

慢性拘束ストレスによる脳内セロトニン代謝 及びセロトニン受容体の変化とイミプラミン, ブスピロンの影響

瀬 良 裕 邦

広島大学医学部神経精神医学教室 (主任: 山脇成人教授)

受付 平成3年9月10日

受理 平成3年10月21日

ラットに1時間(単回)ないし22時間/日の金網拘束ストレスを1日, 3日及び7日間負荷し, ラット脳の3部位(前頭皮質: FC, 視床+視床下部: TH, 延髄+橋: PO)におけるセロトニン代謝及びセロトニン受容体の経時的な変化を検討した。さらに imipramine (10mg/kg, i. p.) と buspirone (5mg/kg, i. p.) を投与し両薬剤の影響も併せて検討し, 以下のような結果を得た。

- 1) 拘束負荷時の 5-HT, 5-HIAA 濃度の経時変化では, 5-HT 濃度は FC, TH で3日目に軽度の増加を認めた。5-HIAA 濃度は3部位で1日目より著明な増加を認めた。増加率は FC, TH では1日目が最大となり, PO では3日目が最大となり, 以後は徐々に減少していった。5-HIAA/5-HT ratio は3部位共に1日目で最大となり, FC, TH では3日目に急減したが, PO では7日目に減少していった。
- 2) 拘束1日および7日負荷後の FC における 5-HT₂受容体及び 5-HT_{1A}受容体の解離定数 (KD), 最大結合数 (Bmax) には変化がなかった。
- 3) Imipramine 単独では急性投与でセロトニン代謝に影響せず, 7日間投与で 5-HIAA 濃度を減少させた。ストレス負荷による 5-HIAA, 5-HIAA/5-HT 上昇に対しては1日目から PO を除いては抑制したが, 7日目では全脳部位で抑制が明らかになった。Buspirone は急性投与ではセロトニン代謝を抑制したが, 1日投与では影響がなく7日投与では拘束ストレスによるセロトニン代謝亢進をさらに増強させた。
- 4) Imipramine は7日間投与で拘束ストレスの有無に関係なく 5-HT₂受容体数を減少させたが, 5-HT_{1A}受容体には影響しなかった。Buspirone は急性投与, 慢性投与のいずれでも 5-HT₂, 5-HT_{1A}受容体に影響しなかった。

以上より拘束ストレス負荷によりセロトニン代謝の亢進が起り, 時間とともに適応状態が成立するが, 投射部位である FC, TH では成立が早く, 起始核を含む PO では成立が遅いことが示された。また, FC の 5-HT_{1A}, 5-HT₂受容体は拘束ストレスによるセロトニン代謝の亢進に影響を受けないことが明らかになった。

Imipramine の抗うつ効果は慢性投与時やストレス負荷時にセロトニン代謝を抑制し, 慢性投与で 5-HT₂受容体を減少させることにより発現すると考えられる。しかし, 最近抗うつ効果を示すと報告されている buspirone は急性投与時にセロトニン代謝を抑制したのみで慢性投与時にはむしろ亢進させ, セロトニン受容体には影響しなかったことより抗うつ効果として共通の作用は見いだせなかった。

Key words : Chronic restraint stress, Serotonin metabolism, Serotonin receptor, Imipramine, Buspirone

うつ病の病因に関してモノアミン仮説は依然重要な位置を占めているが、近年セロトニン神経の関与が指摘され多くの研究がなされてきている。その中で Aprison^ら³⁾により次のような仮説が提唱されている。うつ病患者では素因として慢性的にセロトニン機能の低下状態が存在し、その結果セロトニンシナプス後部受容体は代償的に過感受性化しセロトニン神経伝達は一応正常に保たれている。ところが、何らかのストレスに遭遇しシナプス前部からセロトニンが放出されると、この過感受性化した受容体とあいまってセロトニン伝達の過剰が起こるとする「セロトニン伝達過剰仮説」である。このような仮説を軸にしてセロトニン代謝、抗うつ薬の作用機序、セロトニン受容体等の面から様々な知見が述べられているが相反する報告も多くいまだに一致をみていない。

一方うつ病が何らかのストレスによって誘発されることは多くの臨床的研究によって明らかにされている。そこでこれまで動物に様々なストレスを負荷しうつ病動物モデルを作成しようとする試みがなされてきた⁴⁾が、今までのところ成功しているとは言いがたい。しかしながらストレス負荷時に起こす行動上の障害にはうつ病にみられる症状とよく似た症状があるのも事実である。このためストレス状況下における脳の種々の神経伝達物質やその受容体の変化を測定することは疾病を基本的な形で理解するのに役立つものと思われる。これまで動物に拘束、強制水泳、電撃、寒冷刺激などいろいろな方法でストレスを負荷し研究されてきているが、この中で拘束ストレスは著明な食欲不振と成長低下ともなって行動量の減少と脱糞の増加が起こる。また拘束ストレスは他のストレスより ACTH や oxytocin などの反応を強くおこし⁵⁾、比較的強力なストレスの一つと考えられている。この拘束ストレスによる報告は多いが、いずれも急性期のものが多く、慢性拘束ストレスの報告は意外に少ない。

そこで著者は慢性拘束ストレス下における脳内セロトニン代謝、セロトニン受容体 (5-HT_{1A}, 5-HT₂) の変動について検討した。また、抗うつ剤 (imipramine), 5-HT_{1A} 受容体のパーシャルアゴニストである buspirone を投与してセロトニン代謝、セロトニン受容体に対する影響を調べた。

方 法

1. 拘束ストレスモデルの作成

Wistar 系雄性ラット 150 g-200 g を用い、40×40 cm, 3 mm 目の四角の金網を折り曲げて四角錐を作り、その中にラットを入れた後ラットのサイズに合わ

せて金網を曲げて固定し、拘束ストレスを負荷した。拘束ストレスは1日22時間続け、14:00-16:00の2時間解放して餌と水を与えた。対照群として餌と水を自由に摂取した群を用いた。拘束期間を1日、3日、7日の三群を作成し、各々に対照群をとった。

また、上記のストレスに暴露したラットに imipramine (10 mg/kg, i. p.), buspirone (5 mg/kg, i. p.) を朝、夕2回投与しセロトニン代謝、セロトニン受容体に対する影響を調べた。対照群には生理食塩水を投与した。セロトニン代謝は前頭皮質 (FC), 視床+視床下部 (TH), 延髄+橋 (PO) の3部位で測定し、セロトニン受容体については前頭皮質 (FC) のみ測定した。また、薬物 (imipramine, buspirone) の急性効果を検討するため単回投与後1時間の拘束実験を併せて行った。

2. 脳の切り出し方法

ストレス負荷終了直後すなわち14:00-16:00の間に断頭し、Glowinski らの方法¹⁶⁾に従い、氷上にて前頭皮質 (FC), 視床+視床下部 (TH), 延髄+橋 (PO) の3部位を切り出した。一部は高速液体クロマトグラフィーによるセロトニンの測定に用い、残りは-80℃で冷凍し、binding assay に用いた。

3. 高速液体クロマトグラフィーによる脳内モノアミンの測定

氷冷下にとりだした脳に20倍量の 0.1 N perchloric acid を加え、polytron (目盛り 8, 10秒間) によりホモゲナイズした。これを 12,000 g 15分間遠沈し、得られた上清を millipore filter (pore size 0.33 μm) で濾過し、isoproterenol を内部標準物質として電気化学検出器-高速液体クロマトグラフィー (HPLC-ECD) を用いて serotonin (5-HT), 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) を測定した。移動相は16% methanol, 220 mg/L octanesulfonic acid を含む 50 mM phosphate buffer (pH 3.20) とし、分析カラムは Hiber LiChrosorb RP-18 を用いた。

4. レセプター結合実験

1) 膜標品の作成

5-HT₂受容体実験では分割した前頭皮質を氷冷した緩衝液 (Tris-HCl, 50 mM:pH 7.4, 37℃) 15 ml 中で、ポリトロン (目盛り 8, 10秒間) を用いてホモゲナイズし、4℃ 50,000 g で10分間遠沈した。得られた沈渣を 15 ml の同緩衝液で再浮遊し再遠沈した。得られた沈渣を100-200倍量の同緩衝液で再浮遊し試料とした。5-HT_{1A}の受容体結合実験では、内因性の5-HT を除去する目的で37℃, 20分間インキュベートした。これを再度 4℃ 50,000 g で遠沈した。得られ

た沈渣を100-200倍量の 50 mM Tris-HCl 緩衝液で再浮遊し試料とした。

2) 5-HT₂受容体結合実験

Leysen らの方法²⁵⁾ に従い、0.08 nM-2.6 nM の6濃度からなる ³H-Ketanserin (2719.5 GBq/mmol, Janssen Biotech, N.V.)と膜標品 (0.2-0.4 mg protein) を 1 ml の 50 mM Tris-HCl 緩衝液中で37°C15分間インキュベートした。インキュベーション後、セルハーベスタ (Brandel 社製) を用いて Whatman GF/B グラスファイバーフィルター上に吸引濾過し、氷冷した緩衝液 (5 ml) で2回洗浄した。フィルターをバイアル瓶に入れ、シンチゾール EX-H (Dojindo) 10 ml を加えてよく混和した後、液体シンチレーションカウンターにより放射活性を測定した。非特異的結合は 100 μM の 5-HT の存在下に求め、特異的結合値は総結合値から非特異的結合値を差引いて求めた。

