

博士論文

ラットにおける条件性恐怖反応の  
ストレス誘発性増強  
: PTSD 動物モデルとして

平成 26 年度

領家 梨恵

筑波大学大学院人間総合科学研究科

感性認知脳科学専攻

# 目次

第 1 章	序論	1
第 1 節	ストレスとストレス反応	1
第 2 節	ストレス関連疾患動物モデル	4
2-1	電撃を用いたトラウマストレスの影響	7
2-2	拘束によるトラウマストレスの影響	11
2-3	<i>Single prolonged stress</i> によるトラウマストレスの影響	12
2-4	社会的ストレスによるトラウマストレスの影響	14
第 3 節	恐怖学習における HPA 系および交感神経系の関与	15
第 4 節	PTSD 動物モデルとしての恐怖反応増強現象	19
第 5 節	本研究の目的	21
第 2 章	ストレスによる情動性および条件性恐怖反応への長期的影響	24
第 1 節	文脈恐怖条件づけにおけるストレスの影響 — 電撃, 強制水泳または複合ストレスが及ぼす効果の比較 — 【実験 I】	24
	目的	24
	方法	26
	結果	34
	考察	37
第 2 節	文脈恐怖条件づけとオープンフィールド行動における複合ストレスの影響 — リマインダーの有無が及ぼす効果の比較 — 【実験 II】	39
	目的	39
	方法	42
	結果	46
	考察	53

第 2 章の総合的考察 .....	56
<b>第 3 章 複合ストレスによる条件性恐怖反応増強におけるストレス反 応系の関与の検討 .....</b>	<b>61</b>
第 1 節 ストレス誘発性条件性恐怖反応増強に及ぼす metyrapone 末梢投 与の効果【実験Ⅲ】 .....	61
目的.....	61
方法.....	64
結果.....	71
考察.....	77
第 2 節 ストレス誘発性条件性恐怖反応増強に及ぼす propranolol 末梢投 与の効果【実験Ⅳ】 .....	79
目的.....	79
方法.....	81
結果.....	82
考察.....	86
第 3 節 ストレス誘発性条件性恐怖反応増強に及ぼす副腎摘除の効果【実 験Ⅴ】 .....	89
目的.....	89
方法.....	91
結果.....	94
考察.....	100
第 3 章の総合的考察 .....	102
<b>第 4 章 複合ストレスによる条件性恐怖反応増強における中枢 HPA 系の関与の検討 .....</b>	<b>105</b>
第 1 節 ストレス誘発性条件性恐怖反応増強に及ぼす alpha/helical CRF 脳室内投与の効果【実験Ⅵ】 .....	105
目的.....	105

方法.....	107
結果.....	110
考察.....	115
第 2 節 ストレス誘発性条件性恐怖反応増強に及ぼす RU38486 脳室内投 与の効果【実験Ⅶ】 .....	116
目的.....	116
方法.....	118
結果.....	120
考察.....	124
第 4 章の総合的考察 .....	126
第 5 章 ストレス誘発性条件性恐怖反応増強に及ぼす RU38486 およ び pranolol 末梢投与の効果【実験Ⅷ】 .....	129
目的.....	129
方法.....	131
結果.....	133
考察.....	138
第 6 章 全体的考察および今後の展望 .....	141
要約 .....	148
引用文献.....	154

## 第 1 章

### 序論

#### 第 1 節 ストレスとストレス反応

受験や多くの人の前でのプレゼンテーションといった心理的に大きな負担がかかった時に、体調を崩してしまったという経験を持っている人は少なくない。さらに、受験の失敗、親しい友人の裏切り、近親者の死、交通事故、性的被害といったトラウマ的事象に関する経験は、人生の中の重要な出来事であり、価値観をネガティブな方向に変え、身体的不調の慢性化を引き起こすほどの影響力を有している。

日常生活に密接に関係するストレスに対して人々の興味関心は強く、今日までストレス研究は精力的に行われてきた。ストレスについて今日までに知られている定義およびメカニズムについて先行研究を基に以下に概観する (Brandão, Zanoveli, Ruiz-Martinez, Oliveira, & Landeira-Fernandez, 2008; de Quervain, Aerni, Schelling, & Roozendaal, 2009; Lupien, McEwen, Gunnar, & Heim, 2009; Romero & Butler, 2007; Roozendaal, McEwen, & Chattarji, 2009; Sapolsky, Romero, & Munck, 2000; Stam, de Lange, Graveland, Verhave, & Wiegant, 2007)。

生体におけるストレスという単語は、ハンス・セリエが用いはじめ、外的な刺激が生体に作用したときに非特異的に生じる生体内の歪みのことである。加えてセリエは、この歪みを引き起こす刺激をストレッサーと呼んだ。

セリエによってストレスという概念が定義される以前から、心身の関連は哲学者によって議論されており、デカルトが非身体的である心が身体に影響を及ぼすことを示唆したことはよく知られている。実験

医学からは、クロード・ベルナールが「内部環境の固定性」という考えを提唱し、生体の内部環境は平衡を保つことが必要であり、外部環境が変化したとしても一定であるとした。この考えを「恒常性（ホメオスタシス）」と呼んだのが生理学者であるウォルター・B・キャノンである。キャノンは、生体が周囲の環境変化に応じてそれぞれ個別の適切な反応を示すことにより生体の内部環境を一定に保つことが出来ることを恒常性とした。

これらの概念を経て、さらに自らの成果を加えることで、前述したセリエはストレス学説を提唱した。この学説の礎となるのは、ストレスに対する生体の非特異的な適応反応であり、彼はこれを「汎適応症候群」とした。ストレスに対する身体的反応は3期に分類され、その第1期はストレスに対して身体が緊張反応を示す警告反応期であり、ショック相と反ショック相に分けられる。ショック相は、ストレスに対する適応反応が発現する以前の段階である。体温低下、血圧低下、血糖値の低下および急性胃腸潰瘍がみられ、ショックが強すぎる場合はそのまま死に至る。反ショック相は、ショックに対する生体の防衛・適応反応が始まる時期である。ストレスが続くと、生体の反応は第2期である抵抗期に入る。ここでは持続するストレスと身体の抵抗力とが一定のバランスをとっている状態で安定する。さらにストレスが長引くと、生体の反応は第3期である疲弊期に移行する。ここでは一度獲得された抵抗力も失われ、再びショック相に似たあらゆる兆候が示される。体温の下降、胸腺やリンパ節の委縮および副腎皮質の機能低下などが見られる。セリエはこれら一連の生体の適応反応、すなわちストレス反応の中心が副腎皮質刺激ホルモン（adrenocorticotropic hormone：ACTH）－グルココルチコイド（glucocorticoid：GC）系であるとした。

副腎皮質ホルモンのひとつであり、ストレスホルモンとして知られるGCは、今日においてもその働きの解明が行われている。副腎皮質

からの GC の放出は、ストレッサーに対するホルモン反応カスケードにおける最終反応である。まず、拘束や不安といったストレスを感じると、扁桃体や海馬など、身体内外からの刺激を処理する脳部位が視床下部にシグナルをおくる。視床下部の細胞は、下垂体前葉に接続している門脈システムの毛細血管が集結する正中隆起に投射しており、視床下部から正中隆起にシグナルが送られると門脈血に様々なホルモンが放出される。それらホルモンの中で最も重要なのが、副腎皮質刺激ホルモン放出因子 (corticotropin-releasing factor: CRF) とアルギニン・バソプレシン (arginine vasopressin: AVP) である。このうち CRF が下垂体前葉の受容体に結合することで、続いて ACTH が血中に放出される。ACTH が副腎皮質細胞の受容体に結合すると、ここではステロイド合成酵素の産生が刺激される。GC は他のステロイドと同様、産生されると貯蔵されることはないため、ACTH による GC の生産量と GC の放出量には差がない。このカスケードは、視床下部－下垂体－副腎皮質系 (Hypothalamic-Pituitary-Adrenal axis: HPA 系) と呼ばれ、ストレス反応における GC 放出の主要経路である。

GC は標的細胞に到達すると、細胞膜を通り抜けて、細胞内の細胞質受容体である GR $\alpha$  に結合する。この GR $\alpha$  - GC 複合体は核内で標的遺伝子である DNA 配列 [GC 応答配列 (glucocorticoid response elements; GRE) と呼ばれる] に結合して、遺伝子転写の促進・抑制因子として働く。加えて、GC の受容体は細胞膜上にも存在することが明らかとなっており、この受容体は GC による急性的な行動調節に関与していると考えられている。

二つ目の主なストレス反応系は交感神経系である。副腎髄質から放出されるカテコールアミンであるノルエピネフリンとエピネフリンの両者がストレス反応に関与している。カテコールアミンは特異的膜結合型 G プロテイン受容体に結合し、細胞内 cyclic adenosine

monophosphate (cAMP) シグナリング系を介して細胞の反応を急速に活性化する。このようなノルエピネフリンとエピネフリンによる反応は、闘争・逃走反応と呼ばれる。主な反応としては、内臓の活動の抑制、視覚の鋭敏化、脳血流量を増加させることによる覚醒化、酸素交換能の上昇、グリコーゲンの分解によるグルコースの放出、筋の血管拡張、体表面の血管収縮、心拍増加、立毛などが挙げられる。これら闘争・逃走反応は、捕食者や同種の競争相手からの脅威を生き延びるために有益な生体反応である。

一方、ノルエピネフリンやエピネフリンと比較すると、GC はゆっくりとその効果を表すことが知られている。一般的に、GC 血中濃度の増加はストレッサーを受けた 3~5 分後では検出することができない。GC は遺伝子転写率を変化させることによって生理学的効果をもたらすことから、ストレッサーへの曝露から 20~30 分経過してようやく GC の効果はみられる。もしその後ストレッサーが持続しなければ、ネガティブフィードバック機能が作用し、30~60 分経過すると GC 血中濃度は減少する。しかしすでに合成・放出された GC は機能し続けることができるため、結果的に GC の生理学的効果はかなり長く続くことになる。

## 第 2 節 ストレス関連疾患動物モデル

一般的に、トラウマ的事象の経験直後に心理的および身体的不調が顕在化する場合は、急性ストレス障害として診断される。急性ストレス障害では、数日ないしは数週間で通常の生活を送ることのできる程度にまで症状が改善される。それに対して、トラウマ的事象経験後 1 か月以上経過してもなお不調が改善されない、あるいは症状の悪化、顕在化が見られる場合は心的外傷後ストレス障害 (post-traumatic



stress disorder ; PTSD) と診断される。PTSD はトラウマ的事象を経験後に長期間持続する症状を記載するために 1980 年代に確立され、その診断においては症状が長期間持続するという点が最も重要視される (Yehuda & McFarlane, 1995)。アメリカではベトナム戦争帰還兵にみられた異常なストレス反応の持続をきっかけに、PTSD は精神疾患の一つとして認知されるようになり、日本においては、阪神・淡路大震災、地下鉄サリン事件などの際にマスコミに多く取り上げられてその名を知られるようになった。PTSD の主な症状としては、苦痛な再体験や、外傷と関連した刺激の回避と全般的反応性の麻痺、覚醒亢進が挙げられる (American Psychiatric Association, 2000)。

臨床場面では、PTSD 治療に認知行動療法が用いられており、長期曝露法を基礎にして認知的再体制化と不安管理訓練が併せて実施される。トラウマ反応の脱感作とトラウマ関連事象認知の修正を繰り返して行うことで、ストレス反応を軽減させる。しかし、それらの治療によって PTSD の症状を一時的に軽くすることはできるが、認知行動療法のみによる治療の予後は芳しくない。そこで、薬物療法が並行して行われることが多い。PTSD 治療薬として使用されているのは、主にベンゾジアゼピン系抗不安薬と選択的セロトニン再取り込み阻害薬 (SSRI) である。しかしながらそれら薬物の効果もまた十分であるとはいえず、新たな薬物療法の開発が期待されている。他の類似した精神疾患に関する生物学的、心理学的および社会学的モデルや臨床研究に基づいた PTSD の治療は今日まで進められてきているが、有効な治療法を検証する必要性は現在も続いている。

ストレッサーに曝された動物は、ヒトの精神疾患に呈されるような精神不安状態や神経伝達物質量の異常性、脳の形態学的異常と類似した症状を示すことから、精神疾患の動物モデルとしての応用が期待されている。なぜなら、精神疾患発症の根底にある神経メカニズムの解明、治療薬物の神経学的、内分泌学的影響の検証、新薬の開発といっ

た生体に直接働きかける必要のある研究において、動物を被験体とした基礎研究が不可欠なためである。PTSD に関しても、病態に基づく動物モデルの作成が試みられているが、それらのモデルの再現性、妥当性は十分に検証されているとは言えない。有用な動物モデルの出現は、PTSD 治療法の開発に飛躍的な進展をもたらすこととなろう。

Willner (1986) は、精神疾患の動物モデルを用いた研究を行うにあたり、実験動物が下記の三項目をすべて有することで、精神疾患の理想的な動物モデルになりうると主張している。

一つめは表面妥当性 (face validity)、現象論的類似性である。つまり、精神疾患を患ったヒトとその動物モデルで観察される行動的症状の相似性・類似性を有するか否かということである。

二つめは構成概念妥当性 (construct validity) であり、動物モデルとヒトにおいて行動系の変容と神経系の変容との間に類似した関連性が認められるか否かということの意味する。

最後は予測妥当性 (predictive validity)、つまり、動物モデルでみられる薬物の効果がヒトの病的状態への効果を反映するか否かであり、精神疾患に対する新規化合物の臨床効果を予測する能力を求められる。

さらに PTSD の動物モデルは、Yehuda & Antelman (1993) によって、以下の 5 つの具体的な評価基準が提唱されている。

(1) ストレッサーへの短時間曝露であっても PTSD 様の生理学的・行動学的結果が引き起こされる。

(2) 曝露されるストレッサーの強度に依存して、PTSD 症状の程度は変化する。

(3) ストレッサーは、長期間持続するか、あるいは時間経過とともにより顕著な生物学的変化を引き起こす。

(4) ストレッサーは二方向性 (興奮性あるいは抑制性) の生物学的変化を引き起こしうる。

(5) ストレッサーへの反応における個人差が、経験（例：過去に受けたストレッサー後の適応状況）と遺伝、あるいはその二つの相互作用によって生じる。

これまでに様々な手法によって PTSD 動物モデル作成が試みられているが、PTSD の動物モデルの有用性を評価する基準は曖昧であり、研究者によって異なっている。また、PTSD 治療薬の効果検討を目的として薬物投与を行った研究や PTSD 発症時の神経メカニズムの解明を目的とした研究は、妥当性を十分に検証された動物モデルを用いていなかった。そこで本章では、代表的な先行研究のモデル作成手順とその結果をストレスの種類ごとに概観し、PTSD 動物モデルとしての有用性について議論する。なお、母子分離によるストレスや幼児期に与えられたストレッサーによって、その後 PTSD 様の症状が引き起こされることが知られているが（Cameron et al., 2005; Levine, 2001）、成体期前の発達過程にある動物は、内分泌系が大きな変動を見せるため、ストレスによる影響を左右する因子は成体期と異なる可能性が考えられる。そのため本稿で取り上げる先行研究は、成体期の動物を用いたものに限定した。また本稿では、動物の行動的・生理的機能に多大な影響を及ぼしうる強度のストレッサーのことを、動物にとっての“トラウマストレス”と定義した。

## 2-1 電撃を用いたトラウマストレスの影響

Levine, Madden, Conner, Moskal & Chris Anderson (1973) は、トラウマストレスに、強い電撃を用いてその後の HPA 系の変化とオープンフィールドにおける行動変容を検証したパイオニアである。彼らの研究では、このトラウマストレスを経験した動物は、その後電撃ストレスに対する副腎皮質ホルモンの過剰反応と、オープンフィールド場面における移動活動量と立ち上がり反応の減少が見られた。

その後、inescapable shock-learned helplessness (IS-LH) を用

いた研究が行われた (van der Kolk, Greenberg, Boyd, & Krystal, 1985; Weiss & Glazer, 1975)。IS-LH モデルは、もともと鬱病の動物モデルとして開発，検証されてきたが，PTSD モデルとしての有用性も指摘されている。しかしながら，IS-LH パラダイムによって生じた鬱症状は，72 時間しか継続しないために PTSD 動物モデルとしての有用性を問題視する研究者もいる (Yehuda & Antelman, 1993)。

たとえば Maier (2001) の研究では，プレキシグラス製の円筒にラットを入れて，尻尾に電撃 (1mA, 5sec) 80 回を与えるという逃避不能電撃をトラウマストレスとして用いた。その後，音を条件刺激 (CS) としたシャトル箱での逃避・回避学習を訓練したところ，トラウマストレスの 48 時間後では，逃避潜時がトラウマストレスを受けていない統制群よりも長く，すなわち学習性無気力の状態にあった。しかしながらトラウマストレスから 69 時間以上経過すると，逃避潜時は統制群と同程度にまで回復した。一方，48 時間毎にトラウマストレスを受ける環境に曝され続けると，ラットはトラウマストレスを受けた日から 18 日経過してもテストにおいて学習性無気力の状態を示した。以上の結果は，トラウマストレスを受けた環境がその“リマインダー”として作用している可能性を示している。そこで彼らは，ストレスを受けた環境 (リマインダー) への曝露はヒトの PTSD 症状におけるトラウマ記憶の再体験を疑似的に再現していると考え，この手続きは PTSD モデルとして妥当であると主張した。

同様にリマインダーを用いた研究としては，トラウマストレスとしてシャトル箱での電撃を用いたものがある (Diehl et al., 2007; Louvart, Maccari, Ducrocq, Thomas, & Darnaudéry, 2005; Pynoos, Ritzmann, Steinberg, Goenjian, & Prisecaru, 1996)。ここでは，電撃を伴わないシャトル箱への再曝露がリマインダーとされ，PTSD 様症状が誘発されるかどうかを検討された。これらの研究で，シャトル箱は，マウスの入った箱のドア開放と非常に明るい光の点灯より，マ

ウスが隣の暗い部屋に逃避する習性を利用した装置であった。マウスが隣の部屋に移動するとドアが閉まり、10秒間2mAの電撃を受けるというトラウマストレスを与えられた。トラウマストレスを与えた後、週に1回シャトルボックスへの再曝露を行った。Pynoos et al. (1996)では、6週間リマインダーを与えられ続けたマウスは、時間の経過に伴って(24時間, 3週間, 6週間)驚愕反応が増強した。しかし、リマインダーを与えられなかったマウスの驚愕反応(全身のびくつき)はトラウマストレスを与えられなかったマウスと差がなかった。

一方、シャトル箱を用いたより最近の一連の研究は、リマインダーを与えなくてもトラウマストレスの影響が長期間持続することを示した。これらの研究では、トラウマストレスとして電撃を与え、その後安静期を経た後に、電撃を受けた装置に対するラットのストレス反応の評価を行い、PTSD動物モデルとしての有用性を検討した(Koba et al., 2001; Sawamura et al., 2004; Wakizono et al., 2007)。彼らは、シャトル箱を用いて、片側の箱にラットを閉じ込め、逃避不能電撃(0.8mA, 15sec)を60回与えた。そのトラウマストレスの2週間後に、同じ装置で光刺激をCSとしたシャトル二方向回避学習を行ったところ、トラウマストレスを受けたラットはCSに対してより多く回避反応を示し、CSが提示されない時にも隣室への移動反応が多くみられた。加えて、トラウマストレスを受けたラットはCS-US条件づけ開始前の順応期間中に、装置内での活動性が抑制された。これらの結果は、トラウマストレスがPTSD様の長期に渡る行動変容(電撃を受けた装置自体およびCSに対する過剰反応)を引き起こすことを示した。前述したIS-LHの研究で逃避不能な電撃の効果が72時間以上は持続しなかったのとは矛盾した結果ではあるが、シャトル箱における電撃ストレスによってPTSD様の症状を引き起こすことが確認できた点で、新たな評価法が示唆されたといえる。

さらに、同じパラダイムを用いて、PTSD治療の第一選択薬となっ

ている SSRI の一つ paroxetine (PRX) の効果が検討された (Sawamura et al., 2004)。トラウマストレスを受けた直後に PRX を 15mg/kg 投与されたラットでは、トラウマストレスを受けた後に溶媒群と比較して、シャトル箱での自発活動量の増加および CS が提示されていない時間帯（試行間間隔）の隣室への移動反応の減少がみられた。すなわち PRX は、このモデル動物での PTSD 様の症状を緩和することが示された。

電撃ストレスを用いた近年の研究において、Bruijnzeel, Stam, & Wiegant (2001) は、15 分間に 0.5mA の電撃を 10 回与える方法を用いた。トラウマストレス後の反応の測定には 2, 4, 10 週間後に defensive withdrawal test (明るいオープンフィールドの中に黒いボックスを置き、そこから動物が出てくるまでの潜時および、出てくる頻度を不安指標とする) を行った。トラウマストレスを与えられたラットは、すべての測定時点で不安指標が高かった。この研究では、トラウマストレスを与えられたのは別の装置で、比較的弱いストレス（新奇場面であり明るい場所）に対する反応を測定しており、トラウマストレスを経験したことによるストレス脆弱性が示された。

同様に、Brennan, Beck, Ross, & Servatius (2005) はプラスチックチューブでラットを固定し、尾部への電撃 (2 mA, 3sec) を 40 回与えるトラウマストレスを用いて、その 24 時間後に光を CS としたレバー押し回避反応を 4 時間連続して訓練した。トラウマストレスを受けなかった統制群は、4 時間のセッション内にレバー押しによる回避行動をあまり示さなかったが、トラウマストレスを受けたラットは、セッション中最後の 1 時間において統制群に比べて有意なレバー押し行動の増加、すなわち回避率の上昇を示した。この結果もまた、トラウマストレスによるストレス脆弱性を示しているといえ、トラウマストレス群は訓練セッション中の電撃に対し過敏に反応したために、回避学習の促進がみられたと考えられる。

さらに Rau, DeCola, & Fanselow (2005) は、床が金属グリッドの箱を使用し、1.0 mA、1秒間の電撃を15回与えることをトラウマストレスとした。トラウマストレス後の反応を測定するテストとして、トラウマストレスを与えられたのとは異なる環境で、環境と電撃を対提示させる文脈恐怖条件づけを行ったところ、先行するトラウマストレスによる恐怖条件づけの増強がみられた。この増強作用は、トラウマストレス時の装置と連合した恐怖反応が、条件づけ時の装置に対して単に般化しただけという可能性も考えられるが、トラウマストレス直前に NMDA 受容体拮抗薬である DL-2-amino-5-phosphonovalerate (AP5) を投与すると、トラウマストレス時の条件性恐怖反応を抑制したが、その後の恐怖条件づけの増強効果はやはり認められた。したがって、トラウマストレスを経験したことによるその後の恐怖反応の増強は、単にトラウマストレスに対する反応が般化したことによるものではなく、トラウマストレスによって生じた何らかの内的変化、とくに HPA 系の変化が関与していることを示唆している。

## 2-2 拘束によるトラウマストレスの影響

Armario のグループが immobilization in the wooden boards (IMO; 四肢と頭部を木板上で固定する方法) を用いた PTSD 動物モデルの研究を多く報告してきた (Belda, Fuentes, Nadal, & Armario, 2008; Belda, Márquez, & Armario, 2004; Dal-Zotto, Martí, & Armario, 2003; Martí et al., 2001; Vallès, Martí, García, & Armario, 2000)。Martí et al. (2001) は、IMO またはチューブによる拘束ストレス (円筒形のチューブを用いて全身を固定) をトラウマストレスとしてラットに与え、その数日後に、再び同じ IMO を与えた後で、血中コルチコステロンと副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) 濃度を指標として、HPA 系のネガティブフィードバック機能を評価した。その結果、あらかじめトラウマストレスとしての IMO を与えら

れたラットでのみ HPA 系の長期間にわたる変化が認められ、IMO を 20 分間以上受けたラットは、その 6 日後に再度受けた IMO 処置後においてコルチコステロン分泌の抑制（すなわちネガティブフィードバック機能の亢進）がみられた。

Belda et al. (2004) は、IMO 処置を行い、その後、コルチコステロンおよび ACTH 反応と高架式十字迷路での情動行動の評価を行った。トラウマストレスとしてあらかじめ IMO を与えられたラットは、同ストレスへのコルチコステロンの過剰なネガティブフィードバックを示した。高架式十字迷路での行動は統制群と差が見られなかった。彼らは電撃ストレスの影響も検討したが、電撃ストレスを与えられたラットでは、同じストレスに再曝露された時、コルチコステロンと ACTH の分泌量が最初の電撃ストレス時と比較して減少していた。しかし、IMO によるトラウマストレスの場合とは異なり、高架式十字迷路においては、事前のトラウマストレスを与えられなかった群と比較して、オープンアームでの滞在時間が有意に増加した。

これらの研究でみられたトラウマストレスによる HPA 系のネガティブフィードバック機能の増強効果は PTSD 患者での知見と一致している。PTSD 患者の内因性グルココルチコイドを測定した研究によると、合成副腎皮質ステロイド剤であるデキサメタゾン投与により、PTSD 患者に特異的にコルチゾール分泌のネガティブフィードバック機能の増強がみられている (Yehuda et al., 1993)。

### 2-3 Single prolonged stress によるトラウマストレスの影響

Single prolonged stress (SPS) とは、Liberzon, Krstov, & Young (1997) によって提唱されたストレス曝露法である。SPS では、①2 時間の拘束ストレス、②20 分間の強制水泳ストレス、③エーテルストレス（昏睡）の 3 種類の異なるストレスを経時的に連続して動物に与える。Liberzon et al. (1997) では、トラウマストレスの影響



を調べるために、その 1 週間後に再び拘束ストレスを与え、HPA 系機能の評価を行った。その結果、SPS を与えられたラットでは統制群と比較して、ACTH 分泌のネガティブフィードバック機能の増強が認められた。この方法は、その後 PTSD 動物モデル作成の代表的な手法の一つとなっている (Cui, Sakamoto, Higashi, & Kawata, 2008; Khan & Liberzon, 2004; Kohda et al., 2007; Takahashi, Morinobu, Iwamoto, & Yamawaki, 2006; Yoshii et al., 2008)。トラウマストレスから 1 週間経過後にその影響を評価している点で、ヒトの PTSD でみられる潜伏期 (PTSD はトラウマストレスの直後に発症するわけではない) を考慮していると言える。典型的な PTSD 患者にみられる時間経過による症状の顕在化や悪化を再現することが可能であり、動物モデルとしての有効性を期待されている。

また、文脈恐怖条件づけの条件性恐怖反応増強のメカニズムを調べるために、Real time quantitative polymerase chain reaction (RT-PCR)法により、SPS 処置動物の海馬における遺伝子発現を検討した研究もある。SPS を受けたラットでは、条件性恐怖反応の増強が見られるが、この動物の海馬において glycine transporter 1 (Gly-T1) と vesicle-associated membrane protein 2 の mRNA 発現が増加していることが明らかになった (Iwamoto, Morinobu, Takahashi, & Yamawaki, 2007)。これらの結果から Gly-T1 の増加は恐怖記憶の消去障害に関係している可能性があると示唆された。また、Yamamoto et al. (2008) は、SPS を与えたラットの条件性恐怖反応の消去における NMDA 受容体アゴニスト D-cycloserine (DCS) の効果を検討した。その結果、SPS は条件づけられた恐怖の消去を遅らせ、DCS はそれを軽減した。また、SPS は消去前および消去期間中の海馬の NMDA 受容体サブタイプ (NR1,2A,2B,2C) mRNA の発現を上昇させたが、DCS の反復投与はその上昇を抑制した。SPS による PTSD 動物モデルの作成には、電撃を与えるという要素が含まれていないので、

SPS トラウマストレスに対する恐怖反応が、その後の恐怖条件づけにおける電撃曝露の文脈に般化することは少ないと考えられる。その意味で、電撃への恐怖反応の純粋な増強を測定できるという点は、PTSD 様症状の評価を行う上での利点の一つといえる。

より最近になって、Wang et al. (2008) は、SPS を改良した手法を検討した。彼らは、トラウマエピソードとなる SPS の後に、電撃を一回だけ与える手順を用いた。SPS の後に電撃を与えられたラットは、与えられなかったラットと比較して、1 週間後の文脈恐怖条件づけにおける条件性恐怖反応が増強していた。一方 SPS のみを用いた先行研究の場合とは異なり、SPS だけのラットは、SPS を受けなかったラットと差が見られなかった。トラウマストレスの中に電撃が含まれないと、その後の電撃を用いた恐怖条件づけでの恐怖反応増強効果がみられないのかどうかは、SPS パラダイムの PTSD 動物モデルとしての有用性に関わる重要な問題であり、今後のさらなる研究が待たれる。

#### 2-4 社会的ストレスによるトラウマストレスの影響

Adamec のグループは、トラウマストレスとして捕食者遭遇ストレスサーを用いた研究を多く報告してきた。彼らの研究では、対象となるラットを猫のいる箱の中に 10 分間入れ、そのトラウマストレスの後にホールボードテスト、高架式十字迷路テスト、驚愕反応テストを行うことでトラウマストレスのその後の情動反応への影響を検討した (Adamec, Burton, Blundell, Murphy, & Holmes, 2006; Adamec, Burton, Shallow, & Budgell, 1999; Adamec, Shallow, & Budgell, 1997; Adamec & Shallow, 1993; Blundell & Adamec, 2006)。Adamec & Shallow (1993) では、トラウマストレスの 1~21 日後に上記のテストを行ったところ、これらのラットは、どの時点においても、トラウマストレスを与えられなかったラットより不安傾向が高かった。

同様に Cohen のグループは、捕食者のにおいをストレッサーとして用いた研究を多く発表してきた。雄のネコが 2 ヶ月間寝床としていた布を段ボール箱に置き、そこへラットを 10 分間曝露することをトラウマストレスとした。その 1 週間後に高架式十字迷路を用いて、不安レベルを測定したところ、統制群と比較して、トラウマストレスを受けたラットはオープンアーム滞在時間が減少しており、不安レベルの亢進が認められた (Cohen, Benjamin, Kaplan, & Kotler, 2000; Cohen, Kaplan, & Kotler, 1999)。

Adamec らと Cohen らのパラダイムはどちらも、本能的恐怖となるネコやそのにおいへの曝露をトラウマ的ストレッサーとして用いた研究である。ラットはネコから外傷を受けることはなかったため、捕食者による心理的ストレッサーを用いた実験といえる。トラウマストレスから 1 週間以上経過した後でも、トラウマストレス処置を受けなかったラットに比べて、より高い不安が維持されていたことから、PTSD モデル動物としての有用性が示唆される。

### 第 3 節 恐怖学習における HPA 系および交感神経系の関与

代表的なストレス反応である HPA 系および交感神経系の活性化は、情動行動の表出や情動記憶・学習に深く関与していることが多くの研究で指摘されている (Lupien et al., 2009; McEwen, 2000; Roozendaal et al., 2009) (Fig.1)。たとえば、一般的に副腎摘出 (adrenalectomy; ADX) により動物の不安レベルが亢進することが知られており (File, Vellucci, & Wendlandt, 1979)、GC 投与は不安レベルに対して用量依存的 (12 mg/kg あるいは 3 mg/kg) に 2 方向性 (亢進あるいは抑制) の作用を持つことが報告されている (File et al., 1979)。また、ADX によって抑制される恐怖反応 (フリーズング)

