

拘束ストレスのラット脳内フリーラジカル, スーパーオキシドジスムターゼ活性および チオバルビツール酸反応物質への影響に関する研究

岡山大学医学部附属分子細胞医学研究施設神経情報学部門 (指導: 森 昭胤教授)

岡 村 容 子

(平成7年1月31日受稿)

Key words: 拘束ストレス, ヒドロキシルラジカル, スーパーオキシドジスムターゼ活性,
チオバルビツール酸反応物質, 脳

緒 言

Weininger¹⁾の方法による拘束ストレスは, ラットの胃粘膜出血や潰瘍を発生させるので, 従来情動ストレスの実験モデルとして広く利用されている²⁻⁵⁾. 情動ストレスに脳内モノアミンなどの神経伝達系が密接に関与することは古くより知られていたが⁶⁾, 最近これらの神経伝達系へのフリーラジカルの関与が注目されている^{4,5,7)}. 一方, ニューロンの膜が過酸化されると Na⁺, K⁺-ATPase 活性が低下すること⁸⁾, 不飽和脂質やスーパーオキシドによりγ-アミノ酪酸 (GABA) やドーパミンのニューロンへの取り込みが抑制されること⁹⁻¹¹⁾, 脳組織中に鉄塩を投与すると活性酸素種が発生し, 過酸化脂質が増加するが, その際ドーパミンの取り込みは低下し¹²⁾, セロトニンは一過性に増加すること¹³⁾, フリーラジカル発生系に関与する phospholipase A₂ や hypoxanthine-xanthine oxidase 反応系 (スーパーオキシド発生系) を実験系に添加すると GABA-receptor/Cl⁻ channel の機能が阻害され¹⁴⁾, また逆に, muscimol 結合は増加すること¹⁵⁾, あるいはフリーラジカルの発生源となるアラキドン酸の添加によってシナプトソームからのグルタミン酸および GABA の Ca 非依存性流出が促進されること¹⁶⁾など, フリーラジカルによりニューロン膜が過酸化されると神経機能に変化が生じることを想定させる報告が数多く

なされている.

本研究においては, ラットに拘束ストレスを負荷し, 脳内諸部位のフリーラジカル, チオバルビツール酸反応物質 (thiobarbituric acid reactive substances: TBARS) およびスーパーオキシドジスムターゼ (superoxide dismutase: SOD) 活性の変化を検討し, 拘束ストレスによりラット脳内にフリーラジカルが発生することを認めたので報告する.

材 料 と 方 法

1. 実験動物

生後8週齢の雄性 Wistar 系ラットを使用した. 動物は日本クレア (大阪) より購入後, 湿度55%, 温度23度, 12時間明暗サイクル (7:00~19:00を明期, 19:00~7:00を暗期) のもとで1週間飼育した. 飼料はオリエンタル酵母工業(株)製 MF 飼料を使用し, 水は給水瓶で自由に摂水させた.

2. 実験試薬

スピントラッピング剤の5,5-ジメチル-1-ピロリン-N-オキサイド (DMPO) は第一化学薬品株式会社 (東京) より購入した. キサンチンオキシダーゼ (cow milk) はベーリンガーインゲルハイム社 (東京) より購入した. その他の試薬は最高純度のものを使用した.

3. 拘束ストレス

Weiningerの方法¹⁾により, ラットに拘束スト

レスを負荷した。ラットを24時間絶食後、実験群のラットは軽度のエーテル麻酔下で背臥位とし、口、左右上下肢および尻尾を固定し、その後6時間放置した。対照には正常ラットを用いた。拘束後ラットを断頭し、水冷したガラスプレート上で Glowinski and Iversen の方法¹⁷⁾に従って大脳皮質、海馬、線条体、中脳、橋・延髄および小脳を摘出後、直ちに液体窒素中に投入し、分析開始まで保存した。

4. フリーラジカルの分析

脳組織に20倍量の生理食塩水を加え、ホモゲナイズした後、ホモジネート200 μ lにDMPOを20 μ l加えて、ミキサーで攪拌し、DMPO添加40秒後に電子スピン共鳴 (electron spin resonance: ESR) スペクトロメーター (JEOL JES-FE1XG) を用いてヒドロキシルラジカル(\cdot OH)、カーボンセンターラジカル (\cdot C) および水素ラジカル (\cdot H) を DMPO のスピニングアダクトとして測定した。