3) 5-HT_{1A}受容体結合実験

Peroutka らの方法³⁷⁾ に従い、0.04 nM-1.3 nM の6濃度に展開した [³H] 8-hydroxy-2 (di-n-propylamine)-tetroalin (以下 8-OH-DPAT) と膜標品 (0.8 mg protein) を 1 ml の 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4, 37°C, 20 μM パージリン, 4 mM CaCl₂, 0.1%アスコルビン酸を含む) 中で37°C10分間インキュベートした後、5-HT₂結合と同様の操作を行い放射活性を測定した。非特異的結合は 100 μM の 5-HT の存在下に求めた。

解離定数と結合数はスキッチャード解析を用いて求めた。試料の蛋白定量は Lowry らの方法²⁷⁾ に従って、牛血清アルブミンを標準にして測定した。

また、有意差検定には分散分析 (ANOVA) を行ったのち Scheffe's test を用い、一部は Student's t test を用いた。

結 果

1. 拘束ラットにおける体重の変化

Fig. 1 に示すようにラットに22時間/日の拘束を負荷すると2日目より対照群と比較して有意に体重が減少していった (p<0.01)。imipramine 単独ではやや体重の増加を抑制する傾向にあったが有意差はなく、buspirone 投与による影響は認めなかった。拘束による体重減少に対して imipramine, buspirone は影響しなかった。

2-1. 脳内セロトニン代謝と拘束ストレスの影響

1日拘束, 3日拘束, 7日拘束における3脳部位, 前頭皮質 (FC), 視床+視床下部 (TH), 延髄+橋

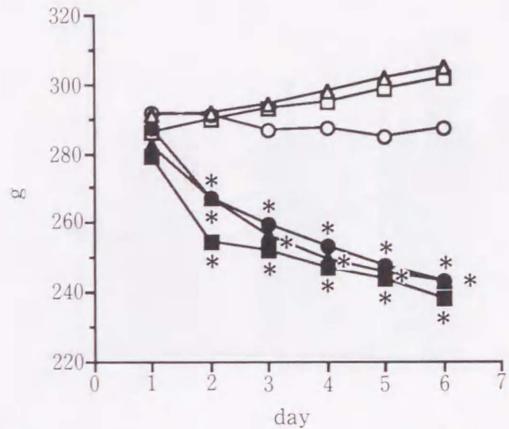


Fig. 1. Effect of restraint stress over 7 days period on body weight. □: control+saline, ○: control+imipramine, △: control+buspirone, ■: stress+saline, ●: stress+imipramine, ▲: stress+buspirone. The values indicates a mean body weight for 8 rats. Significantly different from paired control: * p<0.01.

(PO) のセロトニン代謝の経時的変化を Fig. 2 に示す。5-HIAA 濃度はいずれの脳部位においても各対照群と比較し拘束群で大きく増加していた (p<0.01)。部位別では PO の増加が最も大きく、ついで FC, TH の順であった。対照群と比較した 5-HIAA 濃度の増加度は FC, TH では1日拘束群で最も大きく3日拘束群, 7日拘束群と拘束日数が多くなるにつれて減少していたが PO では3日拘束群 (147.4%) で最も大きかった。各脳部位の 5-HT 濃度は FC と TH の3日拘束群で対照群と比較して増加していた (p<0.05) が、その他の拘束群と各々の

Table 1. ³H-Ketanserin binding in frontal cortex of restrained rats

	N	Bmax (fmol/mg protein)	KD (pM)
1 day control	7	144.1±4.8	103.3± 3.3
stress	7	152.9±4.3	104.1± 5.0
2 day control	8	198.0±4.8	136.1±10.8
stress	7	219.2±7.7	161.6±16.6
7 day control	8	180.1±5.9	108.9±10.0
stress	6	184.8±5.3	101.4±12.9

The equilibrium dissociation affinity constants (KD) and the maximum specific binding (Bmax) were calculated by Scatchard analysis using concentrations of ³H-ketanserin from 0.08 nM to 2.6 nM. Values are mean±SEM.

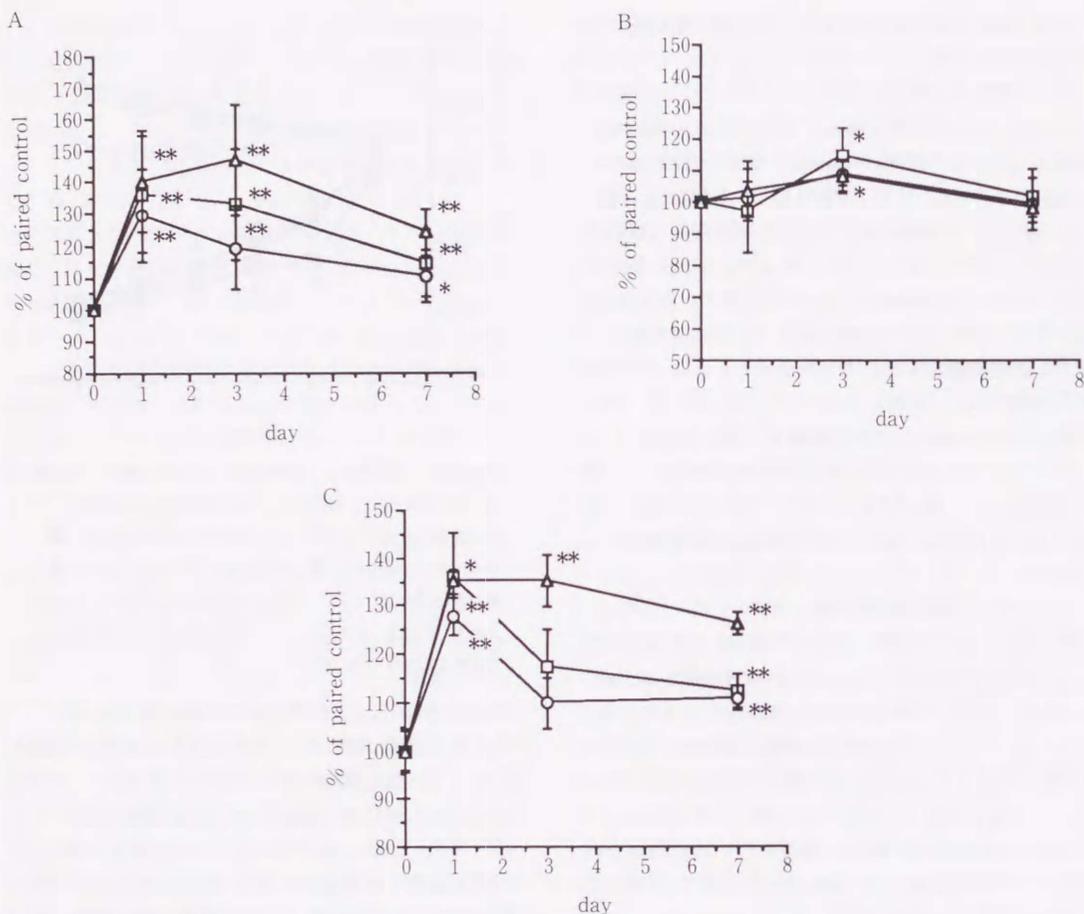


Fig. 2. Effect of restraint stress for 1, 3 and 7 days on serotonin metabolism in 3 discrete brain regions. A: 5-HIAA level, B: 5-HT level, C: 5-HIAA/5-HT ratio. □: frontal cortex (FC), ○: thalamus+hypothalamus (TH), △: medulla+pons (PO). These values % of paired control (mean±S. E. M.). Significantly different from paired control: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ by Student's *t* test. The 5-HIAA level in control of 1 day restraint stress are: FC, 1.46 ± 0.16 ; TH, 2.99 ± 0.28 ; PO, 2.62 ± 0.28 (nmol/mg protein) and the 5-HT level are: FC; 1.76 ± 0.34 , TH; 3.67 ± 0.07 , PO; 3.13 ± 0.20 (nmol/mg protein).

