

研究課題名

母仔分離ストレスモデルの酸化ストレス
脆弱性とその分子機構の解明

課題番号 18591297

平成 18 年度～平成 19 年度科学研究費補助金(基盤研究(C))

研究成果報告書

平成 20 年 5 月 30 日

研究代表者 植田 勇人
宮崎大学医学部准教授

目 次

はしがき	2
研究組織・研究経費	3
研究発表	4
著書・原著	4
国際学会	6
国内学会	7
懇和会	9
研究内容	10
研究目的	10
実験 1	10
実験 2	14
総 括	18
発表論文	23

はしがき

ヒト疫学調査では劣悪な養育環境は知的障害・運動能力・身体発達障害の素地を形成し[1]さらにうつ病発症・ストレス脆弱性を昂進[2]させるという報告があり、これらは初期養育環境が、成熟後の神経伝達系異常に影響してくることを示唆するものである。てんかん原性獲得もグルタミン酸神経伝達やレドックス状態の変化によって修飾を受けるものであるから、幼若期における養育環境がてんかんなどの酸化ストレスに脆弱性を帯びる一因になることが強く推測され、今回の研究へと発展した。実際、母仔分離 (neonatal isolation:NI) 実験ではすでにPTZけいれん誘発性後に、NI群で海馬組織障害と学習障害の顕著化[3]、GABA-A受容体の発現量低下・機能低下[4]などの生化学的・形態的諸変化が報告されている。この度の当該研究ではまず母仔分離操作を受けたラットは拘束ストレス直後、脳内の抗酸化能が顕著に低下[5]していることを示すことができた。このことは幼若期における養育環境が劣悪であると、既報のGABA抑制ばかりでなく成熟後後に遭遇する酸化ストレス（ここでは拘束ストレス）に対して脆弱性を示し、レドックスが容易に酸化シフトを起こすことを意味している。さらに、てんかん性病態の一モデルであるキンドリング形成も母仔分離群で著しく容易に完成した。この点も、酸化ストレスへの脆弱性とともに、幼若期の劣悪な養育環境が成熟後における脱分極の容易な暴走を許すことを裏付けるものである。

ヒト疫学調査上では、すでに劣悪な養育環境(両親の離婚・虐待・希薄な親子関係)が、うつ病・不安障害に影響することが危惧されている。中には、てんかん発症との因果を報告したものも散見されるが、心理的ストレス負荷よりも、虐待起因性の頭部外傷に説明を求める報告が多く、幼児期の心理ストレスをてんかん起因とするTeicherらの報告があるもののごく少数に限られている [6, 7]。本研究では、幼児期の不遇な心理的養育環境が成長後に易痙攣性やてんかん原性の早期獲得に結びつくことを示した。てんかんと心理的養育環境の因果関係の存在を深める結果となった。今後は、ヒト疫学調査上の多因子解析が望まれる。

研究組織

研究代表者：植田 勇人（宮崎大学医学部准教授）

研究分担者：土井 拓 （宮崎大学医学部助教）

研究分担者：中島 晉 （宮崎大学医学部准教授）

研究分担者：石田 康 （宮崎大学医学部教授）

研究経費

平成 16 年度 1,700 千円

平成 17 年度 1,600 千円

計 3,300 千円

研究発表

<著書・原著>

1. Willmore JL, Ueda Y, Triggs WJ. Encyclopedia of Basic Epilepsy Research. In Schwarzkroin P, ed. Models of seizures and epilepsies B: Traumatic hemorrhage and iron-induced epileptogenesis vol Kidlington, Oxford, 2007.
2. Willmore LJ, Ueda Y, Triggs WJ. Role of lipid peroxidation and transporter proteins during epilepsy. Encyclopedia of Basic Epilepsy Research in press, 2007.
3. Kojima T, Mukai W, Fuma D, Ueda Y, Okada M, Sakaki Y, Kaneko S. Determination of genomic breakpoints in an epileptic patient using genotyping array. Biochem Biophys Res Commun 341(3) : 792-6, 2006.
4. Takatsuru Y, Takayasu Y, Iino M, Nikkuni O, Ueda Y, Tanaka K, Ozawa S. Roles of glial glutamate transporters in shaping EPSCs at the climbing fiber-Purkinje cell synapses. Neurosci Res 54(2) : 140-8, 2006.
5. Ueda Y, Noor JI, Nagatomo K, Doi T, Ikeda T, Nakajima A, Ikenoue T. Generation of lipid radicals in the hippocampus of neonatal rats after acute hypoxic-ischemic brain damage. Exp Brain Res 169(1) : 117-121, 2006.
6. Yokoyama H, Morinobu S, Ueda Y. EPRI to estimate the in vivo intracerebral reducing ability in adolescent rats subjected to neonatal isolation. J Magn Reson Imaging 23(5) : 637-40, 2006.
7. Nagatomo K, Ueda Y, Doi T, Nakajima A. An acute dysfunction of the glutamate transport activity has been shown to generate free radicals and suppress the anti-oxidant ability in the hippocampus of rats. Neurosci Res 57(3) : 477-80, 2007.
8. Nagatomo K, Ueda Y, Doi T, Takaki M, Tsuru N. Functional role of GABA transporters for kindling development in GLAST KO mice. Neurosci Res 57(2) : 319-21, 2007.
9. Nakajima A, Ueda Y. Effects of hydroxyl radicals generated from the depleted uranium-hydrogen peroxide systems. Journal of

Radioanalytical and Nuclear Chemistry 272(2) : 251–255, 2007.

