

**ラット聴覚けいれんに伴う脳内GABA及び
グルタミン酸神経系の形態学的変化**

課題番号：16591145

**平成16年度～平成17年度科学研究費補助金
(基盤研究 (C))
研究成果報告書**

平成18年5月

研究代表者 石田康

(宮崎大学医学部臨床神経科学講座精神医学分野 教授)

はしがき

本報告書は文部科学省科学研究費補助金基盤研究（C）の助成のもとに行つた「ラット聴覚けいれんに伴う脳内GABA及びグルタミン酸神経系の形態学的変化」の研究成果をとりまとめたものである。当初の計画がすべて達成されたわけではなく未熟な点も多々目につくが、いくつかの新しい知見を得ることが出来た。研究は現在、新たな展開のもとに継続中である。報告書をまとめるにあたり、各専門の研究者各位にご批判いただきとともに、2年間にわたり御支援・御指導いただいた関係各位の方々に心から御礼申し上げます。

課題番号：16591145

研究課題：ラット聴覚けいれんに伴う脳内GABA及びグルタミン酸神経系の形態学的变化

研究組織

研究代表者：石田康（宮崎大学医学部教授）

研究分担者：植田勇人（宮崎大学医学部助教授）

研究分担者：安部博史（宮崎大学医学部助手）

研究分担者：西森利數（宮崎大学医学部教授）

研究分担者：武田龍一郎（宮崎大学医学部助手）

研究経費

平成16年度 2300千円

平成17年度 1300千円

計 3600千円

研究発表

(1) 学会誌等

Fos expression in GABAergic cells and cells immunopositive for NMDA receptors in the inferior and superior colliculi following audiogenic seizures in rats.

Ishida, Y., Nakahara, D., Hashiguchi, H., Nakamura, M., Ebihara, K., Takeda, R., Nishimori, T. and Niki, H.

Synapse 46 (2): 100-107 (2002)

Changes in dopamine D₂ receptors and 6-[¹⁸F]fluoro-L-3,4-dihydroxyphenylalanine uptake in the brain of 6-hydroxydopamine-lesioned rats.

Ishida, Y., Kawai, K., Magata, Y., Takeda, R., Hashiguchi, H., Abe, H., Mukai, T. and Saji, H.

Neurodegenerative Diseases 1 (2-3): 109-112 (2004)

Perirhinal N-methyl-D-aspartate and muscarinic systems participate in object recognition in rats.

Abe, H., Ishida, Y. and Iwasaki, T.

Neurosci. Lett. 356 (3): 191-194 (2004)

Regional differences in the expression of Fos-like immunoreactivity after central salt loading in conscious rats: modulation by endogenous vasopressin and role of the area postrema.

Kato, K., Chu, C.-P., Kannan, H., Ishida, Y., Nishimori, T. and Nose, H.

Brain Res. 1022 (1-2): 182-194 (2004)

Cerebral blood flow abnormalities induced by transient hypothyroidism after thyroidectomy—Analysis by Tc-99m-HMPAO and SPM96-.

Nagamachi, S., Jinnouchi, S., Nishii, R., Ishida, Y., Fujita, S., Futami, S., Kodama, T., Tamura, S. and Kawai, K.

Ann. Nucl. Med. 18 (6): 469–477 (2004)

Effects of separate lesions of the hippocampus and the perirhinal cortex on performance in spontaneous recognition task for object and place.

Abe, H., Ishida, Y. and Iwasaki, T.

Japanese Journal of Physiological Psychology and Psychophysiology 22 (3): 257–266 (2004)

Unilateral lesions of mesostriatal dopaminergic pathway alters the withdrawal response of the rat hindpaw to mechanical stimulation.

Takeda, R., Ikeda, T., Tsuda, F., Abe, H., Hashiguchi, H., Ishida, Y., and Nishimori, T.

Neurosci. Res. 52 (1): 31–36 (2005)

Alteration of striatal [¹¹C]raclopride and 6-[¹⁸F]fluoro-L-3,4-dihydroxyphenylalanine uptake precedes development of methamphetamine-induced rotation following unilateral 6-hydroxydopamine lesions of medial forebrain bundle in rats.