対照群との間で差はなかった。セロトニン代謝率は 5-HIAA/5-HT であらわされるが、拘束によるセロトニン代謝への影響は1日群で最も大きく、脳部位では PO で最も大きかった。また、PO においては一旦上昇した代謝率は7日間の間大きくは変化しなかったが、FC, TH では3日目で大きく低下していた。

2-2. 拘束ストレスによる受容体の変化

FC に於ける 5-HT₂受容体の変化は Table 1 に示したように1日拘束群, 3日拘束群, 7日拘束群ともに対照群と比較して有意の差はなかった。また、FC における 5-HT_{1A} 受容体の7日拘束後の変化も Table 4 に示したように対照群と比較して有意の差は

なかった。

3-1. セロトニン代謝に対する imipramine, buspirone の影響

急性実験 (1時間拘束) : Fig. 3 に示したように 5-HIAA 濃度は FC の対照群, 拘束群共に imipramine 投与により有意に低下し ($p < 0.05$), TH の対照群でも有意に低下した ($p < 0.01$)。5-HT 濃度及び 5-HIAA/5-HT は対照群, ストレス群共に変化しなかった。Fig. 4 に buspirone の効果を示す。5-HIAA 濃度は対照群ではいずれの脳部位でも減少傾向を示したが有意な差はなかった。しかし拘束群では FC, TH において buspirone 投与により有意に減

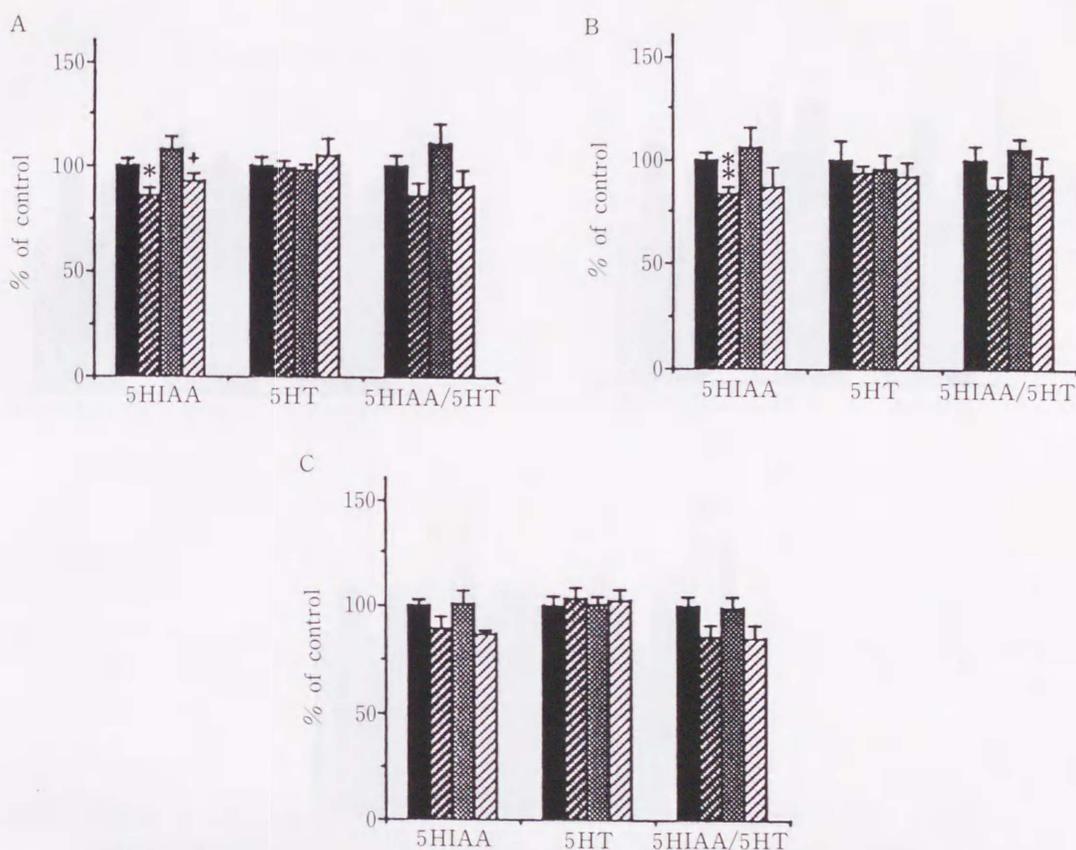


Fig. 3. Effect of imipramine on serotonin metabolism in 3 discrete brain regions of rats restrained for 1 hr. These rats were treated with imipramine (10 mg/kg, i. p.) A: frontal cortex (FC), B: thalamus+hypothalamus (TH), C: medulla+pons (PO). The values are % of control (mean±S.E.M.). ■: control+saline (CS), ▨:stress+saline (SS), ▩:control+imipramine (CI), ▪:stress+imipramine (SI), Significantly different by Scheffe'test (* <0.05, **<0.01 compared to CS; + p<0.05, ++<0.01 compared to SS).

少しした ($p < 0.05$)。

5-HT 濃度は FC の対照群で buspirone 投与により有意に増加した ($p < 0.05$) が、拘束群では buspirone 投与により saline 投与に比較して増加する傾向は認められるものの有意の差はなかった。5-HIAA/5-HT は対照群では FC, PO で有意に低下し ($p < 0.05$)、拘束群では buspirone 投与によりすべての脳部位で低下した (FC: $p < 0.01$, TH: $p < 0.05$, PO: $p < 0.05$)。

慢性実験：Fig. 5 に 1 日拘束の結果を示す。Imipramine 単独投与により FC における 5-HIAA 濃度は saline と比較し有意の差はないものの低下の傾向を示した。また 1 日拘束により saline の 5-HIAA 濃度は有意に増加するが ($p < 0.01$)、imipramine は FC, TH で拘束ストレスによる増加を有意に抑制した

(FC: $p < 0.01$, TH: $p < 0.01$)。PO では有意の差はなかった。Buspirone 単独では FC で 5-HIAA 濃度を軽度増加させたが有意の差はなく TH, PO では変化がなかった。また、buspirone は 1 日拘束でいずれの部位でも拘束ストレスによる 5-HIAA 濃度の増加に影響しなかった。5-HT 濃度は対照群と拘束群では変化がなく、imipramine 及び buspirone による影響もなかった。5-HIAA/5-HT は imipramine 単独、buspirone 単独では saline 群と変わらなかったが、拘束ストレスにより有意に上昇し (FC: $p < 0.01$, TH: $p < 0.05$, PO: $p < 0.01$)、この上昇は FC, TH で imipramine 投与により有意に抑制された (FC: $p < 0.01$, TH: $p < 0.01$)。しかし PO では変化はなかった。Buspirone はいずれの部位でも 5-HIAA/5-HT に影響していなかった。

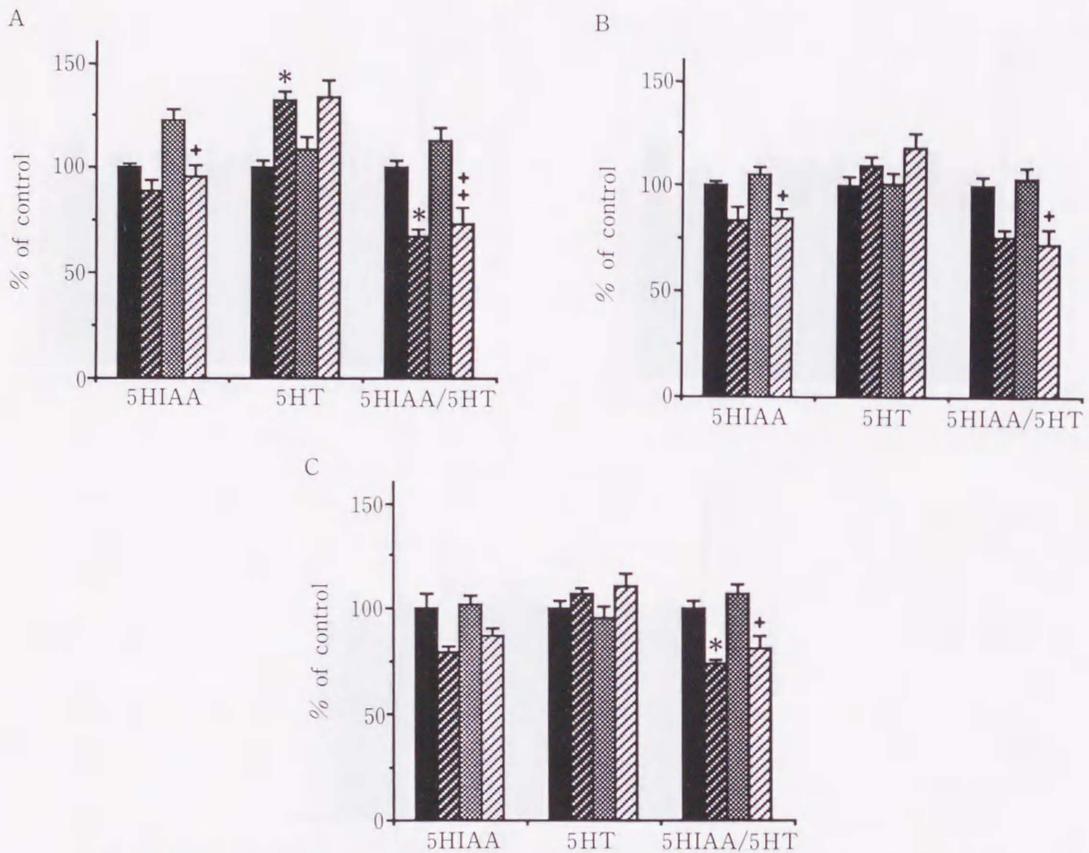


Fig. 4. Effect of buspirone on serotonin metabolism in 3 discrete brain regions of rats restrained for 1 hr. These rats were treated with buspirone (5 mg/kg, i. p.) before restraint stress. A: frontal cortex (FC), B: thalamus+hypothalamus (TH), C: medulla+pons (PO). The values are % of control (mean±S.E.M.). ■: control+saline (CS), ▨: stress+saline (SS), ▩: control+buspirone (CB), ▪: stress+buspirone (SB), Significantly different by Scheffe'test (* <0.05, ** <0.01 compared to CS; + p<0.05, ++ <0.01 compared to SS).