10. Nakajima A, Ueda Y. Relationship between copper biosorption and microbial inhibition of hydroxyl radical formation in a copper(II)-hydrogen peroxide system. World Journal of Microbiology and Biotechnology 2007.
11. Noor JI, Ueda Y, Ikeda T, Ikenoue T. Edaravone inhibits lipid peroxidation in neonatal hypoxic-ischemic rats: an in vivo microdialysis study. Neurosci Lett 414(1): 5–9, 2007.
12. Takaki M, Ueda Y, Doi T, Nagatomo K, Murashima YL, Nakajima A, Kannan H. Age-dependent changes in the hippocampal antioxidant ability of EL mice. Neurosci Res 58(3): 336–8, 2007.
13. Ueda Y. Epilepsy and Redox. Research Communications in Biological Psychology, Psychiatry and Neurosciences 30(151–164, 2007.
14. Ueda Y, Doi T, Nagatomo K, Nakajima A. Protective role of pentobarbital pretreatment for NMDA-R activated lipid peroxidation is derived from the synergistic effect on endogenous anti-oxidant in the hippocampus of rats. Neurosci Lett 417(1): 46–9, 2007.
15. Ueda Y, Doi T, Nagatomo K, Nakajima A. In vivo activation of N-methyl-d-aspartate receptors generates free radicals and reduces antioxidant ability in the rat hippocampus: Experimental protocol of in vivo ESR spectroscopy and microdialysis for redox status evaluation. Brain Res 1178(20–7, 2007.
16. Ueda Y, Doi T, Nagatomo K, Tokumaru J, Takaki M, Willmore LJ. Effect of levetiracetam on molecular regulation of hippocampal glutamate and GABA transporters in rats with chronic seizures induced by amygdalar FeCl₃ injection. Brain Res 1151(55–61, 2007.
17. Ueda Y, Doi T, Nagatomo K, Willmore LJ, Nakajima A. Functional role for redox in the epileptogenesis: molecular regulation of glutamate in the hippocampus of FeCl₃-induced limbic epilepsy model. Exp Brain Res 181(4): 571–7, 2007.
18. Ueda Y, Yokoyama H, Nakajima A, Takaki M, Nagatomo K, Doi T, Willmore LJ. In Vivo EPR Estimation of Bilateral Hippocampal Antioxidant Ability

of Rats with Epileptogenesis Induced by Amygdalar FeCl₃ Microinjection. *Epilepsia* 48(10): 1947-51, 2007.

<国際学会>

1. Doi T, Ueda Y, Nagatomo K, Willmore J. Role of glutamate and GABA transporters in the development of pentylenetetrazol kindling. 1st North American Regional Epilepsy Congress, 60th Annual Meetings of the American Epilepsy Society &Canadian League Against Epilepsy, December 1-5th, 2006 (San Diego, California).
2. Kojima T, Fuma D, Ueda Y, Okada M, Kaneko S. Determination of genomic breakpoints in an epileptic patient using genotyping array. 36th Annual Meeting of Annual Meeting of Society for Neurosciences, October 14-18th, 2006 (Atlanta).
3. Takaki M, Ueda Y, Nakajima A, Doi T, Nagatomo K, Willmore LJ. Measurement of antioxidant status using EPR and microdialysis during seizures in the EL mouse. 1st North American Regional Epilepsy Congress, 60th Annual Meetings of the American Epilepsy Society &Canadian League Against Epilepsy, December 1-5th, 2006 (San Diego, California).
4. Ueda Y, Doi T, Nagatomo K, Takaki M, Nakajima A, Willmore LJ. The functional role of glutamate transporter associated protein (GTRAP3-18) in the epileptogenesis induced by PTZ-kindling. 1st North American Regional Epilepsy Congress, 60th Annual Meetings of the American Epilepsy Society &Canadian League Against Epilepsy, December 1-5th, 2006 (San Diego, California).
5. Willmore LJ, Ueda Y, Yokoyama H, Nakajima A, Takaki M, Nagatomo K, Doi T. In vivo EPR Estimation of Bilateral Hippocampal Antioxidant Ability of Rats with Epileptogenesis induced by Amygdalar FeCl₃ Microinjection 1st North American Regional Epilepsy Congress, 60th Annual Meetings of the American Epilepsy Society &Canadian League Against Epilepsy, December 1-5th, 2006 (San Diego, California).

6. Noor J, Ikeka T, Ueda Y, Ikenoue T. Edaravone inhibits lipid peroxidation in neonatal hypoxic-ischemic rats: An In vivo microdialysis study. The Endocrine Society's 89th Annual Meeting, June, 2-5th, 2007 (Toronto).
7. Takaki M, Ueda Y, Doi T, Nagatomo K, Murashima Y, Willmore J. Molecular regulation of anti-oxidant ability in the hippocampus of EL mice. 61th American Epilepsy Society's Annual Meeting, November30th-decemver 4th, 2007 (Philadelphia).
8. Ueda Y, Takaki M, Doi T, Nagatomo K, Nakajima A, Willmore J. Neuroprotective effect of levetiracetam is derived from the synergistic effect on endogenous anti-oxidant in the hippocampus of rats. 61th American Epilepsy Society's Annual Meeting, November30th-Decemver 4th, 2007 (Philadelphia).

<国内学会>

(特別講演)

1. 植田勇人. In vivo 条件での レドックス評価と病態モデルへの応用. 第 29 回日本神経科学大会, 7月 19 日～21 日, 2006 (京都).
2. 植田勇人. 神経疾患における脳内レドックスの解析とその役割. 第 49 回日本小児神経学会, 7月 5-6 日, 2007 (大阪).

<シンポジウム>

1. 植田勇人, 高木麻夕子, 中島暉. シンポジウム 「マイクロダイアリーシス-ESR 法を用いた中枢病態モデルの脳内抗酸化能評価」. 第 45 回電子スピニンサイエンス学会年会, 11月 14-17 日, 2006 (京都).
2. Ueda Y. 2007 Redox regulation and anti-convulsive effect of zonisamide. Excegran Grand Symposium, 2月 3 日, 2007 (Soul).

<一般講演>

1. 中島暉, 松田恵美子, 植田勇人. 金属イオン-過酸化水素系を利用する脂溶性物質の抗酸化評価. 第 45 回電子スピニンサイエンス学会年会, 11 月 14～16 日, 2006 (京都).