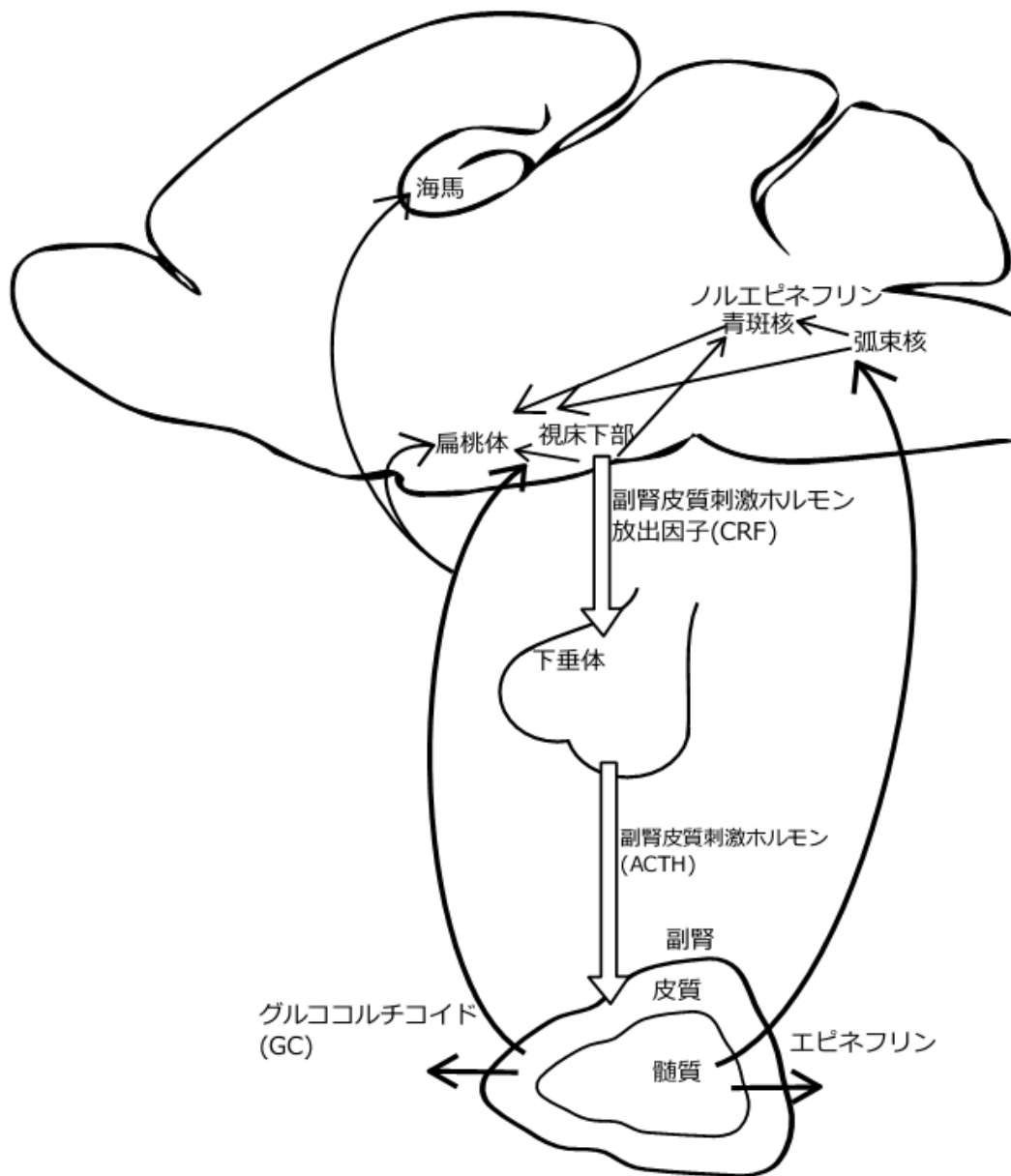


Fig. 1 恐怖学習に影響を及ぼすストレス反応系

副腎皮質刺激ホルモン放出因子 (CRF) は、ストレスに反応して視床下部から分泌され、下垂体における副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) 分泌を促し、結果として副腎皮質からのグルココルチコイド (GC) 分泌に至る。CRF の働きは内分泌調整だけでなく、扁桃体や青斑核に作用し、恐怖学習に関与する。副腎皮質から分泌された GC は血流に乗り、全身に運ばれる。GC は血液脳関門を通り、主に視床下部と海馬、さらに扁桃体といった多くの部位に作用し、HPA 系のネガティブフィードバックおよび標的部位の神経調節を担っている。交感神経系のエピネフリンは、副腎髄質から放出され、全身に作用する。エピネフリンは血液脳関門を通過できないが、求心性迷走神経における  $\beta$  アドレナリン受容体を賦活させることで、直接的に脳幹の孤束核を介して、または間接的に青斑核を介して、扁桃体や前頭前野といった情動に関与するといわれる脳部位に作用する。

は、GC 投与によって回復する (Bohus et al., 1987)。同様に、GC 合成阻害薬である metyrapone (MET) 投与は高架式十字迷路におけるオープンアームでの滞在時間を増加させる (Roozendaal, Bohus, & McGaugh, 1996)。GC 受容体 (GR) 遮断薬の脳室内投与においても同様の結果が得られている (Korte, de Boer, de Kloet, & Bohus, 1995)。さらに、MET の末梢投与は文脈恐怖条件づけでの条件性恐怖反応を減弱する (Cordero, Kruyt, Merino, & Sandi, 2002)。GR の遮断薬である RU38486 の脳室内投与もまた条件性恐怖反応を抑制するという報告がある (Cordero & Sandi, 1998)。MET を投与すると結果的に 11-deoxycorticosterone が増加し、それが GR の遮断薬になるという報告がある (Roozendaal et al., 1996)。つまり、MET は結果的に GR に対して遮断薬様の作用を持ち、これは GR 遮断および GC の抑制は、不安や恐怖といった情動反応を抑制する方向に働くことと一致する。HPA 系初期のシグナルである CRF の主な働きは、ストレスに対する神経内分泌反応の協調であるが、加えて、免疫システムに影響を及ぼし (Owens & Nemeroff, 1991)、脳内神経調節因子として働くことが知られている (Chalmers, Lovenberg, Grigoriadis, Behan, & De Souza, 1996)。CRF 受容体 (CRFR) は脳内に広く分布しているため、不安、摂食や学習といった様々な行動への関与が報告されている。たとえば、扁桃体中心核におけるストレス応答性 CRF 放出は扁桃体外側核 (BLA) CRFR を賦活することで受動的回避学習を促進し (Roozendaal, Brunson, Holloway, McGaugh, & Baram, 2002)、BLA および大脳基底核 CRFR 賦活は不安惹起作用を示す (Gallagher, Orozco-Cabal, Liu, & Shinnick-Gallagher, 2008)。

エピネフリンの末梢における作用は 1 節のとおりであるが、エピネフリン末梢投与は、受動的回避学習を促進することが古くから知られている (Liang, Juler, & McGaugh, 1986)。エピネフリンは血液脳関門を通過できないものの、求心性迷走神経における  $\beta$  アドレナリン受

容体 ( $\beta$ -NER) を賦活させることで、直接的に脳幹の弧束核を介して、または間接的に青斑核を介して、前脳に情報伝達している (Williams & McGaugh, 1993)。それに一致して、ノルエピネフリンの BLA 投与は水迷路学習を促進し、 $\beta$ -NER 遮断薬投与は学習を阻害した (Hatfield & McGaugh, 1999)。

そして、これらの副腎から分泌されるノルエピネフリン・エピネフリンおよび GC の相互作用が、神経可塑性および記憶固定に影響していることが明らかになりつつある (Joëls, Fernandez, & Roozendaal, 2011)。学習において、記憶固定に GC が効果を現すには、不安といった情動喚起によるエピネフリン・ノルエピネフリン活性を必要とすることが示唆されている (Roozendaal, Okuda, Van der Zee, & McGaugh, 2006)。BLA 内の GR 活性は、G プロテイン調節性の作用を介してノルエピネフリン誘発性シグナルを増強することで、記憶固定を促進していると考えられている (Roozendaal, Quirarte, & McGaugh, 2002)。具体的には、嫌悪刺激を用いた試行において扁桃体内にノルエピネフリンが放出され、後シナプスの  $\beta$ -NER および  $\alpha_1$  アドレナリン受容体 ( $\alpha_1$ -NER) に結合するため、シグナルが増強されると示唆された (Hatfield & McGaugh, 1999)。 $\beta$ -NER は adenylylate cyclase と直接結合しており、cAMP を合成し、 $\alpha_1$ -NER は  $\beta$ -NER によって引き起こされた反応を調節する役割を担う (Pilec & Enna, 1986)。GC はこの  $\alpha_1$ -NER と連関することで  $\beta$ -NER-cAMP 活動を促進している可能性が考えられている (Duman, Strada, & Enna, 1989)。cAMP は cAMP-dependent protein kinase (PKA) の活性を介することで細胞内情報伝達系を開始させるようで、その結果、他脳部位における記憶固定調節に関与する可能性が示唆される (Roozendaal, Quirarte, et al., 2002)。

#### 第 4 節 PTSD 動物モデルとしての恐怖反応増強現象

あらかじめ強いストレスに曝された動物は、後の恐怖条件づけが増強される現象が知られている (Cordero, Venero, Kruyt, & Sandi, 2003; Rau et al., 2005; Rau & Fanselow, 2009)。このようなストレスへの鋭敏化現象は、PTSD 患者にみられるような過覚醒症状と類似している。

恐怖条件づけは、嫌悪記憶の強度を評価するために伝統的に用いられてきた (Fanselow, DeCola, & Young, 1993)。恐怖条件づけとは、古典的条件づけを応用した学習パラダイムの一つである。条件づけを行うためには、特定の反応を必ず誘発する何らかの刺激を選択する必要がある。ラットを用いた恐怖条件づけの場合、多くは、刺激にフットショックが用いられ、フットショックは呼吸以外の体動を示さなくなるすくみ反応 (フリージング) を誘発する。この場合、フットショックとフリージングのペアは、それぞれ無条件刺激 (unconditioned stimulus; US) と無条件反応 (unconditioned response; UR) と呼ばれる。古典的条件づけパラダイムにおける第 3 の要素は、条件刺激 (conditioned stimulus; CS) である。古典的条件づけの試行のはじめ、CS は UR を喚起しないが、CS に続けて US を提示し続けることで、CS が提示されるとすぐに UR を喚起するようになる。CS 中の UR は条件反応 (conditioned response; CR) と呼ばれる。恐怖条件づけには、手掛かり恐怖条件づけと文脈恐怖条件づけの 2 種類がある。手掛かり恐怖条件づけでは音または光が CS として用いられ、文脈恐怖条件づけでは実験装置内の色、音、においや触覚刺激といった不可避的に存在する「文脈刺激」が CS として用いられる。

Rau et al. (2005) は、床が金属グリッドの箱を使用し、1.0 mA, 1 秒間の電撃を 15 回与えることをトラウマストレスとした。トラウマストレス後の反応を測定する行動テストとして、トラウマストレス

を与えた文脈とは異なる装置で文脈恐怖条件づけを行ったところ、先行するトラウマストレスによる恐怖条件づけの増強がみられた。Rau & Fanselow (2009)では、この現象を **stress-enhanced fear learning** と呼んでいる。トラウマストレス直前の AP5 投与により、トラウマストレス時の条件性恐怖反応を抑制したにもかかわらず、その後の恐怖条件づけの増強効果はかわらず認められた。したがって、**stress-enhanced fear learning** は、単にトラウマストレスに対する反応が般化したことによるものではなく、トラウマストレスによって生じた何らかの内的変化、とくにストレス反応としての HPA 系および交感神経系の変化が関与しているのかもしれないと考えられた。

Kohda et al. (2007) の研究では、SPS を与える 5 分前に GR 遮断薬の RU40555 を末梢投与したところ、SPS から 1 週間後に行った文脈恐怖条件づけの条件性恐怖反応増強が抑えられた。よって、GR が SPS による恐怖反応増強に関与している可能性が示唆された。

また別の研究では、捕食者ストレスを受けたあと、その 1 週間後に不安レベルが高まると報告されている (Adamec, Muir, Grimes, & Pearcey, 2007)。彼らの研究では、捕食者ストレスの直前または直後に  $\beta$ -NER 遮断薬である **propranolol (PRO)**、GR 遮断薬である **RU38486**、鉱質コルチコイド受容体遮断薬である **spironolactone**、または抗不安薬である **chloridiazepoxide (CPZ)** を腹腔内投与し、その 1 週間後に高架式十字迷路、明暗選択課題を測定したところ、捕食者ストレス後の PRO 投与または、PRO と RU38486 の併用投与は高架式十字迷路および明暗選択課題での不安行動亢進を抑制した。これらの結果は、捕食者ストレスによる長期間の不安惹起効果は複数の神経メカニズムが関与していると示唆した。

また、100 回の逃避不能電撃の 2 時間前に **CRFR<sub>1</sub>** 遮断薬である **antalarmin (20 mg/kg)** を腹腔内投与したところ、翌日の恐怖条件づけにおける条件性恐怖の増加がみられなくなったという報告もあ



る (Deak et al., 1999)。Antalarmin は血液脳関門を通過できることから、この結果は中枢の CRFR<sub>1</sub> によってストレスによる行動変容が調整されている可能性を示した。Adamec, Fougere, & Risbrough (2010) では、捕食者ストレスの 30 分前または直後に CRFR<sub>1</sub> 遮断薬である CRA0450 (20 mg/kg) 投与が、捕食者ストレスの 1 週間後に行われた高架式十字迷路と明暗選択課題における不安様行動の低下や聴覚驚愕反射増強低下を示したことから、捕食者ストレス開始および直後における CRFR<sub>1</sub> 活性化は、捕食者ストレス後の驚愕反応増強などにみられる不安関連行動に関与していることが示唆された。

## 第 5 節 本研究の目的

一般的にトラウマストレスを与えられた動物は、そのストレスの種類に関わらず、数日間以上、行動の変容もしくは HPA 系反応の変化などの生理学的変化を示すようになる。しかし、それぞれの先行研究は、行動実験のみであったり生理学的指標の計測のみであったりするため、行動と生理学的指標の総合的な検討を行う必要がある。

PTSD の治療においては、トラウマ体験に対する心理的治療介入の効果的なタイミングなど、いまだ不明確な点も多い。PTSD は数カ月ないしは数年後までも続くという特徴から、PTSD モデルが妥当であるかどうかは、そのモデルにおけるトラウマストレスの影響が長期間持続するかどうか重要なポイントになる。動物を用いた PTSD の基礎的研究においても長期的な視点が求められており、長期間にわたる実験パラダイムの動物モデルが必要不可欠である。先行研究からもトラウマストレスを受けた動物はその後、弱い恐怖刺激に対しても過敏に反応することが報告されており (Fanselow & Bolles, 1979; Fanselow et al., 1993; Rau et al., 2005)、動物モデルは PTSD の有

用な研究手法である。PTSDは、トラウマ体験をした後、遅延を置いて発症する点、および数か月以上症状が続くという特徴があるものの、動物を用いたトラウマストレスから長期間経過後の知見はいまだに不十分である。近年になってようやく、単回ストレス曝露が長期間の行動変容を引き起こすことが注目され、長期間症状に苦しむPTSDの動物モデルとしての有用性が議論されはじめている (Armario, Escorihuela, & Nadal, 2008)。たとえば社会的ストレスは、不安惹起やうつ様症状といった変化を長期間示す (Koolhaas, Meerlo, De Boer, Strubbe, & Bohus, 1997)。しかしながら、そのような長期にわたる動物の観察は、PTSD様症状の評価に行動指標を用いた研究でしかみられず、神経メカニズムだけに焦点を当てた研究では依然として短期間の観察にとどまっている (Cai, Blundell, Han, Greene, & Powell, 2006; Zhang et al., 2008)。今後は、神経メカニズムの解明を目的とした研究においても、長期的な行動学的・生物学的変容の生じる動物モデルを提唱する必要があると考えられる。

そこで本研究の第2章では、ラットにおけるストレス誘発性恐怖反応増強効果を元に、恐怖条件づけパラダイムを用いたより長期的なPTSDモデルラットパラダイムの作成を行うことを第一の目的とした。第2章第1節では、4回のフットショック (1.0 mA, 1 sec) または20分間の強制水泳、あるいはフットショックと強制水泳を併せた複合ストレス (MS) がその2週間後の文脈恐怖条件づけに及ぼす影響を検討した。第2節では、MSを想起させるようなリマインダー処置の有無が後の文脈恐怖条件づけに及ぼす影響を検討した。

Rau et al. (2005) は、トラウマストレスの条件性恐怖反応増強効果のメカニズムに関する検討において、トラウマストレス時の文脈と電撃との連合学習がその後の恐怖条件づけに般化したために恐怖反応増強が生じたわけではないことを、グルタミン酸 NMDA 受容体遮断薬の投与により証明した。しかしながら、恐怖反応増強効果を引き

起こす初期因子について、明確な見解はいまだに得られていないままである。トラウマストレス時のストレス反応が後の恐怖反応増強になんらかの影響を及ぼすことは予想されているものの、恐怖反応増強効果の形成への関与を決定づけるには至っていない。そこで、第3章では、MS手続きを用いて、MS前にHPA系および交感神経系を阻害する薬物を投与することで、トラウマストレスの恐怖反応増強効果におけるストレス応答の関与を検討することを目的とした。第4章では、中枢におけるHPA系および交感神経系の恐怖反応増強効果への関与を検討した。第5章では、HPA系と交感神経系の相乗作用が恐怖反応増強効果に及ぼす影響を検討した。第3章から5章により、恐怖反応増強効果を引き起こすのに必要なMS応答性ストレス反応を明らかにすることを目的とした。

本研究では、MSによってストレス応答が賦活される前に、それぞれのストレス応答を薬理的および外科的に抑制させることが、後の行動に与える影響を検討することとした。GCやエピネフリン・ノルエピネフリンといったストレス応答分泌の阻害は、ストレスによって生じるGC調節性の抗炎症作用や免疫低下といった身体的症状を妨げ、神経生物学的にはストレス応答分泌調節性の扁桃体活性が抑制されることで、ストレスによる扁桃体内の神経伝達もまた抑制されると予想された。よって、トラウマストレス後の情動亢進およびストレスへの鋭敏化を抑えると予想された。

## 第 2 章

### ストレスによる情動性および条件性恐怖反応への長期的影響

#### 第 1 節 文脈恐怖条件づけにおけるストレスの影響 – 電撃, 強制水泳または複合ストレスが及ぼす効果の比較 – 【実験 I】

##### 目的

ストレス研究に用いられる代表的なストレッサーとして尾部への電撃や足への電撃（フットショック）が挙げられる（Fanselow et al., 1993; Seymour Levine et al., 1973; van der Kolk et al., 1985）。Rau et al. (2005) は、トラウマストレスとして 1.0 mA のフットショックを 15 回または 4 回与えることで、恐怖学習増強を引き起こしている。本実験では、先行研究をもとに、1.0 mA で 1 秒間のフットショックを 4 回与えることが後の文脈恐怖条件づけにおける条件性恐怖反応増強を引き起こすかを検討した。

また、Porsolt, Anton, Blavet, & Jalfre (1978) の提唱した強制水泳によるストレス負荷課題は、うつ様行動測定課題として広く用いられている。加えて、Liberzon et al. (1997) の提唱した PTSD 動物モデルである SPS においても強制水泳が含まれている。そこで本実験では、20 分間の強制水泳が後の文脈恐怖条件づけにおける条件性恐怖反応増強を引き起こすかを検討した。

さらに、フットショックと強制水泳の組み合わせが条件性恐怖反応増強を引き起こすかを検討するために、フットショックと強制水泳の MS を事前に与えることをトラウマストレスの一つとした。

トラウマストレスによる後の恐怖反応増強を検討する課題として、US に 0.1 mA という微弱な電撃をもちいる文脈恐怖条件づけをトラ

ウマストレスの2週間後に行った。事前にストレスを受けたラットは、ごく弱い文脈恐怖条件づけであっても、恐怖条件づけが成立し、さらにその恐怖反応（フリーズング）が維持されると予想した。ストレスを受けた動物にだけ見られる現象を、ストレス誘発性恐怖反応増強と呼称することとした。この現象は、PTSDにみられる些細な刺激に対する過剰な反応や、過覚醒といった症状と類似すると仮定される。

Maier (2001)の研究では、ラットの尻尾に電撃（1.0 mA, 5sec）80回を与えるという逃避不能電撃をトラウマストレスとして用いて、後に逃避・回避学習を訓練したところ、48時間毎にトラウマストレスを受けた環境にラットが曝され続けると、ラットはトラウマストレスを受けた日から18日経過してもなお、テストにおいて学習性無気力の状態を示した。この結果は、トラウマストレスを受けた環境が、その“リマインダー”として作用している可能性を示している。ストレスを受けた環境（リマインダー）への再曝露はヒトのPTSD症状におけるトラウマ記憶の再体験を疑似的に再現していると考え、この手続きはPTSDモデルとして妥当であると主張された。そこで、本実験では、ストレス事象そのものではないがストレス事象を想起するような環境である、ストレス処置時に飼育室から実験室の移動に用いられる黒い箱への再曝露をリマインダーとして用いた。この黒い箱は、全個体に用いられているためである。具体的には、リマインダー処置とは、フットショック、強制水泳またはMSを行った1週間後に、リマインダーである黒い箱へ3分間だけラットを曝露することであった。

以上をまとめると、本研究ではラットへのストレス負荷として、4回のフットショック（1.0 mA, 1 sec）または20分間の強制水泳、あるいはフットショックと強制水泳を併せたMSがその2週間後の文脈恐怖条件づけに及ぼす影響を検討することを目的とした。これにより、本研究で用いる、長期間の行動変容を引き起こすパラダイムに適切なストレッサーを確立した。

## 方法

### 1. 被験体

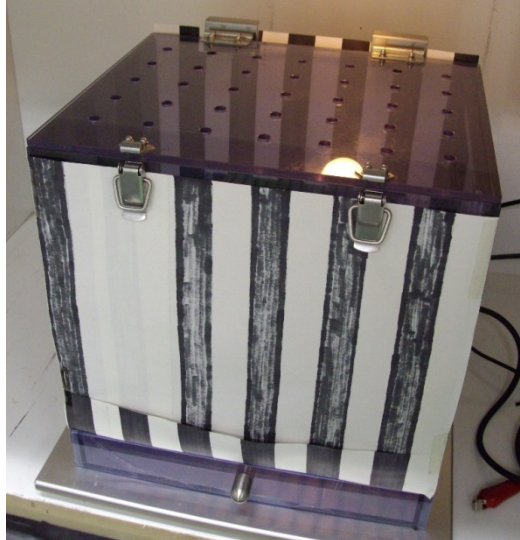
Wistar-Imamichi 系雄ラット 32 匹（実験開始時 8 週齢）を用いた。すべてのラットは実験動物用ホワイトフレーク（オリエンタル酵母株式会社）を敷いたプラスチックのホームケージで個別飼育された。飼育室の照明は 8:00AM に点灯，8:00PM に消灯の明期 12 時間，暗期 12 時間の明暗期周期に設定された。すべての行動実験は明期に行われた。飼育室の温度は 23 度に維持され，水と餌（MF；オリエンタル酵母株式会社）は自由に摂取させた。

### 2. 装置

【電撃箱】MS（フットショック）を与えるための装置（30×25×30 cm，O'Hara & CO., LTD 製，Fig. 2a）は，防音箱（100×45×60 cm，TECH SERV.INC 製）に入れられており，両側面は黒のプレキシガラス，上部は透明のプレキシガラス，前後は透明のプレキシガラスに縦のストライプ模様（幅は約 5 cm）の模造紙を張り付けてあった。床はグリッド（直径 5 mm，19 本，グリッド間の幅 1.5 cm）になっており，フットショックを与えることができた。また，電撃箱の上部に照明として白熱電球が取り付けられた。防音箱の内壁は白色であり，防音箱背面の内壁と電撃箱の間にはホワイトのノイズ（75 dB）を保つための CD ラジカセが設置された。

【強制水泳装置】MS（強制水泳）には，水色の丸型ポリバケツ（直径 40 cm×高さ 50 cm，積水ライフテック株式会社製，Fig. 2b）を用いた。強制水泳処置時には高さ 30 cm まで水が

a



b



Fig. 2 複合ストレスのフットショックに用いた電撃箱 (a)と強制水泳装置 (b)

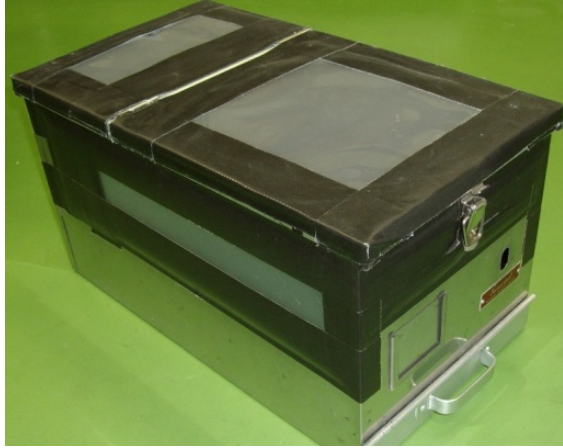
入れられた。強制水泳装置は電撃箱と同じ実験室に置かれていた。

【リマインダー箱】MSを与えられる日、ラットは黒い箱に入れられて飼育室と実験室間を移動した。アルミ製の箱（20×40×20 cm, Okazaki Sangyo CO., LTD 製, Fig. 3a）であり、外装内装ともに色は黒であった。この箱を後にリマインダーとして用いた。

【恐怖条件づけ装置】恐怖条件づけ装置（34×26×28 cm, O'Hara & CO., LTD 製）は、防音箱（70×60×60 cm, MUROMACHI KIKAI CO., LTD 製, Fig. 3b）に入れられており、前側面および上部が透明のプレキシガラス、床はグリッド（直径 1 mm, 27 本, グリッド間の幅 1 cm）になっており、フットショックを与えることができた。防音箱の内部は白色の内壁、150 lux の照明、50 dB のホワイトノイズであった。被験体の行動は装置の中央上部に設置されたカメラで撮影され、撮影された映像の解析には、Image J（米国 National Institutes of Health において作成されたフリーウェア；<http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>により入手可能）をもとに作られた TIME FZ4（O'Hara & CO., LTD）を使用した。これにより、映像を 0.5 秒毎の画像として取り込み、被験体が呼吸以外動かない状態が 5 秒以上続いた場合をフリージングとして判定した。



a



b

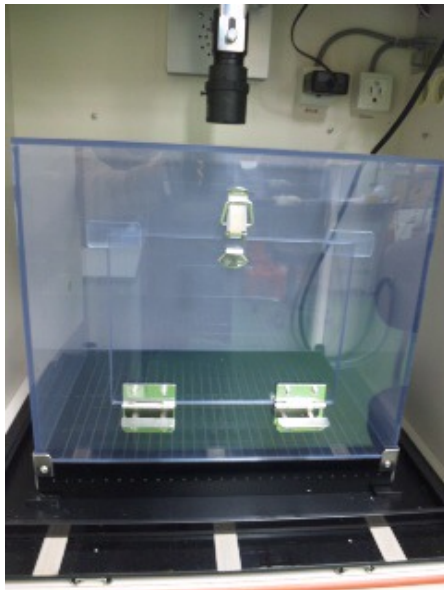


Fig. 3 リマインダー箱 (a) と条件づけ装置 (b)

### 3. 手続き

まず被験体を，ストレス処置を与えられない Non-MS (NMS) 群 (n=4)，フットショックのみを与えられる shock 群 (n=9)，強制水泳のみを与えられる swim 群 (n=9) および MS を与えられる (MS) 群 (n=10) にランダムに振り分けた。

実験開始 1 日目 (Day1) に MS 処置を行い，1 週間後の Day8 に MS の記憶を想起させるようなリマインダー試行を行った。Day11~Day14 に恐怖条件づけ装置馴化，Day15 に恐怖条件づけ，Day16 に保持テスト (test I) を行った。さらに 6 日間の保持期間を経て Day23 に 2 回目の保持テスト (test II) を行い，3 回目の保持テストは Day30 (test III) に行った。

以下に各手続きの詳細を述べる。また，実験スケジュールの模式図を Fig. 4 に示す。

#### 【MS 処置】 (Day1)

MS 群のラットは飼育室から実験室に移動した後，20 分間リマインダー箱にて待機した。その後，25 分間電撃箱に入れられた。電撃箱では約 300 秒間経過後にランダムで 1.0 mA のフットショックが 1 秒間流れ，被験体は 25 分間の間にフットショックを計 4 回受けた。

続いて 20 分間の強制水泳が行われた。被験体は腹部がバケツの内壁を向いた状態で静かに入れられた。終了後被験体はドライヤーとタオルで乾燥処置を受けた。再びリマインダー箱にて移動し，飼育室のホームケージに戻された。

NMS 群のラットは MS 群と同様に飼育室から実験室へ移動した後に，20 分間リマインダー箱にて待機した。その後，電撃箱にフットショックなしで 25 分間放置された。その後，被験体は床敷きの入った仮のホームケージ内で 20 分間待機した後，再びリマ

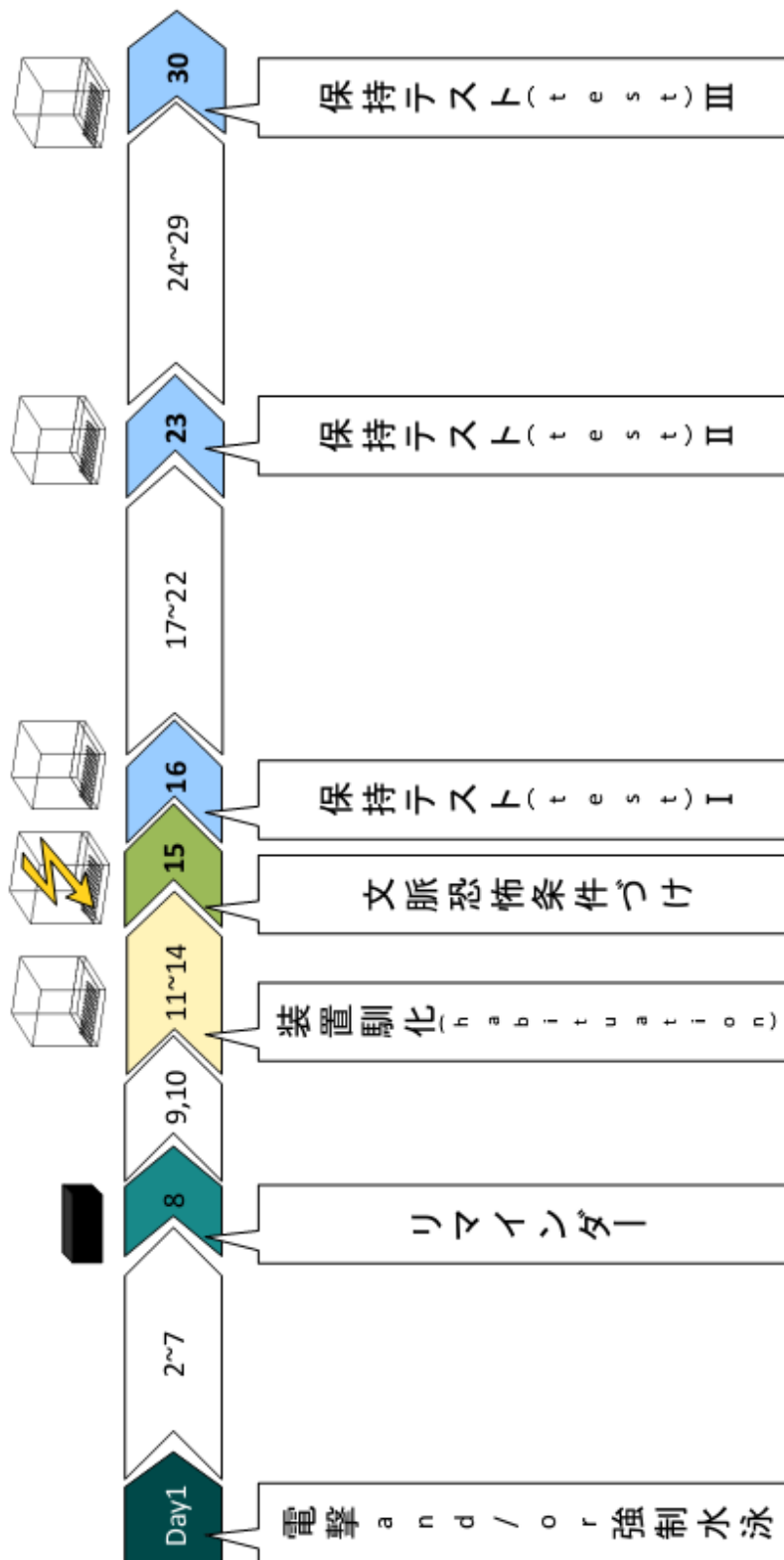


Fig. 4 実験スケジュール(実験 I)