ESR スペクトロメーターでの測定条件は、室温で、磁場を334.3 \pm 5 mT、掃引時間を1分、modulationを0.08 mT、responseを0.1秒とした。

ヒドロキシルラジカルのスピン数は、ヒドロキシルラジカルの4本のシグナルのうち第二番めのシグナルの高さと内部標準(酸化マンガン)シグナルの高さととの相対比を求め、さらに既知濃度の2,2,6,6-テトラメチル-4-ヒドロキシルピペリジノキシド (TEMPOL ; 6.811 \times 10¹⁴ spins/ml)のシグナルの高さととの相対比より、計算により求めた。

5. SOD 活性の分析

脳諸部位の組織の SOD 活性の測定はミトコンドリア分画について行った。ミトコンドリアの分画は次のようにして行った。すなわち、各組織に20倍量の生理食塩水を加え、ホモゲナイズし、1,600 g で15分冷却遠心し、得られた上清を再び11,000 g で30分冷却遠心した。ついで、その沈査を0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.8) に懸濁し、これを SOD 活性測定用試料のミトコンドリア分画とした。

SOD 活性は ESR スペクトロメーターを用いた平松らの方法^{18,19)}に準拠して測定した。すなわ

ち、試験管に2 mM ヒポキサンチンを50 μ l、ジエチレントリアミンペンタ酢酸を35 μ l、試料を50 μ l 及び DMPO を15 μ l とし、キサンチンオキシダーゼを50 μ l 加えたのち、攪拌後反応液を ESR 測定用セルに移し、キサンチンオキシダーゼ添加40秒後より ESR スペクトロメーターを用いてスーパーオキシドを DMPO のスピニングアダクト (DMPO-O₂) として分析した。

ESR スペクトロメーターの分析条件は、室温で磁場を334.3 \pm 5 mT、掃引時間を2分、modulationを0.08mT、responseを0.1秒とした。

6. TBARS の分析

TBARS の分析は八木法²⁰⁾に従って行った。すなわち、フリーラジカルの分析に使用した残りのホモジネート0.2mlを試験管にとり、8.1% ドデシルスルホン酸ナトリウム溶液0.2ml、20% 酢酸緩衝液 (pH 3.5) 1.5mlを、1%チオバルビツール酸溶液1.5ml、蒸留水0.6mlを加えて混合した後、1時間加熱した。ついで蒸留水を1 ml 加えた後、n-ブタノール・ピリジン混液(15:1) 5 mlを加えて供栓をし、振とう機で5分間振とうした。その後、3,000回転で10分間遠心分離し、得られたn-ブタノール・ピリジン層をピペットで約3 ml 以上別の試験管にとり、分光蛍光光度計で蛍光測定を行った(励起波長515 nm、蛍光波長532 nm)。

7. 蛋白質の定量

蛋白質の定量は protein assay reagent (Pierce, Rock Jord. II) を使用した。

8. 有意差検定

有意差検定は Student's *t*-test を用いて行った。

結 果

Fig. 1 に6時間拘束後のラットの胃を示した。正常ラットの胃に対して (Fig. 1 A), 6時間拘束後の胃においては明らかに胃粘膜に出血性びらんが認められた (Fig. 1 B)。

次にラット線条体の ESR によるフリーラジカルの分析を行った結果、Fig. 2 に示すごとくヒドロキシルラジカルの特性を示す4本 (1:2:2:1) のシグナルの他、わずかではあるがカーボンセンターラジカル (6本) および水

素ラジカル(9本)の特性を示すシグナル²¹⁾が検出された。その他の各脳組織中にも同様のシグナルが検出された。

カーボンセンターラジカルおよび水素ラジカルのシグナルは正常ラットおよび拘束ストレスラットのいずれの脳組織中にも検出可能であったが、きわめて低値であったので、定量的な比較検討を行わなかった。また、スーパーオキシド(O₂⁻)のスピニアダクトは正常群および拘束ストレス群のいずれの脳組織においても検出限界以下であった。

正常ラット群の中脳、橋・延髄および小脳のヒドロキシルラジカルは大脳皮質、海馬および線条体に比べて多かった。拘束ストレスを負荷したラットにおいてはヒドロキシルラジカルは