2. 植田勇人, 土井拓, 中島暉, 徳丸潤, 鶴紀子, 石田康. キンドリング形成過程におけるグルタミン酸トランスポーター機能調節因子(GTRAP3-18)の機能解明とGABA合成能に関する研究. 第17回てんかん治療研究振興財団研究報告会, 3月3日, 2006
3. 植田勇人, 横山秀克, 中島暉, 土井拓, 長友慶子, 高木麻夕子. 鉄塩誘導てんかんモデルにおける両側海馬抗酸化能の経時変化. 第40回日本てんかん学会, 9月27-29日, 2006(金沢).
4. 植田勇人, 高木麻夕子, 中島暉, 鶴 紀子, 土井拓, 長友慶子. GLAST欠損マウスにおけるキンドリング発展とレドックス. 第1回九州てんかん研究会, 7月1日, 2006(福岡).
5. 横山秀克, 植田勇人, 中島暉, 吉村哲彦. 鉄塩誘導てんかんモデルにおける両側海馬還元能のRSID法による経時モニタリング. 第34回日本磁気共鳴医学会, 9月14~16日, 2006(筑波).
6. 高木麻夕子, 植田勇人, 中島暉, 村島善也, 土井拓, 長友慶子, 河南洋. ELマウスにおけるictogenesis成立前後の海馬抗酸化能評価. 第40回日本てんかん学会, 9月27-29日, 2006(金沢).
7. Matsuda E, Nakajima A, Ueda Y. Effect of Polyphenol Compounds on the DNA Damage and ROS Formation by Depleted Uranium. ISESS-SEST2007, 11月6日-9日, 2007
8. 岩本泰行, 森信繁, 高橋輝道, 山脇成人, 植田勇人, 土井拓, 長友慶子, 高木麻夕子. Single prolonged stress (SPS)ラットを用いたPTSDの分子生物学的研究. 第29回日本生物学的精神医学会・第37回日本神経精神薬理学会, 7月11-13日, 2007(札幌).
9. 植田勇人. ペントバルビタールによる神経細胞保護作用は脳内抗酸化能亢進に起因する
. 第34回日本脳科学会, 6月8-9日, 2007(出雲).
10. 植田勇人, 高木麻夕子, 中島暉, 村島善也, 土井拓, 長友慶子, 河南洋. ELマウスにおけるictogenesis成立前後の海馬抗酸化能評価. 第29回日本フリーラジカル学会, 6月9-10日, 2007(名古屋).
11. 植田勇人, 高木麻夕子, 土井拓, 長友慶子, 村島善也, 河南洋. ELマウスにおけるictogenesis形成と海馬抗酸化能低下の分子機構. 第41回日本てんかん学会, 11月1-2日, 2007(福岡).

12. 植田勇人, 高木麻夕子, 拓 土, 長友慶子, グルタミン酸トランスポーターへのレドックス制御とてんかん原性獲得機序. トランスポーター研究会九州部会, 11月 24 日, 2007 (熊本).
13. 高木麻夕子, 植田勇人, 土井拓, 長友慶子, 村島善也, 洋 河. てんかんミュータント EL マウスの発作原性獲得期における海馬抗酸化能低下とグルタミン酸トランスポーターの発現. トランスポーター研究会九州部会, 11月 24 日, 2007 (熊本).

<懇話会>

1. 高木麻夕子, 植田勇人, 中島暉, 村島善也, 土井拓, 長友慶子, 河南洋. EL マウスにおける海馬抗酸化能の減弱 ; マイクロダイアリーシステム EPR 法を用いた評価. 第 27 回宮崎てんかん懇話会, 6 月 23 日, 2006 (宮崎).
2. 高木麻夕子, 植田 勇人, 中島 暉, 長友 慶子, 土井 拓, 河南洋. EL マウスにおける海馬抗酸化能の減弱. 第 11 回宮崎ニューロサイエンス研究会, 7 月 10 日, 2007 (宮崎).

研究目的

近年増加傾向にある幼児・思春期精神障害の成立機序やその対応方法について、現代の日本社会は、精神科臨床に大きな期待を寄せている。内分泌攪乱物質・環境ホルモンの影響は既に広く研究されており[8] [9]、ヒトの疫学調査からも劣悪な環境で養育された幼児（両親の離婚・虐待・希薄な親子関係など）は、成長後に知的障害・運動機能障害に加え、うつ病に高頻度に認める視床下部・下垂体・副腎皮質系（HPA系）の過剰な機能亢進、学習性無力の易形成、学習能力の低さなど心理的ストレスに対する脆弱性を有することが知られている[1]。また、劣悪な養育環境は発育の早期段階に良好な環境（environmental enrichment）におかれることで、一連の心理的ストレス脆弱性は回避できることなども知られている[10]。しかしながら、幼児・思春期精神障害の成立についての包括的研究が望まれるなかで、心理的ストレス脆弱性の研究が先行するばかりで、劣悪な環境で養育され発育成長した個体が、虚血・低酸素・けいれん負荷などの物理的ストレスに対してどの程度の脆弱性を有するかに関する研究は世界的にも少ない。劣悪な養育環境が、ノルアドレナリン・セロトニン神経伝達異常の研究を通じ、うつ病発症の危険因子を成すと考えられること[11]から、幼若期の養育環境は、成熟後の神経伝達機能を広範囲に修飾している可能性が大きい。

我々は、電子スピニ共鳴装置を用いた実験研究で、乳児期に低酸素・虚血に暴露されたモデル動物やパーキンソン病モデルや症候性てんかんなどといった中枢疾患の病態では、酸化ストレスへの脆弱性が存在することを証明している。その結果、脳内レドックスの酸化シフトが各種病態に積極的に関与していることを提唱した。母仔分離ストレスに暴露された個体においても酸化ストレスへの脆弱性の存在が十分予測され得る。

本研究では、母仔分離という劣悪な環境で養育された場合の酸化ストレスへの脆弱性の存在証明を行い酸化ストレスへの脆弱性を具体的に検証する。

【実験 1】母仔分離ストレス負荷ラットにおける脳内抗酸化能の解析実験

本研究は宮崎大学動物実験委員会の承認を得たうえで遂行する（承認番号1998-155-11）。

1) 母仔分離ストレス負荷ラット(NI群)の作成

NI群ラットの作成は、Kehoeらの方法に準拠[12]し、2日から9日令に至った雄性

Sprague-Dawley (SD系) ラットを母ラットと一日一時間、プラスチックボックスに入れ別室におく隔離操作をもって母子分離ストレスとする。生後21日目で離乳を行い、その後は以下の飼育環境下で90日齢まで飼育した。24+/-2°C、湿度55+/-15%、照度サイクル1~2時間毎の明暗期をもつ食餌・摂水制限のない動物舎内にステンレス製ケージを置きそのなかにて飼育する。

2) 酸化ストレスへの脆弱性の検討

生体には酸化ストレスに対する防御機構としての種々の還元剤が備えられており、酸化と還元のバランスがとられている。したがって、この還元能が低下しても酸化障害は生じうる。一方、我々は電子スピン共鳴(ESR)画像化装置を用いて、ラットの脳部位別の還元能を *in vivo* で計測する手法を開発すみである。この手法では、生体に投与されたニトロキシドラジカルが生体内の還元剤によりESR検出不可化合物に還元される性質を利用して、脳内の還元能を評価している(図1)。