インダー箱にて移動し、飼育室のホームケージに戻された。

#### 【リマインダー試行】(Day8)

すべての被験体について、3分間リマインダー箱の中に放置された後、ホームケージに戻された。

#### 【装置馴化】(Day11~Day14)

MSを受けた電撃箱に対する恐怖反応が条件づけ装置に対しても般化する可能性があるため、恐怖条件づけを行う前に、条件づけ装置に対する馴化を行った。

すべての被験体について、実験室前でホームケージのまま20分間待機させた。その後、被験体を恐怖条件づけ装置に5分間入れ、その様子をカメラで撮影した。馴化試行は各日につき1回で、試行終了後すぐに被験体はホームケージに戻された。解析では、初めの2分間のフリージング率をそれぞれ算出した。

#### 【文脈恐怖条件づけ】(Day15)

馴化試行同様、被験体を実験室前でホームケージのまま20分間待機させた後、恐怖条件づけ装置に3分間入れて、その様子をカメラで撮影した。被験体は、試行開始119秒後および178秒後の計2回、フットショック(0.1 mA, 2 sec)を与えられた。解析では初めの2分間のフリージング率をそれぞれ算出した。終了後、被験体はすぐにホームケージに戻された。

#### 【保持テスト】(Day16, Day23, Day30)

恐怖条件づけ時と同様の手続きで条件性恐怖反応の保持テストを行った。実験室前でホームケージのまま20分間待機させた後、被験体を恐怖条件づけ装置にフットショックを与えずに3分間入

れて、その様子をカメラで撮影した。解析では初めの 2 分間のフリーズング率をそれぞれ算出した。終了後、被験体はすぐにホームページに戻された。

#### 4. 統計分析

全ての分析には SPSS (SPSS Inc.) を用いて 1 要因, 2 要因または 3 要因の分散分析を行い, 下位検定には単純主効果の検定, LSD 法または Bonferroni 法を用いた。

## 結果

### 1. 装置馴化

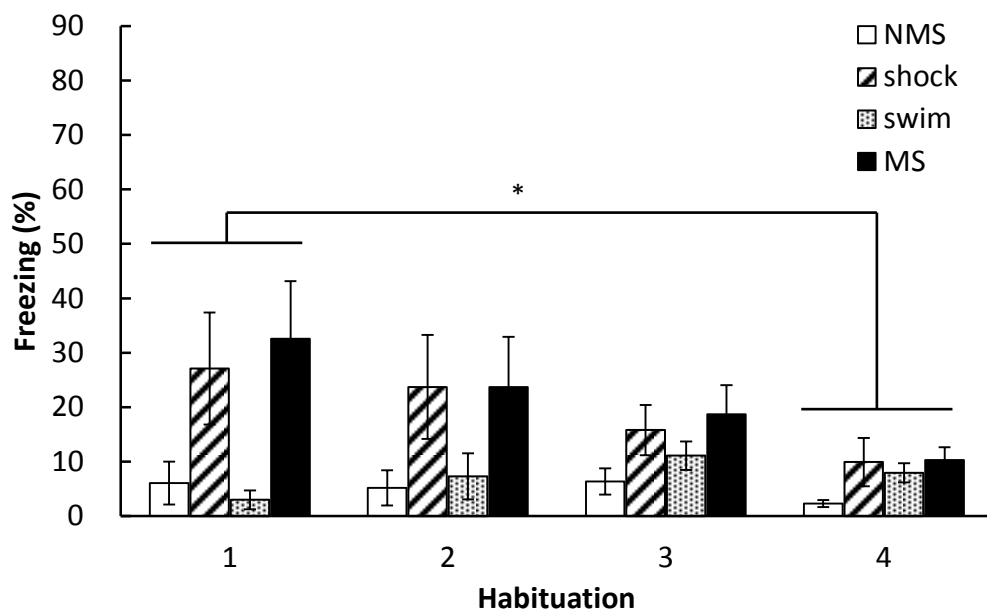
装置馴化（試行 1～4）の各試行について，各試行を 1 分ずつ 5 ブロックに分け，各試行最初の 2 ブロックにおけるフリージングの割合の平均値をそれぞれ算出して分析した。これら全体の推移を Fig.5a に示す。

shock 群および MS 群は NMS 群および swim 群よりも 1 試行目のフリージングが高いようにみえるものの，統計的差は認められなかった。試行が進む毎にすべての動物のフリージング率が同程度になった。装置馴化（試行 1～4）について 2 要因混合計画の分散分析（stressor（4）×day（4））を行ったところ，day の主効果 [ $F(3,84) = 2.78, p < 0.05$ ] のみ有意であった。そこで多重比較を行ったところ，1 試行目は 4 試行目よりもフリージング率が高く ( $p < 0.05$ )，2 ないし 3 試行目とは差が認められなかった。

### 2. 保持テスト

条件づけ前（base level; BL），条件づけ翌日の保持テスト（test I），条件づけ 1 週間後の保持テスト（test II），条件づけ 2 週間後の保持テスト（test III）について，各試行を 1 分ずつ 3 ブロックに分け，フリージングを測定した。各試行最初の 2 ブロックにおけるフリージングの割合の平均値をそれぞれ算出して分析した。これら全体の推移を Fig. 5b に示す。

a



b

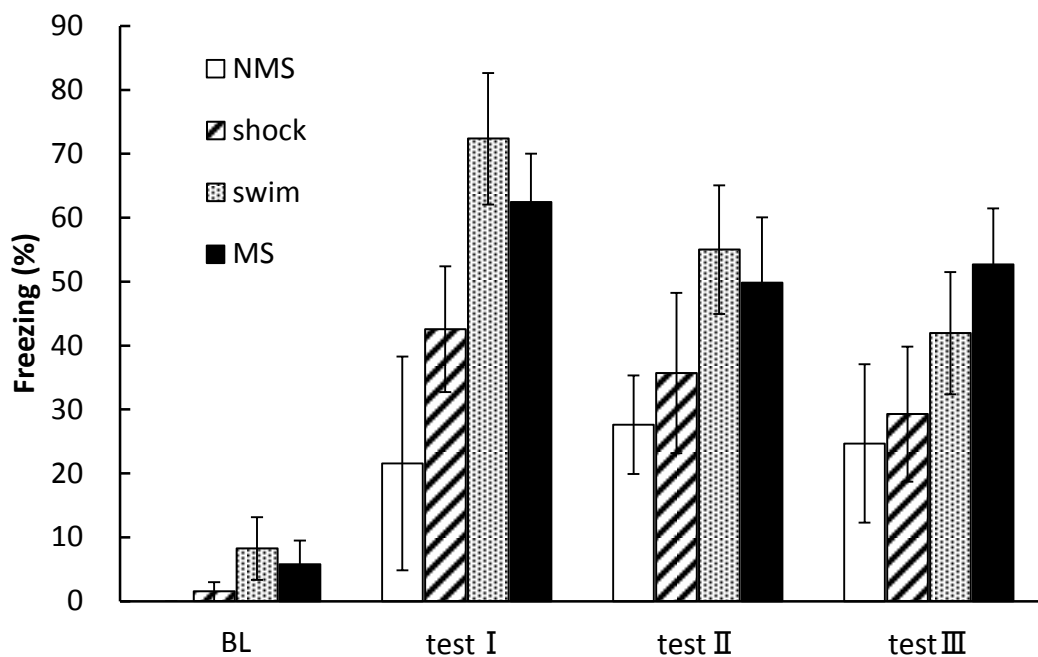


Fig. 5 (a) MS後の装置馴化(habituation)1~4試行目におけるフリージング率。(b) MS後の文脈恐怖条件づけにおけるBL, test I, test II 及びtest IIIのフリージング率。統制群(NMS; n = 4), フットショック群(shock; n = 9), 強制水泳群(swim; n = 9)および電撃と強制水泳を併せた複合ストレス群(MS; n = 10)の4群にラットを振り分け, それぞれの処置を行った。その処置を1日目とし, 11~14日目に装置馴化を行った。文脈恐怖条件づけ, 保持テスト1, 2, 3回目はそれぞれ, 15日目, 16日, 23日, 30日に行われた。平均および±SEMを示す。\*p < 0.05。

shock 群は NMS 群と差が認められなかった。統計的な差は認められないものの、MS 群は swim 群よりも高いフリージングが testⅢまで維持される傾向にあった。BL, test I, test II および testⅢについて、2 要因混合分散分析 (stressor (4) × day (4)) を行った。その結果、stressor, day の主効果に有意差が認められた [ $F(3, 28) = 2.59, p = 0.07, F(3, 84) = 27.29, p < 0.001$ ]。そこで下位検定として多重比較を行ったところ、swim 群および MS 群はフリージング率が NMS 群よりも高かった ( $p < 0.05, p < 0.05$ )。また、swim 群および MS 群は shock 群よりもフリージング率が高い傾向がみられた ( $p = 0.07, p = 0.09$ )。



## 考察

本実験の結果，強制水泳または MS による強いストレスは，その 2 週間後に行われた恐怖条件づけにおけるフリージングを増強し，その条件づけから 1 週間後及び 2 週間後に行われた保持テストにおいても同様に恐怖反応を増強することが示された。したがって本実験において，ストレスから 2 週間後に観察されるストレス誘発性恐怖反応増強に，主に強制水泳ストレスが関わっており，フットショックのみでは，恐怖反応増強効果を引き起こすことはできないことが明らかになった。さらに，強制水泳群に比べて MS 群は保持テスト 3 回目まで高いフリージング率を維持する傾向がみられたことから，フットショックと強制水泳を組み合わせることでより強い恐怖反応増強効果を引き起こすことが示唆された。

本実験では，トラウマストレスから 2 週間後の文脈恐怖条件づけが増強され，さらにその後 2 週間もの間恐怖反応が維持されており，PTSD の診断基準である長期間の症状持続を動物において再現できたといえる。本実験で用いた MS は，より妥当性の高まった PTSD 動物モデルとして有用であると考えられる。

Rau & Fanselow (2009) は，1.0 mA のフットショックを 4 回与えただけで 93 日後のストレス誘発性恐怖学習増強が生じると示しているが，本実験では再現できなかった。彼らの研究と本実験では，用いたラットの系統 (Long-Evans 系と Wistar-Imamichi 系)，トラウマストレスから恐怖条件づけまでの期間 (93 日と 14 日)，条件づけ時の電撃強度 (1.0 mA と 0.1 mA) など様々な点で異なることから結果の不一致の原因は同定することができないが，本実験に用いた手続きにおいて 30 日間持続する恐怖反応増強を引き起こすには，1.0 mA のフットショック 4 回だけでは不十分であり，強制水泳を同時に行う必要があった。そして，ヒトがトラウマストレスに曝されるとしたら，

そのストレッサーは 1 種類限りでない場合の方が多いと考えられ、複数のストレッサーを用いることで、PTSD 発症に沿った動物モデルとなるかもしれない。

また本実験では、トラウマストレスを想起させるようなリマインダー処置を用いた。これは、先行研究においてトラウマストレスを受けた環境がその“リマインダー”として作用している可能性が示唆され、ヒトの PTSD 症状におけるトラウマ記憶の再体験を疑似的に再現していると考えたためである (Maier, 2001; Pynoos et al., 1996)。本実験においても、文脈恐怖条件づけにみられるような、ストレス事象によって引き起こされる長期間の行動変容が、リマインダーを用いることで観察された。しかしながら、本実験でみられたストレス誘発性恐怖反応増強効果が MS 自体によるものなのか、MS にリマインダーが加わったことによるものなのかを区別することができなかった。そこで、本実験でみられた MS から 2 週間後の文脈恐怖条件づけにおける恐怖反応増強は、リマインダーが存在していなくとも引き起こされたのか、またはリマインダーは恐怖反応増強に必須であるのかを検討する必要がある。

## 第 2 節 文脈恐怖条件づけとオープンフィールド行動における複合 ストレスの影響 – リマインダーの有無が及ぼす効果の比 較 – 【実験Ⅱ】

### 目的

実験Ⅰの結果から、フットショックおよび強制水泳からなる MS は、いずれの群よりも条件性恐怖反応増強を維持したため、本研究におけるトラウマストレスとして、MS を用いることとした。

くわえて、実験Ⅰにおいて MS を与えられた文脈というリマインダーへの再曝露を行った。なぜならばいくつかの先行研究によって、トラウマストレスを受けた文脈に動物を再度曝することによって、PTSD 患者にみられるトラウマストレスの再体験を模倣できることが指摘されているためである。Maier (2001) の研究では、ラットが逃避不能電撃を与えられた後、48 時間毎に逃避不能電撃を受けた環境に曝され続けると、ラットは逃避不能電撃を受けた日から 18 日経過しても、逃避・回避学習において学習性無気力の状態を示した。同様にリマインダーを用いた研究としては、トラウマストレスとしてシャトル箱での電撃を用いたものがある (Diehl et al., 2007; Louvart et al., 2005; Pynoos et al., 1996)。Pynoos et al. (1996) では、6 週間リマインダー (シャトル箱) に曝され続けたマウスは、時間の経過に伴って (24 時間, 3 週間, 6 週間) 驚愕反応が増強した。しかし、リマインダーを与えられなかったマウスの驚愕反応はトラウマストレスを与えられなかったマウスと差がなかった。以上の結果は、トラウマストレスを受けた環境がその“リマインダー”として作用している可能性を示している。

そこで彼らは、ストレスを受けた環境 (リマインダー) への曝露はヒトの PTSD 症状におけるトラウマ記憶の再体験を疑似的に再現し

ていると考え、この手続きは PTSD モデルとして妥当であると主張した。

実験 I では、フットショックや強制水泳といったストレッサーそのものではなく、MS を与えられた文脈というリマインダーへの再曝露が、その後の恐怖条件づけに及ぼす影響について検討した。本研究では、フットショックを与えられた装置そのものでも、強制水泳を行った装置でもなく、MS 処置日の飼育室と実験室間の移動用に使用された黒い箱にラットを曝すことをリマインダーとした。本研究は MS を用いているため、どちらかの装置にバイアスがかかるのを防ぐ目的で移動用の黒い箱をリマインダー装置として用いることとした。MS の後にリマインダーを行うパラダイムを用いたところ、長期間の条件性恐怖反応増強の形成を引き起こしたものの、実験 I だけでは、恐怖反応増強効果が MS 自体によるものなのか、MS にリマインダーが加わった効果なのかを判断することはできなかった。

そのため実験 II では、実験 I でみられた MS から 2 週間後の文脈恐怖条件づけにおける恐怖反応増強は、リマインダーが存在していなくとも引き起こされたのか、またはリマインダーは恐怖反応増強に必須であるのかを確かめることとした。

また PTSD は、トラウマ経験直後に異常なストレス反応を示すわけではなく、数日から数週間後、場合によっては数年後に異常なストレス反応に悩まされることが臨床的にわかっている。ラットにおいてもこのような経時的な変化が観察されるかどうかを検討することは、PTSD 動物モデル研究として重要である。Bruijnzeel et al. (2001) は、ストレスから 1 週間目までの間の行動テストでは、不安関連行動にストレス群と統制群で大きな差はみられていないにもかかわらず、ストレスから 14 日以上経過後に行動を測定した場合において、ストレス群に不安行動の増大がみられることを報告している。MS を経験したラットにおいて、時間経過に伴った情動性の変容を観察すること

ができたなら，動物モデルとしての妥当性が高まると考えられる。そこで本実験では，MS の翌日と約 3 週間後に OFT を行うことで，MS による情動性の経時的変化の観察を行った。

以上をまとめると，実験 II では，MS の 1 週間後に行われるリマインダーの有無が，後の文脈恐怖条件づけおよびオープンフィールド行動に及ぼす影響を検討することを目的とした。

## 方法

### 1. 被験体

Wistar-Imamichi 系雄ラット 31 匹（実験開始時 8 週齢）を用いた。飼育環境および実験時刻は実験 I と同様であった。

### 2. 装置

実験 I と同じ電撃箱，強制水泳装置，リマインダー箱，恐怖条件づけ装置を用いた。

【オープンフィールド装置】塩化ビニル製のオープンフィールド実験装置（90×90×45 cm，O'Hara & CO., LTD 製，Fig.6）を使用した。内壁は黒色，床面は灰色に塗装されていた。オープンフィールドの中央上部には照明として 4 つの電球が設置してあり，被験体の行動は装置の中央上部に設置された撮影用カメラで記録された。撮影された映像の解析には，NIH Image（米国 National Institutes of Health において作成されたフリーウェア；<http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>により入手可能）をもとに作られた Image OF for open field test（O'Hara & CO., LTD）を使用した。これにより，オープンフィールド底面を縦 6 マスと横 6 マスの 36 区画したうち，外周部を除いた 16 区画を装置中心部として判定した。



Fig. 6 オープンフィールド装置

### 3. 手続き

まず被験体を NMS 群 (n=9), MS を与えられるが 1 週間後にリマインダー箱に曝露しない MS+no-リマインダー (MS+NR) 群 (n=11) および MS+リマインダー (MS+R) 群 (n=11) にランダムに振り分けた。

実験開始 1 日目 (Day1) に MS 処置を行い, Day2 および Day23 にオープンフィールドテスト (OFT I, OFT II) を行った。MS から 1 週間後の Day8 に MS の記憶を想起させるようなリマインダー試行を行った。その後 2 日間ホームケージ内で通常飼育した後, Day11~Day14 に恐怖条件づけ装置馴化, Day15 に恐怖条件づけ, Day16 に保持テスト (test I) を行った。さらに Day24 に 2 回目の保持テスト (test II) を行い, 3 回目の保持テストは Day31 (test III) に行った。

以下に OFT の詳細を述べる。また, 実験スケジュールの模式図を Fig. 7 に示す。

#### 【オープンフィールドテスト】(Day2, Day23)

すべての被験体について, OF 装置のある実験室内で, ホームケージのまま 20 分間の馴化を行った後に OFT を行った。被験体は装置の特定の角に静かに置かれた。その後の 10 分間の総移動量 (total distance), 立ち上がり数 (rearing), 装置壁への寄りかかり数 (leaning-against-wall) および装置中央部での累積滞在時間 (center time) を記録した。脱糞数 (defecation) はラットを装置から取り出した後に記録された。各行動は 30 秒毎に分けて記録された。



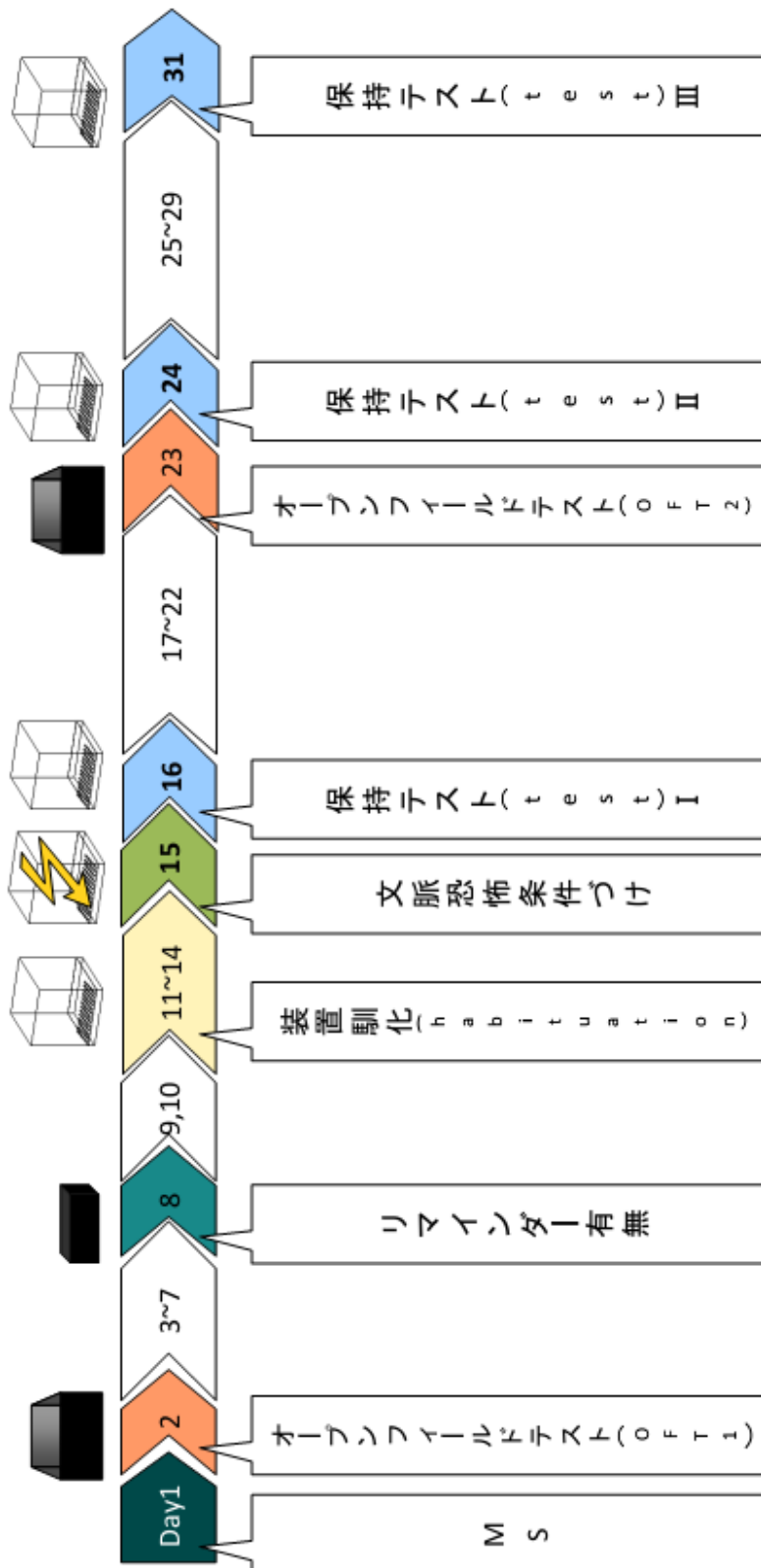


Fig. 7 実験スケジュール(実験 II)

## 結果

### 1. オープンフィールドテスト

Day2 と Day23 に行った OFT について、36 区画に分割された装置床面の中心から 20 区画に滞在した割合 (center time) を Fig. 8a に、後肢立ち (rearing) 回数を Fig. 8b に、総移動量 (total distance) を Fig. 9a に、壁への寄りかかり (leaning-against-wall) 回数を Fig. 9b に、脱糞数 (defecation) を Fig. 10 に示す。

Day 23 において、MS 処置による活動性の低下がみられ、MS 処置群はうつ様行動が高いような傾向にあった。さらにその活動性の低下は MS+R 群において顕著であった。

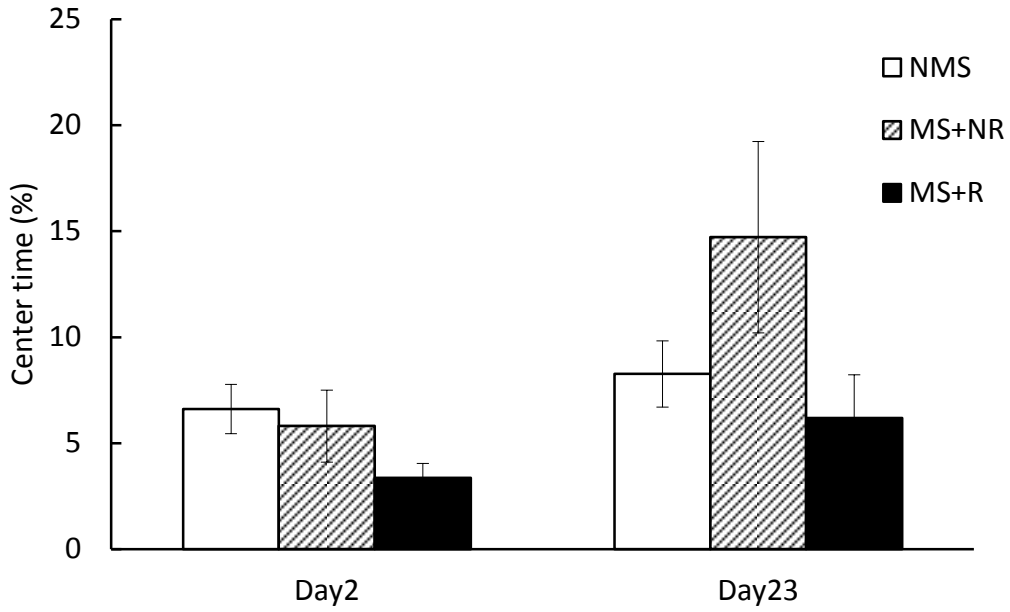
center time について、Day2 と Day23 それぞれの時点において分散分析を行ったところ、Day2 と Day23 の両試行において、全群に有意な差は認められなかった。

rearing について Day2 と Day23 それぞれの時点において分散分析を行ったところ、Day2 と Day23 の両試行において、全群に有意な差は認められなかった。

total distance について、Day2 と Day23 それぞれの時点において分散分析を行ったところ、Day2 に有意な差は認められなかったが、Day23 では、両 MS 群は NMS 群より total distance が有意に低かった [ $F(2, 28) = 5.29, p < 0.05$ ]。

leaning-against-wall について、Day2 と Day23 それぞれの時点において分散分析を行ったところ、Day2 において有意な差は認められなかった。Day23 においては、両 MS 群は NMS 群より leaning-against-wall 回数が有意に低かった [ $F(2, 28) = 5.99, p < 0.01$ ]。

a



b

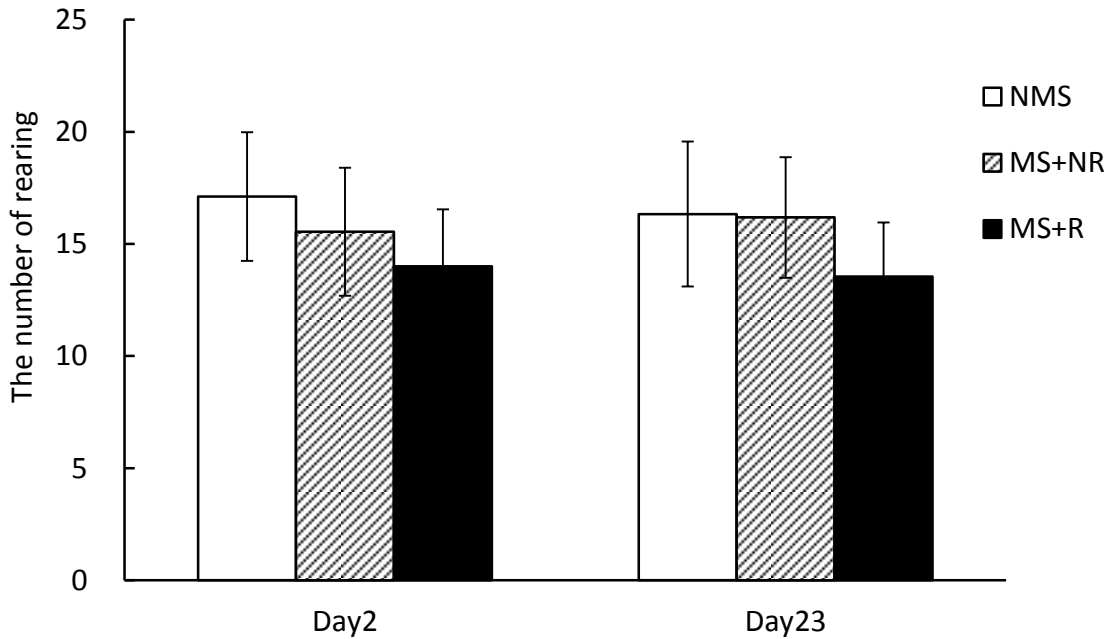
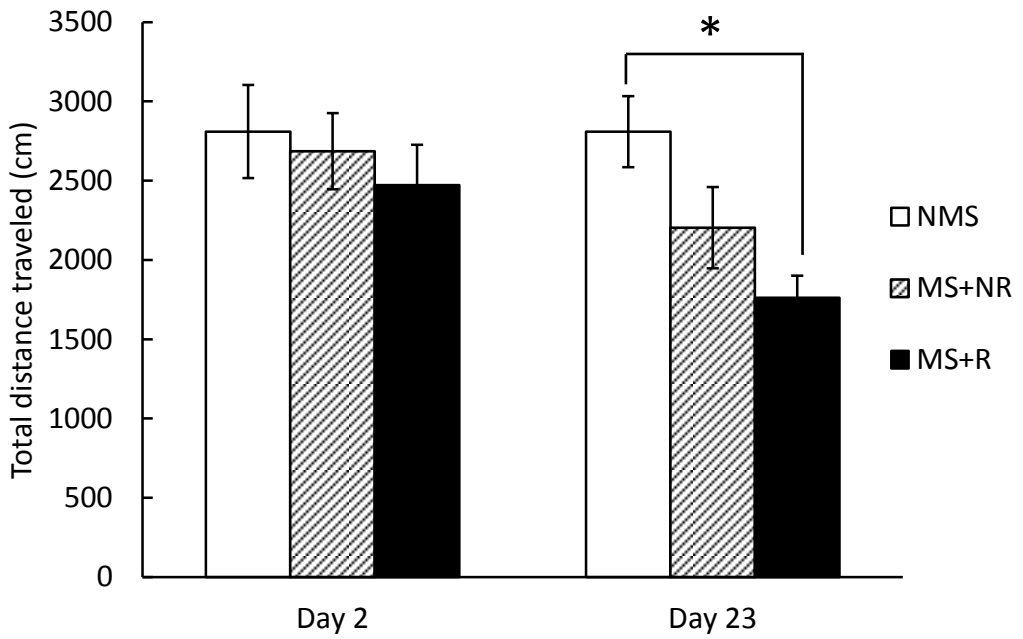