Fig. 6 に 7 日拘束の結果を示す。5-HIAA 濃度は imipramine 単独では saline と比較しすべての部位で有意の減少 (FC; $p < 0.01$, TH; $p < 0.01$, PO; $p < 0.05$) を示した。拘束による 5-HIAA 濃度の上昇は 1 日拘束と比較して少なかったが, 7 日拘束ストレスで増加した 5-HIAA 濃度は imipramine 投与によりいずれの脳部位でも有意の差を持って低下した (FC; $p < 0.01$, TH; $p < 0.01$, PO; $p < 0.01$)。Buspirone 単独では 5-HIAA 濃度はいずれの部位でも増加傾向にあるが, TH で有意の増加を認めた ($p < 0.05$)。さらに, buspirone は拘束ストレスにより増加した 5-HIAA 濃度をいずれの部位でも更に増加させた (FC; $p < 0.05$, TH; $p < 0.05$, PO; $p < 0.01$)。5-HT 濃度は FC の拘束における imipramine 投与で有意の減少 ($p < 0.01$) を示したのみでその他のい

れの群でも有意の変化は無かった。5-HIAA/5-HT は imipramine 単独では PO のみで saline と比較して有意に低下した ($p < 0.05$) 他は特に有意の変化は認めなかった。Buspirone 単独でも saline と比較して差はなかった。7 日拘束ストレスにより 5-HIAA/5-HT は FC で変化なく, TH, PO で有意の上昇を認めた (TH; $p < 0.05$, PO; $p < 0.01$)。Imipramine は FC では影響せず, TH, PO で有意に 5-HIAA/5-HT を低下させた (TH; $p < 0.05$, PO; $p < 0.01$)。Buspirone は拘束ストレスで上昇した 5-HIAA/5-HT を FC, PO で更に上昇させた (FC; $p < 0.01$, PO; $p < 0.01$) が TH では上昇させるものの有意の差はなかった。

3-2. 5-HT₂, 5-HT_{1A} 受容体に対する imipramine 及び buspirone の影響

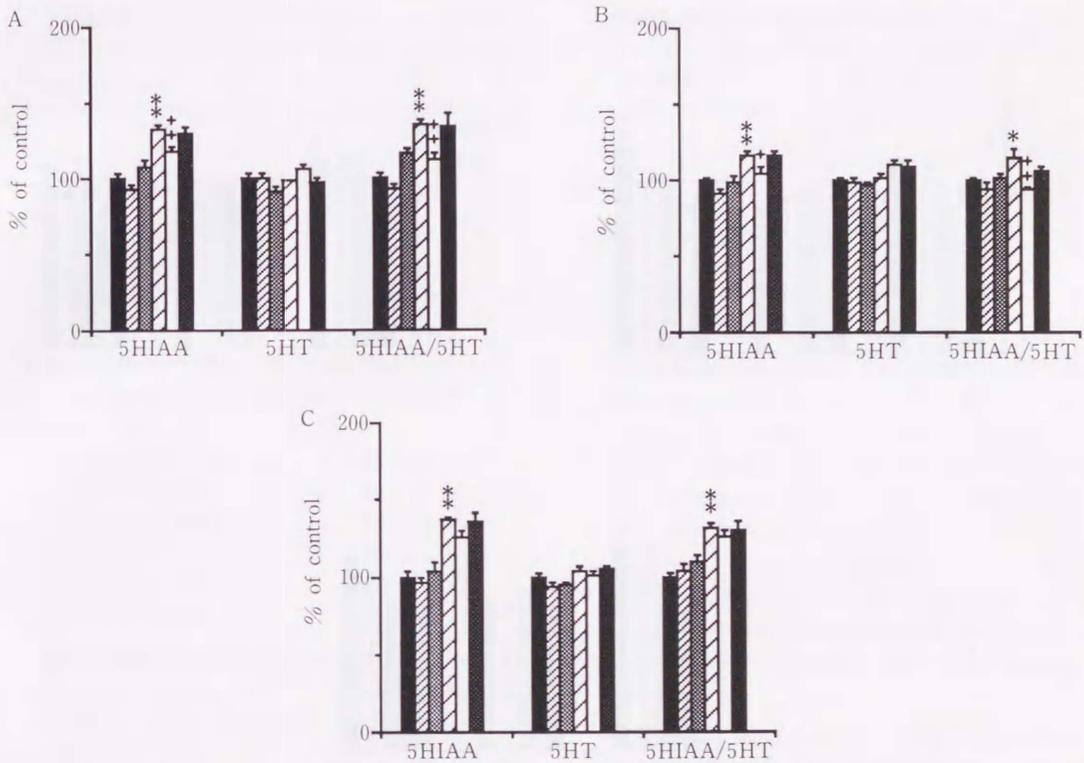


Fig. 5. Effect of imipramine and buspirone on serotonin metabolism in 3 discrete brain regions of rats restrained for 1 day. These rats were treated with imipramine (10 mg/day, i. p.) and buspirone (5 mg/day, i. p.) twice a day. A: frontal cortex (FC), B: thalamus+hypothalamus (TH), C: medulla+pons (PO). The values are % of control (mean±S.E.M.). ■: control+saline (CS), ▨: control+imipramine (CI), ▩: control+buspirone (CB), ▤: stress+saline (SS), □: stress+imipramine (SI), ▥: stress+buspirone (SB), Significantly different by Scheffe'test (* <0.05, **<0.01 compared to CS; + p<0.05, ++ <0.01 compared to SS).

Table 2 に示したように1日群では saline 単独と比較して imipramine 単独による ³H-ketanserin 結合に対する影響は認められなかった。また、拘束においても imipramine は saline と比較して有意の差はなかった。しかしながら、7日群では各対照群と比較して imipramine 単独及び拘束 imipramine とともに ³H-ketanserin 結合は有意の減少を示した (p<0.05)。そこで7日拘束における imipramine の効果を結合飽和実験で追試した結果を Table 3 に示した。Imipramine 投与により解離定数 (KD) が若干高くなる傾向にあったが、5-HT₂受容体数 (Bmax) は著明に低下した (control-imipramine; p<0.01, stress-imipramine; p<0.05)。1日および7日拘束における buspirone の ³H-ketanserin 結合に及ぼす影響を調べたが、各対照群と比較して有意の差はなかった。

Table 4 に示したように7日拘束では imipramine は 5-HT_{1A}受容体に対して KD, Bmax 共に影響しなかった。また、buspirone も 5-HT_{1A}受容体の KD, Bmax に影響しなかった。

考 察

これまでストレスの脳内アミンに対する影響を調べるためストレスラーとして電気ショック、強制水泳、拘束等が用いられてきた。Reinhard ら³⁹⁾によると脳内アミンのうちセロトニンは穏やかなストレスに対して反応し難いと述べている。したがってセロトニンに対する影響を検討するためには強いストレスラーが必要となるため、今回は拘束ストレスを用いた。これまで拘束を用いた報告では比較的短時間のものが多いが、今回の実験ではストレスの強度をできるだけ強く