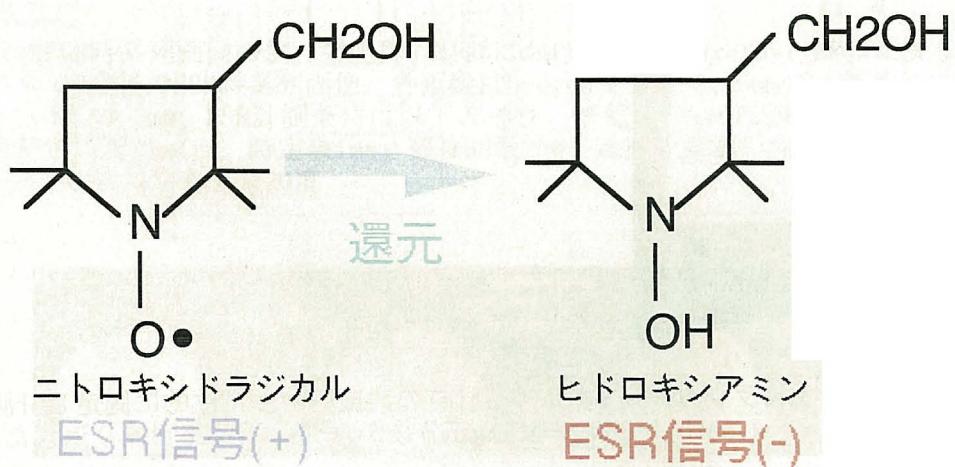


図 1

ニトロキシドラジカルの構造図。ニトロキシドラジカルは脳内還元物質によりその磁性を失うことが知られている。よって、ニトロキシドラジカルのESR信号の減衰速度は脳内抗酸化能に依存しているので、その減衰パターンから脳内抗酸化能やレドックス状態を推測することが出来る。

本研究では、この画像法を用いて、母子分離ストレス負荷の成長ラットに拘束ストレスを加えた場合の大脳皮質、海馬、線条体における還元能を分析した。母仔分離操作から7週齢間後の時点でのESRによる画像化実験を行なった。8週齢になった成熟時点で90分間の拘束ストレスを負荷し、その後の抗酸化能をESR法で測定した。拘束ストレスはSuenaga T [13]らの方法に従った。ネンブタール麻酔下の各々のラットに対して、血液脳関門透過性ニトロキシドラジカルで

ある3-hydroxymethyl-2, 2, 5, 5-tetramethylpyrrolidine-1-oxy1 (hydroxymethyl-PROXYL) (生物ラジカル研究所にて合成) を2mmol/kgの用量で尾静注し、ESR画像化装置(図2；生物ラジカル研究所にて製作)の共振器内に定位的に固定し計測を行なった。計測はhydroxymethyl-PROXYL投与後5分後から5分おきに5回繰り返した。

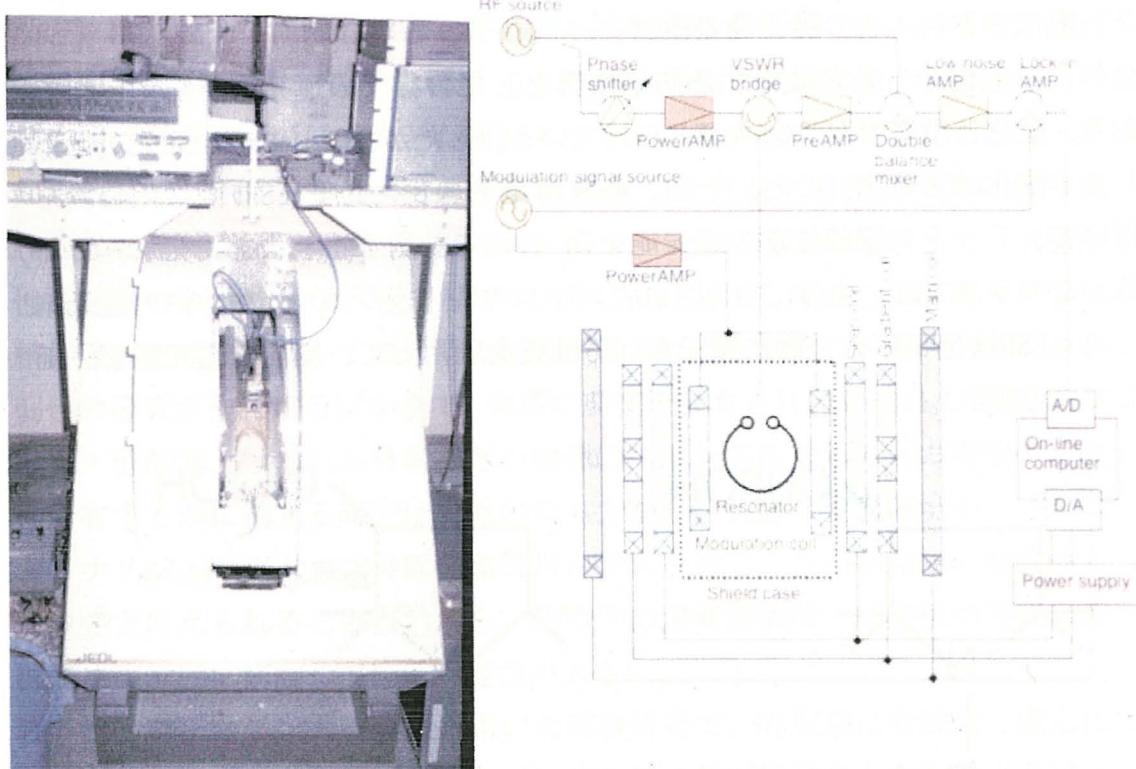


図2

ESR画像化装置(図2；生物ラジカル研究所にて製作)の共振器内に定位的に固定し計測を行なった。計測はhydroxymethyl-PROXYL投与後5分後から5分おきに5回繰り返した。

結果

各群のESR時系列画像の例を図4に示す。各画像のスライス平面に相当するラット脳地図を投影し、右半球の大脳皮質、線条体、海馬の3箇所におけるESR信号強度の平均値を算出した(図5)。