Fig. 8 MSの翌日および22日経過後のオープンフィールドテストにおけるcenter time (a)およびrearing (b)。NMS群 (n = 9), またはMS群にラットを振り分け, MS群をMSの1週間後にリマインダーに曝露しない群 (MS+NR; n = 11) またはする群 (MS+R; n = 11) のいずれかに振り分けた。平均および±SEMを示す。

a



b

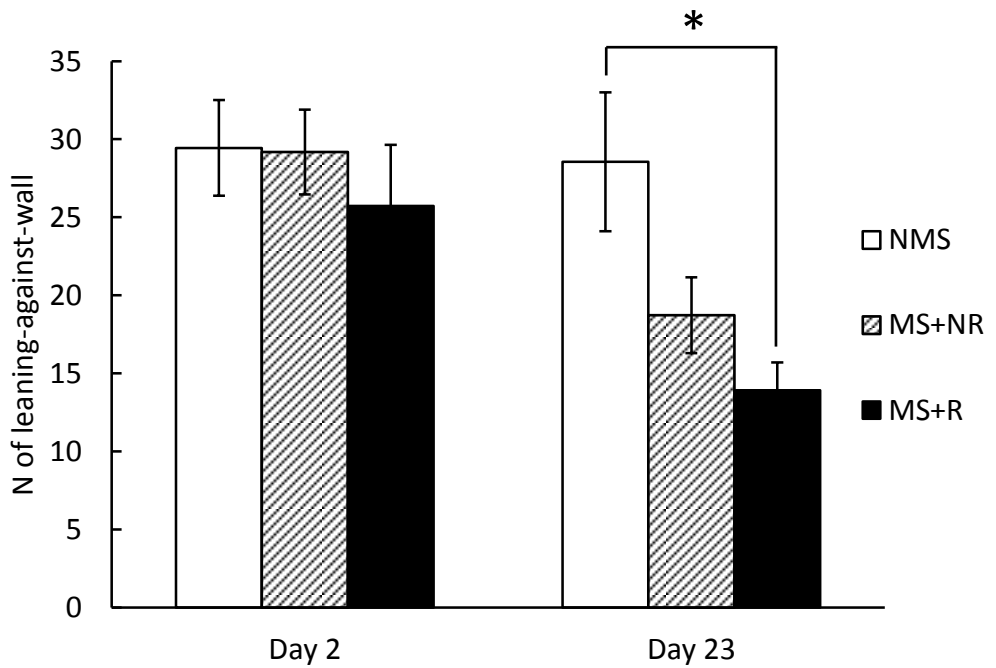


Fig. 9 MS翌日および22日経過後のオープンフィールドテストにおける total distance (a) および leaning (b)。NMS群 (n = 9), またはMS群にラットを振り分け, MS群をMSの1週間後にリマインダーに曝露しない群 (MS+NR; n = 11) またはする群 (MS+R; n = 11) のいずれかに振り分けた。平均およびSEMを示す。\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ 。

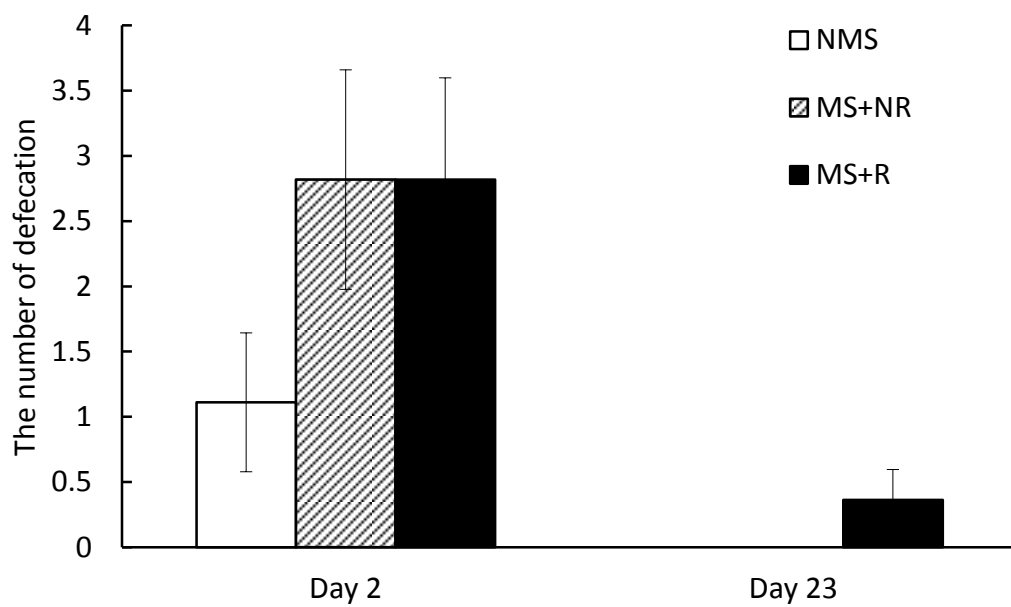


Fig. 10 MSの翌日及び22日後のオープンフィールドテストにおけるdefecation。NMS群 (n = 9), またはMS群にラットを振り分け, MS群をMSの1週間後にリマインダーに曝露しない群 (MS+NR; n = 11) またはする群 (MS+R; n = 11) のいずれかに振り分けた。平均および±SEMを示す。

分散分析を行ったところ、Day2 と Day23 の両試行において、両 MS 群は defecation が NMS 群と比べると多いようにみられるが、統計的に有意な差は認められなかった。

## 2. 装置馴化

装置馴化（試行 1～4）の各試行について、各試行を 1 分ずつ 5 ブロックに分け、各試行最初の 2 ブロックにおけるフリージングの割合の平均値をそれぞれ算出して分析した。これら全体の推移を Fig.11a に示す。

装置馴化の 1 試行に、MS 処置を受けた群は、フリージングが少し高い傾向にあった。2 試行目以降はすべての群に差はほとんどみられなかった。装置馴化（試行 1～4）について 2 要因混合計画の分散分析（stressor (2) × day (4)）を行ったところ、stressor の主効果のみに有意傾向がみとめられた [ $F(1, 28) = 2.65, p < 0.1$ ]。そこで多重比較を行ったところ、3 群間に統計的に有意な差はみられなかった。

## 3. 保持テスト

条件づけ前（base level； BL）、条件づけ翌日の保持テスト（test I）、条件づけ 1 週間後の保持テスト（test II）、条件づけ 2 週間後の保持テスト（test III）について、各試行を 1 分ずつ 3 ブロックに分け、各試行最初の 2 ブロックにおけるフリージングの割合の平均値をそれぞれ算出して分析した。これら全体の推移を Fig.11b に示す。

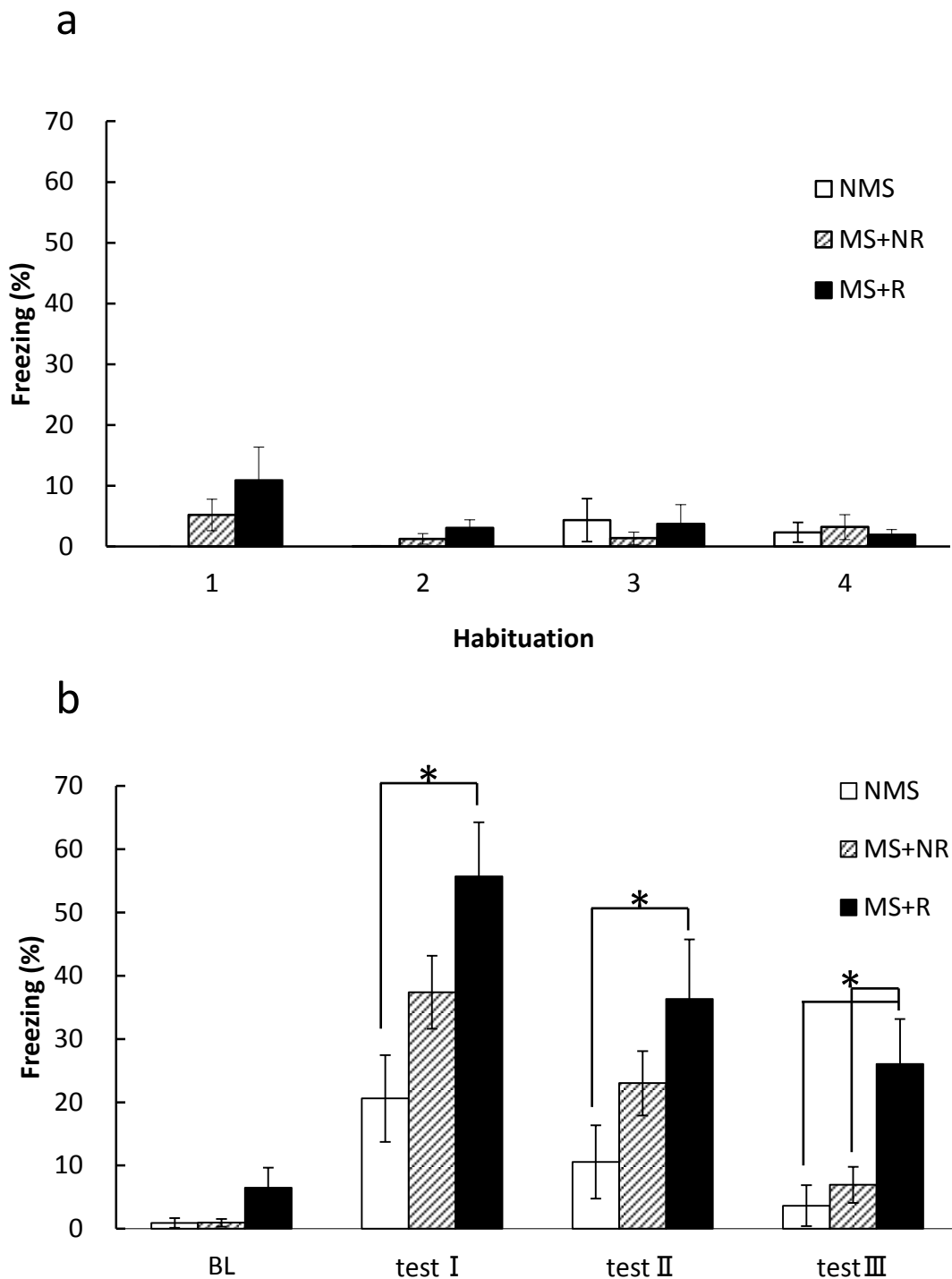


Fig. 11 (a) MS後の装置馴化(habituation)1~4試行目におけるフリージング率。NMS群(n=9),またはMS群にラットを振り分け,MS群をMSの1週間後にリマインダーに曝露しない群(MS+NR;n=11)またはする群(MS+R;n=11)のいずれかに振り分けた。MS処置を1日目とし,11~14日目に装置馴化を行った。(b)MS後の文脈恐怖条件づけにおけるBL,test I,test II及びtest IIIのフリージング率。文脈恐怖条件づけ,保持テスト1,2,3回目はそれぞれ,15日目,16日,24日,31日目に行われた。平均および±SEMを示す。  
\* $p < 0.05$ 。

MS+R 群はすべての保持テストにおいて、最も高いフリーズングを示した。MS+NR 群は NMS 群よりもフリーズングが高い傾向にあるが、MS+R 群ほどではなかった。

BL, test I, test II および test III について 2 要因混合分散分析 (stressor(2) × day(4)) を行ったところ、stressor, day の主効果および、stressor × day の交互作用が有意であった [ $F(2, 28) = 5.36, p < 0.05, F(3, 84) = 30.98, p < 0.01, F(6, 84) = 2.78, p < 0.05$ ]。そこで下位検定として単純主効果および多重比較を行ったところ、test I と test II および test III の各試行において、MS+R 群は NMS 群よりもフリーズング率が高かった ( $p < 0.01$ )。また、NMS 群は試行毎のフリーズング率に差はみられなかった。MS 群においては、test I と test II のフリーズング率が BL よりも高く ( $p < 0.01, p < 0.1$ )、同様に test III よりも高かった ( $p < 0.01, p < 0.01$ )。BL と test III 間には、フリーズング率に差がなかった。MS+R 群においては、全 test 試行において BL よりもフリーズング率が高かった (I ;  $p < 0.01, II, III ; p < 0.01$ )。



## 考察

本実験の結果、フットショックと強制水泳による強いストレスは、その 2 週間後に行われた恐怖条件づけにおけるフリージングを増強し、その条件づけから 1 週間後及び 2 週間後に行われた保持テストにおいても同様に恐怖反応を増強することが再現された。さらに、MS の翌日に行われた OFT での行動には MS の影響がみられなかったのに対して、MS から約 3 週間後の OFT では移動活動量の低下がみられた。また、リマインダーを与えられた MS 群は、リマインダーを経験しなかった MS 群と比較して、恐怖条件づけでのフリージング反応をより強く示し、その保持もまたより強く認められた。したがって、フットショックと強制水泳を合わせた MS は、長期間にわたってラットの恐怖反応を増強すること、そしてその効果は MS の直後よりも時間が経過した後の方がより強くみられることが示唆された。さらに MS を想起させるようなリマインダーによって MS の効果がより増強されることが明らかとなった。

本研究では、MS の翌日と約 3 週間後に OFT を行うことで、MS による情動性の経時的変化の観察を行った。その結果、OFT における移動活動量に経時的な変化がみられ、ストレスから約 3 週間後においてのみ情動性の亢進が認められた。社会的ストレスを用いた先行研究では、ストレスの 14 日後に高架式十字迷路を用いて不安指標を測定したところ、ストレスを受けたラットにおけるオープンアームでの滞在時間が減少することが報告されている (Cohen et al., 2000, 1999)。単回の電撃ストレスを用いた研究では、“defensive withdrawal test”を用いてストレス負荷の 2, 6, 10 週間後に行動を測定したところ、ストレスを受けた動物はすべての時期において行動の鋭敏化がみられている (Bruijnzeel et al., 2001)。“defensive withdrawal test”とは、明るく照らされたオープンフィールド内に置かれた不透明な箱か

ら動物がオープンフィールドに出ていくまでの潜時および、オープンフィールド行動を指標とした行動テストである。不透明な箱から動物が出てくる潜時が大きいほど、情動性が亢進していると判断される。この研究では、ストレスから1週間目までの行動テストでは、不安関連行動にストレス群と統制群で大きな差はみられていないが、ストレスから14日以上経過後に行動を測定した場合において、単回電撃ストレスを行った群に不安行動の増大がみられている。約3週間後のOFTにおいて、MS処置群はNMS群と比べて移動活動量が低下したという本実験の結果は、これらの先行研究と一致している。しかし本実験のように、同一個体を用いて、ストレスの直後と数週間後に繰り返し特定の行動を測定した研究はこれまで行われていない。本実験では、MSの直後よりも3週間ほど時間が経過した方が活動性の低下がみられるという点で、PTSD患者にみられるような時間が経過することでうつ症状が顕在化する傾向と類似していると考えられるかもしれない。

本実験の文脈恐怖条件づけの結果から、MSを受けた後に、その強いストレス自体ではなく、それを想起させるような文脈に曝露することが、後の恐怖反応をより増大させることが示唆された。このことは、本実験と同様にリマインダーを用いて後の恐怖条件づけや高架式十字迷路及びOFTの検討を行った先行研究の結果と一致している(Diehl et al., 2007; Louvart et al., 2005; Pynoos et al., 1996)。しかしながら、恐怖刺激そのものの文脈には曝さずに、恐怖刺激の文脈に関連するだけの装置をリマインダーとして用いた本実験とは異なり、それらの先行研究では恐怖刺激を与えた文脈と同一の文脈をリマインダーとしている。本実験の結果は、恐怖刺激自体でなくても、それを想起させるような刺激でもリマインダーとしての効果を持つことを新たに示唆しているといえる。さらにPTSD患者において、全く同じ文脈でトラウマを再体験することはまれであり、直接的トラウマ

ではない文脈への再曝露をリマインダーとして用いることで、PTSD  
動物モデルとしてより適切であると考えられる。

## 第 2 章の総合的考察

本章では、4 回のフットショック (1.0 mA, 1 sec) または 20 分間の強制水泳、あるいはフットショックと強制水泳を併せた複合ストレス (MS) がその 2 週間後の文脈恐怖条件づけに及ぼす影響 (実験 I) および、リマインダーへの曝露の有無 (実験 II) が、その後の恐怖条件づけおよびオープンフィールド行動に及ぼす影響について検討した。フットショックまたは強制水泳、あるいはその両方を組み合わせた MS をラットに与え、その 2 週間後に文脈恐怖条件づけを行ったところ、強制水泳または MS を与えたラットにおいて条件性恐怖反応増強がみられた。そして、その条件性恐怖反応増強の維持は、MS を与えられたラットにおいて最も顕著にみられた。この結果から、ストレス誘発性恐怖反応増強効果の長期間の持続を引き起こすのに、MS が最も有用であることが示唆された。

つぎに、MS の 1 週間後にリマインダーを与えたラットと与えられなかったラットにおける文脈恐怖条件づけとオープンフィールド行動を検討したところ、リマインダーを与えられた MS 群は、リマインダーを経験しなかった MS 群と比較して、MS の 2 週間後に行われた恐怖条件づけにおけるフリージングを増強し、その保持もまたより強く認められた。さらに、リマインダーを与えられたラットは、MS の翌日に行われた OFT での行動には影響がみられなかったのに対して、MS から約 3 週間後の OFT では移動活動量の低下が強く観察されたことから、うつ様行動を示したと示唆される。

以上の結果をまとめると、本章では、フットショックと強制水泳を組み合わせた MS をトラウマ的事象として用いること、さらに MS 後に MS を想起させるようなリマインダーに曝すことが、ストレス誘発性恐怖反応増強およびその持続を引き起こすことが明らかとなった。ストレス誘発性恐怖学習増強を報告している Fanselow のグループは、

事前に与えるストレッサーにフットショックを用い、その後の恐怖条件づけにフットショックを用いており、事前ストレッサーとその後のストレッサーが同一種類であった。事前ストレッサーとその後ストレッサーが同一種条件のストレス誘発性の行動変容を検討比較するために、本研究においてもフットショックを用いた事前ストレッサーであり、強い恐怖反応を長期間示す MS を用いるのが妥当である。

MS から 2 週間経過後の文脈恐怖条件づけが増強され、くわえてその条件性恐怖反応増強の持続が 2 週間にも及んだ。先行研究においてトラウマストレスから数週間経過後の恐怖条件づけの増強はすでに報告されているものの (Rau & Fanselow, 2009), その持続について検討したのは本実験が初めてである。時間の経過および文脈曝露の繰り返しによって、MS を与えられていないラットは恐怖条件づけが漸減していくにも関わらず、MS を与えられたラットは強い恐怖反応を示し続けたことから、MS によって引き起こされた些細なストレス事象への鋭敏化・過剰反応が観察されたものと考えられる。

本実験では、MS の翌日と約 3 週間後に OFT を行うことで、MS による情動性の経時的変化の観察を行った。その結果、OFT における移動活動量に経時的な変化がみられ、ストレスから約 3 週間後においてのみ情動性の亢進が認められた。社会的ストレスを用いた先行研究では、ストレスの 14 日後に高架式十字迷路を用いて不安指標を測定したところ、ストレスを受けたラットではオープンアームでの滞在時間が減少することが報告されている (Cohen et al., 2000, 1999)。単回の電撃ストレスを用いた研究では、“defensive withdrawal test” を用いてストレス負荷の 2, 6, 10 週間後に行動を測定したところ、ストレスを受けた動物はすべての時期において行動の鋭敏化がみられている (Bruijnzeel et al., 2001)。この研究では、ストレスから 1 週間までの間の行動テストでは、不安関連行動にストレス群と統制群で大きな差はみられていない。しかし、ストレスから 14 日以上経過

後に行動を測定した場合において、ストレス群に不安行動の増大がみられている。約 3 週間後の OFT において、MS 群は NMS 群と比べて移動活動量が低下したという本実験の結果はこれらの先行研究と一致している。しかし本実験のように、同一個体を用いて、ストレスの直後と数週間後に繰り返し特定の行動を測定した研究はこれまで行われていない。本実験では、トラウマストレスの直後よりも 3 週間ほど時間が経過した方が活動性の低下がみられるという点で、PTSD 患者にみられるような時間が経過することでうつ症状が顕在化する傾向と類似していると考えられるかもしれない。

OFT を行動の評価法として用いた場合、現れた行動をどのように扱うかはよく議論されるところである。Montgomery (1955) によれば、OFT における歩行行動は、新奇刺激への接近ばかりでなく、それによって惹起された恐怖からの回避という独立した 2 つの動因によって成立する行動であると説かれている (two-factor theory)。

探索行動とは、“生体が「見知らない」あるいは「慣れない」モノが持つ新奇刺激に直面するとそれに接近し、そこを動き回り、特定の刺激対象があればそれに近づいて、臭いをかいだりかじったりつかんだりする行動であり、時間とともに急速に減少する行動”と定義されている。Halliday (1966) は新奇刺激によって惹起された恐怖が探索行動の唯一の動因になるため、その新奇刺激に関する情報を得ようとするために探索するのだと説明した。Welker (1959) は「強制探索場面」では、動物が場面から逃避しようとする行動までが探索行動として誤って測定されてしまうことを警告し、逃避行動の存在を考慮しなくてはならないとした。

OFT における rearing は歩行行動と同様の変動パターンを呈すことが多く、中枢神経系の興奮を表す指標として考えられている。また defecation と urination の増加は情動亢進を表しているとされ、自律神経反応の一つであるこれらの行動は、歩行・rearing・grooming と

は異なり、情動性と密接に結びついていることから、情動性の的確な指標として以前から広く利用されている (Kitanaka & Ueno, 1975)。

また、OFT によって情動性を測定することの妥当性を確実に証明することは困難であるため、異なった視点から OFT を解釈している研究もある。たとえば Tachibana (1980, 1982) は「情動性」という概念を捨て、「新奇なあるいはストレスのかかった場面での反応性」という新たな構成概念を提唱しており、これは従来の「情動性」にあった交感神経系、遺伝規定等の特色を捨てたものである。ここでは、テスト場面での経験の有無や装置内の照明の強さを変数として、最初の1分間の移動活動量および rearing 数を評価することで、この新たな概念に妥当性が検証されている (Tachibana, 1980, 1982)。以上のようなことを考慮すると、本実験での OFT の結果の解釈としては、time-dependent sensitization (TDS) と称されるように、時間が経過することによって、OFT に対して鋭敏化し、交感神経系の亢進から歩行行動などの活動性が抑えられたという考え方ができよう。

もう一つの解釈として、MS によりセロトニン系の活動が減弱した結果として、動物が「うつ」のような症状を呈している可能性が考えられる (Katagiri, Kagaya, Nakae, Morinobu, & Yamawaki, 2001)。この場合は、本来の活動性自体も減退している可能性がある。これについては MS 後に、OFT だけでなく、ホームケージでの活動性も併せて検討する必要があるだろう。しかしながら、OFT における defecation はトラウマストレスを受けたかどうかに関わらず、Day2 と比較して Day23 では減少傾向がみられている。したがって、OF 装置に対して少なからず馴化が生じている可能性が考えられ、Day23 においては OF に恐怖を感じ、交感神経系が賦活したというよりも、探索行動などのポジティブな行動が生起されなくなった「うつ」様行動の可能性が高いといえる。MS の翌日に行われた OFT での行動には影響がみられなかったのに対して、MS から約 3 週間後の OFT では移動活動

量の低下がみられたことは、PTSD 患者にみられるような時間が経過することでうつ症状が顕在化する傾向と類似していると考えられるかもしれない。

これらの行動変容は PTSD に特徴的なものと考えられる。弱い刺激への過剰反応および、うつ様行動という 2 方向性の行動変容が観察されたと解釈可能と思われるため、本動物モデルは新たな表面妥当性を確立した PTSD 動物モデルとして有用であろうと示唆される。



### 第 3 章

#### 複合ストレスによる条件性恐怖反応増強における ストレス反応系の関与の検討

##### 第 1 節 ストレス誘発性条件性恐怖反応増強に及ぼす metyrapone 末梢投与の効果【実験Ⅲ】

###### 目的

電撃、拘束ストレス、SPS とよばれるいくつかのストレッサーを組み合わせた PTSD 動物モデル、または社会的ストレスをトラウマストレスとして事前に与えた PTSD 動物モデルといったように、PTSD 動物モデルは複数提唱されており、PTSD 動物モデル研究に注目が集まっている。PTSD 動物モデル研究は、トラウマストレス後の曝露療法や薬物療法といった治療法に焦点を当てた研究が主であり、PTSD 発症における神経メカニズムに焦点を当てた研究はほとんど行われていない。しかしながら、PTSD 発症のメカニズムが明らかとなることで、PTSD の根本的治療法を探る一助となる可能性が考えられ、PTSD 発症メカニズムを明らかにすることは、PTSD 研究において重要な課題である。

PTSD モデル動物の研究の一つである Rau et al. (2005) は、トラウマストレス誘発性条件性恐怖反応増強効果のメカニズムに関する検討において、トラウマストレスの文脈と電撃との連合学習が単純にその後の恐怖条件づけに般化しているのではないことを、グルタミン酸 NMDA 受容体遮断薬の投与により証明した。トラウマストレスを与える前に NMDA 受容体遮断薬を投与することで、トラウマストレスとその文脈との間の連合学習を阻害したとしても、後にトラウマストレスによる恐怖反応増強効果はみられたのである。そこで彼らは、

トラウマストレスの増強効果のメカニズムとして、ストレスホルモンのような生理学的変化の関与の可能性を指摘している。

副腎皮質からの GC の放出は、ストレッサーに対する HPA 系の最終反応である。まず、痛みや不安といったストレスを感じると、扁桃体や海馬など、身体内外からの刺激を処理する脳部位が視床下部にシグナルを送り、最終的に副腎皮質から GC が放出される。GC は標的細胞に到達すると、細胞膜を通り抜けて、細胞内の細胞質受容体である GR $\alpha$  に結合する。この GR $\alpha$  - GC 複合体は核内で標的遺伝子である GRE に結合して、遺伝子転写の促進・抑制因子として働く。

GC 放出は行動表出および記憶・学習に深く関与しており、GC の増減によって恐怖反応は変化することが知られている (Bohus et al., 1987)。さらに、MET を投与することによって、恐怖条件づけの表出を減弱させる (Cordero et al., 2002)。MET は 11-deoxycorticosterone を GC に代謝する酵素を阻害することで、GC の生合成を抑制する薬物であり (Roosendaal et al., 1996)、GC 濃度の上昇を妨げ、GC が調整している HPA 系のネガティブフィードバックを減弱させる。結果として、視床下部の CRF と ACTH の分泌を刺激することとなり、追隨して 11-deoxycorticosterone の蓄積が起こる (Fiad, Duffy, & McKenna, 1994)。観察される影響から、薬理的副腎皮質摘出とよばれることがある。MET を投与すると結果的に 11-deoxycorticosterone が増加し、それが GR の遮断薬になるという報告がある (Roosendaal et al., 1996)。

PTSD モデル動物の研究はこれまでに数多くなされているが、トラウマ経験時における GC を含む HPA 系の関与を検討した研究はほとんど報告されていない。そこで、実験Ⅲでは、第 2 章と同様の MS 手続きを用いて、MS 前に HPA 系に影響を及ぼす薬物を投与することで、MS の恐怖反応増強効果における HPA 系の関与を検討することを目的とした。具体的には、MS 処置前に MET を投与することによ

って GC 合成を阻害することで，MS による GC 分泌というストレス反応を抑制することが後の行動に与える影響を検討することとした。

## 方法

### 1. 被験体

Wistar-Imamichi 系雄ラット 32 匹（実験開始時 8 週齢）を用いた。飼育環境および実験時刻は実験 I と同様であった。

### 2. 装置

実験 I と同じ電撃箱，強制水泳装置，リマインダー箱，恐怖条件づけ装置を用いた。

### 3. 薬物

2-Methyl-1,2-di-3-pyridyl-1-propanone (Sigma & Aldrich) を 45% (2-Hydroxypropyl)- $\beta$ -cyclodextrin (Sigma & Aldrich) に溶解 (25, 100 mg/ml) して metyrapone (MET) 溶液を作成した。先行研究において恐怖条件づけまたは不安様行動への影響が観察された用量を参考に，本実験で用いる用量を決定した (Hirani, Sharma, Jain, Ugale, & Chopde, 2005; Yang, Chao, Ro, Wo, & Lu, 2007)。

### 4. 手続き

被験体を MS 処置 × 薬物投与 (metyrapone 25 mg/kg (MET25), MET 100 mg/kg (MET100) or vehicle (VEH)) および NMS + VEH の 4 群に振り分けた (NMS + VEH 群 (n = 8), MS + VEH 群 (n = 8), MS + MET25 群 (n = 8), MS + MET100 群 (n = 8))。平常時のコルチコステロン値を測定するため，MS の前日に尾静脈より

採血を行った。

実験開始 1 日目 (Day1) に、ラットは飼育室から実験室に移動した直後に体重を測定され、薬物の腹腔内投与 (1 ml/kg) を行われた。ラットは 30 分間の待機時間の後、MS 処置手続きを開始された。これ以降の行動実験はすべて実験 I と同様であった。また、実験スケジュールの模式図を Fig. 12 に示す。

#### 【採血】

ラットは、呼吸出来るように端に穴が明けられ、尾部のみが露出するように入り口を絞ることのできる濃紺の布 (ポリエステル) 製の拘束装置に速やかに入れられた。そして速やかにカミソリで尾部に傷をつけ、毛細管を用いて尾静脈より採血された。

### 5. コルチコステロン血中濃度測定

ラットのコルチコステロン (CORT) 血中濃度は酵素免疫測定法 (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: ELISA) を用いて測定した。

#### 【CORT 抽出】

-80°C にて保存された血清を融解したのち直径 12 mm × 長さ 75 mm × 厚さ 0.8 mm の試験管 (DISPOSABLE CULTURE TUBE: サーマフィッシャーサイエンティフィック株式会社) に 20  $\mu$ l または 10  $\mu$ l ずつ注入し、そこに 2 ml のジエチルエーテル (和光純薬工業株式会社) を加え、室温にて攪拌したのちそのまま 10 分以上静置した。その後、ドライアイスにて約 -80°C まで冷却したエタノールへ試験管を 10 分間浸漬し、エーテル層のみを別の試験管へと移し、凍結した水層を除去した。エーテル層は 50°C の恒温水