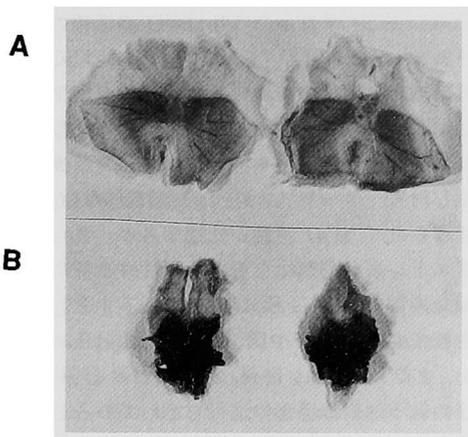


Fig. 1 Immobilization stress-induced hemorrhagic erosion in the stomach of rats. (A) No stress control, (B) Stress model.

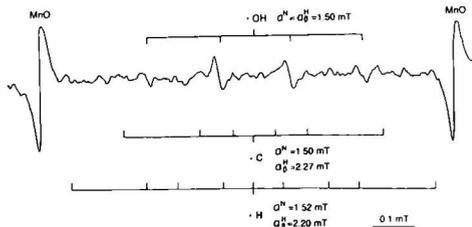


Fig. 2 Spectra of free radicals as DMPO spin adducts in immobilization stress induced rat striatum.

橋・延髄において有意に増加し、中脳および小脳において増加傾向があった (Fig. 3)。

正常ラット群においては、中脳、橋・延髄および小脳の SOD 活性は大脳皮質、海馬および線条体に比べて高い傾向が認められた。拘束ストレス負荷群においては中脳皮質、海馬および小脳の SOD 活性は有意に低下していたが、中脳においては増加していた (Fig. 4)。

正常ラット群においては、中脳および橋・延髄の TBARS は他の脳部位に比べて高い値を示した。拘束ストレス負荷群においては中脳皮質

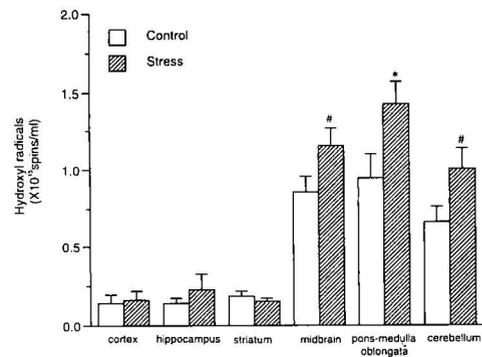


Fig. 3 Immobilization stress induced change of hydroxyl radical concentration in the rat brain. Each value represents the mean \pm SEM of 5 to 8 animals. * $p < 0.05$, # $0.05 < p < 0.10$ vs. control.

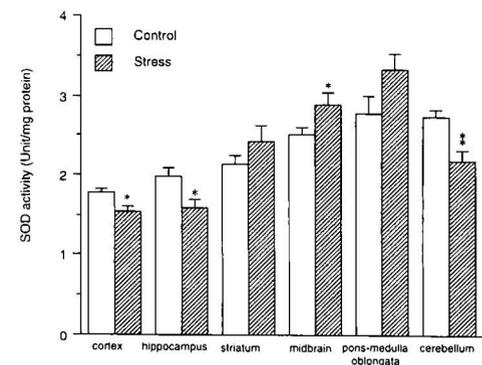


Fig. 4 Immobilization stress induced change of superoxide dismutase (SOD) activity in mitochondria of rat brain. Each value represents the mean \pm SEM of 7 to 8 animals. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. control.

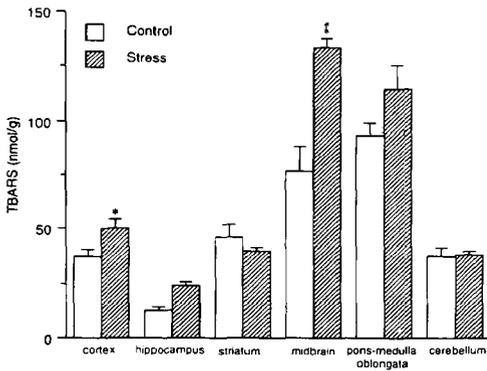


Fig. 5 Immobilization stress induced change of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) concentration in the rat brain. Each value represents the mean \pm SEM of 7 to 8 animals. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. control.