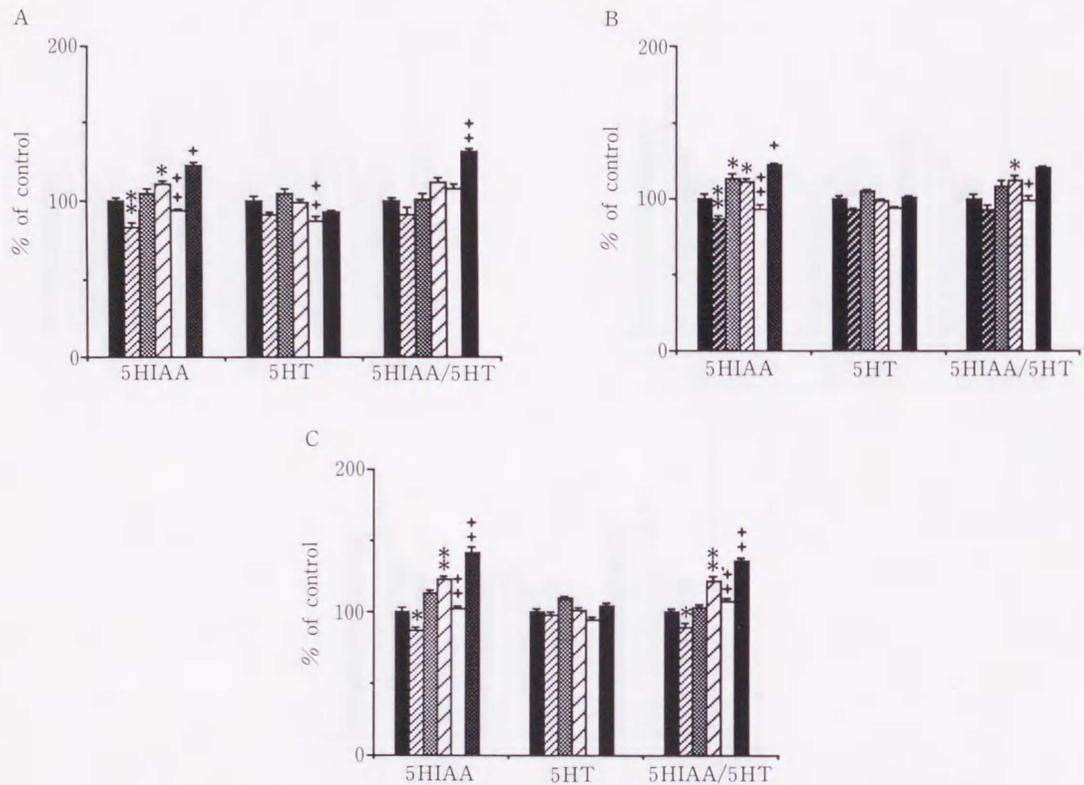


Fig. 6. Effect of imipramine and buspirone on serotonin metabolism in 3 discrete brain regions of rats restrained for 7 days. These rats were treated with imipramine (10 mg/day, i. p.) or buspirone (5 mg/day, i. p.) twice a day. A: frontal cortex (FC), B: thalamus+hypothalamus (TH), C: medulla+pons (PO). The values are % of control (mean±S.E.M.). ■: control+saline (CS), ▨: control+imipramine (CI), ▩: control+buspirone (CB), ▤: stress+saline (SS), □: stress+imipramine (SI), ▦: stress+buspirone (SB), Significantly different by Scheffe's test (* <0.05, **<0.01 compared to CS; + p<0.05, ++ <0.01 compared to SS).

する意味で1日22時間という長時間の拘束を用いた。また長時間の拘束のため food deprivation の状態を作ることになるが、Curzon ら¹⁰⁾ は24時間の food deprivation により脳内トリプトファン、5-HT、5-HIAA が増加し、ストレスの一つとして報告している。一方、食餌中のトリプトファンの長期欠乏により脳内トリプトファン、5-HT、5-HIAA が減少する⁵⁾ とか食餌中の炭水化物が血中及び脳内トリプトファンを増加させ、さらに脳内 5-HT を増加させるなどの報告^{12,13)} もあるが、食餌量が減ることでトリプトファンや炭水化物の摂取量が減ったとすると5-HT、5-HIAA は減少することになり今回の結果と合わない。従って本研究では拘束ストレスと food deprivation ストレスの両者を負荷したことになると思われる。

体重を指標として今回の拘束ストレスのストレス強度を調べたが、Fig. 1 のごとく対照群と比較して2日目より拘束群で著明に低下した。Fig. 1 には示していないが食餌時間2時間/日の対照群では2日目に拘束群と同程度低下するが以後はほぼ同じ値を維持した。したがって初期の低下は食餌に大きく影響されたものと考えられるが、以後のなだらかな体重減少は拘束ストレスによるものと考えられた。また、今回使用した imipramine と buspirone は体重の変化に特に影響を与えないこともわかった。体重減少に対してこれらの薬物が影響しなかったことは、ストレスを遮断するほどの抗ストレス作用がないためか、摂食時間が短すぎたためと考えられた。

1. セロトニン代謝に対する拘束ストレスの影響

本研究では前頭皮質 (FC)、視床+視床下部 (TH)、

Table 2. ³H-Ketanserin binding in frontal cortex of restrained rats treated with imipramine and buspirone

	N	Specific binding (fmol/mg protein)
1 day		
control-saline	8	45.3±2.3
control-imipramine	10	43.0±2.1
control-buspirone	10	44.1±2.0
stress-saline	9	44.1±1.6
stress-imipramine	9	42.6±1.1
stress-buspirone	10	42.3±2.0
7 days		
control-saline	8	43.9±1.8
control-imipramine	8	33.4±1.5*
control-buspirone	8	36.7±1.4
stress-saline	8	38.7±1.8
stress-imipramine	6	32.5±2.6*
stress-buspirone	7	40.0±2.4

These values represent means±SEM of specific binding at 0.63 nM of ³H-ketanserin. ANOVA; Scheffe's test: * p<0.05 compared to control-saline.

延髄+橋 (PO) の3部位で調べた。それらの部位での5-HIAA, 5-HT濃度の差ばかりでなく、拘束ストレス負荷による経時的変化においても部位による差があることがわかった。対照群における5-HIAA, 5-HTの濃度は共にTHで最も高くFCで最も低かった。これまで5-HIAA, 5-HTについて脳内分布はいくつか調べられている^{33,41)}が、今回の結果はほぼそれらに一致していた。一方拘束ストレスによる5-HIAA濃度の増加はFCやTHでは拘束早期に最大に達し次第に減少していくが、POはそれらより遅れて最大に達し比較的高い値をしばらく維持していた。拘束による5-HTの変化はFC, THの3日目で増加した以外はいずれの部位でも有意の変化を認めなかった。5-HIAA/5-HTがセロトニン活動を示す生化学的指標としてよく用いられている⁴¹⁾。今回の結果では3日目のFC, THを除いて高い値を示したが、5-HIAA濃度と同様に次第に低下した。このことは拘束期間中セロトニン代謝の亢進が続くが、その程度は軽くなっていくことを示唆している。急性ストレス下でのセロトニン代謝についての報告は多くが5-HIAAの増加と5-HTの無変化を報告している^{10,20,31)}が、Adellら¹⁾のように1時間の拘束で5-HIAA, 5-HTともに変化がないと報告しているも

Table 3. ³H-Ketanserin binding in frontal cortex of 7 days restrained rats treated with imipramine

	N	Bmax (fmol/mg protein)	KD (pM)
control-saline	8	213.0±6.4	170.4±9.8
control-imipramine	8	151.0±8.1**	224.3±9.2
stress-saline	7	187.5±8.2	188.7±9.0
stress-imipramine	6	153.1±6.6*	237.8±8.1

These rats were restrained 22 hr/day during 7 days and treated with imipramine (10 mg/kg, i. p.) twice a day. The equilibrium dissociation affinity constants (KD) and the maximum specific binding (Bmax) were calculated by Scatchard analysis using concentrations of ³H-ketanserin from 0.08 nM and 2.6 nM. Values are mean±SEM. Statistical evaluation was performed by means of a one-way ANOVA for dependent measurements. * p<0.05, compared to stress-saline, **p<0.01, compared to control-saline.

Table 4. ³H-8-OH-DPAT binding in frontal cortex of 7 days restrained rats treated with imipramine and buspirone

	N	Bmax (fmol/mg protein)	KD (pM)
control-saline	6	64.4±5.2	1168.5±121.1
stress-saline	6	70.4±4.0	1128.6±149.8
control-imipramine	6	62.9±3.0	892.5±60.6
stress-imipramine	6	63.6±3.2	961.7±107.5
control-buspirone	6	73.1±4.0	1110.3±121.4
stress-buspirone	6	64.1±4.6	994.2±73.0

These rats were restrained 22 hr/day during 7 days and treated with imipramine (10 mg/kg, i. p.) and buspirone (5 mg/kg, i. p.) twice a day. The equilibrium dissociation affinity constants (KD) and the maximum specific binding (Bmax) were calculated by Scatchard analysis using concentrations of ³H-8-OH-DPAT from 0.04 nM to 1.3 nM. Values are mean±SEM. Statistical evaluation was performed by means of a one-way ANOVA for dependent measurements.: no significance.