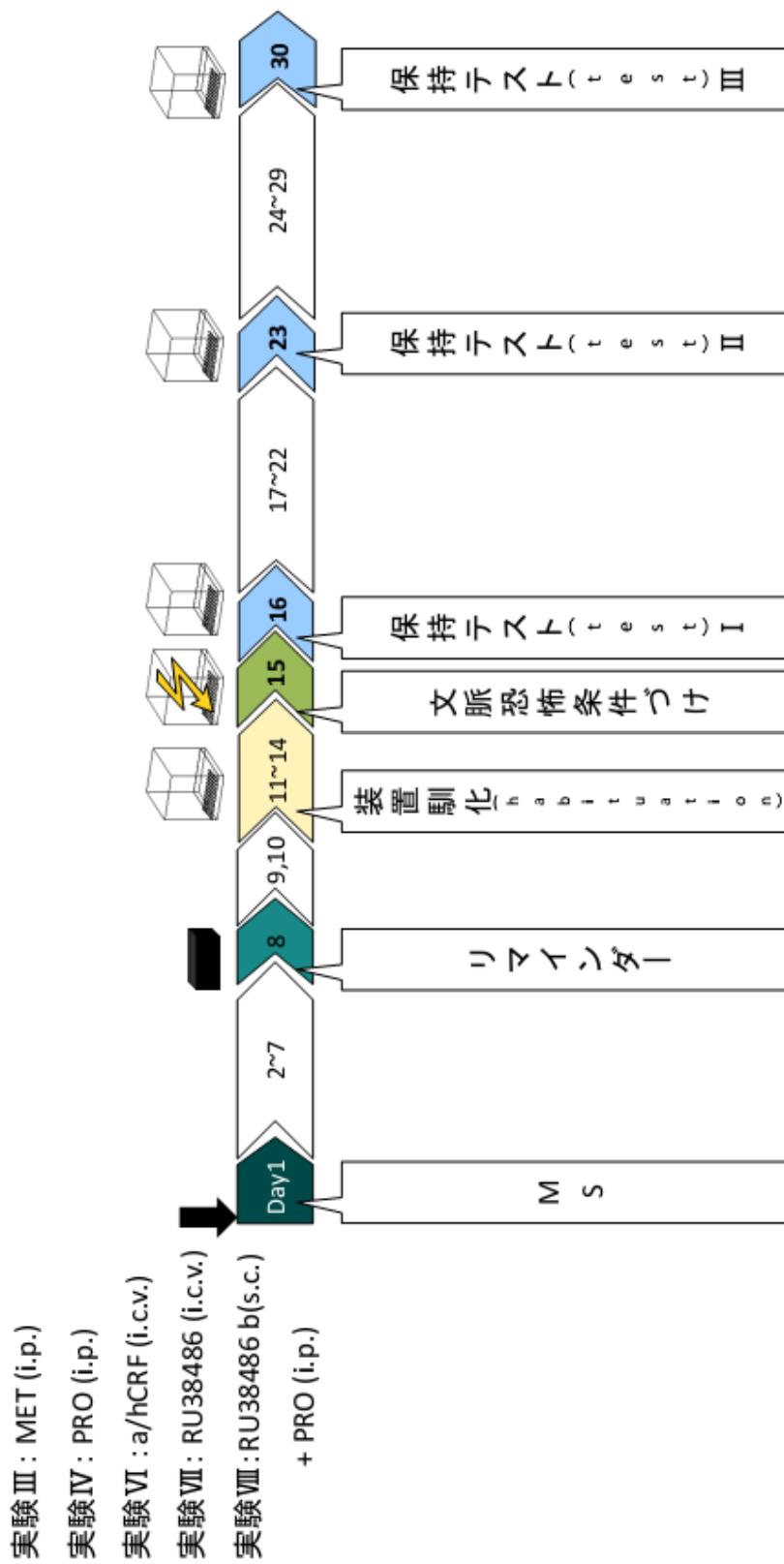


Fig. 12 実験スケジュール(実験Ⅲ, Ⅳ, Ⅵ, Ⅶ, ⅧおよびⅧに共通)。MS 処置前に薬物処置を行った。

槽内で蒸発乾固させた。これに 0.1%ウシ血清アルブミン入りリン酸緩衝液(アッセイバッファー)をそれぞれ 200  $\mu$ l または 100  $\mu$ l ずつ加えて 10 倍希釈とした。

#### 【CORT 濃度測定】

CORT 濃度測定には，抽出したコルチコステロンと西洋ワサビ過酸化酵素 (horseradish peroxidase: HRP) 標識コルチコステロンを直接競合させる酵素免疫測定法を用いた。なお，ELISA の手順を Fig. 13 に，試薬の組成を Table1 に示す。

96 穴プレート (EIA/RIAplate, 9018: Corning Incorporated) に，炭酸緩衝液で 50 ng/ml に希釈した二次抗体 (Anti-Rabbit IgG(H+L) (GT): 生化学バイオビジネス株式会社) を 1 穴あたり 100  $\mu$ l 分注し，室温で 24 時間インキュベートして抗体を定着させ，プレート内の炭酸緩衝液をデカンテーションにより取り除いてアッセイバッファーと交換したのち 4°C で冷蔵保存した。測定に使用する際にはアッセイバッファーをデカンテーションにより取り除き，洗浄瓶を用いてプレートを 3 度洗浄した。

洗浄後，抽出したサンプルと，400 ng/ml から 2 倍ずつ 0.391 ng/ml まで段階希釈することで 11 通り用意した標準コルチコステロン (コルチコステロン: 和光純薬工業株式会社) を 96 穴プレートの各穴にそれぞれ 25  $\mu$ l ずつ分注した。その後，一次抗体としてアッセイバッファーで 800,000 倍に希釈した抗コルチコステロン血清 (Corticosterone-3-CMO-BSA, FKA420-E: コスモ・バイオ株式会社) と 40,000 倍に希釈した HRP 標識コルチコステロン (Corticosterone-3-CMO-BSA, FKA419: コスモ・バイオ株式会社) を，96 穴プレートの各穴へそれぞれ 100  $\mu$ l ずつ分注した。分注がすべて終了したのち，遮光のもと 4°C にて 24 時間インキュベ

トした。インキュベート終了後にデカンテーションによって反応液をすべて取り除き，洗浄瓶を用い4回洗浄した。その後，基質緩衝液を1穴あたり150  $\mu$ lずつ分注し，遮光のもと36~40°Cにて60分インキュベートしたのち硫酸（硫酸：36 N 硫酸（和光純薬工業株式会社）を4 Nに希釈）を1穴あたり50  $\mu$ lずつ加えて反応を停止させた。反応停止後は，マイクロプレートリーダー（MODEL 680XR：バイオ・ラッドラボラトリーズ株式会社）を用いて波長450 nmの吸光度を測定し，標識コルチコステロンの吸光度から得た検量線をもとに血清中のコルチコステロン濃度（ng/ml）を算出した。なお，血清中コルチコステロン濃度は同じサンプルを2穴で測定したものの平均値とし，その変動係数が15%以上となったものについては，実験結果として用いなかった。



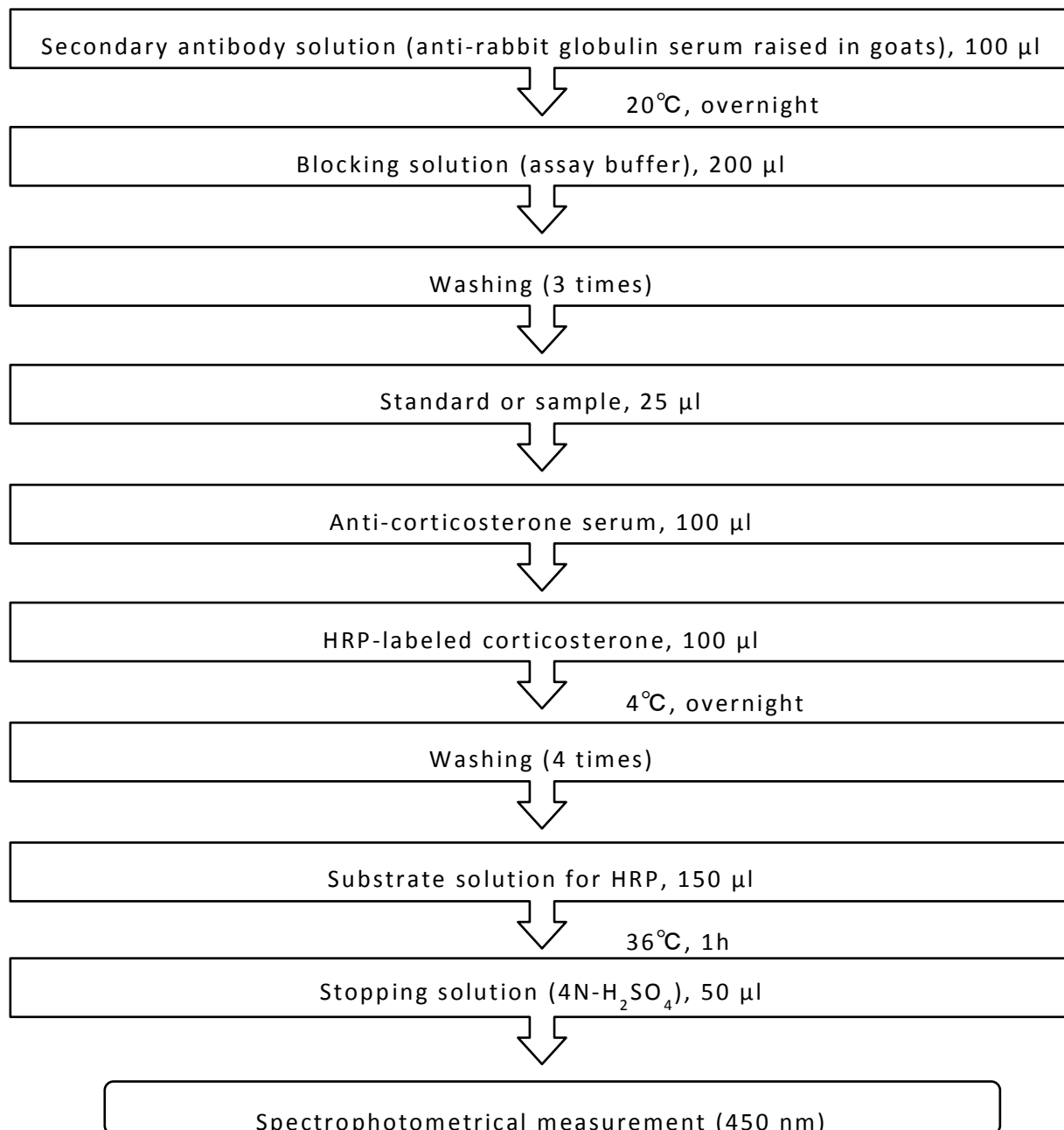


Fig. 13 ELISA 手順

0.1%ウシ血清アルブミン入りリン酸緩衝液(アッセイバッファー)		
リン酸水素ナトリウム二水和物	7.12 g/L	メルクジャパン株式会社
塩化ナトリウム	8.5 g/L	和光純薬工業株式会社
ウシ血清アルブミン	1 g/L	
超純水	計 1000 ml に調整	
5N 塩酸	pH7.2 に調整	和光純薬工業株式会社
炭酸緩衝液		
炭酸ナトリウム十水和物	4.29 g/L	和光純薬工業株式会社
炭酸水素ナトリウム	2.92 g/L	和光純薬工業株式会社
超純水	計 1000 ml に調整	
1N 塩酸	pH9.6 に調整	和光純薬工業株式会社
洗浄液		
ホリオキシエチレンソルビタンモノオレート (Tween80)	0.5 g/L	シグマアルドリッチジャパン株式会社
超純水	計 1000 ml に調整	
基質緩衝液(A)		
過酸化尿素	1.0 g/L	シグマアルドリッチジャパン株式会社
リン酸水素ナトリウム二水和物	18.0 g/L	メルクジャパン株式会社
クエン酸水和物	10.3 g/L	和光純薬工業株式会社
超純水	計 1000 ml に調整	
基質緩衝液(B)		
3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン(TMBZ)	0.5 g/L	株式会社同仁化学研究所
ジメチルスルホキシド	40 ml/L	シグマアルドリッチジャパン株式会社
クエン酸水和物	10.3 g/L	和光純薬工業株式会社
超純水	計 1000 ml に調整	

Table 1. ELISA に用いた緩衝液および洗浄液の組成

## 結果

### 1. 装置馴化

装置馴化（試行 1～4）の各試行について、各試行を 1 分ずつ 5 ブロックに分け、各試行最初の 2 ブロックにおけるフリージングの割合の平均値をそれぞれ算出して分析した。これら全体の推移を Fig.14 に示す。

装置馴化の 1 試行目に、MS+VEH 群は NMS+VEH 群および MS+MET100 群と比べ、フリージングが高かった。2 試行目以降は MS+VEH 群のフリージングが下がっていき、4 試行目においてすべての群に差はみられなかった。装置馴化（試行 1～4）について 2 要因混合計画の分散分析（stressor（4）×day（4））を行ったところ、stressor の主効果に有意傾向がみとめられ [ $F(3, 28) = 4.75, p < 0.01$ ], stressor×day の交互作用が有意であった [ $F(9, 84) = 4.56, p < 0.01$ ]。そこで単純主効果の検定および多重比較を行ったところ、1 試行目において、MS+VEH 群は NMS+VEH 群および MS+MET100 群と比べ有意に高いフリージングを示した ( $p < 0.05$ )。MS+VEH 群および MS+MET25 群は NMS+VEH 群と比べ、フリージングが高かった ( $p < 0.05$ )。MS+MET100 群は、MS+VEH 群および MS+MET25 群比べてフリージングが低く ( $p < 0.05$ )、NMS+VEH 群とは差がみられなかった。

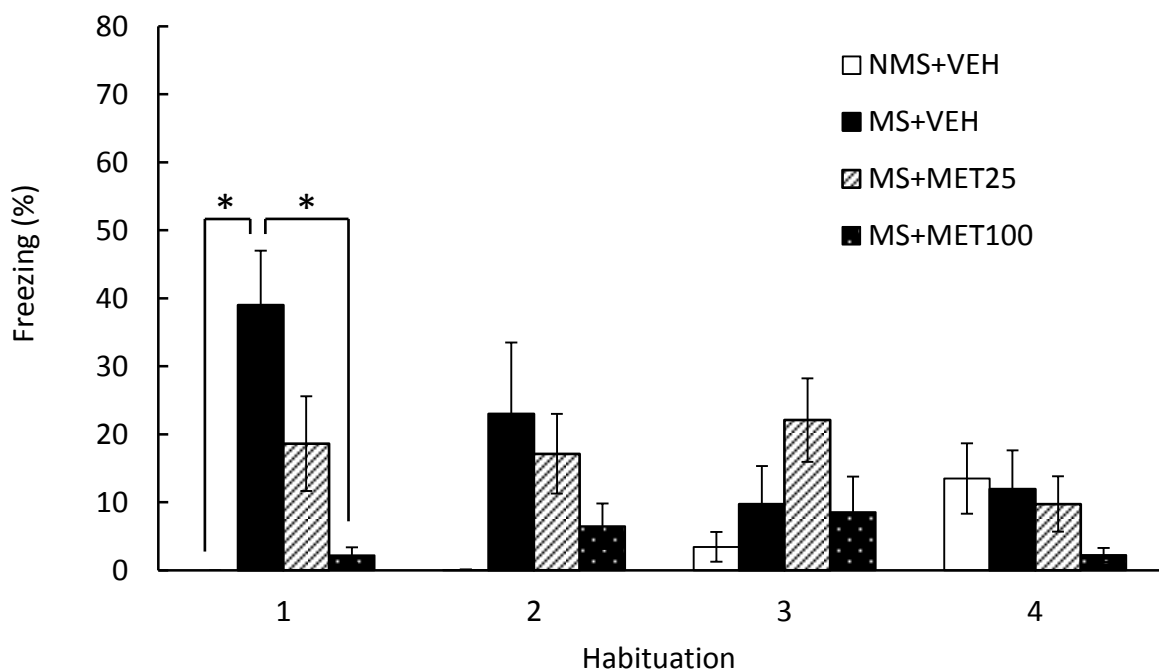


Fig. 14 MS後の装置馴化 (habituation) 1~4試行目におけるフリージング率。MSの30分前にmetyrapone (MET)または溶媒 (VEH)を腹腔内投与し、NMS+VEH (n = 8)、MS+VEH (n = 8)、MS+MET25 (n = 8)またはMS+MET100 (n = 8)にラットを振り分けた。MS処置を1日目とし、11~14日目に装置馴化を行った。平均および±SEMを示す。\*p < 0.05。

## 2. 保持テスト

条件づけ前 (base level; BL), 条件づけ翌日の保持テスト (test I), 条件づけ 1 週間後の保持テスト (test II), 条件づけ 2 週間後の保持テスト (test III) について, 各試行を 1 分ずつ 3 ブロックに分け, 各試行最初の 2 ブロックにおけるフリージングの割合の平均値をそれぞれ算出して分析した。これら全体の推移を Fig.15 に示す。

test I において群間に有意な差はみられなかったものの, test II におけるすべての MS のフリージングは NMS 群の 2 倍ほど高いことから, MET 処置は文脈恐怖条件づけに影響を及ぼさなかったと考えられる。

BL, test I, test II および test III について, 2 要因分散分析 (stressor (4) × day (4)) を行ったところ, stressor, day の主効果および, stressor × day の交互作用が有意であった [  $F(3, 28) = 3.14, p < 0.05$ ,  $F(3, 48) = 69.97, p < 0.01$ ,  $F(9, 84) = 2.99, p < 0.01$  ]。そこで下位検定として単純主効果の検定および多重比較を行ったところ, test II において, MS+MET25 群と MS+MET100 群は, NMS+VEH 群よりもフリージング率が高く ( $p < 0.05$ ), MS+MET100 群は MS+VEH 群よりもフリージングが高かった ( $p < 0.05$ )。test III において, すべての MS 群は, NMS+VEH 群よりもフリージングが高かった ( $p < 0.05$ )。MS+MET25 群と MS+MET100 群のいずれにおいてもフリージングに差はなく, 薬物用量の効果はみられなかった。

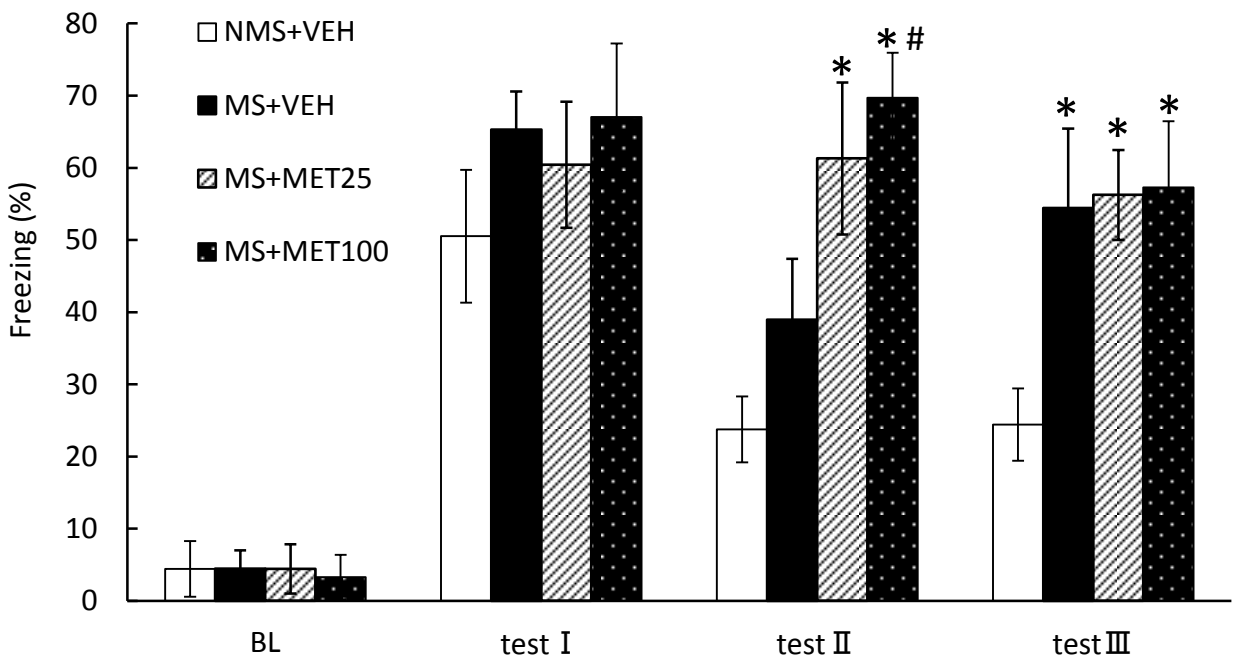


Fig. 15 MS後の文脈恐怖条件づけにおけるBL, test I, test II 及びtest IIIのフリージング率。MSの30分前にmetyrapone (MET)または溶媒 (VEH)を腹腔内投与し, NMS+VEH (n = 8), MS+VEH (n = 8), MS+MET25 (n = 8)またはMS+MET100 (n = 8)にラットを振り分けた。MS処置を1日目とし, 文脈恐怖条件づけ, 保持テスト1, 2, 3回目はそれぞれ, 15日目, 16日, 23日, 30日に行われた。平均および±SEMを示す。  
 \*p < 0.05: NMS+VEHと比較, #p < 0.05: MS+VEHと比較。

### 3. コルチコステロン血中濃度

ベースライン(MSの前日;baseline)およびMS後(after MS)に採集した血液について、ELISAを用いてCORT血中濃度を定量した。各時点の群ごとの平均値について Fig. 16 に示す。

MS後のCORT血中濃度については、ストレスの有無にかかわらず、ベースライン時と比べてストレス後で増加が認められた。MS後のCORT血中濃度における1要因分散分析(stressor(4))の結果、群間に有意な差がみられた [ $F(3, 21) = 7.8, p < 0.01$ ]。多重比較を行ったところ、MS+VEH群およびMS+MET25群はNMS+VEH群およびMS+MET100群よりもCORT血中濃度が高かった ( $p < 0.05$ )。さらに、MS+MET100群は他の群よりもCORT血中濃度が有意に低かった ( $p < 0.05$ )。METは用量依存的にMS後のCORT血中濃度上昇を抑制した。

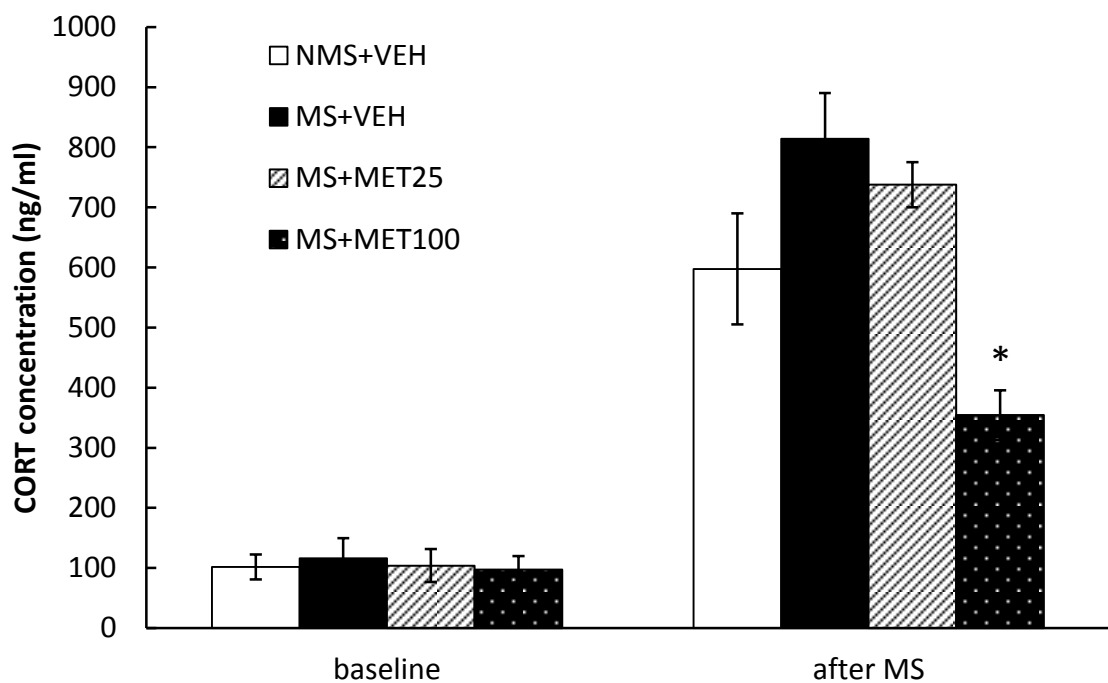


Fig. 16 MS前日 (baseline) およびMS直後 (after MS) におけるCORT血中濃度。MSの30分前にmetyrapone (MET) または溶媒 (VEH) を腹腔内投与し, NMS+VEH (n = 8), MS+VEH (n = 8), MS+MET25 (n = 8) またはMS+MET100 (n = 8) にラットを振り分けた。平均および±SEMを示す。\*p < 0.05。



## 考察

本実験の結果，MS 処置は，ストレス誘発性恐怖反応増強効果を引き起こすことが確認された。また，MS 時 GC 分泌を抑制したとしても恐怖反応増強効果は阻害されないことが示された。

MET100 mg/kg 投与群の MS 後 CORT 血中濃度は，MS+VEH 群の約半分の値であり，ストレスによる CORT 濃度上昇は MET によって有意に抑えられたと考えられる。MET 投与によって拘束ストレス誘発性コカイン渴望を阻害した先行研究では，MET を 100 mg/kg 投与することで行動に影響がみられたため，MET100 mg/kg という用量は行動に影響を与えうる量である (Marinelli, Le Moal, & Piazza, 1996)。この先行研究の MET 投与ラットにおける GC 濃度は，VEH 投与ラットの 3 分の 2 程度の濃度であり，本実験においても同程度の GC 濃度抑制が観察された。MS 後の GC 抑制が認められた場合においても，その後の恐怖条件づけに影響をしなかったという本実験の結果は，MS による恐怖反応増強効果における HPA 系 GC 分泌の関与の否定を示唆した。

ストレス誘発性恐怖反応増強効果に MET の効果はみられなかった一方，装置馴化においては MET 投与の影響がみられた。MET100 mg/kg 投与群は，装置馴化 1 試行目におけるフリージング反応をほとんど示さなかった。MS 装置にはフットショックを与えるための金属グリッドが備わっており，文脈恐怖条件づけ装置もまたフットショックを使用するための金属グリッドが備わっている。恐怖条件づけ文脈はバックグラウンドノイズ，照明，装置内壁およびグリッドの太さや本数，さらに動物を出し入れする扉の方向といった点で MS 文脈と全く異なっていたものの，MS 装置に対する恐怖反応は恐怖条件づけ装置に対して般化したと考えられる。そのため，フリージングを示すはずの MS 処置を受けた群がフリージングを示さなかったということは，

恐怖反応増強効果に影響は示さなかったものの、MS 前 MET 投与は MS 時の恐怖条件づけが 2 週間後の文脈恐怖条件づけに対して般化するのを阻害したと考えられる。GC はストレス場面における記憶固定を促進させる効果があるため (Roosendaal et al., 2009), MET 投与による GC 合成阻害は、MS 文脈での恐怖記憶の固定を阻害した可能性がある。つまり、MS を受けた環境の記憶固定を阻害された MS+MET100 群は、装置馴化でフリージングを生じるのに必要な恐怖記憶を保持していなかったため、般化が生じなかったと示唆される。装置馴化において般化が生じなかったにも関わらず、恐怖反応増強が生じたことを併せて考えると、文脈記憶の表象自体が恐怖反応増強効果に関わっているのではなく、感覚を司る部位における神経伝達の変容あるいは、恐怖反応を引き起こす神経伝達回路の変容が生じたために、ストレス誘発性恐怖反応増強効果が形成される可能性が示唆された。ストレス誘発性恐怖学習増強は、単に般化を示しているのではなく、新たな恐怖学習の促進であるとする Rau et al. (2005) の研究を本実験の結果は支持したといえる。

## 第 2 節 ストレス誘発性条件性恐怖反応増強に及ぼす propranolol 末梢投与の効果【実験Ⅳ】

### 目的

実験Ⅲにおいて、MS による恐怖反応増強効果のメカニズムとして、MS 応答の GC 分泌関与を検討するため、MET を投与したものの、恐怖反応増強効果に影響を及ぼさなかった。序でも述べたように、主要なストレス反応系は、HPA 系だけでなく交感神経系の賦活が広く知られている (McEwen, 2000)。

交感神経系のストレス反応はエピネフリンおよびノルエピネフリンが司っており、内臓の活動の抑制、視覚の鋭敏化、脳血流量を増加させることによる覚醒化、酸素交換能の上昇、グリコーゲンの分解によるグルコースの放出、筋の血管拡張、体表面の血管収縮、心拍増加、立毛などの効果は急速に現れる。エピネフリンは血液脳関門を通過できないものの、求心性迷走神経における  $\beta$ -NER を賦活させることで、直接的に脳幹の弧束核を介して、または間接的に青斑核を介して前脳に情報伝達している (Williams & McGaugh, 1993)。そして、BLA は主に、弧束核から始まっているノルエピネフリン神経支配を受けるため (Williams, Men, Clayton, & Gold, 1998)、ストレスフルな刺激によって BLA におけるノルエピネフリンレベルが増加する。そのため、ストレスフルな事象によるノルエピネフリン増加は、BLA 賦活を介して嫌悪記憶の固定を調節していると示唆されている (McGaugh & Roozendaal, 2002)。

propranolol (PRO) は  $\beta$ -NER 遮断薬であり、心筋に作用することで心拍・血圧下降効果があるため、高血圧症、狭心症や不整脈の治療に一般的に用いられている。また、血液脳関門を通過し、脳脊髄にも到達するため、中枢での作用が期待される。恐怖条件づけの直前、ま

たは直後に PRO を投与すると、直後に投与した場合に恐怖条件づけは成立するが、直前に投与した場合は恐怖条件づけが阻害されると報告されている (Bush, Caparosa, Gekker, & LeDoux, 2010)。その他に、ヒトを対象とした実験も行われている。Brunet et al. (2008) の研究では、PTSD の患者に個々のトラウマ的出来事を書き出してもらったすぐ後に、PRO を投与した。その一週間後に各々ストレスフルな事象の映像を見てもらいながら生理反応を測定したところ、PRO を投与された患者では、トラウマ事象の映像によってもたらされた生理反応が小さかった。したがって、PRO は動物の条件性恐怖反応だけではなく、ヒトの PTSD 症状も抑制すると考えられることから、恐怖反応増強への関与が予想される。

そこで本実験では、MS 前に  $\beta$ -NER の遮断薬である PRO を投与することで、MS の恐怖反応増強効果におけるエピネフリン・ノルエピネフリンの関与を検討することを目的とした。

## 方法

### 1. 被験体

Wistar-Imamichi 系雄ラット 42 匹（実験開始時 8 週齢）を用いた。飼育環境および実験時刻は実験 I と同様であった。

### 2. 装置

実験 I と同じ電撃箱，強制水泳装置，リマインダー箱，恐怖条件づけ装置を用いた。

### 3. 薬物

propranolol 溶液 (20 mg/ml) は, (±)-propranolol hydrochloride (Sigma & Aldrich) を 0.9% 生理食塩水にて緩やかに加熱しながら溶解し作成した。先行研究において恐怖条件づけへの影響が観察された用量の中でも高用量であったものを参考に，本実験で用いる用量を決定した (Kabitzke, Silva, & Wiedenmayer, 2011)。