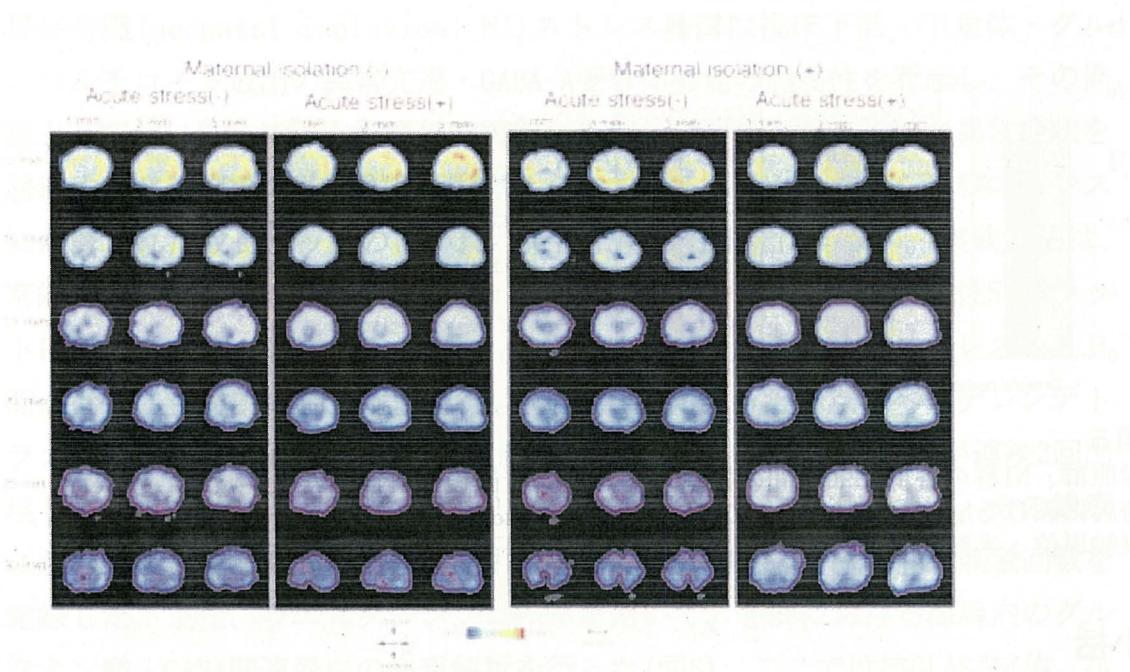


図3

各群のESR時系列画像の例。対照群、NI群におけるhydroxymethyl-PROXYL投与5、10、15、20、30分後のESR時系列画像。各画像はbregma後方1、3、5mmのスライスであり、スライス厚は0.5mm。ESR計測条件は以下の通り。RF電力50mW@720MHz、磁場掃引幅15mT、磁場掃引速度15mT/s、時定数1ms、積算回数2回、磁場変調幅0.2mT@100kHz、磁場勾配1mT/cm、磁場勾配変更角20度

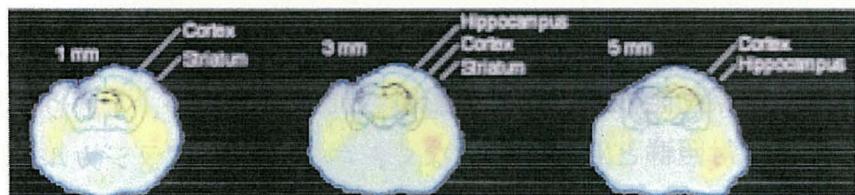


図4

ESR画像のスライス平面に相当するラット脳地図を投影

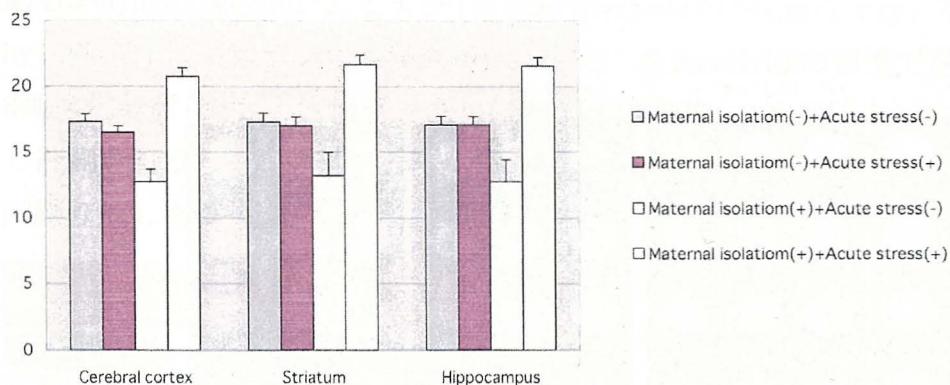


図 5

対照群、NI群の各群に90分間の拘束ストレス負荷直後に計測した大脳皮質、線条体、海馬におけるhydroxymethyl-PROXYLの半減期(Student's t-test, *p<0.05)
縦軸単位；半減期（分）

小括

これらの画像領域におけるESR信号強度の平均値の時間変化を、片対数プロットしたところ再現性よく直線性が観察された(決定係数の絶対値>0.98)。これは信号強度が指数関数的に減衰しており、脳内還元能を反映するニトロキシドラジカルの半減期はニトロキシドラジカル減衰の指標となる。よって、脳内還元能を反映するニトロキシドラジカルの減衰の指標としてニトロキシドラジカルの半減期を算出した。

また、この実験ではニトロキシドラジカルの減衰が母仔分離[入れる：操作]を受けたラットでの脳内循環動態の違いに多少影響されていないか、という疑問がでるが、脳内移行には対照群とNI群に差はなく、ニトロキシドラジカルの除去・減衰のうち血液循環によって脳組織から除去されるものは、10%以下と少ない。よって各群の半減期の相違は血液循環ではなく、脳内抗酸化能を反映するものであると考えられる。さらに下大静脈で生じるわずかなニトロキシドラジカル減衰は、脳・肝臓・腎臓・脾臓・肺・腸その他多くの臓器に移行したニトロキシドラジカルが各臓器内にある抗酸化物質によって減衰することが検証済みである。よって、脳内の循環動態に依存した相違ではなく、脳内抗酸化能の違いによると結論づけられる。