Ishida, Y., Kawai, K., Magata, Y., Abe, H., Yoshimoto, M., Takeda, R., Hashiguchi, H., Mukai, T. and Saji, H.

Neurosci. Lett. 389 (1): 30–34 (2005)

Regional distributions of manganese, iron, copper and zinc in the brains of 6-hydroxydopamine-induced parkinsonian rats.

Tarohda, T., Ishida, Y., Kawai, K., Yamamoto, M., Amano, R.
Anal. Bioanal. Chem. 383 (2): 224–234 (2005)

Effect of intrathecal administration of hemokinin-1 on the withdrawal response to noxious thermal stimulation of the rat hind paw.

Endo, D., Ikeda, T., Ishida, Y., Yoshioka, D., Nishimori, T.
Neurosci. Lett. 392 (1–2): 114–117 (2006)

(2) 総説

脳内微小透析法を用いた神経科学研究 一宮崎大学における取り組みを中心について.

植田勇人, 石塚雄太, 橋口浩志, 河南洋, 石田康
脳と精神の医学, 15 (1): 83-89 (2004)

ドーパミン研究と老年精神医学の接点.

石田康
宮崎県精神科医会誌, 19: 9-12 (2004)

パーキンソン病の精神症状－ドーパミン神経研究からの眺望－.

石田康
精神神経学雑誌, 107 (3): 290-293 (2005)

経頭蓋磁気刺激効果のPETによる研究.

林拓也, 大西隆, 石田康, 宇川義一, 飯田秀博
神経内科 62 (1): 5-10 (2005)

脳内自己刺激行動実験による脳内強化機構の解析.

石田康, 安部博史, 橋口浩志, 中原大一郎
九州神経精神医学, 51 (3-4): 139-148 (2005)

(3) 学会発表等

[特別講演・教育講演]

パーキンソン病の精神症状－ドーパミン研究からの眺望－.

石田 康
第100回日本精神神経学会総会（教育講演），札幌市，5月20～22日
(2004)

パーキンソン病の精神症状－ドーパミン研究からの眺望－.

石田 康

第386回北九州精神科集談会, 小倉市, 10月15日 (2004)

黒質線条体ドーパミン神経破壊動物をもちいた行動科学研究.

石田 康

第1回宮崎パーキンソン病懇話会, 宮崎市, 11月19日 (2004)

パーキンソン病の精神症状－ドーパミン研究からの眺望－.

石田 康

和風会講演会, 豊中市, 2月4日 (2005)

パーキンソン病の精神症状－ドーパミン研究からの眺望－.

石田 康

第41回大分精神科集談会, 大分市, 6月4日 (2005)

パーキンソン病の精神症状－ドーパミン研究からの眺望－.

石田 康

第160回佐賀精神科集談会, 佐賀市, 12月15日 (2005)

パーキンソン病の精神症状.

石田 康

福精協筑後ブロック学術講演会, 久留米市, 12月20日 (2005)

[シンポジウム]

妊娠ラットへのストレスが仔の学習・記憶および情動機能に与える影響.

安部博史, 日高乃理子, 石田康

第2回Neuroscience Frontier Research Conference, 浦安市, 8月20－21日 (2005)

[一般講演]

自発的空間位置再認記憶課題の遂行に及ぼすラット嗅周皮質損傷の効果.

安部博史, 石田康, 岩崎庸男

第22回日本生理心理学会大会, 武生市, 5月29-30日 (2004)

$\alpha 1b$, $\alpha 1bd$ アドレナリン受容体欠損マウスの学習・記憶行動.

安部博史, 石塚雄太, 田上昭人, 河南洋, 石田康

第31回日本脳科学会, 6月11-12日, 宮崎市 (2004)

Y字迷路における $\alpha 1b$, $\alpha 1bd$ アドレナリン受容体欠損マウスの学習・記憶行動.