のもある。本研究の1時間拘束ではストレス負荷による5-HIAA, 5-HT共に有意の変化なく、Adellら¹⁾

の結果と一致していた。ただ今回の結果でも 5-HIAA は部位によっては増加の傾向にあり、実験条件によっては1時間の拘束でも変化がおこることも考えられる。一方、慢性ストレス下でのセロトニン代謝の報告はいくつかある^{1,21)}が、本研究で示したような経時的な変化を検討したものはなかった。今回の結果は拘束ストレスによるセロトニン代謝の継時的変化には部位による違いがあることを示している。特にセロトニン神経核である縫線核を含む PO で 5-HIAA 濃度及び 5-HIAA/5-HT の高い値が続いたことは興味ある所見である。また、セロトニン代謝が FC, TH では1日目、PO では3日目を最大としてしだいに对照群の値に近づくことは、拘束ストレスに対する適応状態が形成されていく過程を示していると考えられる。本研究の結果から適応状態となるまでに少なくとも7日以上かかることがわかった。この適応状態について Ohi ら³²⁾は行動薬理的な面から検討し5日間で最大に達したとしているが、彼らは foot shock をストレスとして用いておりストレスの種類やストレスの強度の違いが差となってあらわれたものと考えられる。これまでの慢性ストレスでの報告^{1,21)}と本研究の結果の違いは 5-HT の動きである。とくに Adell ら¹⁾は1時間の急性拘束ストレスでは 5-HIAA, 5-HT に変化を認めず、1日1時間24日間の慢性拘束ストレスを負荷したところ 5-HIAA と 5-HT が増加し、さらに1時間拘束を追加したところ 5-HIAA が更に増加し、逆に増加していた 5-HT は減少し对照群と差がなくなったと報告している。本研究では 5-HT の濃度は3日群を除いてほぼ对照群と差はなかった。この点を考えると拘束の負荷期間にも違いがあるが、本研究ではストレス負荷直後いわばストレス中に屠殺しており、Adell ら¹⁾がストレス負荷後20時間して屠殺していることによる違いと考えられる。今回の結果は Adell ら¹⁾の24日間+1時間拘束の結果と一致している。したがって、ストレスの影響を検討するときストレスそのもの影響なのかストレス後の回復過程なのかを考える必要があるとされる。

2. セロトニン受容体に対する拘束ストレスの影響

セロトニン受容体は Peroutka と Snyder³⁵⁾ や Pedigo ら³⁴⁾によって亜型分類され、現在は更に細分化され、その生理的機能も次第に明らかにされてきつつある。その中でとくに 5-HT₂ 受容体はうつ病との関連が示唆されており、また不安との関連で注目されていた 5-HT_{1A} 受容体もうつ病との関連²⁴⁾が示唆されるようになってきている。5-HT_{1A} 受容体は大脳皮質ではシナプス前部及び後部に存在する^{18,19)}といわれ、

5-HT₂ 受容体はシナプス後部の 5-HT_{1A} 受容体の機能を抑制しているとする報告⁶⁾があり、5-HT₂ 受容体と 5-HT_{1A} 受容体の相互作用を考える上からも両者を調べる事は大切な事と思われる。大脳皮質のうち前頭前野は他の大脳皮質よりも比較的高濃度のセロトニンを含み縫線核を起始核とするセロトニンニューロンの重要な終末部位であると考えられている³⁸⁾こと、Morgan ら³¹⁾の immobilization stress での 5-HIAA やセロトニン代謝回転の増加が大脳皮質で最も著しかったという報告に基づいて今回は前頭皮質における 5-HT₂, 5-HT_{1A} 受容体について調べた。今回の結果は 5-HT₂, 5-HT_{1A} の両受容体共に对照群と比較して解離定数 (KD), 最大結合数 (Bmax) に有意の変化はなかった。同様の報告としては Ohi ら³²⁾の報告がある。彼らは反復 foot shock ストレスを用い大脳皮質の 5-HT₁ 受容体、海馬の 5-HT_{1A} 受容体、大脳皮質の 5-HT₂ 受容体を調べ KD, Bmax に変化を認めなかったと報告している。5-HT_{1A} 受容体に関してはこの大脳皮質の結果は 5-HT_{1A} だけでなく他の subtype を含んだものであり本研究と単純な比較はできないが、5-HT₂ 受容体については一致していた。しかしながら Biegón ら⁸⁾, Arora and Melzer⁴⁾ はうつ病患者の血小板で 5-HT₂ 受容体の増加を認め、実験的には12日間の active wheel stress によりラット前頭皮質の 5-HT₂ 受容体が増加するとの報告²⁸⁾もあり、5-HT₂ 受容体については増加する場合もあるようである。5-HT_{1A} 受容体については慢性ストレスに関連した報告は先の Ohi らの報告³²⁾しかなく本研究の結果と併せて考えると、今のところストレスそのものは 5-HT_{1A} 受容体に影響しないものと考えられる。

本研究のセロトニン受容体の結果と先に述べたセロトニン代謝の結果からいくつかの考え方ができる。第一にこれまでの受容体仮説からするとセロトニン代謝回転が亢進すれば受容体は減少する (down-regulation) はずであるが、セロトニン受容体に変化がなかったことは有効な受容体刺激に変化がなかったと考えることもできる。即ち今回の結果では 5-HIAA 濃度は増加しているが 5-HT 濃度は変化しておらず、シナプス間隙におけるセロトニンは一定で受容体刺激に至るまでに再吸収され分解されてしまうという考え方である。もしそうだとすると受容体数に変化がなかったことは説明し得るが、残念ながらセロトニン uptake 活性を測定していないこともあり何故有効な刺激とならないかの説明は困難である。第二には受容体そのものの性質の問題である。Koshikawa ら²²⁾は 5-HT precursor を使って 5-HT₂ 受容体の変化を検

討しているが、脳内 5-HT 濃度の増加だけでは受容体数の減少をもたらすのに十分ではなく、5-HT₂ 受容体は agonist 刺激で down-regulation し antagonist 刺激で up-regulation するという the regular receptor regulation theory (以下、受容体規則性仮説)²²⁾ には当てはまらないと述べている。さらに 5-HT₂ 受容体は agonist, antagonist の両方で down-regulation をおこすこと²⁶⁾、セロトニン神経の破壊もしくは合成酵素阻害剤により前シナプスの活動を低下させても 5-HT₂ 受容体の up-regulation はおこらない²⁹⁾ など他の受容体と異なっていることが示唆されており、これら 5-HT₂ 受容体の特殊性が今回のストレスにおけるセロトニン代謝の亢進と 5-HT₂ 受容体の不変という結果にあらわれたものと考えられる。しかしながら今回の結果から少なくとも 5-HT₂ 受容体数は拘束ストレス負荷後のセロトニン代謝の亢進には左右されないと考えられる。

また、5-HT_{1A} 受容体についても 5-HT₂ 受容体と同様に変化しなかった。これから考えると 5-HT_{1A} 受容体に関してもストレス負荷によるセロトニン代謝亢進の影響は受けないと考えられる。

3. セロトニン代謝及び受容体に対する imipramine の影響

今回のセロトニン代謝に対する imipramine の効果として対照群に対し imipramine 単独では 1 日目では 5-HIAA, 5-HT 共にほとんど影響を及ぼさないが 7 日目では 3 脳部位において 5-HIAA を有意に減少させた。1 日拘束では imipramine は FC, TH の 5-HIAA, 5-HIAA/5-HT の増加を有意に抑制するが、PO では imipramine の影響はなかった。7 日拘束では imipramine はすべての部位で 5-HIAA の増加を有意に抑制した。1 時間群のような短時間ではほとんど効果を現わさず、1 日、7 日と時間を経るに従ってセロトニン代謝への影響が明らかになったということはうつ病の治療において抗うつ剤の効果発現に 1-2 週間かかるという事実と関連している可能性がある。また、PO はストレスに対する適応現象が他の部位より遅く、imipramine の効果発現も遅くあらわれる点は興味を持たれる。これらのことは、imipramine がシナプス間隙における 5-HT の再吸収を抑制する急性作用とは別に、慢性投与によりセロトニン代謝を抑制する作用を持つことを示唆しており抗うつ作用との関連を更に検討する必要があると考えられる。

セロトニン受容体とくに 5-HT₂ 受容体については抗うつ剤の慢性投与によって down-regulation が起こること^{9, 36, 42)} が知られている。今回の結果でも im-

ipramine 投与 7 日目には有意の Bmax の低下を認めた。一方、抗うつ剤の単回投与では変化がないとする報告と減少するという報告がある。これらは使用薬剤や方法が異なっており比較は難しいが、本研究の投与 1 日目では変化を認めなかった。これらの結果は先に示した imipramine によるセロトニン代謝の減少から予想される受容体の増加 (supersensitivity) とは反対の結果であり、一般の受容体の regulation とは異なっている。この点に関しては抗うつ剤の慢性投与による 5-HT₂ 受容体の down-regulation はシナプス間隙の 5-HT レベルの変動によるものでないとか抗うつ効果を持たない 5-HT 取り込み阻害薬は 5-HT₂ 受容体の down-regulation を示さないことがいわれ、抗うつ剤の効果は 5-HT₂ 受容体への直接作用が関与している可能性が示唆されている。本研究の結果もこの可能性を支持するものと考えられる。

5-HT_{1A} 受容体に対する imipramine 反復投与の影響をみたものでは Akiyoshi ら²⁾ が大脳皮質で不変、Mizuta ら³⁰⁾ が減少を報告し、海馬で山脇ら⁴⁷⁾ が不変を報告している。本研究の結果は前頭皮質のみであるが、imipramine は 5-HT_{1A} 受容体に影響しなかった。このようにまだ一致した意見はなく、他の抗うつ薬での報告^{2, 45)} でもさまざまな結果となっており一定の結論は出しにくい。

