., Meaney, M.J. and Merali, Z.** 1998. Do early-life events permanently alter behavioral and hormonal responses to stressors? *Int. J. Dev. Neurosci.* 16: 149-164.
2. **Berridge, M.J.** 1993. Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* 361: 315-325.
3. **Bremner, J.D., Randall, P., Scott, T.M., Bronen, R.A., Seibyl, J.P., Southwick, S.M., Delaney, R.C., McCarthy, G., Charney, D.S. and Innis, R.B.** 1995. MRI-based measurement of hippocampal volume in patients with combat-related posttraumatic stress disorder. *Am. J. Psychiatry* 152 : 973-981.
4. **Bremner, J.D., Vythilingam, M., Vermetten, E., Southwick, S.M., McGlashan, T., Nazeer, A., Khan, S., Vaccarino, L.V., Soufer, R., Garg, P.K., Ng, C.K., Staib, L.H., Duncan, J.S. and Charney, D.S.** 2003. MRI and PET study of deficits in hippocampal structure and function in women with childhood sexual abuse and posttraumatic stress disorder. *Am. J. Psychiatry* 160 : 924-932.
5. **Bylund, D.B., Eikenberg, D.C., Hieble, J.P., Langer, S.Z., Lefkowitz, R.J., Minneman, K.P., Molinoff, P.B., Ruffolo, R.R. and Trendelenburg, U.** 1994. International Union of Pharmacology nomenclature of adrenoceptors. *Pharmacol. Rev.* 46 : 121-136.
6. **Francis, D.D., Diorio, J., Plotsky, P.M. and Meaney, M.J.** 2002. Environmental enrichment reverses the effects of maternal separation on stress reactivity. *J. Neurosci.* 22 : 7840-7843.
7. **Gilmer, W.S. and McKinney, W.T.** 2003. Early experience and depressive disorders: human and non-human primate studies. *J. Affect. Disord.* 75 : 97-113.
8. **Gould, E., McEwen, B.S., Tanapat, P., Galea, L.A. and Fuchs, E.** 1997. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. *J. Neurosci.* 17 : 2492-2498.
9. **Gould, E., Tanapat, P., McEwen, B.S., Flugge, G. and Fuchs, E.** 1998. Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 95 : 3168-3171.
10. **Huot, R.L., Plotsky, P.M., Lenox, R.H. and McNamara, R.K.** 2002. Neonatal maternal separation reduces hippocampal mossy fiber density in adult Long Evans rats. *Brain Res.* 950 : 52-63.
11. **Izumi, Y. and Zorumski, C.F.** 1999. Norepinephrine promotes long-term potentiation in the adult rat hippocampus in vitro. *Synapse* 31 : 196-202.
12. **Kalinichev, M., Easterling, K.W., Plotsky, P.M. and Holtzman, S.G.** 2002. Long-lasting changes in stress-induced corticosterone response and anxiety-like behaviors as a consequence of neonatal maternal separation in Long-Evans rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 73 : 131-140.
13. **Kehoe, P. and Bronzino, J.D.** 1999. Neonatal stress alters LTP in freely moving male and female adult rats. *Hippocampus* 9 : 651-658.
14. **Kehoe, P., Clash, K., Skipsey, K. and Shoemaker, W.J.** 1996. Brain dopamine