安部博史, 石塚雄太, 田上昭人, 河南洋, 石田康

第26回日本生物学的精神医学会, 7月21-23日, 東京 (2004)

慢性疼痛モデル動物に対するミルナシプランの疼痛軽減効果.

武田龍一郎, 池田哲也, 安部博史, 橋口浩志, 石田康, 西森利數

第26回日本生物学的精神医学会, 7月21-23日, 東京 (2004)

神経因性疼痛モデルラットに発現するアロディニアに対する抗うつ薬髄腔内投与の効果.

池田 哲也, 武田 龍一郎, 安部 博史, 石田 康, 西森 利數

第27回日本神経科学大会・第47回日本神経化学会大会合同大会, 9月21-23日, 大阪 (2004)

神経因性疼痛モデル動物に対するミルナシプランの疼痛軽減効果.

武田 龍一郎, 安部 博, 橋口 浩志, 池田 哲也, 石田 康, 西森 利數

第27回日本神経科学大会・第47回日本神経化学会大会合同大会, 9月21-23日, 大阪 (2004)

ラットの物体弁別および物体再認に及ぼす嗅周皮質内NMDA受容体またはアセチルコリン受容体遮断薬投与の効果.

安部 博史, 石田 康, 岩崎 庸男

第27回日本神経科学大会・第47回日本神経化学会大会合同大会, 9月21
-23日, 大阪(2004)

NMDA and muscarinic blockade in the perirhinal cortex impairs object discrimination and recognition in rats.

Abe, H., Ishida, Y., Iwasaki T.

COE International Symposium on Recent Advance in Biological Active Peptides and Signal Transduction. 宮崎大学21世紀COE国際シンポジウム, 11月27日, 宮崎市(2004)

抗うつ薬ミルナシプランの疼痛軽減作用に関する行動・形態学的研究.

武田龍一郎, 安部博史, 石田康

日本脳科学会, 千葉市, 6月3-4日(2005)

バゾプレッシンV1b受容体ノックアウトマウスの不安行動に対するSSRI・SNRIの効果.

石塚雄太, 安部博史, 田上昭人, 石田康, 河南洋

日本適応医学会第9回学術集会, 宮崎市, 6月10-11日(2005)

胎生期ストレスが仔ラットの情動反応性および視床下部室傍核におけるストレス惹起性Fos蛋白発現に及ぼす影響.

安部博史, 日高乃理子, 渡邊裕子, 石塚雄太, 武田龍一郎, 橋口浩志, 石田康
日本適応医学会第9回学術集会, 宮崎市, 6月10-11日(2005)

糖尿病モデルラットにみられるアロディニアに対する抗うつ薬, SNRI, SSRIの効果.

池田哲也, 吉岡大輔, 武田龍一郎, 石田康, 西森利數

日本疼痛学会, 宇都宮市, 7月27日(2005)

ミルナシプランの疼痛軽減作用に関する行動・形態学的研究.

武田龍一郎, 池田哲也, 安部博史, 橋口浩志, 渡邊裕子, 日高乃理子, 西森利數, 石田康

第27回日本生物学的精神医学会・第35回日本神経精神薬理学会合同年会,
大阪市, 7月6-8日 (2005)

バゾプレッシンV1b受容体ノックアウトマウスの不安行動に対するSSRI・SNRI
の効果.

石塚雄太, 安部博史, 田上昭人, 石田康, 河南洋

第27回日本生物学的精神医学会・第35回日本神経精神薬理学会合同年会,
大阪市, 7月6-8日 (2005)

胎生期ストレスが仔ラットの認知機能と視床下部室傍核のストレス惹起性Fos
蛋白発現に及ぼす効果.