本研究の結果から、母仔分離ストレス負荷後成熟したラットの脳内還元能は、亢進しているが、急性拘束ストレスによって急激に疲弊することが示された。

【実験2】母仔分離ストレス暴露ラットにおけるてんかん原性獲得と分子機構

母仔分離(neonatal isolation; NI)ストレス暴露は視床下部 - 下垂体 - グルココルチコイド放出の異常亢進・GABA-A受容体機能の脆弱性を惹起し、その帰結としてけいれんに伴う海馬細胞障害・記憶・学習障害など様々な異常症状を誘導する発達期のストレス要因と考えられている。しかしながら当該ストレスに暴露された成長ラットのけいれん獲得に関する研究は少ない。実験方法は、宮崎大学動物実験委員会承認の下、Kehoe Pら[12]の方法に従い、雄性SD系ラットに対して生後2日齢からスタートして1日1時間分離させるストレスを8日間かけた。生後21日齢で離乳を行い、p49日齢に至った時点でペンチレンテトラゾール(PTZ)40 mg/kgを隔日に腹腔内投与開始し、全身けいれんが連續2回出現した時点でキンドリング完成とした。PTZキンドリング過程では、その観察において投与後20分間の観察期間中の各けいれん潜時・持続時間・刺激回数を記録した。また、ウエスターングロットを用いて、各群における海馬内のグルタミン酸・GABA関連蛋白の発現解析を行った(図6)。ここでは抗GLAST抗体、抗GLT1抗体、抗EAAC1抗体、抗GAT1抗体、抗GAT3抗体、抗GTRAP3-18抗体、抗GluR1抗体、抗NMDA-R1抗体、抗GluR2抗体の計9種類の一次抗体を用いてその後、peroxidaseの結合した2次抗体と反応させECL法にて各シグナル強度を検出し統計解析を行った。

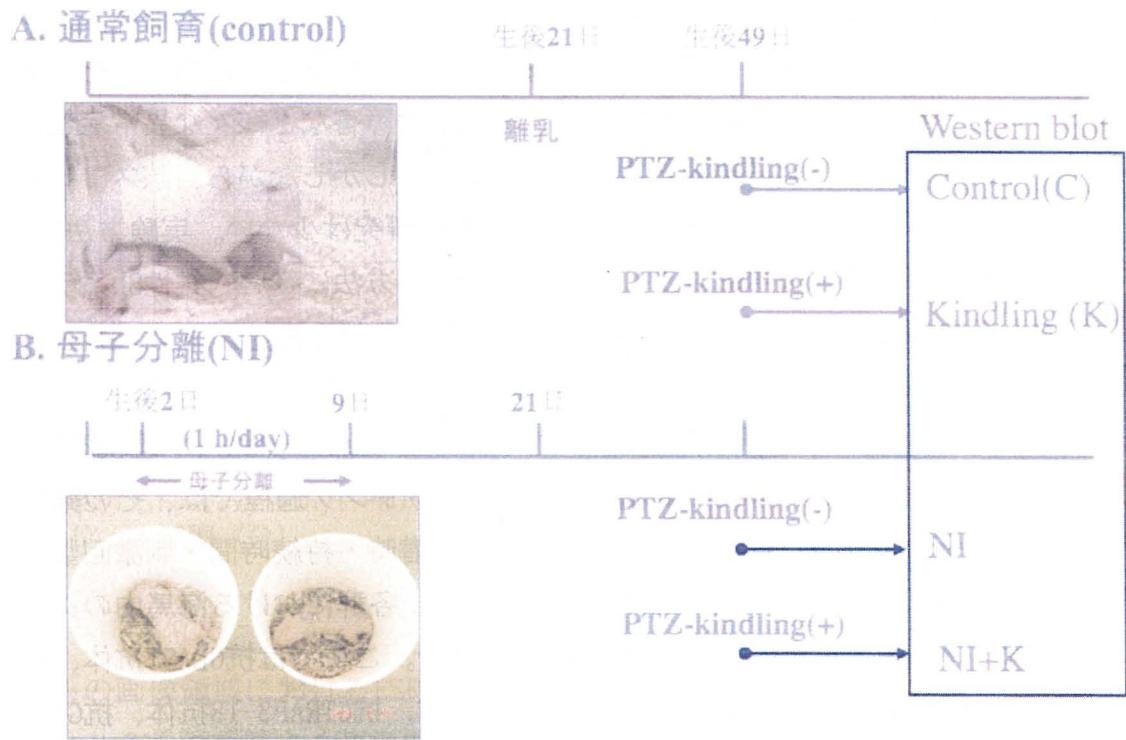


図6

母仔分離とPTZキンドリンの経過図。雄性SDp2-p9ラットに対して1日1時間仔ラットを母ラットと別室におくNIストレスを負荷[変更：雄性SDラットを用いて、生後2日齢から8日間、1日1時間仔ラットを母ラットと別室におくNI群を設けた。さらに生後21日齢で離乳を行い、生後49日齢に至った時点でのペンチレンテトラゾール(PTZ)40 mg/kgを隔日に腹腔内投与開始し、全身けいれんが連続2回出現した時点で完成とした。また、ウエスタンプロットを用いて各群における海馬内のグルタミン酸・GABA関連蛋白の発現解析を行った。

【結果】

1) NI群ではキンドリン初期のけいれん潜時が有意に短く、キンドリン後半でけいれん持続時間が有意に長かく、早期にキンドリンが完成した。

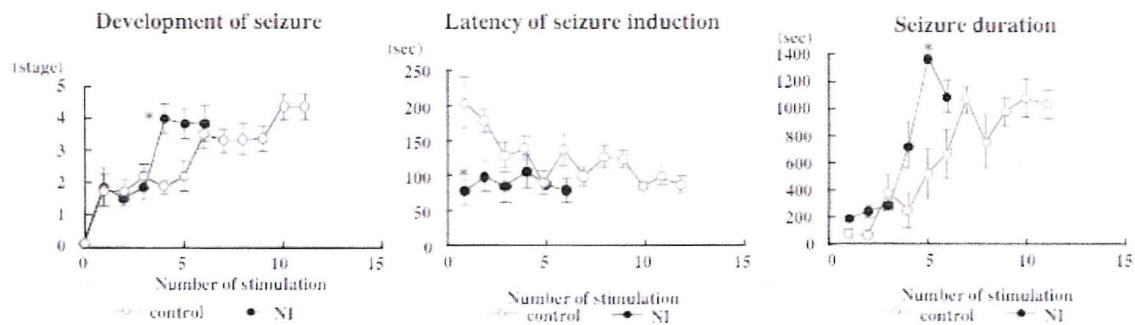


図7

NI群では1) キンドリン初期のけいれん潜時が有意に短い。2) しかし、対照群で観察されたけいれん潜時短縮現象は、NI群では観察されていない。3) キンドリン

後半でけいれん持続時間が有意に長い。4) 早期にキンドリングが完成した。

NI群においてGLAST, EAAC1, Glu-R1, NMDA-R1は有意に対照群と比し発現増加、一方GAT-1, GTRAP3-18は有意な発現の低下が観察された。