- response in isolated 10-day-old rats: assessment using D2 binding and dopamine turnover. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 53 : 41-49.
15. **Kehoe, P., Shoemaker, W.J., Triano, L., Hoffman, J. and Arons, C.** 1996. Repeated isolation in the neonatal rat produces alterations in behavior and ventral striatal dopamine release in the juvenile after amphetamine challenge. *Behav. Neurosci.* 110 : 1435-1444.
 16. **Kempermann, G., Kuhn, H.G. and Gage, F.H.** 1997. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 386 : 493-495.
 17. **Kida, S., Josselyn, S.A., de Ortiz, S.P., Kogan, J.H., Chevere, I., Masushige, S. and Silva, A.J.** 2002. CREB required for the stability of new and reactivated fear memories. *Z Neuroscience* 5 : 348-355.
 18. **Kobayashi, M., Imamura, K., Kaub, P.A., Nakadate, K. and Watanabe, Y.** 1999. Developmental regulation of intracellular calcium by N-methyl-D-aspartate and noradrenaline in rat visual cortex. *Neuroscience* 92 : 1309-1322.
 19. **Kudo, Y., Ito, K., Miyakawa, H., Izumi, Y., Ogura, A. and Kato, H.** 1987. Cytoplasmic calcium elevation in hippocampal granule cell induced by perforant path stimulation and L-glutamate application. *Brain Res.* 407 : 168-172.
 20. **Liu, D., Caldji, C., Sharma, S., Plotsky, P.M. and Meaney, M.J.** 2000. Influence of neonatal rearing conditions on stress-induced adrenocorticotropin responses and norepinephrine release in the hypothalamic paraventricular nucleus. *J. Neuroendocrinol.* 12 : 5-12.
 21. **MacVicar, B.A. and Tse, F.W.** 1988. Norepinephrine and cyclic adenosine 3':5'-cyclic monophosphate enhance a nifedipine-sensitive calcium current in cultured rat astrocytes. *Glia* 1 : 359-365.
 22. **Matthews, K., Dalley, J.W., Matthews, C., Tsai, T.H. and Robbins, T.W.** 2001. Periodic maternal separation of neonatal rats produces region- and gender-specific effects on biogenic amine content in postmortem adult brain. *Synapse* 40: 1-10.
 23. **McCormick, C.M., Kehoe, P., Mallinson, K., Cecchi, L. and Frye, C.A.** 2002. Neonatal isolation alters stress hormone and mesolimbic dopamine release in juvenile rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 73: 77-85.
 24. **Meaney, M.J., Diorio, J., Francis, D., Widdowson, J., LaPlante, P., Caldji, C., Sharma, S., Seckl, J.R. and Plotsky, P.M.** 1996. Early environmental regulation of forebrain glucocorticoid receptor gene expression: implications for adrenocortical responses to stress. *Dev. Neurosci.* 18 : 49-72.
 25. **Minneman, K.P.** 1988. Alpha 1-adrenergic receptor subtypes, inositol phosphates, and sources of cell Ca²⁺. *Pharmacol. Rev.* 40 : 87-119.
 26. **Minneman, K.P. and Esbenshade, T.A.** 1994. Alpha 1-adrenergic receptor subtypes. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 34 : 117-133.
 27. **Nakano, T., Wenner, M., Inagaki, M., Kugaya, A., Akechi, T., Matsuoka, Y., Sugahara, Y., Imoto, S., Murakami, K. and Uchitomi, Y.** 2002. Relationship between distressing cancer-related recollections and hippocampal volume in cancer survivors. *Am. J. Psychiatry* 159 : 2087-2093.
 28. **Nilsson, M., Perfilieva, E., Johansson, U., Orwar, O. and Eriksson, P.S.** 1999. Enriched environment increases neurogenesis in the adult rat dentate gyrus and improves spatial memory. *J. Neurobiol.* 39 : 569-578.
 29. **Okamoto, Y., Kagaya, A., Motohashi, N. and Yamawaki, S.** 1995. Inhibitory effects of lithium ion on intracellular Ca²⁺ mobilization in the rat hippocampal slices. *Neurochem. Int.* 26 : 233-238.
 30. **Pine, D.S. and Cohen, J.A.** 2002. Trauma in children and adolescents: risk and treatment of psychiatric sequelae. *Biol. Psychiatry* 51 : 519-531.
 31. **Plotsky, P.M. and Meaney, M.J.** 1993. Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-in-