### 4. 手続き

被験体を MS 処置 × 薬物投与 (propranolol 20 mg/kg (PRO) or 0.9% 生理食塩水 (SAL)) の 4 群に振り分けた (NMS+SAL 群 (n = 8), NMS+PRO 群 (n = 7), MS+SAL 群 (n = 14), MS+PRO 群 (n = 13))。実験開始 1 日目 (Day1) に，ラットは飼育室から実験室の移動直後に体重を測定され，薬物の腹腔内投与 (1 ml/kg) を行われた。ラットは 30 分間の待機時間後，MS 処置手続きを開始された。以降の行動実験はすべて実験 I と同様であった。

## 結果

### 1. 装置馴化

装置馴化（試行 1～4）の各試行について、各試行を 1 分ずつ 5 ブロックに分け、各試行最初の 2 ブロックにおけるフリージングの割合の平均値をそれぞれ算出して分析した。これら全体の推移を Fig.17 に示す。

MS+PRO 群は、MS+SAL 群と比較して、装置馴化 1 試行目におけるフリージング率が低かった。

装置馴化（試行 1～4）について 3 要因混合計画の分散分析（stressor (2) × drug (2) × day (4)）を行ったところ、MS 処置の主効果 [ $F(1,38)=15.26$ ,  $p<0.01$ ] および試行の主効果 [ $F(3,114)=3.78$ ,  $p<0.05$ ] が有意であった。また、薬物と試行の交互作用 [ $F(3,114)=5.57$ ,  $p<0.01$ ]、MS 処置と試行の交互作用 [ $F(3,114)=4.81$ ,  $p<0.01$ ]、薬物と MS 処置と試行の交互作用 [ $F(3,114)=6.39$ ,  $p<0.01$ ] が認められた。

そこで各馴化試行で薬物投与×MS 処置の 2 要因分散分析を行ったところ、1 回目の馴化試行において、薬物投与の主効果 [ $F(1,38)=6.92$ ,  $p<0.05$ ]、MS 処置の主効果 [ $F(1,38)=14.52$ ,  $p<0.01$ ] および交互作用 [ $F(1,38)=5.52$ ,  $p<0.05$ ] のすべてが有意であった。そこで単純主効果の検定を行ったところ、SAL 群において MS 処置の主効果が有意であり [ $F(1,38)=18.97$ ,  $p<0.01$ ]、MS 群のほうが NMS 群に比べてフリージング率が高かった。さらに MS 群において薬物の主効果が有意であり [ $F(1,38)=12.40$ ,  $p<0.01$ ]、SAL 群のほうが PRO 群に比べてフリージング率が高かった。

また 2 回目と 4 回目の馴化試行においては、MS 処置の主効果のみが有意であり [2 回目 :  $F(1,38)=8.66$ ,  $p<0.01$ ; 4 回目 :

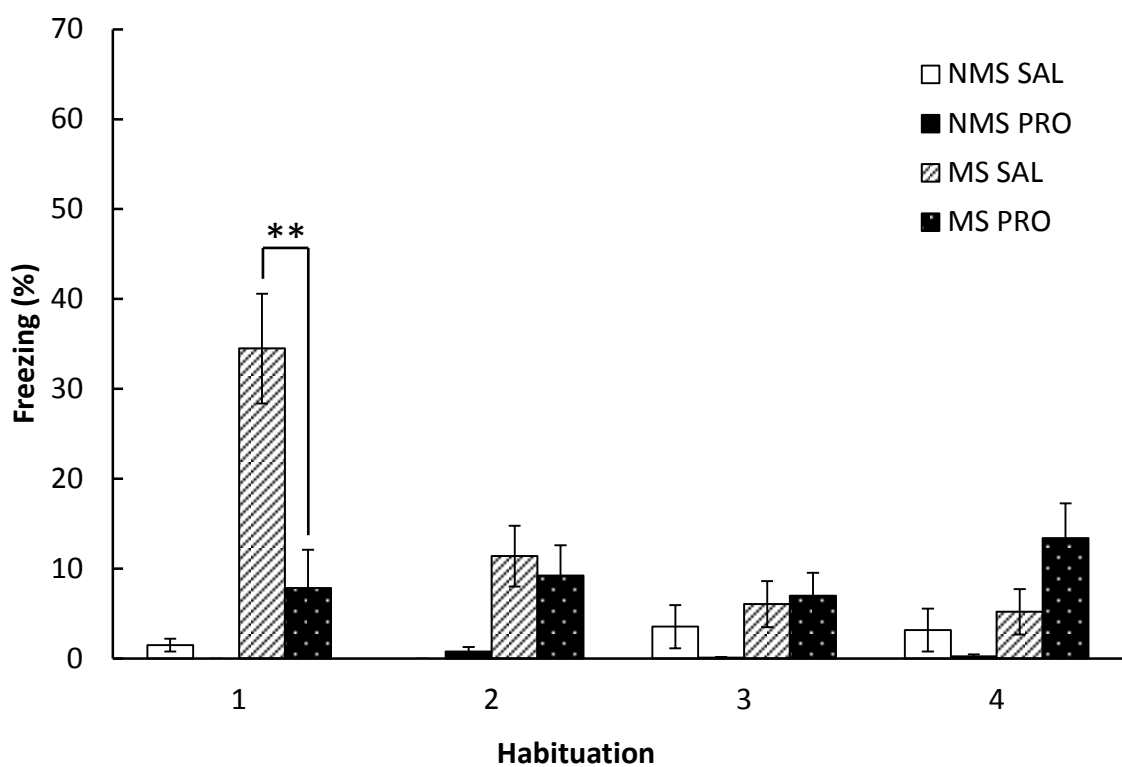


Fig. 17 MS後の装置馴化 (habituation) 1~4試行目におけるフリージング率。MSの30分前にpropranolol(PRO)または生理食塩水(SAL)を腹腔内投与し、NMS+SAL(n=8)、NMS+PRO(n=7)、MS+SAL(n=14)またはMS+PRO(n=13)にラットを振り分けた。MS処置を1日目とし、11~14日目に装置馴化を行った。平均および±SEMを示す。\*p < 0.01。

$F(1,38)=4.59, p<0.05]$ , 薬物投与の有無に関わらず, MS 群のほうが NMS 群よりもフリージング率が高かったが, 3 回目の馴化試行においては群間に有意差はみられなかった。

## 2. 保持テスト

条件づけ前 (base level; BL), 条件づけ翌日の保持テスト (test I), 条件づけ 1 週間後の保持テスト (test II), 条件づけ 2 週間後の保持テスト (test III) について, 各試行を 1 分ずつ 3 ブロックに分け, 各試行最初の 2 ブロックにおけるフリージングの割合の平均値をそれぞれ算出して分析した。これら全体の推移を Fig.18 に示す。

MS 処置群においてフリージングの増強がみられたものの, 薬物処置の効果はみられなかった。NMS 群は試行が進むにつれてフリージング率が大きく低下していった一方で, MS 処置群はフリージング増強を維持していた。

BL, test I, test II および test III について, (stressor (2) × drug (2) × day (4)) を行ったところ, MS 処置の主効果 [ $F(1, 38)=7.77, p<0.01$ ] および試行の主効果 [ $F(3, 114)=23.43, p<0.01$ ] が有意であった。また, 薬物と試行の交互作用に有意傾向がみられた [ $F(3, 114)=2.16, p=0.1$ ]。そこで事後検定として単純主効果の検定を行ったところ, 薬物投与の有無に関わらず, 保持テスト 3 回すべてにおいて, MS を受けた群は NMS 群よりもフリージング率が高かった ( $p<0.05$ )。また NMS 群についても薬物投与の有無に関わらず, ベースレベルと比較して保持テスト 1 回目と 2 回目ではフリージング率の増加が有意に認められたが, 保持テスト 3 回目ではベースレベルまで減少していた ( $p<0.05$ )。一方, MS 群



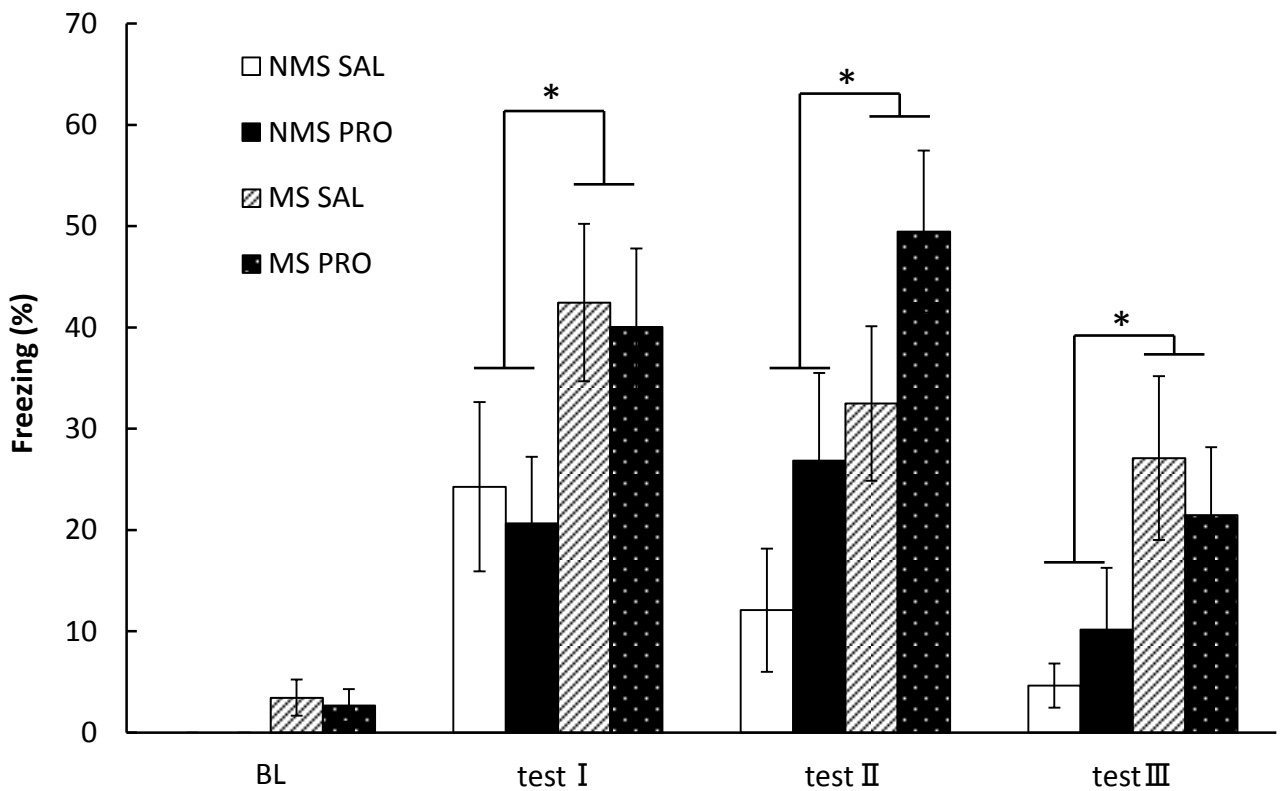


Fig. 18 MS後の文脈恐怖条件づけにおけるBL, test I, test II 及びtest IIIのフリージング率。MSの30分前にpropranolol(PRO)または生理食塩水(SAL)を腹腔内投与し, NMS+SAL(n = 8), NMS+PRO(n = 7), MS+SAL(n = 14)またはMS+PRO(n = 13)にラットを振り分けた。MS処置を1日目とし, 文脈恐怖条件づけ, 保持テスト1, 2, 3回目はそれぞれ, 15日目, 16日, 23日, 30日目に行われた。平均および±SEMを示す。

\*p < 0.05。

については，3回の保持テストすべてにおいてベースレベルよりも有意に増加していたが ( $p<0.01$ )，1，2回目の保持テストと比べて3回目の保持テストでは減少していた ( $p<0.01$ )。

## 考察

本実験の結果、MS 処置は、ストレス誘発性恐怖反応増強効果を引き起こすことが再び確認された。また、MS 時  $\beta$ -NER を抑制しても恐怖反応増強効果は阻害されないことが示された。実験Ⅲと同様に、ストレス誘発性恐怖反応増強効果に薬物の効果はみられなかったものの、装置馴化において PRO 投与の影響がみられた。MS+PRO20 mg/kg 投与群は、装置馴化 1 試行目におけるフリージング反応をほとんど示さなかった。

恐怖条件づけにおける  $\beta$ -NER 受容体の関与については、これまでにいくつかの研究によって検討されている。最近では、Bush et al. (2010) は、恐怖条件づけ訓練前の扁桃体内 PRO 投与が、保持テストでの条件性恐怖反応を低下させるが、恐怖条件づけの訓練直後に投与した場合には、保持テストでの恐怖反応には影響しないことを報告している。一方、Kabitzke et al. (2011) は、仔ラットを用いて、ネコの匂いを US とした文脈恐怖条件づけの訓練前または訓練後に PRO を腹腔内投与した場合、どちらの投与タイミングにおいても保持テストにおける条件性恐怖反応が低下すること報告している。また最近になって、PRO は、ヒトの PTSD の治療薬としての効果が期待されている。実際 Brunet et al. (2008) は、PTSD 患者に対し、トラウマ的記憶を思い出した後に PRO を投与した結果、その 1 週間後にトラウマ的出来事の映像を見せた場合の生理的反応が減弱することを報告している。そのため、本実験の結果は、MS 時に  $\beta$ -NER を遮断することで MS 文脈獲得が阻害されたものと示唆される。実験Ⅲと一致する結果が得られたといえるだろう。よって、 $\beta$ -NER は学習促進を調整しているものの、ストレス誘発性恐怖反応増強の発展においては、主要な役割を担っていないことが示唆された。

我々の研究室の予備実験にて PRO 投与用量を検討したところ、投

与可能な最大用量は PRO20 mg/kg であることが分かった。強いストレスをラットに与えることでノルエピネフリンの反応は非常に大きくなることが予想されたため、本実験では、PRO の効果を最大用量の一用量のみ検討した。また、先行研究 (Sullivan, Wilson, & Leon, 1989; Weber, Watts, & Richardson, 2003) で用いられている用量の中でも、高用量を本研究で採用した。これらの先行研究では強い光による恐怖増強驚愕反応が、試行前の PRO (20 mg/kg) 腹腔内投与によって減弱され、強い光が提示されてもラットは驚愕反応を示さなくなっていることから、本研究で用いた用量が不十分であったとは考えにくい。さらに PRO 用量を増やしたことによる MS 誘発性恐怖反応増強への影響の検討は困難であるため、さらなる検討を行うためには、脳部位特異的に  $\beta$ -NER 賦活を完全に抑制した実験を行う必要があるかもしれない。

### 第3節 ストレス誘発性条件性恐怖反応増強に及ぼす副腎摘除の効果【実験V】

#### 目的

実験Ⅲ・Ⅳにおいて、ストレス誘発性恐怖反応増強を引き起こす初期因子として、ストレス反応としてのGC分泌ないしエピネフリン・ノルエピネフリンに注目した。しかしながら、MS前MET投与によるGC合成阻害およびMS前PRO投与による $\beta$ -NER阻害は、MSによる恐怖反応増強効果に影響を及ぼさなかった。MS+MET100群において、MS後CORT血中濃度は有意な低下を示したものの、ベースレベルと比べると高いことから、MET投与によって十分なGC阻害効果が得られなかった可能性が考えられた。すなわちストレスによるわずかなGC分泌が、その後の恐怖反応増強に影響した可能性が残された。

ADXによって抑制される恐怖反応（フリージング）は、GC投与によって回復することが知られている（Bohus et al., 1987）。さらに瞬目反射を用いた痕跡条件づけは、急性ストレス曝露によって増強されるが、この増強はADXによって抑制される（Beylin & Shors, 2003）。この瞬目反射を用いた痕跡条件づけパラダイムは、CSとUSの間に時間的隔たりがあるため習得が困難な課題であり、海馬依存であることが知られている（Beylin et al., 2001）。海馬はGRが豊富に存在している部位であることから、ADXによる条件づけ増強の抑制は、海馬のGRを介した現象である可能性がある。

ADXは、GC血中レベルの最低値を保ち続けることができるため、MS応答性GC・エピネフリン分泌およびその後のGC血中レベル変動を阻害するのに有効な手技であると考えられる。そこで本実験では、GCおよびエピネフリン分泌器官である副腎をMS前に摘除すること

により，副腎からのストレス反応系に関与する副腎を完全に抑え，その後の文脈恐怖条件づけに及ぼす影響を検討することを目的とした。

## 方法

### 1. 被験体

Wistar-Imamichi 系雄ラット 29 匹（実験開始時 8 週齢）を用いた。飼育環境および実験時刻は実験 I と同様であった。

### 2. 装置

実験 I と同じ電撃箱，強制水泳装置，リマインダー箱，恐怖条件づけ装置を用いた。

### 3. 手術

ラットはペントバルビタール（35 mg/kg）腹腔内投与による全身麻酔下で両側副腎摘除（ADX）手術を行われた。麻酔下に背部の毛を刈り，アルコールで消毒後，背側肋骨下より切開し，副腎をピンセットではさみ取り，腹膜および皮膚を縫合した。偽手術（sham）群は，背側を切開し，副腎を目視した後に縫合した。ADX ラットは，飲水として 0.9%生理食塩水を与えられた。実験終了後，副副腎の残存しないことを確認した。

### 4. 手続き

被験体を MS 処置×副腎摘除手術の 4 群に振り分けた（NMS sham 群（n = 8），NMS ADX 群（n = 7），MS sham 群（n = 8），MS ADX 群（n = 6））。副腎摘除手術は MS（Day1）を与えられる少なくとも 7 日前に行われ，術後は回復期を置いた。MS 以降の行動実験はすべて実験 I と同様であった。また，実験スケジュー

ールの模式図を Fig. 19 に示す。



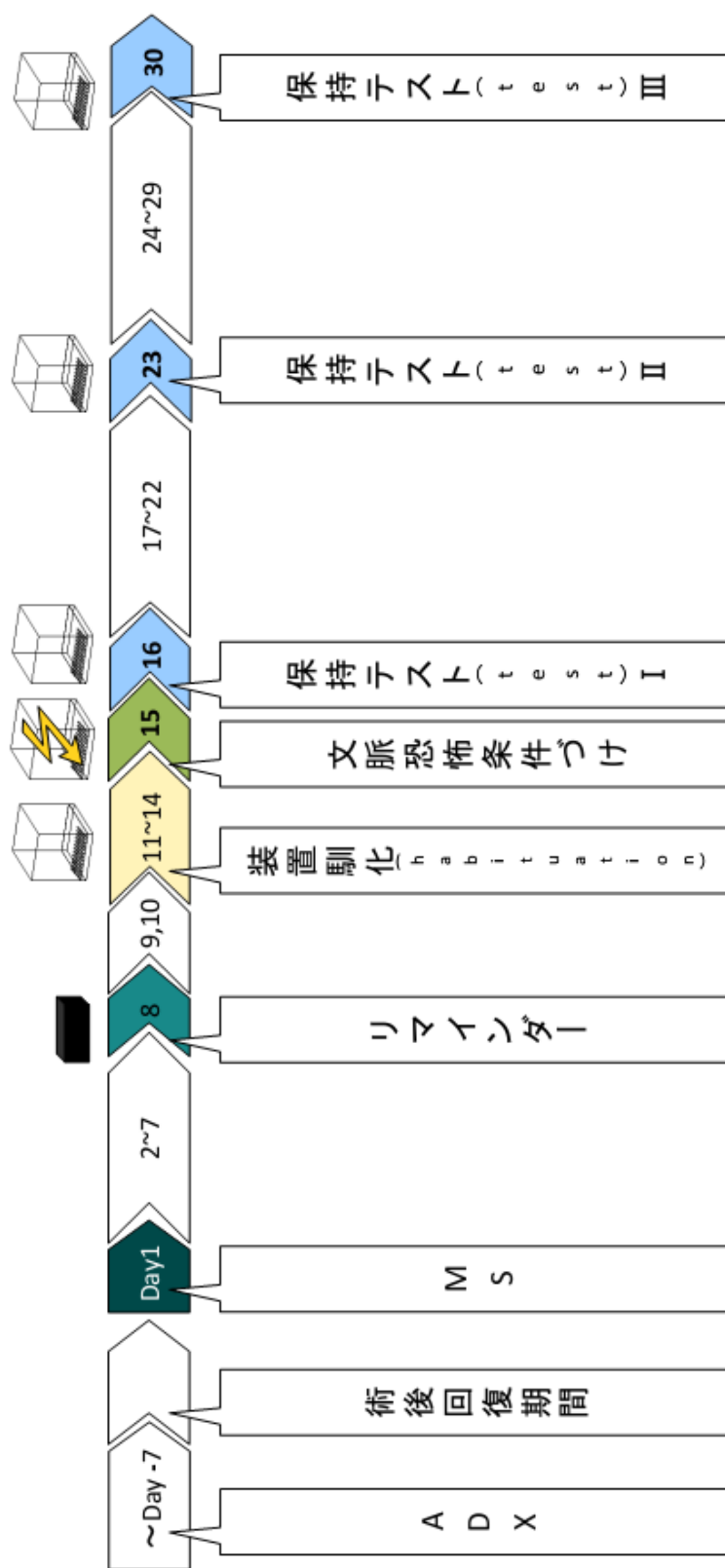


Fig. 19 実験スケジュール。副腎摘除 (ADX) を行った後, 1 週間以上の回復期間を置いて MS を行った。

## 結果

### 1. 装置馴化

装置馴化（試行 1～4）の各試行について、各試行を 1 分ずつ 5 ブロックに分け、各試行最初の 2 ブロックにおけるフリージングの割合の平均値をそれぞれ算出して分析した。これら全体の推移を Fig.20 に示す。

装置馴化の 1, 2 試行目において、ADX 処置に関わらず、MS 処置を受けた群はフリージングが高く、試行を重ねるごとに下がった。ADX 群はフリージングが若干高いようであった。装置馴化（試行 1～4）について 3 要因混合計画の分散分析（stressor（4）×ADX（2）×day（4））を行ったところ、stressor の主効果および ADX の主効果が有意であり [ $F(1, 25) = 20.5, p < 0.01$ ,  $F(1, 25) = 4.79, p < 0.05$ ], stressor×day の交互作用が有意であった [ $F(3, 75) = 8.75, p < 0.01$ ]。そこで単純主効果の検定および多重比較を行ったところ、1 試行目および 2 試行目において、MS 処置を受けた群は NMS 群と比べてフリージングが高かった ( $p < 0.01, p < 0.05$ )。ADX 処置に関わらず MS 処置を受けた群の 1 試行目は、2 試行目以降と比べてフリージングが高く ( $p < 0.05$ )、一方、NMS 群はすべての試行においてほとんどフリージングをしめさなかった。

### 2. 保持テスト

条件づけ前 (base level; BL), 条件づけ翌日の保持テスト (test I), 条件づけ 1 週間後の保持テスト (test II), 条件づけ 2 週間

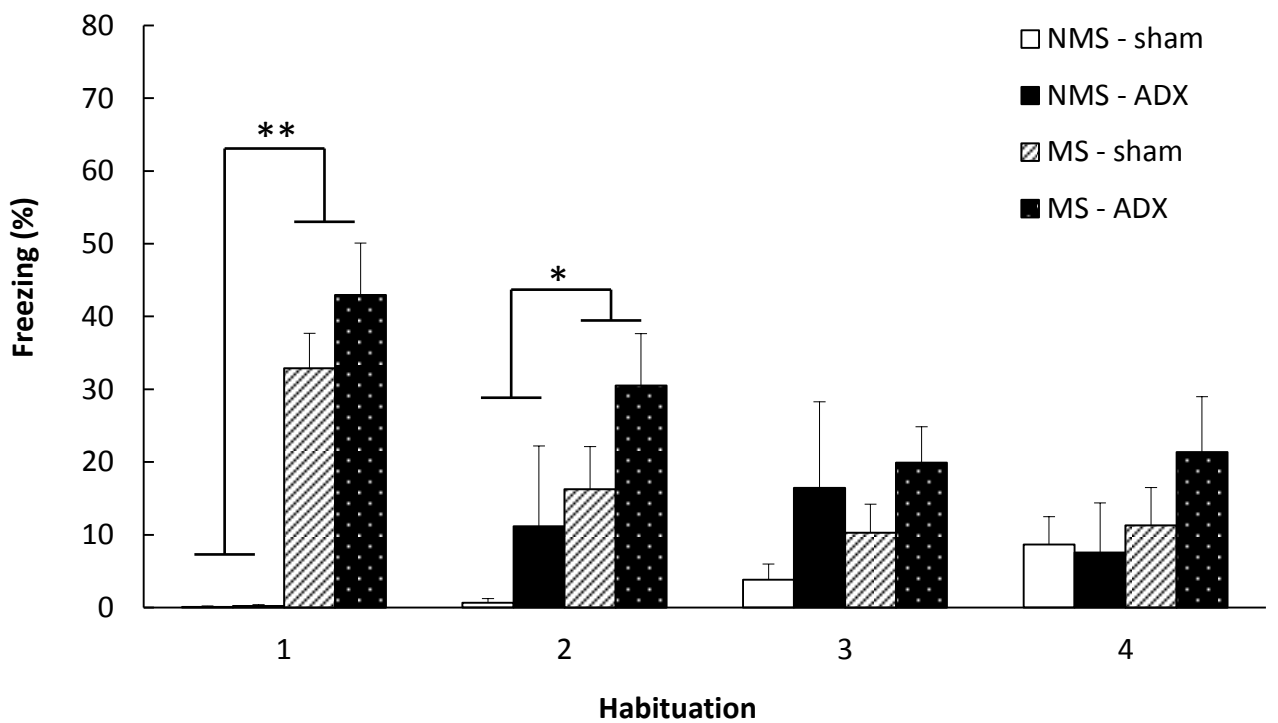


Fig. 20 MS後の装置馴化(habituation) 1~4試行目におけるフリージング率。副腎摘除手術(ADX)または偽手術(sham)を行い, 1週間以上の回復期を置いた後, MS処置を行った。NMS+sham (n = 8), NMS+ADX (n = 7), MS+sham (n = 8)またはMS+ADX (n = 6)の4群にラットを振り分けた。MS処置を1日目とし, 11~14日目に装置馴化を行った。平均および±SEMを示す。\*p < 0.05, \*\*p < 0.01

後の保持テスト (testⅢ) について、各試行を 1 分ずつ 3 ブロックに分け、各試行最初の 2 ブロックにおけるフリージングの割合の平均値をそれぞれ算出して分析した。これら全体の推移を Fig.21 に示す。

3 回の保持テストを通して、すべての MS 群は ADX 処置に関わらず、NMS 群よりもフリージング率が高かった。BL, test I, test II および test III について、3 要因分散分析 (stressor (2) × ADX (2) × day (4)) を行ったところ、stressor, day の主効果および、stressor × day の交互作用が有意であった [  $F(1, 25) = 7.76, p < 0.05$ ,  $F(3, 75) = 13.14, p < 0.01$ ,  $F(3, 75) = 3.12, p < 0.05$  ]。そこで下位検定として単純主効果および多重比較を行ったところ、test I, test II および test III において MS 処置の効果がみられた ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.1$ )。すべての MS 処置群は、すべての test のフリージングが BL よりも高かった ( $p < 0.05$ )。NMS 群の test I におけるフリージングが BL よりも高かったものの、test II ないし III におけるフリージングは差がなかった。

### 3. コルチコステロン血中濃度

ベースライン (MS の前日 ; baseline) および MS 後 (after MS) に採集した血液について、ELISA を用いて CORT 血中濃度を定量した。各時点の群ごとの平均値について Fig. 22 に示す。ADX 群は全体を通して sham 群よりも CORT 血中濃度が低かった。baseline ないし after MS における CORT 血中濃度について、2 要因分散分析 (stressor (2) × ADX (2)) を行ったところ、

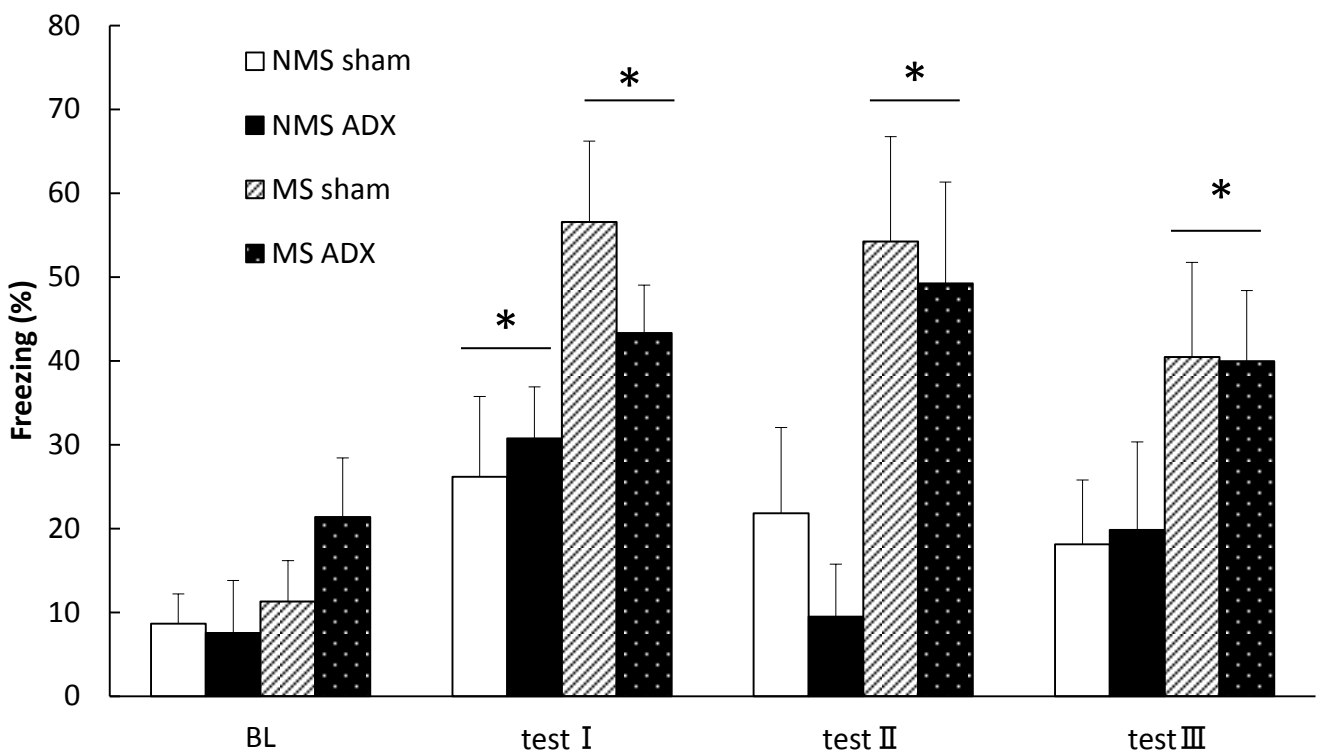


Fig. 21 MS後の文脈恐怖条件づけにおけるBL, test I, test II 及びtest IIIのフリージング率。MS処置を1日目とし、文脈恐怖条件づけ、保持テスト1, 2, 3回目はそれぞれ、15日目、16日、23日、30日目に  
行われた。NMS+sham(n 8), NMS+ADX(n = 7), MS+sham(n = 8)またはMS+ADX(n = 6)の4群にラットを振り分けた。平均および±SEMを示す。