と中脳の TBARS は正常群に比べて有意に増加していた (Fig. 5)。

考 察

ラットを6時間拘束すると胃粘膜に出血性びらんが認められ、この時期に脳部位にヒドロキシルラジカルならびに TBARS が増加すること、および SOD 活性も変動することが認められた。これらの実験成績は、ラットを拘束すると脳内にフリーラジカルが発生することを示唆している。

さらに、ラットに水浸拘束ストレスや火傷ストレスを加えると、容易に胃粘膜病変が認められるのと並行して、TBARS は増加していることが明らかにされている^{22,23}。またストレス負荷による胃粘膜病変の出現は SOD やカタラーゼ、キサンチンオキシダーゼ抑制剤のアロプリノールの投与により抑制されることが知られている²³。さらに、Perry ら²⁴は胃粘膜傷害が SOD やアロプリノールの他にも、ヒドロキシルラジカルの消去剤であるジメチルスルホキシドにより阻止されることから、胃粘膜傷害はスーパーオキシドから二次的に生じるヒドロキシルラジカルが関与していることを示唆していた。従って、本実験は拘束ストレスによって胃粘膜傷害の発生するような時期に対応して脳内においてヒドロ

キシルラジカルが増加しているかどうかについて検討した結果、はじめてその事実を直接証明したことになる。ヒドロキシルラジカルは活性酸素種の中で最も細胞傷害作用の強いラジカルであるので、拘束ストレスによってヒドロキシルラジカルが発生することは極めて重要な知見であり、今後ストレスによる傷害機序の重要な因子としてさらに検討されねばならない。

最近ミトコンドリアの電子伝達系の欠損と疾患との関係について報告されている。例えばパーキンソン病患者の線条体においては、ミトコンドリア電子伝達系の complex I の部位に機能低下が認められ、そのために電子が漏出し、すなわち 1 電子還元で、スーパーオキシドを生ずると想定されている²⁵。またアルツハイマー病においても同様な報告がなされている²⁶。これらを勘案して、本実験においてはミトコンドリア分画の SOD すなわち Mn-SOD の活性の検討を行った。その結果、ミトコンドリアの SOD 活性は拘束負荷群においては脳皮質、海馬、小脳において減少し、中脳においては増加していた。一般に酸素ストレスなどにおいては異常発生したスーパーオキシドを消去するため SOD が誘導されて SOD 活性が亢進するが、さらに酸素ストレスが過剰になると、活性酸素種による細胞傷害が進行し、SOD 活性も低下すると理解されているので²⁷、中脳における増加はその誘導を、また脳皮質、海馬、小脳における SOD 活性の低下は細胞傷害の進行を示しているものと考えられる。

TBARS は、過酸化脂質生成の指標の一つとして測定を行った。TBARS は脳皮質と中脳で増加したが、特に中脳における増加は顕著であった。本実験の脳部位分割法 (Glowinski and Iversen)¹⁷によると中脳に視床下部が含まれているので、これはストレスに対する視床下部の関与を反映しているものとして興味深い。

フリーラジカルの生体内での発生源としては、通常虚血などによるキサンチンまたはヒポキサンチンからの、あるいはアラキドン酸カスケードからのスーパーオキシドの発生、遷移金属イオンと過酸化水素との反応によるヒドロキシルラジカルの生成、あるいは電子伝達系の欠損に

よるスーパーオキシドの漏出などが挙げられる。本実験の結果においてミトコンドリア分画のSOD活性に変動が認められたことは拘束ストレスが大脳皮質、海馬、中脳および小脳のミトコンドリアの電子伝達系に大きな影響を及ぼしている可能性が示唆されるが、その際発生したスーパーオキシドは直ちに過酸化水素と反応して細胞毒性の強いヒドロキシルラジカルとなり、最終的には大脳皮質や中脳で示されるような過酸化脂質の過剰産生をきたすものと想定される。

寒冷、運動負荷、拘束、エタノール、電気ショック、闘争などのストレスは脳内のモノアミンに影響を及ぼすこと、すなわち、ノルエピネフリンの代謝回転が亢進し、セロトニンは増加することが知られている⁶⁾。他方、フリーラジカルが、大脳皮質からのアスパラギン酸およびグルタミン酸などの神経伝達物質の遊離を促進させることも明らかにされている²⁸⁻³⁰⁾。従って、ストレスによりミトコンドリアの電子伝達系を介して発生したフリーラジカルが脳内モノアミンの遊離を亢進せしめている可能性もあり、これらの関係をさらに明らかにすることが今後の重要な研究課題として残されている。