- duced release in adult rats. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 18 : 195-200.
32. **Puumala, T., Greijus, S., Narinen, K., Haapalinna, A., Riekkinen, P. and Sirvio, J.** 1998. Stimulation of alpha-1 adrenergic receptors facilitates spatial learning in rats. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 8 : 17-26.
33. **Sabban, E.L. and Kvetnansky, R.** 2001. Stress-triggered activation of gene expression in catecholaminergic systems: dynamics of transcriptional events. *Trends Neurosci.* 24 : 91-98.
34. **Sapolsky, R.M.** 1996. Why stress is bad for your brain. *Science* 273 : 749-750.
35. **Sapolsky, R.M.** 2000. Glucocorticoids and hippocampal atrophy in neuropsychiatric disorders. *Arch. Gen. Psychiatry* 57 : 925-935.
36. **Sapolsky, R.M., Uno, H., Rebert, C.S. and Finch, C.E.** 1990. Hippocampal damage associated with prolonged glucocorticoid exposure in primates. *J. Neurosci.* 10 : 2897-2902.
37. **Silva, A.J., Paylor, R., Wehner, J.M. and Tonegawa, S.** 1992. Impaired spatial learning in alpha-calcium-calmodulin kinase II mutant mice. *Science* 257 : 206-211.
38. **Silva, A.J., Stevens, C.F., Tonegawa, S. and Wang, Y.** 1992. Deficient hippocampal long-term potentiation in alpha-calcium-calmodulin kinase II mutant mice. *Science* 257 : 201-206.
39. **Tanimura, A., Nezu, A., Tojyo, Y., Matsumoto, Y.** 1999. Isoproterenol potentiates alpha-adrenergic and muscarinic receptor-mediated Ca^{2+} response in rat parotid cells. *Am. J. Physiol.* 276 : C1282-1287.
40. **Uno, H., Tarara, R., Else, J.G., Suleman, M.A. and Sapolsky, R.M.** 1989. Hippocampal damage associated with prolonged and fatal stress in primates. *J. Neurosci.* 9 : 1705-1711.
41. **Vythilingam, M., Heim, C., Newport, J., Miller, A.H., Anderson, E., Bronen, R., Brummer, M., Staib, L., Vermetten, E., Charney, D.S., Nemeroff, C.B. and Bremner, J.D.** 2002. Childhood trauma associated with smaller hippocampal volume in women with major depression. *Am. J. Psychiatry* 159 : 2072-2080.
42. **Watanabe, Y., Gould, E. and McEwen, B.S.** 1992. Stress induces atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3 pyramidal neurons. *Brain Res.* 588 : 341-345.
43. **Zilles, K., Gross, G., Schleicher, A., Schildgen, S., Bauer, A., Bahro, M., Schwendemann, G., Zech, K. and Kolassa, N.** 1991. Regional and laminar distributions of alpha 1-adrenoceptors and their subtypes in human and rat hippocampus. *Neuroscience* 40 : 307-320.

Noradrenaline-Stimulated Intracellular Calcium Increment and the Influence of Neonatal Isolation on its Increment in the Rat Hippocampus

Kouji KUSAKA

Department of Psychiatry and Neurosciences, Division of Frontier Medical Science,
Programs for Biomedical Research, Graduate School of Biomedical Sciences,
Hiroshima University
(Director: Prof. Shigeto YAMAWAKI)

Numerous studies demonstrate that calcium is a major messenger in the intracellular signal transduction, and agonist-stimulated intracellular calcium ($[Ca^{2+}]_i$) increment in the hippocampus plays a pivotal role in the synaptic plasticity. First, we measured the noradrenaline (NA)-mediated $[Ca^{2+}]_i$ increment in adolescent rat hippocampi using the Ca^{2+} sensitive dye, fura-2AM, and fluorescence microscopy. Despite of the involvement of α_2 - and β -adrenergic receptors, α_1 -adrenergic receptors predominantly mediate NA-stimulated $[Ca^{2+}]_i$ increment. Second, we examined the influence of neonatal isolation (NI) on the NA-stimulated $[Ca^{2+}]_i$ increment and the expression of α_1 -adrenergic receptors in adolescent rat hippocampi. As compared to sham-treated rats, the NA-stimulated $[Ca^{2+}]_i$ increment in rats subjected to NI significantly decreased in the CA3 pyramidal and dentate gyrus (DG) granular cell layers in the hippocampus without any changes in the expression of the 3 different α_1 -adrenergic receptor subtypes. Additionally, the administration of environmental enrichment to rats subjected to NI alleviated the downregulation of the NA-stimulated $[Ca^{2+}]_i$ increment in the CA3 pyramidal cell layer but not in the DG granular cell layer. These findings suggest that the NA-mediated hippocampal function may be modulated by various environmental conditions.