\* $p < 0.05$  対応するBLのフリージング率と比較。

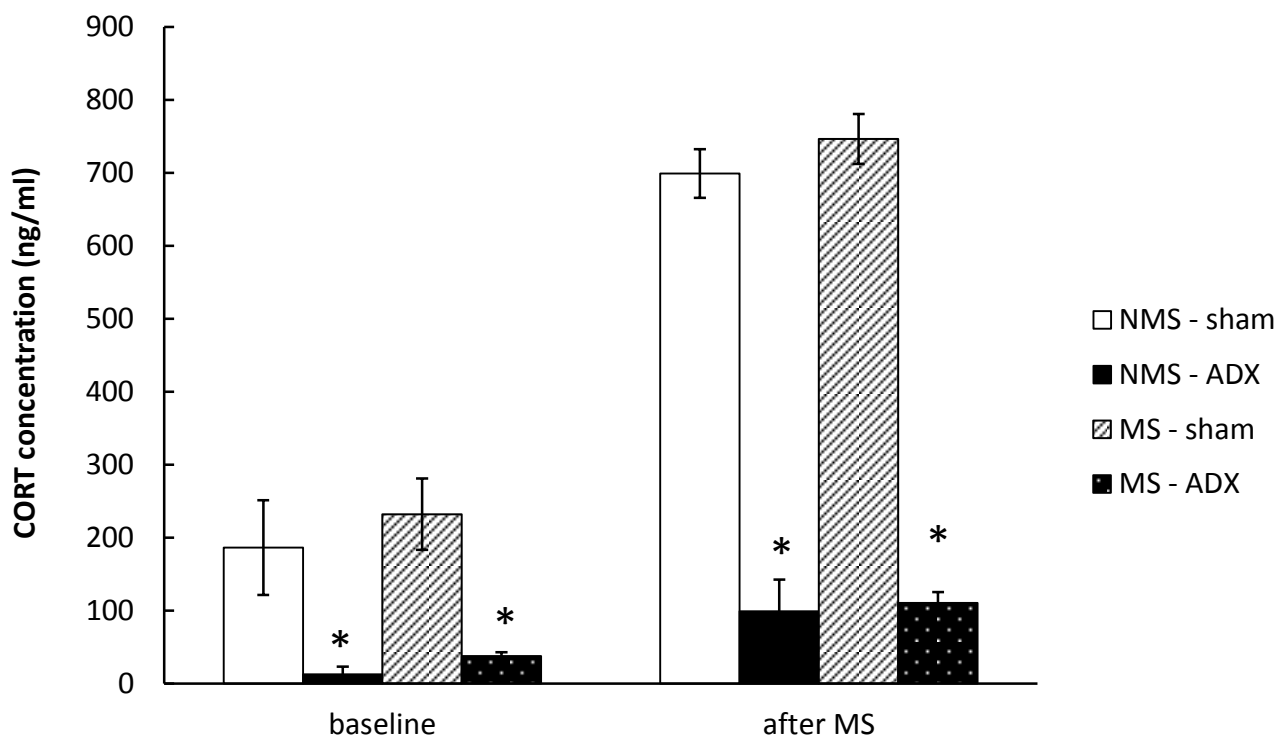


Fig. 22 MS前日 (baseline) およびMS後 (after MS) におけるCORT血中濃度。副腎摘除手術 (ADX) または偽手術 (sham) を行い, 1週間以上の回復期を置いた後, MS処置を行った。NMS+sham (n = 8), NMS+ADX (n = 7), MS+sham (n = 8) またはMS+ADX (n = 6) の4群にラットを振り分けた。平均および±SEMを示す。\*p < 0.05。

baseline および after MS の両時点において ADX 処置の効果が認められた [ $F(1, 10) = 12.75, p < 0.01, F(1, 21) = 290.02, p < 0.01$ ]. sham 群について, MS 処置によってベースライン時と比較し, CORT 血中濃度は, 有意な増加が認められた。

## 考察

本実験において、実験ⅢおよびⅣと同様に、MS処置は、ストレス誘発性恐怖反応増強効果を引き起こすことが確認された。ADXによってMSによる恐怖反応増強が抑制されると予想したが、MS ADX群においてもストレス誘発性恐怖反応増強がみられたため、ADXは恐怖反応増強を阻害しなかった。ADXによってGCおよびエピネフリン・ノルエピネフリンの分泌を元から阻害したにもかかわらず、ストレス誘発性恐怖反応増強が生じたため、GCおよびエピネフリン・ノルエピネフリン分泌はストレス誘発性恐怖反応増強の形成に主要な役割を担っていないことが再び示唆された。

本実験において、ADXにもかかわらず恐怖条件づけが成立したことは議論すべき点である。多くの恐怖条件づけ研究において、ADXは文脈恐怖条件づけを障害することが知られている（Pugh, Tremblay, Fleshner, & Rudy, 1997）。この先行研究と本実験の不一致は、ADX後の回復期間に起因している可能性が考えられるかもしれない。ADXの数日後に受動的回避学習を行ったときに学習が阻害された一方、ADXの1週間後では学習が阻害されなかったことから（Bialik, Pappas, & Roberts, 1984）、本実験はADXの1週間後にMS処置を行ったために、ADXの効果が生じなかった可能性が考えられる。ADXによるGC枯渇が招くはずの学習障害は、本実験において、たとえばGCに依存しない情報伝達システムの発達のような形で自然に補完された可能性は捨てきれない。ADX処置の直後にMS処置を行い、後の恐怖反応増強を検討すべきだったかもしれないが、ADX後の回復期間を十分にとる必要があるため、行動テストまで1週間以上の回復期間を置くのは一般的である。

また、実験Ⅲ・Ⅳの装置馴化において、MS前薬物投与の影響がみられたものの、ADXは装置馴化においても影響を及ぼさなかった。



MS 処置群は ADX の有無に関わらず、装置馴化 1 試行目において、恐怖条件づけ装置に高いフリーズ率を示した。この装置馴化の結果もまた、ADX 後の情報伝達システムの補完の可能性を支持するかもしれない。なぜなら、MS 群の装置馴化 1 試行目のフリーズ率の高さは、MS 時の電撃箱に対する恐怖条件づけが後の文脈恐怖条件づけ装置に般化したことを反映しているものと考えられるためである。実験Ⅲ・Ⅳにみられた MS+MET100 群および MS+PRO 群の装置馴化 1 試行目のフリーズ率の低さは、MET または PRO 投与による GC または  $\beta$ -NER の活動抑制が MS 時の電撃箱に対する恐怖条件づけ獲得を阻害したと考えられるため、ADX においても GC およびのエピネフリン・ノルエピネフリン分泌を抑制したことによる MS 時の電撃箱に対する恐怖条件づけ障害が生じてもよいはずである。しかしながら本実験の結果、MS 文脈への恐怖記憶は障害されなかった。そのため、GC に依存しない情報伝達システムの発達のような何らかの補完作用によって、ADX の影響が装置馴化にみられなかったと考えるのが妥当と思われる。

### 第 3 章の総合的考察

本章では、2 章で確立した MS パラダイムを用いて、MS 前 MET 腹腔内投与がその 2 週間後の文脈恐怖条件づけに及ぼす影響（実験 III）、MS 前 PRO 腹腔内投与がその 2 週間後の文脈恐怖条件づけに及ぼす影響（実験 IV）および、MS 前 ADX 処置がその 2 週間後の文脈恐怖条件づけに及ぼす影響（実験 V）について検討した。

本章において、MS 処置は、ストレス誘発性恐怖反応増強効果を引き起こすことが再び確認された。MET100 mg/kg 投与群の MS 後 CORT 血中濃度は、MS+VEH 群の約半分の値であり、CORT 濃度上昇は有意に抑えられたにもかかわらず、MS から 2 週間後の条件性恐怖反応増強効果に影響を与えなかった。つまり、MS 時 GC 分泌を抑制したとしても恐怖反応増強効果は阻害されない可能性が示された。

また、MS 時  $\beta$ -NER 活性を抑制したとしても、MS 誘発性恐怖反応増強効果は阻害されないことが示された。この結果から、 $\beta$ -NER 活性は MS による恐怖反応増強効果形成に関与しないことが示唆された。

これら GC およびノルエピネフリン・エピネフリンの分泌の両方を阻害するため、MS の前に ADX 手術を行い、MS 後の恐怖反応増強効果に及ぼす影響を検討したところ、ADX は恐怖反応増強効果に影響を及ぼさなかった。ADX によって GC およびエピネフリン・ノルエピネフリンの分泌をほぼ完全に阻害したにもかかわらず、ストレス誘発性恐怖反応増強が生じたため、GC およびエピネフリン・ノルエピネフリン分泌はストレス誘発性恐怖反応増強の形成に主要な役割を担っていないことが再び示唆された。

ストレス誘発性恐怖反応増強効果に MET または PRO の効果はみられなかった一方で、装置馴化において、MET または PRO の影響がみられた。MS VEH 群は装置馴化 1 試行目に NMS 群と比較して高いフリージング率を示したにもかかわらず、MET100 mg/kg 投与群または

PRO 20mg/kg 投与群は、装置馴化 1 試行目におけるフリージング反応をほとんど示さなかった。MS 群のフリージング率が装置馴化一日目に高いという現象は、MS のひとつであるフットショックを受けた時の恐怖条件づけが、後の文脈恐怖条件づけ装置に般化してしまったがために、条件づけを受ける前の装置にフリージングを示したものと考えられる。それらを併せて考えると、MS を受けた環境の記憶固定を阻害された MS+MET100 群および MS+PRO 群は、装置馴化でフリージングを生じるのに必要な MS における恐怖条件づけを保持していなかったため、文脈恐怖条件づけ装置に般化が生じず、フリージングを示さなかったと示唆される。MET100 mg/kg および PRO 投与で MS における恐怖条件づけが保持されなかったのは、恐怖条件づけ、受動的回避学習および聴覚驚愕反応における GC およびノルエピネフリンの記憶増強効果が関与していると考えられる (Cordero & Sandi, 1998; McEwen, 2000; Weber et al., 2003)。たとえば、MET の末梢投与は文脈恐怖条件づけでの条件性恐怖反応を減弱する (Cordero et al., 2002)。GR の遮断薬である RU38486 の脳室内投与もまた条件性恐怖反応を抑制するという報告がある (Cordero & Sandi, 1998)。さらに、恐怖条件づけにおける  $\beta$ -NER 受容体の関与については、Bush et al. (2010) は、恐怖条件づけの訓練前の扁桃体内 PRO 投与が、保持テストでの条件性恐怖反応を低下させるが、恐怖条件づけの訓練直後に投与した場合には、保持テストでの恐怖反応には影響しないことを報告している。一方、Kabitzke et al. (2011) は、仔ラットを用いて、ネコの匂いを US とした文脈恐怖条件づけの訓練前または訓練後に PRO を腹腔内投与した場合、どちらの投与タイミングにおいても保持テストにおける条件性恐怖反応が低下すること報告している。

トラウマストレスによる恐怖反応増強に、トラウマストレス自体が般化しているわけではないということを示した研究では、トラウマストレス直前に NMDA 受容体拮抗薬である AP5 を投与すると、トラウ

マストレス時の条件性恐怖反応を抑制したが、その後の恐怖条件づけの増強効果はやはり認められたと報告している (Rau et al., 2005)。したがって、トラウマストレスを経験したことによるその後の恐怖反応の増強は、単にトラウマストレスにおける恐怖条件づけが般化したことによるものではなく、トラウマストレスによって生じた生物学的変化が関与しているものと予想された。そこで本章では、ストレス反応である GC とノルエピネフリン・エピネフリン分泌および  $\beta$ -NER の関与を検討したものの、それらはストレス誘発性恐怖反応増強効果に関与しないことが示唆された。また、MS 時に獲得される恐怖条件づけ自体が恐怖反応増強効果に関わっているわけではなく、感覚をつかさどる部位における神経伝達の変容あるいは、恐怖反応を引き起こす神経伝達回路の変容が生じたために、ストレス誘発性恐怖反応増強効果が形成される可能性が示唆された。

## 第 4 章

### 複合ストレスによる条件性恐怖反応増強における 中枢 HPA 系の関与の検討

#### 第 1 節 ストレス誘発性条件性恐怖反応増強に及ぼす alpha/helical CRF 脳室内投与の効果【実験 VI】

##### 目的

これまでの実験で、末梢における GC およびエピネフリン・ノルエピネフリンの作用は、MS 誘発性恐怖反応増強を引き起こす初期因子として関与しないことが示唆された。これまでは HPA 系の最終分子を検討したが、HPA 系は中枢からシグナルが送られることで末梢の副腎からの分泌が生じるため、一連の HPA 系の始まりである CRF が MS 誘発性恐怖反応増強を引き起こしている可能性が考えられる。

室傍核から分泌された CRF は、下垂体前葉に作用することで ACTH 分泌を促し、副腎皮質から GC が分泌される。GC 分泌よりもストレスラーに対して時間的に早く作用するため、ストレス誘発性恐怖反応増強に CRF が関与している可能性が考えられた。HPA 系初期のシグナルである CRF の主な働きは、ストレスに対する神経内分泌反応の協調であるが、加えて、免疫システムに影響を及ぼし (Owens & Nemeroff, 1991)、脳内神経調節因子として働くことが知られている (Chalmers et al., 1996)。CRFR は脳内に広く分布しているため、不安、摂食や学習といった様々な行動への関与が報告されている。たとえば、扁桃体中心核におけるストレス応答性 CRF 放出は BLA の CRFR を賦活することで受動的回避学習を促進し (Roosendaal, Brunson, et al., 2002)、BLA および大脳基底核 CRFR 賦活は不安惹起作用を示す (Gallagher et al., 2008)。

そこで本実験では、MS 前に CRFR の非選択的遮断薬である  $\alpha$ /helical CRF (a/h CRF) を投与することで、MS の恐怖反応増強効果における CRF の関与を検討することを目的とした。特に、a/h CRF を脳室内投与することで、中枢における CRFR の作用を検討することとした。

## 方法

### 1. 被験体

Wistar-Imamichi 系雄ラット 44 匹（実験開始時 8 週齢）を用いた。飼育環境および実験時刻は実験 I と同様であった。

### 2. 装置

実験 I と同じ電撃箱，強制水泳装置，リマインダー箱，恐怖条件づけ装置を用いた。

### 3. 薬物

alpha/helical CRF (a/hCRF) 溶液 (5, 20  $\mu\text{g}/2 \mu\text{l}$ ) は,  $\alpha$ -Helical corticotropin releasing factor fragment (9-41) (Sigma & Aldrich) を 0.9% 生理食塩水にて溶解し作成した。先行研究において行動への影響が観察された用量を参考に，本実験で用いる用量を決定した (Berridge & Dunn, 1989; Menzaghi et al., 1994)。

### 4. ガイドカニューレ埋込手術

硫酸アトロピン (0.05 mg/kg) を腹腔内に投与した後，ペントバルビタールナトリウム (35 mg/kg, i.p.)，ケタミン (10 mg/kg, i.m.) による麻酔下で被検体を脳定位固定装置に固定し，薬物のマイクロインジェクションを行うためのガイドカニューレを片側側脳室に埋め込んだ。Paxinos & Watson (1998) に従い，インジェクションカニューレの先端が，bregma を基準として AP: -0.8 mm, ML: 1.4 mm, DV: -4.5 mm (頭蓋表面より) の位置になる

ようにガイドカニューレを刺入し、被検体の頭蓋に埋め込んだステンレス製ネジと共に、歯科用セメントで固定した。インジェクションカニューレは、ガイドカニューレ先端より 1.0 mm 突き出すようになっていた。術後、約 1 週間の回復期間をおいた。

#### 5. マイクロインジェクション

ガイドカニューレにインジェクションカニューレを刺入し、マイクロインジェクションポンプ (ESP-32: EICOM, Kyoto, Japan) を用いて、薬物ないし溶媒を脳室内投与した。脳室内投与は 1 分あたり 1  $\mu$ l の速度で 2 分間、合計 2  $\mu$ l 投与した。拡散を促すため、インジェクションカニューレは薬物投与終了後 1 分間留置した後、抜き取った。

#### 6. 組織学的検索

行動実験終了後、ペントバルビタールナトリウム深麻酔下で (50 mg/kg, i.p.), 0.9%NaCl 含有の 0.02M リン酸緩衝液、つづいて 10%ホルマリン液で被検体の脳を灌流固定し取り出した。取り出した脳は 10%ホルマリン液で 48 時間固定し、続いて 20%ショ糖溶液に浸漬した。数日後、クリオスタット (CM3000: Leica, Heidelberg, Germany) で厚さ 35  $\mu$ m の冠状断切片を作成し、クレジルバイオレットによるニッスル染色後、光学顕微鏡下でインジェクションカニューレの刺入部位を確認した。

#### 7. 手続き

被験体を MS 処置  $\times$  薬物投与 (a/hCRF 5  $\mu$ g (a/hCRF5),



a/hCRF 20  $\mu$ g (a/hCRF20) または 0.9%生理食塩水 (SAL) の 6 群に振り分けた (NMS+SAL 群 (n = 8), NMS+a/hCRF5 群 (n = 7), NMS+a/hCRF20 群 (n = 7), MS+SAL 群 (n = 9), MS+a/hCRF5 群 (n = 7), MS+a/hCRF20 群 (n = 6))。

実験開始 1 日目 (Day1) に, ラットは飼育室から実験室に移動した直後に薬物の脳室内投与を行われた。ラットは 15 分間の待機時間の後, MS 処置手続きを開始された。これ以降の行動実験はすべて実験 I と同様であった。

## 結果

### 1. 組織学的検索

全ての被検体でインジェクションカニューレの先端が側脳室に位置していたことを確認した。Fig. 23 は、ガイドカニューレが側脳室に刺入されていたことを示す典型的な Nissl 染色切片の写真である。

### 2. 装置馴化

装置馴化（試行 1～4）の各試行について、各試行を 1 分ずつ 5 ブロックに分け、各試行最初の 2 ブロックにおけるフリージングの割合の平均値をそれぞれ算出して分析した。これら全体の推移を Fig.24 に示す。

装置馴化 1 日目に、すべての MS 処置群は薬物処置に関わらず NMS 群よりも高いフリージング率を示し、試行が進む毎にすべての動物のフリージング率が同程度になった。

装置馴化（試行 1～4）について 3 要因混合計画の分散分析（stressor (2) × drug (3) × day (4)）を行ったところ、MS 処置の主効果 [ $F(1,38)=37.4, p < 0.01$ ] および試行の主効果 [ $F(3,114)=23.7, p < 0.01$ ] が有意であった。また、MS 処置と試行の交互作用が認められた [ $F(3, 114)=25.2, p < 0.01$ ]。そこで単純主効果検定および多重比較を行ったところ、1, 2 および 3 試行目は MS 群のフリージングが高く ( $p < 0.01$ )、4 試行目において差はみられなかった。

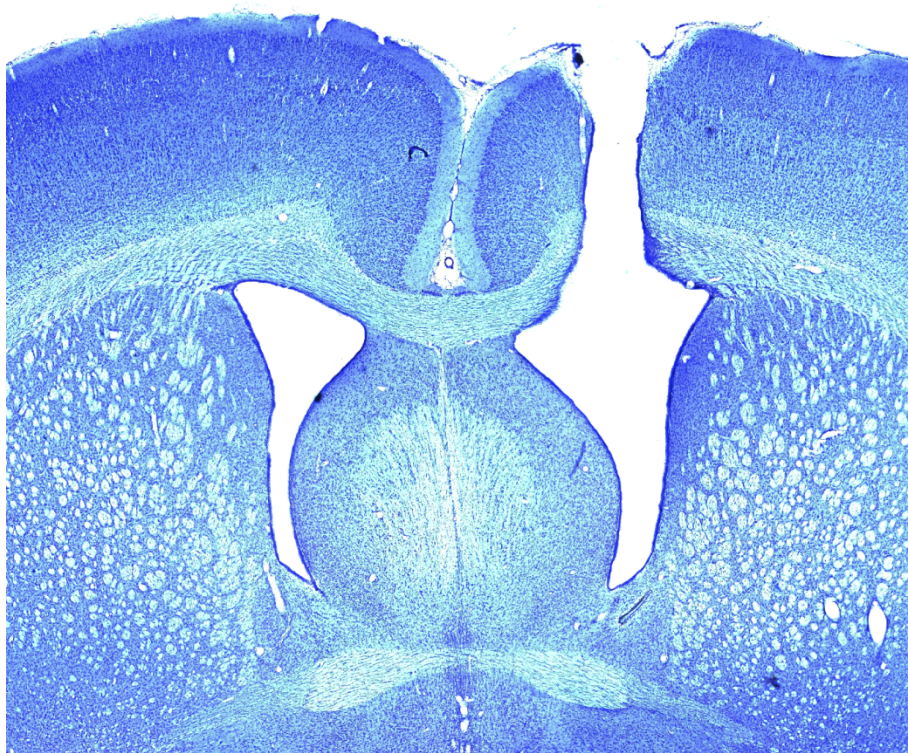


Fig. 23 側脳室におけるガイドカニューレ刺入位置を示すニッスル染色切片の典型例

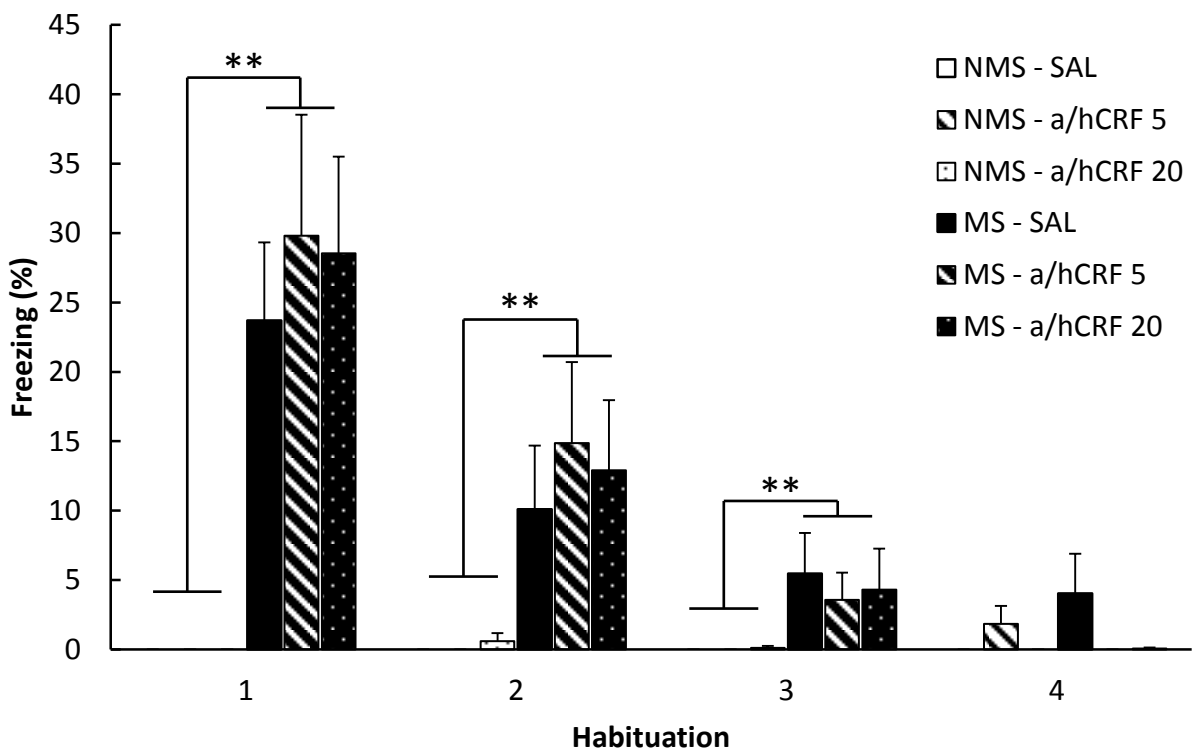


Fig. 24 MS後の装置馴化 (habituation) 1~4試行目におけるフリージング率。MSの15分前にalpha/helical CRF (a/hCRF) または生理食塩水 (SAL) を脳室内投与し, NMS - SAL (n = 8), NMS - a/hCRF 5 (n = 7), NMS - a/hCRF 20 (n = 7), MS - SAL (n = 9), MS - a/hCRF 5 (n = 7) または MS - a/hCRF 20 (n = 6) の6群にラットを振り分けた。MS処置を1日目とし, 11~14日目に装置馴化を行った。平均および±SEMを示す。\*\*p < 0.01

### 3. 保持テスト

条件づけ前 (base level; BL), 条件づけ翌日の保持テスト (test I), 条件づけ 1 週間後の保持テスト (test II), 条件づけ 2 週間後の保持テスト (test III) について, 各試行を 1 分ずつ 3 ブロックに分け, 各試行最初の 2 ブロックにおけるフリージングの割合の平均値をそれぞれ算出して分析した。これら全体の推移を Fig.25 に示す。

MS 群は薬物投与の有無にかかわらず, 高いフリージングを示した。NMS 群は, 薬物の有無にかかわらずすべての試行においてフリージングが低かった。

BL, test I, test II および test III について, 3 要因分散分析 (stressor (2) × drug (3) × day (4)) を行ったところ, stressor の主効果 [ $F(1, 38) = 10.15, p < 0.01$ ] および day の主効果 [ $F(3, 114) = 24.29, p < 0.01$ ] が有意であった。また, stressor × day の交互作用が有意であった [ $F(3, 114) = 4.63, p < 0.01$ ]。そこで下位検定として単純主効果の検定を行ったところ, 薬物投与の有無に関わらず, 保持テスト 3 回すべてにおいて, MS を受けた群は NMS 群よりもフリージング率が高かった (test I :  $p < 0.01$ , test II :  $p < 0.1$ , test III :  $p < 0.01$ )。NMS 群は, BL ないしすべての保持テストについて, 統計的有意差は認められなかった。一方, MS 群は, 薬物投与の有無に関わらず, すべての保持テストのフリージングが BL よりも高かった ( $p < 0.05$ )。

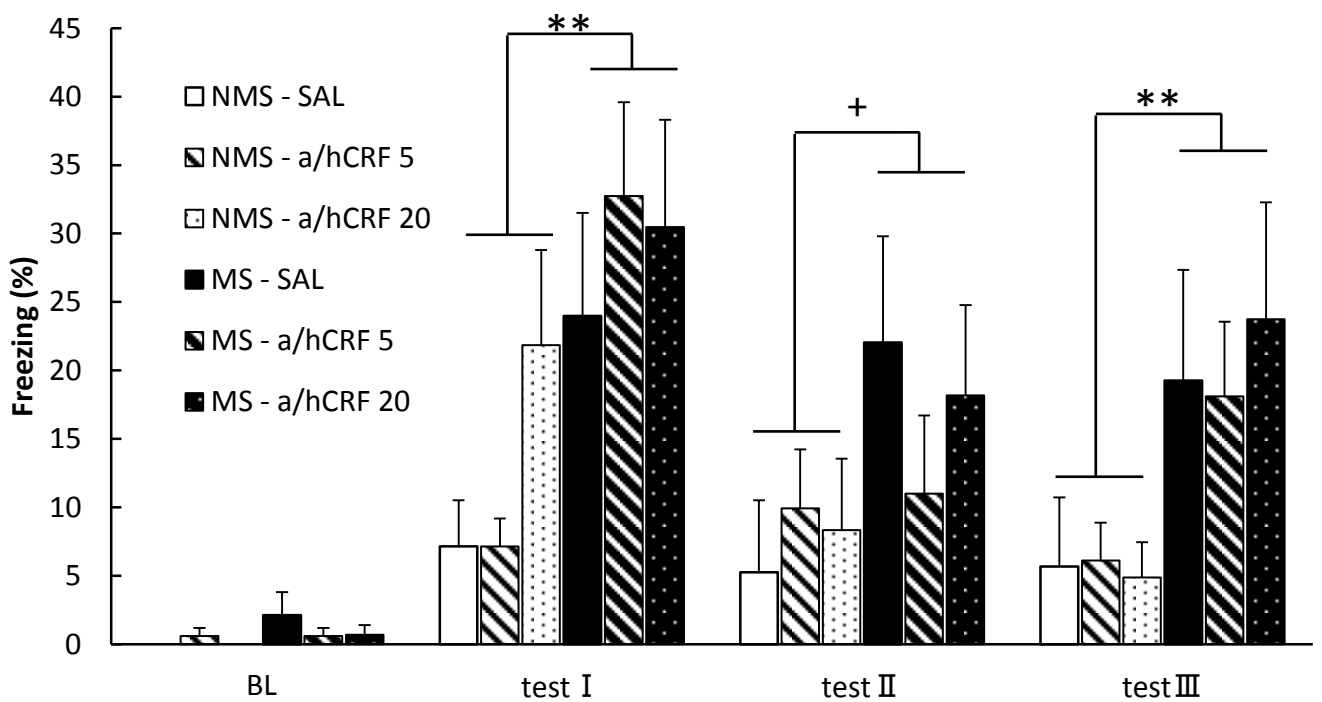


Fig. 25 MS後の文脈恐怖条件づけにおけるBL, test I, test II 及びtest IIIのフリージング率。MSの15分前にalpha/helical CRF(a/hCRF)または生理食塩水(SAL)を脳室内投与し、NMS - SAL(n = 8), NMS - a/hCRF 5 (n = 7), NMS - a/hCRF 20 (n = 7), MS - SAL(n = 9), MS - a/hCRF5(n = 7)またはMS - a/hCRF20 (n = 6)の6群にラットを振り分けた。MS処置を1日目とし、文脈恐怖条件づけ、保持テスト1, 2, 3回目はそれぞれ、15日目、16日、23日、30日目に行われた。平均および±SEMを示す。

## 考察

本実験の結果、MS 処置は、ストレス誘発性恐怖反応増強効果を引き起こすことを確認した。MS 前 a/hCRF 投与に関わらずストレス誘発性恐怖反応増強効果はみられたため、MS 時の中枢におけるストレス応答性 CRFR 活性は、恐怖反応増強の形成調節の主要な因子ではないことが示唆された。

a/hCRF 脳室内投与は恐怖条件づけの検索を阻害し (Kalin & Takahashi, 1990)、扁桃体内 CRF 投与は受動的回避学習を促進するため (Roosendaal, Brunson, et al., 2002)、MS 時 CRFR 不活性が後の恐怖条件づけに影響を及ぼすと仮定したものの、CRFR 遮断は MS による恐怖反応増強効果に影響を及ぼさなかった。しかしながら、いずれの先行研究も恐怖条件づけの成立自体における CRFR の関与を検討しており、強いストレスによる恐怖反応増強における CRFR の関与を検討したものではない。そのため本実験の結果から、CRFR は恐怖条件づけに関与する一方で、ストレス誘発性恐怖反応増強の形成には関与しないと示唆された。

しかし、CRFR はサブタイプによって担っている機能が全く異なるという報告がある (Lebow et al., 2012; Risbrough, Hauger, Pellemounter, & Geyer, 2003; Todorovic et al., 2007)。CRFR<sub>1</sub> 活性は不安惹起作用を示す一方で、CRFR<sub>2</sub> は抗不安作用を示すことが報告されている (Joels & Baram, 2009)。本実験で用いた a/hCRF は非選択的 CRFR 遮断薬であるため、CRFR サブタイプごとの異なる作用を相殺したのかもしれない。今後より選択的な薬物を用いて、CRFR<sub>1</sub> 遮断による恐怖反応増強への影響を検討する必要があるだろう。