結 論

拘束ストレスをラットに6時間与え、脳内のフリーラジカル、SOD活性およびTBARSに及ぼす影響を検討し、次のことを明らかにした。

- 1) 胃に出血性びらんを認めた。
- 2) ヒドロキシルラジカルは橋・延髄において有意に増加し、中脳および小脳において増加傾向があった。
- 3) SOD活性は中脳においては増加していたが、大脳皮質、海馬および小脳において低下していた。
- 4) TBARSは大脳皮質と中脳において生成が亢進していた。

以上より、拘束ストレスを与えると脳内においてはヒドロキシルラジカルが発生して神経細胞傷害をきたす可能性が示唆された。

稿を終るに当たり、御指導、御校閲を賜わった森昭胤教授に深甚なる謝意を表わすと共に、直接御指導いただいた平松緑博士（現、山形県テクノポリス財団生物ラジカル研究室）に深謝致します。

文 献

- 1) Weinger O : The effects of early experience on behavior and growth characteristic. *J Comp Physiol Psychol* (1956) **49**, 1-7.
- 2) McGuigan FJ : The contributions of basic science to stress management. *Int J Stress Manag* (1994) **1**, 247-248.
- 3) Liu J, Wang X and Mori A : Immobilization stress-induced antioxidant defense changes in rat plasma : Effect of treatment with reduced glutathione. *Int J Biochem* (1994) **26**, 511-517.
- 4) Liu J and Mori A : Involvement of reactive oxygen species in emotional stress : A hypothesis based on the immobilization stress-induced oxidative damage and antioxidant defense changes in rat brain, and the effect of antioxidant treatment with reduced glutathione. *Int J Stress Manag* (1994) **1**, 249-263.
- 5) Mori A, Mizukawa K, Kabuto H, Yokoi I, Jisho T and McGuigan FJ : Nitroglycerin relieves emotional stress-induced stomach ulcer in rats. *Int J Stress Manag* (1994) **1**, 299-307.
- 6) Yuwiler A : Stress ; in *Handbook of Neurochemistry*, Vol. 6, Lajtha A ed, Plenum, New York (1971) pp 103-171.
- 7) Hiramatsu M : Emotional stress affected brain free radicals in rats (Abstract). 4th International Congress on Stress Management of the International Stress Management Association, Paris (1992).
- 8) Sun AY : The effect of lipoxidation on synaptosomal (Na⁺+K⁺)-ATPase isolated from the cerebral