4. セロトニン代謝及び受容体に対する buspirone の影響

Buspirone は benzodiazepine (BZP) 系抗不安薬と異なる新しい抗不安薬として知られているが、Eison ら¹¹⁾ や Robinson ら⁴⁰⁾ によってうつ病の治療にも有効であることが臨床的に示されている。生化学的にはシナプス前部及び後部の 5-HT_{1A} 受容体における partial agonist として働き、用量依存的に大脳皮質、海馬のセロトニン合成を抑制し背側縫線核の神経を含むセロトニン神経の発火を抑制する⁴⁸⁾ と言われている。本剤を使ったセロトニン代謝の実験結果は以下の通りであった。1 時間の急性実験において buspirone 単独では全ての脳部位で 5-HIAA を低下させ、5-HT を増加させる傾向にあり、FC と PO では 5-HIAA/5-HT を有意に低下させた。また拘束負荷により軽度上昇した 5-HIAA および 5-HIAA/5-HT 比を有意に抑制した。このことは急性投与においては buspirone はセロトニン代謝に抑制的に働くことを示している。ところが 1 日拘束の結果ではいずれの脳部位でも 5-HIAA, 5-HT 共に変化なくストレスによる 5-HIAA の増加にも何等影響していなかった。また、7 日拘束ではむしろ TH および PO では対照群と比

較して 5-HIAA を増加させ、全ての部位でストレスによる 5-HIAA の増加を更に増加させていた。1日、7日拘束実験での 5-HT にはそれぞれの対照と比較して変化はなかった。このことから buspirone は慢性投与では急性投与とは異なってむしろセロトニン代謝を亢進させることが明らかになった。Buspirone は BZP 薬剤と同様にセロトニンの代謝回転を減少させ、縫線核のセロトニン神経の活動を抑制すること^{43, 48)} が知られているが、慢性投与によるセロトニン代謝の亢進は報告されていない。Beer⁷⁾ によれば 5-HT_{1A} 受容体 agonist の 8-OH-DPAT を単回投与後にシナプス前部に存在する縫線核の 5-HT_{1A} 受容体数が著明に減少するが、シナプス後部に存在する前頭皮質、海馬の 5-HT_{1A} 受容体数に変化がないとされている。これが事実とすれば、buspirone 単回投与ではセロトニン代謝は抑制されるが、2回目以降では縫線核のシナプス前部 5-HT_{1A} 自己受容体が down-regulation しているためにセロトニン神経の発火興奮が起りシナプス後部におけるセロトニン代謝が亢進したと考えることができる。しかし、Larsson²³⁾ によれば7日間の 8-OH-DPAT 投与後にシナプス前部、後部の 5-HT_{1A} 受容体の KD, Bmax とも変化がないとされており、このことはさらに検討が必要である。また別の考えとしては buspirone は dopamine (D₂) 受容体にも親和性をもっていること¹⁴⁾ が知られており慢性投与ではこのような他の経路を介して急性の結果とは異なった作用を現すことも考えられる。Buspirone の FC における 5-HT₂, 5-HT_{1A} 受容体に対する影響を調べたところ正常対照群、ストレス群にたいして急性投与、慢性投与のいずれも影響を持たなかった。5-HT₂ 受容体に関しては buspirone は低親和性であるといわれており理解し易いが、partial agonist として知られている 5-HT_{1A} 受容体にも何等変化がなかった点は受容体規則性仮説からはずれた結果であった。大脳皮質では 5-HT_{1A} 受容体はシナプス前部及び後部に存在すると報告^{18, 19)} されているが、今回の FC での結果は Beer⁷⁾ や Larsson²³⁾ のシナプス後部の 5-HT_{1A} 受容体の結果と一致していた。また Gobbi¹⁷⁾ も autoradiography を使った実験で rat に buspirone を 21日間慢性投与し縫線核で 5-HT_{1A} 受容体数の減少を見たほかは前頭皮質で変化がなかったと報告しており、本研究の結果と一致していた。これらのことから、5-HT_{1A} 受容体も縫線核に存在するものを除いては受容体規則性仮説に当てはまらない受容体であると考えられる。

一方 buspirone の抗うつ効果を考えるとき 5-HT₂ 受容体への影響はなく imipramine をはじめとする抗うつ薬とはまったく異なっており 5-HT₂ 受容体を介さない抗うつ効果を考えなくてはならない。そのひとつとして 5-HT_{1A} 受容体が考えられるが、今回の結果を含めて抗うつ薬の慢性投与では種類によって前頭皮質あるいは海馬で 5-HT_{1A} 受容体が増加するという報告と変化しないという報告^{2, 45)} があるなど一定した結果は得られておらず今後の検討が必要であろう。

謝 辞

稿を終わるにあたり、御指導、御校閲を賜りました広島大学医学部神経精神医学教室・山脇成人教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究を行うにあたり、終始変わらぬ御指導並びに御協力戴いた横田則夫博士に心から感謝いたします。さらに多くの御助言を戴いた本橋伸高講師、山崎正数博士並びに多くの御協力を頂いた広島大学医学部神経精神医学教室の各位に厚く御礼申し上げます。

参 考 文 献

1. Adell, A., Garcia-Marquez, C., Armario, A. and Gelpi, E. 1988. Chronic stress increases serotonin and noradrenaline in rat brain and sensitizes their responses to a further acute stress. *J. Neurochem.* 50 : 1678-1681.
2. Akiyoshi, J., Nagayama, H., Tsuchiyama, K., Mizobe, Y., Nakamera, M., Eto, R., Okada, K., Kojima, K. and Sasaki, I. 1990. Change in 5HT-1A receptor following chronic administration of antidepressants. *Jpn. J. Psych. Neurol.* 44 : 137-138.
3. Aprison, M. H., Takahashi, R. and Tachiki, K. 1978. Hypersensitive serotonergic receptors involved in clinical depression: A theory, p. 23. *In* B. Haber and M. H. Aprison (ed.), *Neuropharmacology and Behavior*, Plenum Press, New York.
4. Arora, R. C. and Meltzer, H. Y. 1989. Serotonergic measures in the brains of suicide victims: 5-HT₂ binding sites in the frontal cortex of suicide victims and control subjects. *Am. J. Psychiatry* 146 : 730-736.
5. Ashley, D. V. M. and Curzon, G. 1981. Effects of long-term low dietary tryptophan intake on determinants of 5-hydroxytryptamine metabolism in the brains of young rats. *J. Neurochem.* 37 : 1385-1393.
6. Backus, L. I., Sharp, T. and Grahame-

- Smith, D. G.** 1989. Behavioral evidence for an interaction between 5-HT₂ and 5-HT_{1A} receptor function. *Br. J. Pharmacol.* **97** : 411.
7. **Beer, M., Kennett, G. A. and Curzon, G.** 1990. A single dose of 8-OH-DPAT reduces raphe binding of [³H]8-OH-DPAT and increases the effect of raphe stimulation on 5-HT metabolism. *Eur. J. Pharmacol.* **178** : 179-187.
8. **Biegon, A., Essar, N., Israeli, M., Elizur, A., Bruch, S. and Bar-Nathan, A. A.** 1990. Serotonin 5-HT₂ receptor binding on blood platelets as a state dependent marker in major affective disorder. *Psychopharmacology* **102** : 73-75.
9. **Blackshear, M. A., Martin, L. L. and Bush, E. S.** 1986. Adaptive changes in the 5-HT₂ binding site after chronic administration of agonists and antagonists. *Neuropharmacology* **25** : 1267-1271.
10. **Curzon, G., Joseph, M. H. and Knott, P.** 1972. Effects of immobilization and food deprivation on rat brain tryptophan metabolism. *J. Neurochem.* **19** : 1967-1974.
11. **Eison, M.** 1990. Serotonin: a common neurobiologic substrate in anxiety and depression. *J. Clin. Psychopharmacol.* **10** : 26s-30s.
12. **Fernstrom, J. D. and Wurtman, R. J.** 1971. Brain serotonin content: Increase following ingestion of carbohydrate diet. *Science* **174** : 1023-1025.
13. **Fernstrom, J. D. and Wurtman, R. J.** 1974. Nutrition and the brain. When a meal rich in carbohydrate is eaten, the brain makes more of the nerve-impulse transmitter serotonin. The mechanism may be part of a closed circle in which diet influences food consumption. *Scientific American* **237** : 84-91.
14. **Gardner, C. R.** 1986. Recent developments in 5-HT-related pharmacology of animal model of anxiety. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **24** : 1479-1482.
15. **Gibbs, D. M.** 1984. Dissociation of oxytocin, vasopressin and corticotropin secretion during different type of stress. *Life Sci.* **35** : 487-491.
16. **Glowinski, J. and Iversen, L. L.** 1966. Regional studies of catecholamine in the rat brain-I. The disposition of [³H]norepinephrine, [³H]dopamine and [³H]dopa in various regions of the brain. *J. Neurochem.* **13** : 655-669.
17. **Gobbi, M., Cavanus, S., Miari, A. and Mennini, T.** 1991. Effect of acute and chronic administration of buspirone on serotonin and benzodiazepine receptor subtype in the rat brain: an autoradiographic study. *Neuropharmacology* **30** : 313-321.
18. **Hall, M. D., Gozlan, H. and Emerit, M. B.** 1986. Differentiation of pre and postsynaptic high affinity serotonin receptor binding sites using physicochemical parameters and modifying agents. *Neurochem. Research.* **10** : 891-912.
19. **Hall, M. D., Mestikawy, S. EL., Emerit, M. B., Pichat, L., Hamon, M. and Gozlan, H.** 1985. [³H]8-hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralin binding to pre and post synaptic 5-hydroxytryptamine sites in various regions of the rat brain. *J. Neurochem.* **44** : 1685-1696.
20. **Joseph, M. H. and Kennett, G. A.** 1980. Brain tryptophan and 5-HT function in stress. *Br. J. Pharmacol.* **73** : 267.
21. **Kennett, G., Chaouloff, F., Marcou, M. and Curzon, G.** 1986. Female rats are more vulnerable than males in an animal model of depression: the possible role of serotonin. *Brain Res.* **382** : 416-421.
22. **Koshikawa, N., Koshikawa, F. and Stephenson, D.** 1990. Further evidence for an anomalous regulation of cortical 5-HT₂ receptors: studies with 5-HT precursors. *Eur. J. Pharmacol.* **178** : 365-369.
23. **Larsson, L. G., Renyi, L., Ross, S. B., Svensson, B. and Angeby-Moller, A.** 1990. Different effects on the responses of functional preand postsynaptic 5-HT_{1A} receptors by repeated treatment of rats with the 5-HT_{1A} receptor agonist 8-OH-DPAT. *Neuropharmacology* **29** : 85-91.
24. **Lesch, K. P., Mayer, S., Disselkamp-Tietze, J., Hoh, A., Schoellhammer, G. and Schulte, H. M.** 1990. Subsensitivity of the 5-hydroxytryptamine_{1A} (5-HT_{1A}) receptor-mediated hypothermic response to ipsapirone in unipolar depression. *Life Sci.* **46** : 1271-1277.
25. **Leysen, J. E., Niemegeers, J. E., Nueten, J. M. V. and Laduron, P. M.** 1981. [³H]ketanserin (R 41 468), a selective ³H-ligand for serotonin₂ receptor binding site: Binding properties, brain distribution, and functional role. *Molecular pharmacology* **21** : 301-314.
26. **Leysen, J. E., Janssen, P. F. M. and Niemegeers, C. J. E.** 1989. Rapid desensitization and down-regulation of 5-HT₂ receptors by DOM treatment. *European J. Pharmacol.* **163** : 145-149.