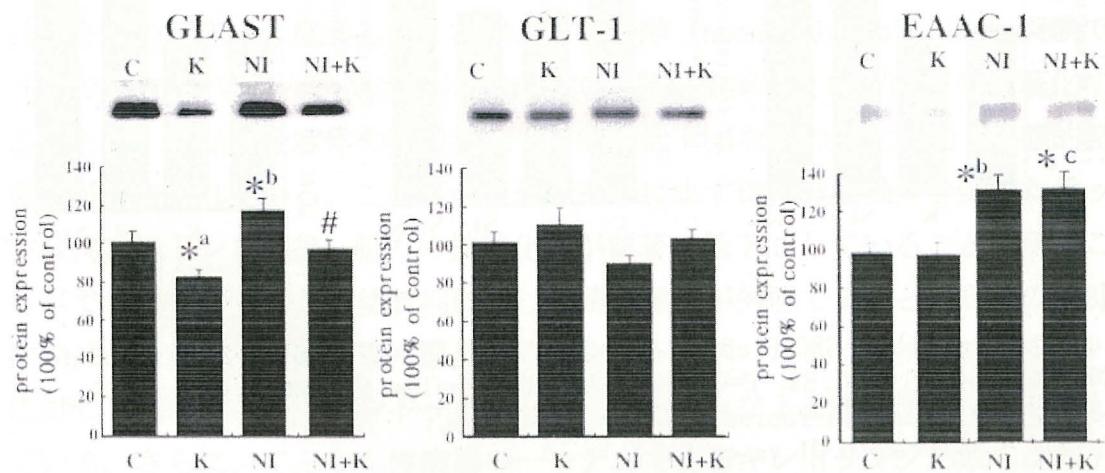


図8

GLAST: F value for GROUP effect, $F_{3,20} = 14.567$, P=0.001; GLT-1: F value for GROUP effect, $F_{3,20} = 1.989$, P=0.414, not significance; EAAC-1: F value for GROUP effect, $F_{3,20} = 19.116$, P=0.001. Data represents mean +/- S.E.M.. *Pa~c < 0.05 vs control, #P<0.05, vs NI

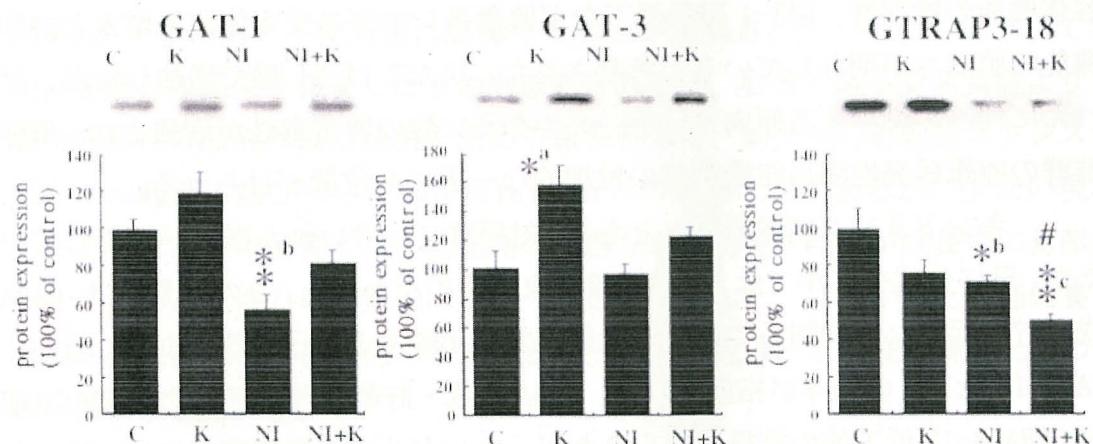


図9

GAT-1: F value for GROUP effect, $F_{3,20} = 9.567$, P=0.021; GAT-3: F value for GROUP effect, $F_{3,20} = 7.89$, P=0.024; GTRAP3-18: F value for GROUP effect, $F_{3,20} = 29.116$, P=0.001

Data represents mean +/- S.E.M..

*Pa~c < 0.05, **P<0.01 vs control, #P<0.05, vs NI

(GTRAP3-18は、EAAC-1とグルタミン酸の結合を阻止する可溶性蛋白)

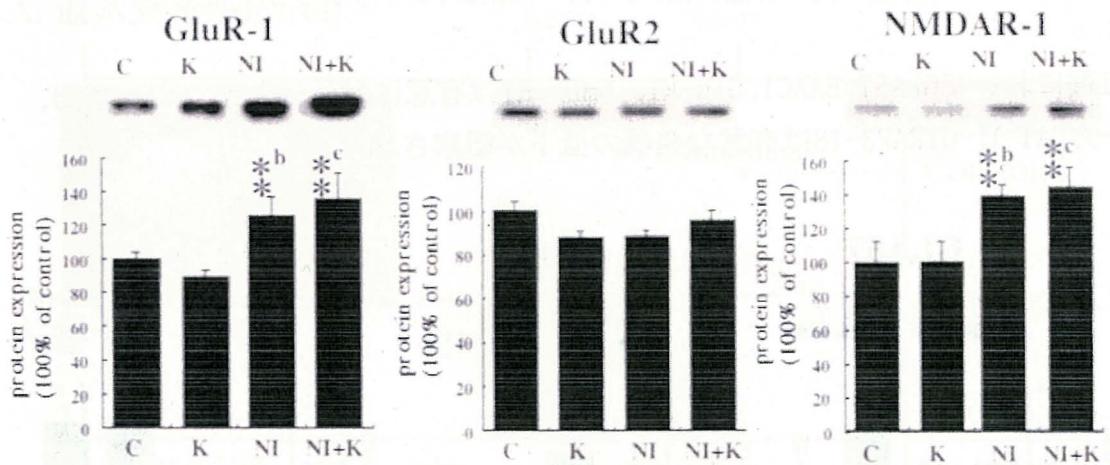


図10

GluR-1: F value for GROUP effect, $F_{3,20} = 19.197$, $P=0.001$; GluR-2: F value for GROUP effect, $F_{3,20} = 2.89$, $P=0.104$; NMDAR-1: F value for GROUP effect, $F_{3,20} = 3.225$, $P=0.001$. Data represents mean \pm S.E.M..
 $*Pa^{\sim}c < 0.05$, $**Pc < 0.01$ vs control