安部博史, 日高乃理子, 渡邊裕子, 武田龍一郎, 橋口浩志, 石田康

第27回日本生物学的精神医学会・第35回日本神経精神薬理学会合同年会,
大阪市, 7月6-8日 (2005)

研究成果

本研究は宮崎医科大学及び理化学研究所動物実験委員会の承認を得たうえで施行した。

生後 16 日齢のWistar系雄性あるいは雌性ラットにベルを用いた音刺激（122-125 dB）を12分間与える（priming）。対照群のラットは、音刺激装置内に12分間滞在させるのみで、ベルは鳴らさない（セッション1）。

実験 1

セッション1終了後、28日齢に達したラットに同様の音刺激（122-125 dB）を1分間与える。すべてのprimingラットが音刺激により wild running (WR) を示した。また、一部のprimingラットは generalized tonic-clonic seizures (GTCS) に発展した（GTCS群）。 GTCSに発展しなかったprimingラットをWR群とする。対照群のラットにも同様の音刺激を1分間与え、その間の行動観察を行った（セッション2）。

実験 2

セッション1終了後、28日齢の時点で比較的微弱な音刺激（約100 dB）を12分間与えた。この刺激により priming ラットも対照群のラットも WR あるいは GTCS を示さなかった（セッション2）。

実験1あるいは2におけるセッション2終了後、ラットをホームケージに戻し、90分後にペントバルビタール（100mg/kg, i. p.）による深麻酔下で灌流固定後脳を摘出し、その後の免疫組織化学法（Fos単染色、Fosと他の蛋白との2重染色）に供した。

灌流固定は①生食、②0.2%ピクリン酸を含む3%パラホルムアルデヒド緩衝液、③10%スクロース緩衝液を用い、脳を摘出した。取り出された脳は、後固定後、ミクロトームにより凍結切片とし、蝸牛神経核、下丘、上丘の3箇所を含む切片を作製した。Fosとの2重染色においては、GABA及び3種類のNMDA受容体サブユニット（NR1, NR2A, NR2B）に対する計4種類の抗体のなかからひとつを組み合わせて免疫染色を施行した。

免疫染色は浮遊法で施行した。c-Fos単染色は、1次抗体（抗c-Fos抗体）、

2次抗体(ビオチン標識抗c-Fos IgG)との反応後, streptavidin-biotin (SAB) 法により反応を進めた。その後, 塩化コバルトに浸漬後, 過酸化水素水を添加した diaminobenzidine (DAB) 溶液により発色させた。二重染色はFos染色終了後、抗 γ -アミノ酪酸(GABA)抗体、抗NMDA受容体1(NR-1)抗体、抗NMDA受容体2A(NR2A)抗体、抗NMDA受容体2B(NR2B)抗体のいずれかを用いて、Fosと同様に(ABC法、この際コバルトによるDAB発色の増強は施行しない)免疫染色を行った。以上の反応終了後、切片をスライドグラス上で風乾した後、脱水・脱脂の目的でアルコール・キシレン浸漬後、封入した。切片上の免疫陽性細胞の観察・定量化は光顕により行い、各観察部位の単位面積当たりのFos陽性細胞数、各neuronal marker陽性細胞数、Fos/neuronal marker両方に陽性の細胞数を計測した。

【結果】

実験1

対照群との比較において、GTCS群の下丘、上丘のいずれの部位においても有意なFos蛋白発現の増加がみられた。WR群の下丘においても有意なFos発現の増加が観察された。しかしながら、上丘のDpGにおけるFos発現には対照群と比べて有意な増加は認められなかった。

下丘、上丘いずれの部位においても、痙攣に伴い発現したFos陽性細胞全体の3～4割がGABAを含んでおり、2～3割はNMDA受容体を有していることが明らかとなった。

実験2

Fos単染色の結果、primingラットでは、約100dBの音刺激により、対照群との比較で高いFos発現が認められた（特に蝸牛神経核、下丘で顕著）。

Fosとの2重染色においては、GABA及び3種類のNMDA受容体サブユニット(NR1, NR2A, NR2B)に対する計4種類の抗体のなかからひとつを組み合わせて免疫染色を施行した。実験自体は終了したが、その結果の持つ意義等については現在考察中であり、今後学会・学術雑誌等で発表予定である。

上記研究以外に、c-Fosを神経応答のマーカーとして種々の形態学的研究（脳内自己刺激行動、情動ストレス実験、疼痛実験、パーキンソン病モデルラットに関する実験）を行った。