- cortex of squirrel monkey. *Biochim Biophys Acta* (1972) **266**, 350—360.
- 9) Braughler JM : Lipid peroxidation-induced inhibition of γ -aminobutyric acid uptake in rat brain synaptosomes : Protection by glucocorticoids. *J Neurochem* (1985) **44**, 1282—1288.
 - 10) Chan PH, Kerlan R and Fishman RA : Reductions of γ -aminobutyric acid and glutamate uptake and $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ activity in brain slices and synaptosomes by arachidonic acid. *J Neurochem* (1983) **40**, 309—316.
 - 11) Debler EA, Sershen H, Lajtha A and Gennaro Jr JF : Superoxide radical-mediated alteration of synaptosome membrane structure and high-affinity- $[^{14}\text{C}]$ aminobutyric acid uptake. *J Neurochem* (1986) **47**, 1804—1813.
 - 12) Pastuszko A, Gordon-Majszak W and Dabrowiecki Z : Dopamine uptake in striatal synaptosomes exposed to peroxidation "*in vitro*". *Biochem Pharmacol* (1983) **32**, 141—146.
 - 13) Hiramatsu M, Fukushima M, Kabuto H, Edamatsu R and Mori A : Amino acids, 5-hydroxytryptamine, and catecholamines in iron-induced epileptogenic foci of rat. *Adv Epileptol* (1987) **16**, 151—154.
 - 14) Schwarz RD, Skolnick P and Paul SM : Regulation of γ -aminobutyric acid/barbiturate receptor-gated chloride influx in brain vesicles by phospholipase A_2 : Possible role of oxygen radicals. *J Neurochem* (1988) **50**, 565—571.
 - 15) Yoneda Y, Kuriyama K and Takahashi M : Modulation of synaptic GABA receptor binding by membrane phospholipids : Possible role of active oxygen radicals. *Brain Res* (1985) **333**, 111—122.
 - 16) Rhoads DF, Osburn LD, Peterson NA and Raghunath E : Release of neurotransmitter amino acids from synaptosomes : Enhancement of calcium-independent efflux by oleic and arachidonic acids. *J Neurochem* (1983) **41**, 531—537.
 - 17) Glowinski J and Iversen L : Regional studies of catecholamines in the rat brain. *J Neurochem* (1966) **13**, 655—669.
 - 18) Hiramatsu M and Kohno M : Determination of superoxide dismutase activity by electron spin resonance spectrometry using the spin trap method. *JEOL news* (1987) **23A**, 7—9.
 - 19) Hiramatsu M, Kohno M, Edamatsu R, Mitsuta K and Mori A : Increased superoxide dismutase activity in human cerebrospinal fluid and rat brain with age by electron spin resonance spectrometry using the spin trap method. *J Neurochem* (1991) **58**, 1160—1164.
 - 20) Ohkawa H, Ohishi N and Yagi K : Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* (1979) **95**, 351—358.
 - 21) Buettner GR : Spin trapping : ESR parameters of spin adducts. *Free Radical Biol Med* (1987) **3**, 259—303.
 - 22) Yoshikawa T, Miyagawa H, Yoshida N, Sugino S and Kondo M : Increase in lipid peroxidation in rat gastric mucosal lesions induced by water-immersion restraint stress. *J Clin Biochem Nutr* (1991) **1**, 271—277.
 - 23) 吉川敏一, 高橋国史, 近藤元治 : 胃粘膜障害とフリーラジカル, a・虚血・再灌流性胃粘膜障害, 活性酸素・フリーラジカル (1991) **2**, 544—556.
 - 24) Perry MA, Wadhwa S, Parks DA, Pickard W and Granger DN : Role of oxygen radicals in ischemia-induced lesions in the cat cortex. *Gastroenterology* (1986) **90**, 362—367.
 - 25) Schapira AHV, Cooper JM, Dexter D, Clark JB, Jenner P and Marsden CD : Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *J Neurochem* (1990) **54**, 823—827.
 - 26) Mutisya EM, Bowling AC and Beal MF : Cortical cytochrome oxidase activity is reduced in

- Alzheimer's disease. *J Neurochem* (1994) **63**, 2179–2184.
- 27) Mori A, Hiramatsu M and Yokoi I : Posttraumatic epilepsy, free radicals and antioxidant therapy : in *Free Radicals in the Brain*, Packer, Prilipko and Christen eds, Springer-Verlag, Berlin (1992) pp 109–122.
 - 28) Pellegrini-Giampietro DE, Cherici G, Alesiani M, Carla V and Moroni F : Excitatory amino acid release from rat hippocampal slices as a consequence of free radical formation. *J Neurochem* (1988) **51**, 1960–1963.
 - 29) Gilman SC, Bonner MJ and Pellmar TC : Free radicals enhance basal release of D- [³H] -aspartate from cerebral cortical synaptosomes. *J Neurochem* (1994) **62**, 1757–1763.
 - 30) Gilman SC, Bonner MJ and Pellmar TC : Peroxide effects on [³H]L-glutamate release by synaptosomes isolated from the cerebral cortex. *Neurosci Lett* (1992) **140**, 157–160.

**Immobilization stress affected free radicals,
superoxide dismutase activity and thiobarbituric
acid reactive substances in the rat brain**

Youko OKAMURA

**Department of Neuroscience,
Institute of Molecular and Cellular Medicine,
Okayama University Medical School,
Okayama 700, Japan
(Director : Prof. A. Mori)**

Immobilization stress for 6 hours induced hemorrhagic erosion in the rat stomach. Hydroxyl radicals significantly increased in the pons-medulla oblongata in stressed rats. Mitochondrial superoxide dismutase (SOD) activity was enhanced in the midbrain but was lowered in the cortex, hippocampus and cerebellum in stressed rats. Thiobarbituric acid reactive substances increased by stress in the cortex and midbrain. These findings suggested that immobilization stress generated hydroxyl radicals and accelerated lipid peroxidation, and affected mitochondrial SOD activity, which may lead to neuronal damage in stressed rats.