27. **Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.** 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193** : 265-275.
28. **Mayeda, A. R., Simon, J. R., Hingtgen, J. N., Hofstetter, J. R. and Aprison, M. H.** 1989. Activity-wheel stress and serotonergic hypersensitivity in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **33** : 349-353.
29. 三国雅彦 1988. 神経伝達と受容体・ホスホイノシチド代謝-抗うつ・抗そう薬の作用機序をめぐって-. *神経精神薬理* **10** : 521-528.
30. **Mizuta, T. and Segawa, T.** 1988. Chronic effects of imipramine and lithium on postsynaptic 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} sites and presynaptic 5-HT₃ sites in rat brain. *Jpn. J. Pharmacol.* **47** : 107-113.
31. **Morgan, W., Rudeen, K. and Pfeil, K.** 1975. Effect of immobilization stress on serotonin content and turnover in regions of the rat brain. *Life Sci.* **17** : 143-150.
32. **Ohi, K., Mikuni, M. and Takahashi, K.** 1989. Stress adaptation and hypersensitivity in 5-HT neuronal systems after repeated foot shock. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **34** : 603-608.
33. **Oomagari, K.** 1989. Effects of morphine and diazepam pretreatment on immobilization stress-induced increase of serotonin metabolism in discrete brain areas of the rat. *Fukuoka Acta Med.* **80** (2) : 81-94.
34. **Pedigo, N. W., Yamamura, H. I. and Nelson, D. I.** 1981. Discrimination of multiple [³H]-5-hydroxytryptamine binding sites by neuroleptic spiperone in rat brain. *J. Neurochem.* **36** : 220-226.
35. **Peroutka, S. J. and Snyder, S. H.** 1979. Multiple serotonin receptors: Differential binding of [³H]-5-hydroxytryptamine, [³H]-lysergic acid diethylamide and [³H]-spiroperidol. *Mol. Pharmacol.* **16** : 687-699.
36. **Peroutka, S. J. and Snyder, S. H.** 1980. Long-term antidepressant treatment decreases spiroperidol-labeled serotonin receptor binding. *Science* **210** : 88-90.
37. **Peroutka, S. J.** 1986. Pharmacological differentiation and characterization of 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B} and 5-HT_{1C} binding sites in rat frontal cortex. *J. Neurochem.* **47** : 529-540.
38. **Reader, T. A.** 1982. Catecholamines and serotonin in rat frontal cortex after PCPA and 6-OHDA: Absolute amounts and ratios. *Brain Res. Bull.* **8** : 527-534.
39. **Reinhard, J. F., Bannon, M. J. and Roth, R. H.** 1982. Acceleration by stress of dopamine synthesis and metabolism in prefrontal cortex: antagonism by diazepam. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **318** : 374-377.
40. **Robinson, D., Rickels, K., Feighner, J., Fabre, L., Gammans, R. E., Shrotriya, R. C., Alms, D., Andary, J. J. and Messina, M.** 1990. Clinical effects of the 5-HT_{1A} partial agonists in depression: a composite analysis of in the treatment of depression. *J. Clin. Pharmacol.* **10** : 67-76.
41. **Shannon, N. J., Gunnet, J. W. and Moore, K. E.** 1986. A comparison of biochemical indices of 5-hydroxytryptaminergic neuronal activity following electrical stimulation of the dorsal raphe nucleus. *J. Neurochem.* **47** : 958-965.
42. **Segawa, T., Mizuta, T. and Nomura, Y.** 1979. Modifications of central 5-hydroxytryptamine binding sites in synaptic membranes from rat brain after long-term administration of tricyclic antidepressants. *Eur. J. Pharmacol.* **58** : 75-83.
43. **Sprouse, J. S. and Aghajanian, G. K.** 1987. Electrophysiological responses of serotonergic dorsal raphe neurons to the 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} agonists. *Synapse* **1** : 3-9.
44. **Steinbuch, H. W. S.** 1984. Serotonin immunoreactive neurons and their projection in the CNS. p. 71-85. *In* A. Bjorklund, T. Hokfelt and M. T. Kuhar (eds.), *Handbook of chemical neuroanatomy. Classical transmitters and transmitter receptors in the CNS.* 3. New York Elsevier.
45. **Welner, S. A., Montigny, D. C., Desroches, J., Desjardins, P. and Surany-Cadotte, B. E.** 1989. Autoradiographic quantification of serotonin_{1A} receptors in rat brain following antidepressant drug treatment. *Synapse* **4** : 347-352.
46. **Willner, P.** 1984. The validity of animal models of depression. *Psychopharmacol.* **83** : 1-16.
47. 山脇成人, 早川 浩, 秀 和泉, 加藤匡宏, 横田 則夫, 杉原順二 1989. 電気けいれん療法の中樞セロトニン受容体に及ぼす効果. 厚生省精神・神経疾患研究委託費, 躁うつ病の発生機序に関する生物学的研究. 昭和63年度研究成果報告書 : 83-89.
48. **Yocca, F. D.** 1990. Neurochemistry and neurophysiology of buspirone and gepirone: interactions at presynaptic and postsynaptic 5-HT_{1A} receptors. *J. Clin. Psychopharmacol.* **10** : 6s-12s.

Effects of Chronic Restraint Stress and Antidepressant Treatment on Serotonin Metabolism and Receptors in Rat Brain

Hirokuni SERA

Department of Neurology and Psychiatry, Hiroshima University School of Medicine
(Director: Prof. Sigeto YAMAWAKI)

Effects of restraint stress on serotonin metabolism and serotonin receptors were examined in 3 discrete brain regions (frontal cortex (FC), thalamus+hypothalamus (TH), medulla+pons (PO)) of the rat.

1) 5-hydroxyindolacetic acid (5-HIAA) concentrations were significantly increased in all regions examined after 1 day stress and remained increased at 3 and 7 days. The degree of increase, however, was attenuated gradually.

2) 5-HT₂ and 5-HT_{1A} receptors did not change in the frontal cortex after chronic stress.

3) Serotonin metabolism did not change in any regions after acute imipramine, while 5-HIAA concentration was decreased following 7 days imipramine treatment. Imipramine suppressed the stress-induced increase in serotonin metabolism in FC and TH but not in PO. Serotonin metabolism was slightly suppressed by acute buspirone, but stress-induced enhancement of serotonin metabolism was further accelerated by chronic buspirone.

4) 5-HT₂ receptors decreased following 7 days administration of imipramine with or without stress, but 5-HT_{1A} receptors did not change. 5-HT₂ and 5-HT_{1A} receptors did not change after administrations of buspirone.

These findings demonstrate that serotonin metabolism was increased after stress and that the degree of increase attenuated gradually, suggesting the development of stress adaptation. The adaptation occurred faster in FC and TH than in PO. Moreover, the present study suggests different antidepressant mechanisms between imipramine and buspirone.