小括

母仔分離モデルに見られるPTZ易痙攣性、PTZけいれん誘発性の重篤な海馬組織障害、キンドリンング早期完成には、AMPA&NMDA受容体発現増加、GABA-A受容体機能の脆弱性、GAT-1発現低下など興奮系シナプス受容体発現増大と抑制系機能の脆弱さが関与していると考察された。GLASTはNI群で増加したが、けいれんに伴って減少する傾向にある。グルタミン酸の興奮毒性が増強され、母仔分離群の痙攣誘発性海馬組織障害の付加的な一因にも位置づけられる。

キンドリンング刺激履歴とともに、対照群ではけいれん潜時が短縮していたが、母仔分離モデルでは、その短縮現象は認めなかった。この背景には、GABA合成・貯蔵促進など抑制系に対する代償機能を示唆する分子機構（EAAC1増加とGTRAP3-18低下）の関与が指摘される。GABA合成・貯蔵促進を示唆するEAAC1増加とGTRAP3-18低下等の結果が得られたが、キンドリンング早期完成には、Glu-R1やNMDA-R1の上昇などのグルタミン酸受容体の発現増大と脆弱なGABA-A受容体機能に加えGAT-1の低下による逆向輸送低下が分子背景に底流しているものと推測した。

総括

ヒト疫学調査では劣悪な養育環境は知的障害・運動能力・身体発達障害の素地

を形成し[1]さらにうつ病発症・ストレス脆弱性を昂進[2]させると云う報告があり、これらは初期養育環境が、成熟後の神経伝達系異常に影響してくることを示唆するものである。てんかん原性獲得もグルタミン酸神経伝達やレドックス状態の変化によって修飾を受けるものであるから、幼若期における養育環境がてんかんなどの酸化ストレスに脆弱性を帯びる一因になることが強く推測され、今回の研究へと発展した。実際、母仔分離 (neonatal isolation) 実験ではすでにPTZけいれん誘発性後に、NI群で海馬組織障害と学習障害の顕著化すること[3]、GABA-A受容体の発現量低下・機能低下[4]などの生化学的・形態的諸変化が報告されている。この度の当該研究ではまず母仔分離操作を受けたラットは拘束ストレス直後、脳内の抗酸化能が顕著に低下[5]していることを示すことができた。このことは幼若期における養育環境が劣悪であると、既報のGABA抑制ばかりでなく成熟後後に遭遇する酸化ストレス（ここでは拘束ストレス）に対して脆弱性を示し、レドックスが容易に酸化シフトを起こすことを意味している。さらに、てんかん性病態の一モデルであるキンドリング形成も母仔分離群で著しく容易に完成した。この点も、酸化ストレスへの脆弱性とともに、幼若期の劣悪な養育環境が成熟後における脱分極の容易な暴走を許すことを裏付けるものである。

ヒト疫学調査上では、すでに劣悪な養育環境(両親の離婚・虐待・希薄な親子関係)が、うつ病・不安障害に影響することが危惧されている。中には、てんかん発症との因果を報告したものも散見されるが、心理的ストレス負荷よりも、虐待起因性の頭部外傷に説明を求める報告が多く、幼児期の心理的ストレスがてんかん起因に結びつける報告はTeicherらの報告などがあるが、少ない現状にある[6, 7]。本研究では、幼児期の不遇な心理的養育環境が成長後に易痙攣性やてんかん原性の早期獲得に結びつくことを示した。てんかんと心理的養育環境の因果関係の存在を深める結果となった。今後は、ヒト疫学調査上での多因子解析が望まれる。

参考文献

- [1] Albers LH, Johnson DE, Hostetter MK, Iverson S, Miller LC. Health of children adopted from the former Soviet Union and Eastern Europe. Comparison with preadoptive medical records. *JAMA*. 278 (11): 922-4, 1997.
- [2] Thierry B, Steru L, Chermat R, Simon P. Searching-waiting strategy: a candidate for an evolutionary model of depression? *Behav Neural Biol.* 41 (2): 180-9, 1984.
- [3] Huang LT, Holmes GL, Lai MC, Hung PL, Wang CL, Wang TJ, Yang CH, Liou CW, Yang SN. Maternal deprivation stress exacerbates cognitive deficits in immature rats with recurrent seizures. *Epilepsia*. 43 (10): 1141-8., 2002.
- [4] Hsu FC, Zhang GJ, Raol YS, Valentino RJ, Coulter DA, Brooks-Kayal AR. Repeated neonatal handling with maternal separation permanently alters hippocampal GABA_A receptors and behavioral stress responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100 (21): 12213-8, 2003.
- [5] Yokoyama H, Sato T, Oteki T, Ohya H, Akatsuka T. Estimation of the in vivo decay rate of EPR signals for a nitroxide radical in rat brain by a region-selected intensity determination method. *Applied Magnetic Resonance*. 29: 363-373, 2005.
- [6] Teicher MH. Scars that won't heal: the neurobiology of child abuse. *Sci Am*. 286 (3): 68-75, 2002.
- [7] Teicher MH, Andersen SL, Polcari A, Anderson CM, Navalta CP. Developmental neurobiology of childhood stress and trauma. *Psychiatr Clin North Am*. 25 (2): 397-426, vii-viii, 2002.
- [8] Schulz KP, Newcorn JH, Schmeidler J, Halperin JM. Lack of seasonal rhythms in central serotonergic function in boys with ADHD. *Psychoneuroendocrinology*. 27 (4): 463-73, 2002.
- [9] Builei TL, Hatherill JR. The role of polyhalogenated aromatic hydrocarbons on thyroid hormone disruption and cognitive function: a review. *Drug Chem Toxicol*. 27 (4): 405-24, 2004.
- [10] Olsson T, Mohammed AH, Donaldson LF, Henriksson BG, Seckl JR. Glucocorticoid receptor and NGFI-A gene expression are induced in

- the hippocampus after environmental enrichment in adult rats. *Brain Res Mol Brain Res.* 23 (4): 349-53, 1994.
- [11] Taylor S, Stein MB. The future of selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) in psychiatric treatment. *Med Hypotheses.* 66 (1): 14-21, 2006.
- [12] Kosten TA, Kehoe P. Neonatal isolation is a relevant model for studying the contributions of early life stress to vulnerability to drug abuse: response to Marmendal et al. (2004). *Dev Psychobiol.* 47 (2): 108-10, 2005.
- [13] Suenaga T, Morinobu S, Kawano K, Sawada T, Yamawaki S. Influence of immobilization stress on the levels of CaMKII and phospho-CaMKII in the rat hippocampus. *Int J Neuropsychopharmacol.* 7 (3): 299-309, 2004.