## 第 2 節 ストレス誘発性条件性恐怖反応増強に及ぼす RU38486 脳室内投与の効果【実験Ⅶ】

### 目的

3 章 1 節（実験Ⅲ）および 3 節（実験Ⅴ）において、ストレスによる GC 分泌がストレス誘発性恐怖反応増強に関与しているのかどうかを検討したが、MET および ADX によって GC 分泌を抑制された動物においても MS 誘発性恐怖反応増強がみられた。これらの結果から、GC 分泌はストレス誘発性恐怖反応増強の形成に関与していない可能性が強く示唆されることとなった。

しかしながら、GR は末梢だけでなく中枢まで広く分布しており、GC は末梢から中枢まで広範に作用することが知られている（Sapolsky et al., 2000）。GR 活性は空間学習に関与しており、モリス水迷路学習の訓練前に GR 遮断薬である RU38486 を脳室内投与することで、プラットホームの位置の記憶が阻害されることが報告されている（Oitzl, Fluttert, Sutanto, & De Kloet, 1998）。また、GR は恐怖学習にも関与しており、恐怖文脈の想起後に GR を不活性化することで、恐怖学習が障害されることが報告されている（Maroun & Akirav, 2008; Tronel & Alberini, 2007）。Kohda et al. (2007) は、SPS パラダイムの直前に GR 遮断薬を投与し、その 1 週間後に文脈恐怖条件づけを行ったところ、SPS による条件性恐怖反応増強が GR 遮断薬用量依存的に抑制されることを報告している。このことから、GR はストレス誘発性恐怖反応増強に関与していることが示唆されるものの、SPS から恐怖条件づけまでの期間が 1 週間と短いため、GR のストレス誘発性恐怖反応増強の影響をより長期間にわたって検討する必要がある。さらに Kohda et al. (2007) は皮下投与による GR 遮断薬の効果しか検討しておらず、中枢の GR がストレス誘発性恐怖反



応増強に関与しているのか，または末梢の GR が関与しているのかどうかは明らかとなっていない。

そこで本実験では，MS 前に GR 遮断薬である RU38486 を脳室内投与し，MS 中の中枢 GR を不活性化させることで，MS による恐怖反応増強効果形成における中枢 GR の関与を検討することを目的とした。

## 方法

### 1. 被験体

Wistar-Imamichi 系雄ラット 16 匹（実験開始時 8 週齢）を用いた。飼育環境および実験時刻は実験 I と同様であった。

### 2. 装置

実験 I と同じ電撃箱，強制水泳装置，リマインダー箱，恐怖条件づけ装置を用いた。

### 3. 薬物

RU-38486 (RU38486) 溶液 (150 ng/2  $\mu$ l) は，mifepristone (Sigma & Aldrich) を 1%エチルアルコールを含む 0.9%生理食塩水にて溶解し作成した。先行研究において薬物による行動への影響が観察された用量を参考に，本実験で用いる用量を決定した (Korte et al., 1995)。

### 4. ガイドカニューレ埋込手術

実験 VII と同様に行った。

### 5. マイクロインジェクション

実験 VII と同様に行った。

## 6. 組織学的検索

実験Ⅶと同様に行った。

## 7. 手続き

被験体を MS 処置×薬物投与 (RU38486 または溶媒 (VEH)) の 4 群に振り分けた (NMS+VEH 群 (n = 4), NMS+RU38486 群 (n = 4), MS+VEH 群 (n = 4), MS+RU38486 群 (n = 4))。

実験開始 1 日目 (Day1) に, ラットは飼育室から実験室に移動した直後に, 薬物の脳室内投与を行われた。薬物投与後, ラットは 15 分間の待機時間の後, MS 処置手続きを開始された。これ以降の行動実験はすべて実験 I と同様であった。

## 結果

### 1. 組織学的検索

全ての被検体において、インジェクションカニューレの先端が側脳室に位置していたことを確認した。

### 2. 装置馴化

装置馴化（試行 1～4）の各試行について、各試行を 1 分ずつ 5 ブロックに分け、各試行最初の 2 ブロックにおけるフリージングの割合の平均値をそれぞれ算出して分析した。これら全体の推移を Fig.26 に示す。

装置馴化 1 日目に、すべての MS 処置群は薬物処置に関わらず NMS 群よりも高いフリージング率を示し、試行が進む毎にすべての動物のフリージング率が同程度になった。

装置馴化（試行 1～4）について 3 要因混合計画の分散分析（stressor (2) × drug (2) × day (4)）を行ったところ、MS 処置の主効果 [ $F(1, 12) = 8.93, p < 0.05$ ] および試行の主効果 [ $F(3, 36) = 4.14, p < 0.05$ ] が有意であった。また、MS 処置と試行の交互作用が認められた [ $F(3, 36) = 6.07, p < 0.01$ ]。そこで単純主効果検定および多重比較を行ったところ、1 試行目において MS 群は NMS 群よりもフリージングが高かく ( $p < 0.01$ )、2、3 および 4 試行目は MS 群と NMS 群でフリージングに有意な差はみられなかった。MS 群において、1 試行目は 2、3 および 4 試行目よりもフリージングが高かった ( $p < 0.05$ )。また、2 試行目は 4 試行目よりもフリージングが高かった ( $p < 0.05$ )。

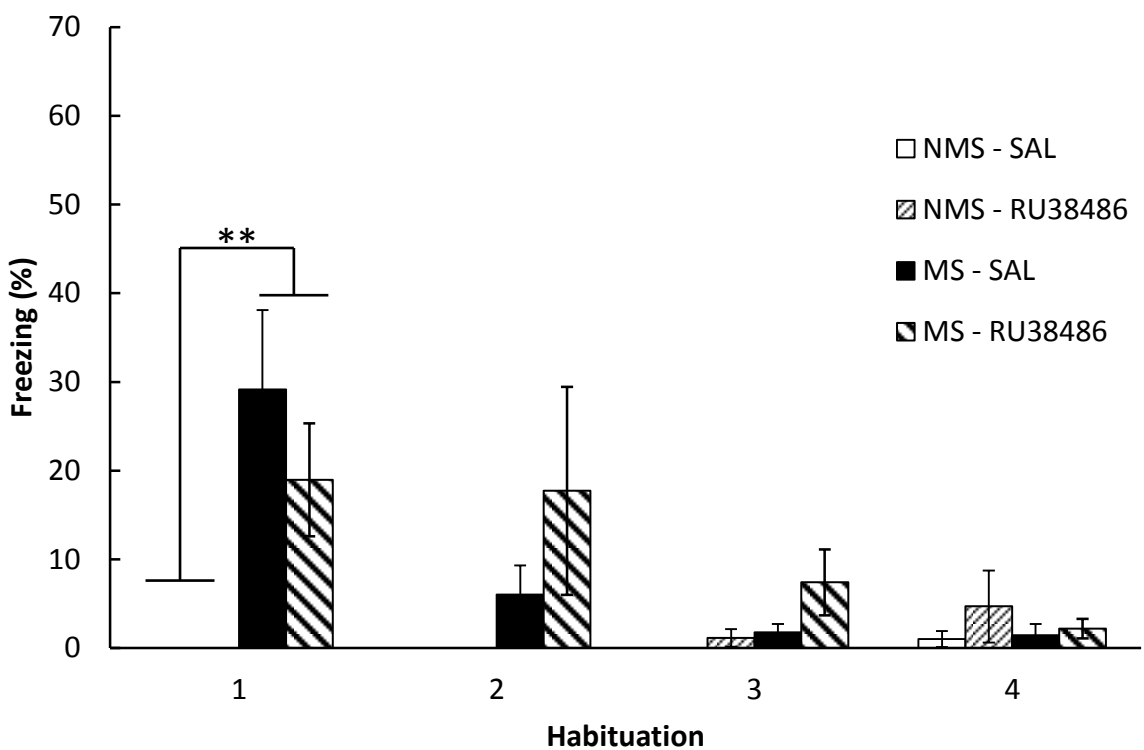


Fig. 26 MS後の装置馴化(habituation) 1~4試行目におけるフリージング率。MSの15分前にRU38486または生理食塩水(SAL)を脳室内投与し, NMS + SAL (n = 4), NMS + RU38486 (n = 4), MS + SAL (n = 4)または, MS + RU38486 (n = 4)の4群にラットを振り分けた。MS処置を1日目とし, 11~114日目に装置馴化を行った。平均および±SEMを示す。\*\*p < 0.01

### 3. 保持テスト

条件づけ前 (base level; BL), 条件づけ翌日の保持テスト (test I), 条件づけ 1 週間後の保持テスト (test II), 条件づけ 2 週間後の保持テスト (test III) について, 各試行を 1 分ずつ 3 ブロックに分け, 各試行最初の 2 ブロックにおけるフリージングの割合の平均値をそれぞれ算出して分析した。これら全体の推移を Fig.27 に示す。

薬物処置の効果は認められず, 保持テストにおいてすべての MS 群は高いフリージングを示し, さらに試行を重ねても高いフリージングを維持した。

BL, test I, test II および test III について, 3 要因分散分析 (stressor (2) × drug (2) × day (4)) を行ったところ, MS 処置の主効果 [ $F(1, 12) = 9.92, p < 0.01$ ] および試行の主効果 [ $F(3, 36) = 19.6, p < 0.01$ ] が有意であった。また, MS 処置と試行の交互作用が有意であった [ $F(3, 36) = 3.58, p < 0.05$ ]。そこで下位検定として単純主効果の検定および多重比較を行ったところ, test I, test II および test III において, MS 群は NMS 群よりもフリージングが有意に高かった ( $p < 0.05$ )。NMS 群は test I および test II のフリージングが BL よりも高かった ( $p < 0.05$ )。MS 群はすべての保持テストのフリージングが BL よりも高かった ( $p < 0.05$ )。

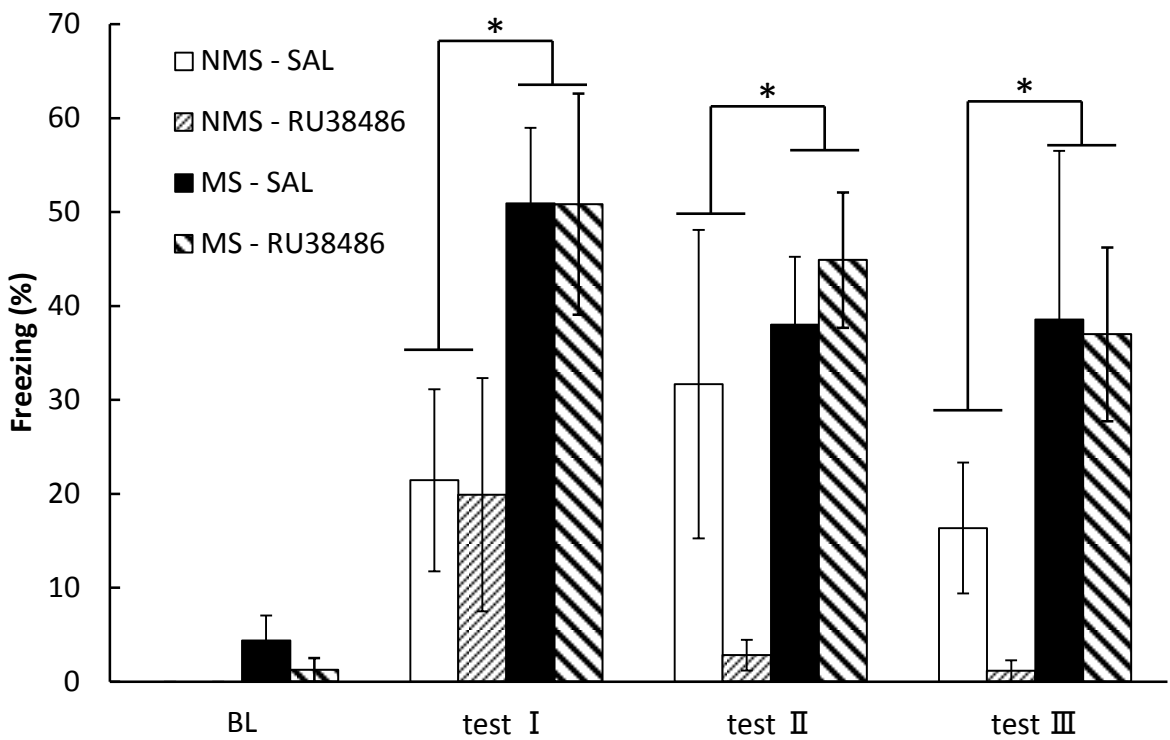


Fig. 27 MS後の文脈恐怖条件づけにおけるBL, test I, test II 及びtest IIIのフリージング率。MSの15分前にRU38486または生理食塩水(SAL)を脳室内投与し, NMS + SAL (n = 4), NMS + RU38486 (n = 4), MS + SAL (n = 4)または, MS + RU38486 (n = 4)の4群にラットを振り分けた。MS処置を1日目とし, 文脈恐怖条件づけ, 保持テスト1, 2, 3回目はそれぞれ, 15日目, 16日, 23日, 30日目に行われた。平均および±SEMを示す。  
\*p < 0.05。

## 考察

本実験においても、MS処置はストレス誘発性恐怖反応増強効果を引き起こすことが確認された。このMS誘発性恐怖反応増強に対して、MS前RU38486脳室内投与は何ら影響をもたらさなかった。

この結果は、SPS前GR遮断薬投与がSPSから7日後の文脈恐怖条件づけにおける増強効果を阻害した先行研究（Kohda et al., 2007）とは一致しなかった。Kohda et al.（2007）はGR遮断薬を全身投与することによって条件性恐怖反応増強に及ぼすGR遮断薬の効果を検討しているが、本研究はGR遮断薬を脳室内に投与した。したがって、ストレス誘発性恐怖反応増強には中枢のGRだけでなく、全身のGR活性が関与している可能性が考えられる。

またKohda et al.（2007）は選択的GR遮断薬であるRU40555を用いている一方で、本実験はRU38486を用いた。使用した薬物が異なるため、本実験と先行研究の結果の不一致が生じたのだろうか。本実験で用いたRU38486は、GR遮断に加えてプロゲステロン受容体もまた遮断することが知られている。薬物の作用機序の違いが結果の違いを生み出した可能性もある。しかし、GRと記憶・学習の関与を検討した多くの先行研究において、GR遮断薬として本実験で用いたRU38486が用いられていることから、RU38486によってもRU40555と同様の効果が期待できたであろう。

つぎに、SPSは拘束ストレス、強制水泳およびエーテル昏睡を組み合わせたパラダイムである一方、本実験のMSはフットショックおよび強制水泳を組み合わせたパラダイムであったため、本研究と先行研究は用いたストレスラーが異なっていた。本研究と先行研究は、強制水泳を用いている以外は全く別のストレスラーを用いているために、GR遮断の恐怖反応増強効果に及ぼす効果が異なった可能性が考えられる。拘束ストレスは不動を強いられる処置であるのに対して、フッ



トショックは逃げ出すために活動を強いられる処置である。Passive coping (immobility) は GC 上昇および低ノルエピネフリンを, active coping は (burying) はノルエピネフリン上昇および低 GC を示すと報告されていることから (Korte, Bouws, Koolhaas, & Bohus, 1992), SPS は passive coping 傾向にあったために GR 遮断薬の効果が出た一方で, MS は active coping 傾向にあったために GR 遮断薬の効果が生じなかった可能性が考えられる。

## 第 4 章の総合的考察

本章では、2 章で確立した MS パラダイムを用いて、MS 前の CRFR 非選択的遮断薬 a/hCRF 脳室内投与がその 2 週間後の文脈恐怖条件づけに及ぼす影響（実験 VI）および、MS 前の GR 遮断薬 RU38486 がその 2 週間後の文脈恐怖条件づけに及ぼす影響（実験 VII）について検討した。

まず本章においても、MS 処置は 2 週間以上にわたってストレス誘発性恐怖反応増強効果を引き起こすことが確認された。そして、薬物処置によるストレス誘発性恐怖反応増強への影響は観察されなかった。MS 前 a/hCRF または RU38486 脳室内投与による中枢 CRFR または GR 活性の阻害は、ストレス誘発性恐怖反応増強効果に影響を与えなかったことから、CRFR および GR 活性は恐怖反応増強の形成調節の主要な因子ではない可能性が示唆された。

GR 遮断薬の結果については、SPS 前 GR 遮断薬投与が、SPS から 7 日後の文脈恐怖条件づけにおける増強効果を阻害した先行研究とは異なっていた（Kohda et al., 2007）。ただ、先行研究と本研究では実験手法がいくつかの点で異なっていたため、そのような結果の不一致が生じた可能性が考えられた。特に GR 遮断薬の投与方法の違いが結果の不一致を生み出した可能性が高い。本実験は GR 遮断薬を脳室内投与し、先行研究は皮下投与していた。本実験は中枢の GR のみを標的にした一方で、先行研究は全身の GR を遮断したと仮定できる。したがって、ストレス誘発性恐怖反応増強には、中枢だけでなく全身の GR が関与している可能性が考えられた。

しかし全身の GR がストレス誘発性恐怖反応増強に関与しているのだとすると、本研究の第 3 章での MET 投与や ADX の影響を検討した実験結果とは一致しない。MET 投与や ADX はまさに全身の血中 CG レベルを抑制する操作であり、Kohda et al. (2007) が行った GR

遮断薬投与と同じ結果が得られるはずである。それにもかかわらず、本研究の第3章でみたように、MS前のMET投与やADXは、その後の恐怖反応増強を抑制することはなかった。したがって、本研究とKohda et al. (2007)とのGR遮断薬投与の結果の不一致は、用いられたストレスの種類や恐怖条件づけ手続きなどの違いに起因するものなのかもしれない。

以上をまとめると、すくなくともMS時のRU38486脳室内投与は、後の恐怖反応増強効果に影響を及ぼさないといえる。実験VIIでは一つの用量しか検討しなかったため、今後用量の検討を行う必要は残されているが、中枢におけるGRはストレス誘発性恐怖反応増強には重要な役割を担っていない可能性が示唆された。

第4章における装置馴化の結果は第3章と異なり、CRFRまたはGR遮断薬中枢投与は、装置馴化1試行目のフリージング率に影響を及ぼさなかった。第3章と第4章における装置馴化の結果を併せて考えると、MS時CRFRまたはGR阻害は、MSフットショック時の恐怖条件づけの保持に影響しなかったため、第3章におけるMS群のMETまたはPRO投与でみられたような装置馴化におけるフリージング率低下が観察されなかったと考えられる。これらの解釈は複雑である。CRFの主な働きは、ストレスに対する神経内分泌反応の協調であるが、加えて、免疫システムに影響を及ぼし(Owens & Nemeroff, 1991)、脳内神経調節因子として働くことが知られている(Chalmers et al., 1996)。CRFRは脳内に広く分布しているため、不安、摂食や学習といった様々な行動への関与が報告されている。a/hCRF脳室内投与は恐怖条件づけの検索を阻害し(Kalin & Takahashi, 1990)、扁桃体内CRF投与は受動的回避学習を促進するため(Roozendaal, Brunson, et al., 2002)、CRFが恐怖条件づけに関与していることは確かめられつつも、CRFが恐怖学習獲得のどの時期により重要であるかは議論が交錯している。記憶学習を獲得・保持・検索の3つの区

分に分類した場合、CRF が恐怖条件づけの獲得・保持ではなく検索に重要であるとする研究と (Kikusui, Takeuchi, & Mori, 2000), 獲得に関わっているとする研究が存在する (Hikichi et al., 2000)。CRF 投与による不安惹起作用および恐怖学習促進はよく検討されているものの、CRFR 遮断薬を投与した研究は十分であるとはいえない。CRFR<sub>1</sub> 活性は不安惹起作用を示す一方で、CRFR<sub>2</sub> は抗不安作用を示すことから (Joels & Baram, 2009), 本研究においては、CRFR サブタイプの効果により遮断薬投与の結果が相殺された可能性も考えられるだろう。CRF の発見は比較的新しく、恐怖条件づけにおける CRF の作用を今後より詳細に検討していく必要があると思われる。恐怖学習に CRF が関与する重要なタイミングが明らかにされることで、本研究における MS 時 CRFR 遮断が MS における恐怖条件づけに影響しなかったことを説明するかもしれない。

## 第 5 章

### ストレス誘発性条件性恐怖反応増強に及ぼす

#### RU38486 および proranolol 末梢投与の効果【実験Ⅷ】

##### 目的

これまでの実験において、末梢および中枢の HPA 系およびエピネフリン・ノルエピネフリンが MS 誘発性恐怖反応増強に関与していない可能性が示唆された。しかしながら、ストレス反応には複数のホルモン及び神経伝達物質の関与が知られており (Joels & Baram, 2009), それらの物質が相互作用することでストレス誘発性恐怖反応増強が形成されている可能性が考えられる。

近年、ノルエピネフリン・エピネフリンおよび GC の相互作用が、神経可塑性および記憶固定に影響していることが明らかになりつつある (Joëls et al., 2011)。記憶学習において、記憶固定に GC が効果を現すには、不安といった情動喚起によるエピネフリン・ノルエピネフリン活性を必要とする (Roosendaal et al., 2006)。そして、BLA 内の GR 活性は、G プロテイン調節性の作用を介してノルエピネフリン誘発性シグナルを増強することで、記憶固定を促進していると考えられている (Roosendaal, Quirarte, et al., 2002)。具体的には、嫌悪刺激を用いた試行では、扁桃体においてノルエピネフリンが放出され、後シナプスの  $\beta$ -NER および  $\alpha_1$ -NER に結合する (Hatfield & McGaugh, 1999)。 $\beta$ -NER は adenylate cyclase と直接結合しており、活性することで cAMP を合成し、いっぽう、 $\alpha_1$ -NER は  $\beta$ -NER によって引き起こされた反応を調節する役割を担う (Pilc & Enna, 1986)。GC はこの  $\alpha_1$ -NER と連関することで、 $\beta$ -NER-cAMP 活動を促進している可能性が考えられている (Duman et al., 1989)。また、cAMP は PKA の活性を介することで細胞内情報伝達系を駆動させ、その結

果，他脳部位における記憶固定調節に関与すると示唆されている (Roosendaal, Quirarte, et al., 2002)。

以上のように，中枢における GC とノルエピネフリンは，互いに協調することで情動喚起による神経伝達を調整していると考えられる。したがって GR または  $\beta$ -NER いずれかの活性が減弱したとしても，他方の強い賦活によって神経伝達が正常化され，本研究の第 3・4 章における MET による GC 合成阻害，PRO による  $\beta$ -NER 遮断または RU38486 による GR 遮断のいずれによっても MS 誘発性条件性恐怖反応増強効果の形成に影響を及ぼさなかった可能性が考えられる。そこで本章では，GR および  $\beta$ -NER を同時に不活性化することで，MS による恐怖反応増強効果形成にストレス反応の複数が相互作用しているかどうかを検討することを目的とした。具体的には，RU38486 および PRO の両方を MS 前に末梢投与し，その 2 週間後の文脈恐怖条件づけに及ぼす影響を検討した。

## 方法

### 1. 被験体

Wistar-Imamichi 系雄ラット 38 匹（実験開始時 8 週齢）を用いた。飼育環境および実験時刻は実験 I と同様であった。

### 2. 装置

実験 I と同じ電撃箱，強制水泳装置，リマインダー箱，恐怖条件づけ装置を用いた。

### 3. 薬物

RU38486 溶液 (200 mg/ml) は，mifepristone (Sigma & Aldrich) を dimethyl sulfoxide (DMSO: Sigma & Aldrich) に溶解し作成した。propranolol 溶液 (20 mg/ml) は，(±)-Propranolol hydrochloride (Sigma & Aldrich) を 0.9% 生理食塩水にて緩やかに加熱しながら溶解し作成した。先行研究において薬物による行動への影響が観察された用量を参考に，本実験で用いる用量を決定した (Adamec et al., 2007; Dal-Zotto et al., 2003)。

### 4. 手続き

被験体を MS 処置 × 薬物投与 (RU38486 および PRO (RU+PRO) または DMSO および SAL (VEH)) の 4 群に振り分けた (NMS VEH 群 (n = 13), NMS RU+PRO 群 (n = 8), MS VEH 群 (n = 8), MS RU+PRO 群 (n = 9))。

実験開始 1 日目 (Day1) に，ラットは飼育室から実験室に移

動した直後に体重を測定され、RU38486 (100 mg/kg) または溶媒を皮下投与された (0.5 ml/kg)。ひきつづき、ラットは 15 分間の待機時間の後、PRO または SAL を腹腔内投与された (1 ml/kg)。さらに 25 分間の待機時間の後、MS 処置手続きを開始された。これ以降の行動実験はすべて実験 I と同様であった。



## 結果

### 1. 装置馴化

装置馴化（試行 1～4）の各試行について、各試行を 1 分ずつ 5 ブロックに分け、各試行最初の 2 ブロックにおけるフリージングの割合の平均値をそれぞれ算出して分析した。これら全体の推移を Fig.28 に示す。

装置馴化 1 日目に、MS VEH 処置群は他の 3 群と比べて高いフリージング率を示した。MS RU+PRO 群は、NMS 群ほどではないものの、MS VEH 群と比べて低いフリージング率を示した。試行が進む毎に、すべての動物のフリージング率が同程度になった。

装置馴化（試行 1～4）について 3 要因混合計画の分散分析（stressor (2) × drug (2) × day (4)）を行ったところ、MS 処置の主効果 [ $F(1, 34) = 19.6, p < 0.01$ ]、薬物処置の主効果 [ $F(1, 34) = 3.2, p < 0.1$ ] および試行の主効果 [ $F(3, 102) = 7.7, p < 0.01$ ] に有意差および有意傾向が認められた。また、MS 処置と試行の交互作用 [ $F(3, 102) = 2.4, p < 0.1$ ] および薬物処置と試行の交互作用 [ $F(3, 102) = 12.9, p < 0.01$ ] が認められた。そこで単純主効果検定および多重比較を行ったところ、MS 処置群は 2～4 試行目よりも 1 試行目のフリージング率が高く ( $p < 0.05$ )、NMS 処置群は 4 試行を通してほとんどフリージングを示さなかった。VEH 処置群は、試行によりフリージングに差が認められ、2～3 試行目と比べて 1 試行目のフリージング率が高かった ( $p < 0.05$ )。

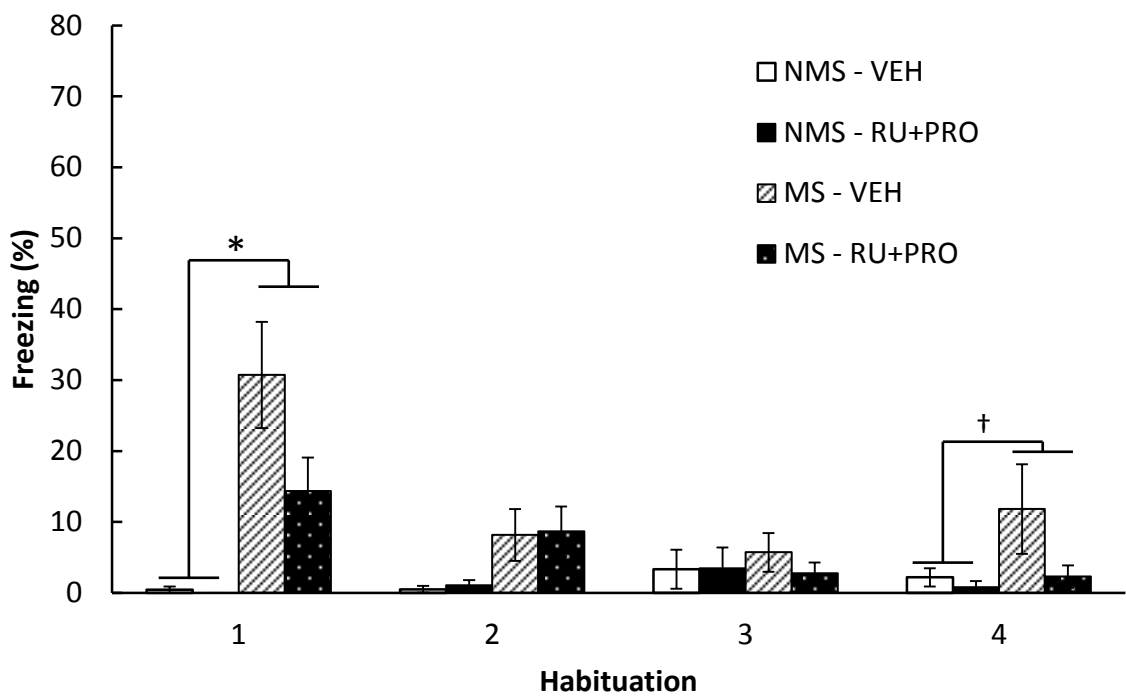


Fig. 28 MS後の装置馴化 (habituation) 1~4試行目におけるフリージング率。MSの35分前にRU38486または溶媒を皮下投与し、20分前にpropranolol(PRO)または溶媒を腹腔内投与し、NMS-VEH(n = 13), NMS-RU+PRO (n = 8), MS-VEH(n = 8)または、MS-RU+PRO (n = 9)の4群にラットを振り分けた。MS処置を1日目とし、11~14日目に装置馴化を行った。平均および±SEMを示す。  
\*p < 0.05, †p < 0.1。

## 2. 保持テスト

条件づけ前 (base level; BL), 条件づけ翌日の保持テスト (test I), 条件づけ 1 週間後の保持テスト (test II), 条件づけ 2 週間後の保持テスト (test III) について, 各試行を 1 分ずつ 3 ブロックに分け, 各試行最初の 2 ブロックにおけるフリージングの割合の平均値をそれぞれ算出して分析した。これら全体の推移を Fig.29 に示す。

MS VEH 群はすべての保持テストにおいて, 高いフリージングを示した。一方, MS RU+PRO 群は MS VEH 群と比較してフリージングが低く, test III において十分に低いフリージング率であった。

BL, test I, test II および test III について, 3 要因分散分析 (stressor (2) × drug (2) × day (4)) を行ったところ, MS 処置の主効果 [ $F(1, 12) = 9.92, p < 0.01$ ], 薬物処置の主効果 [ $F(1, 12) = 9.92, p < 0.01$ ] および試行の主効果 [ $F(3, 36) = 19.6, p < 0.01$ ] が有意であった。また, 薬物処置と試行の交互作用が有意であった [ $F(3, 36) = 3.58, p < 0.05$ ]。さらに, 2 次の交互作用が有意であったため, MS 処置と薬物処置を併せて 2 要因分散分析 (stressor (4) × day (4)) を行った。その結果, 処置の主効果 [ $F(3, 34) = 5.55, p < 0.01$ ] および試行の主効果 [ $F(3, 102) = 39.35, p < 0.01$ ] が有意であった。そこで下位検定として単純主効果の検定および多重比較を行ったところ, test I, test II および test III において処置の効果が有意であった ( $p < 0.05$ )。test I において, MS VEH 群および NMS VEH 群は NMS RU+PRO 群と比べてフリージング率が高かった ( $p < 0.05$ )。test II において, MS VEH 群は NMS RU+PRO 群および MS RU+PRO 群と比べてフリージングが高かった ( $p < 0.05$ )。test III において, MS VEH 群は,

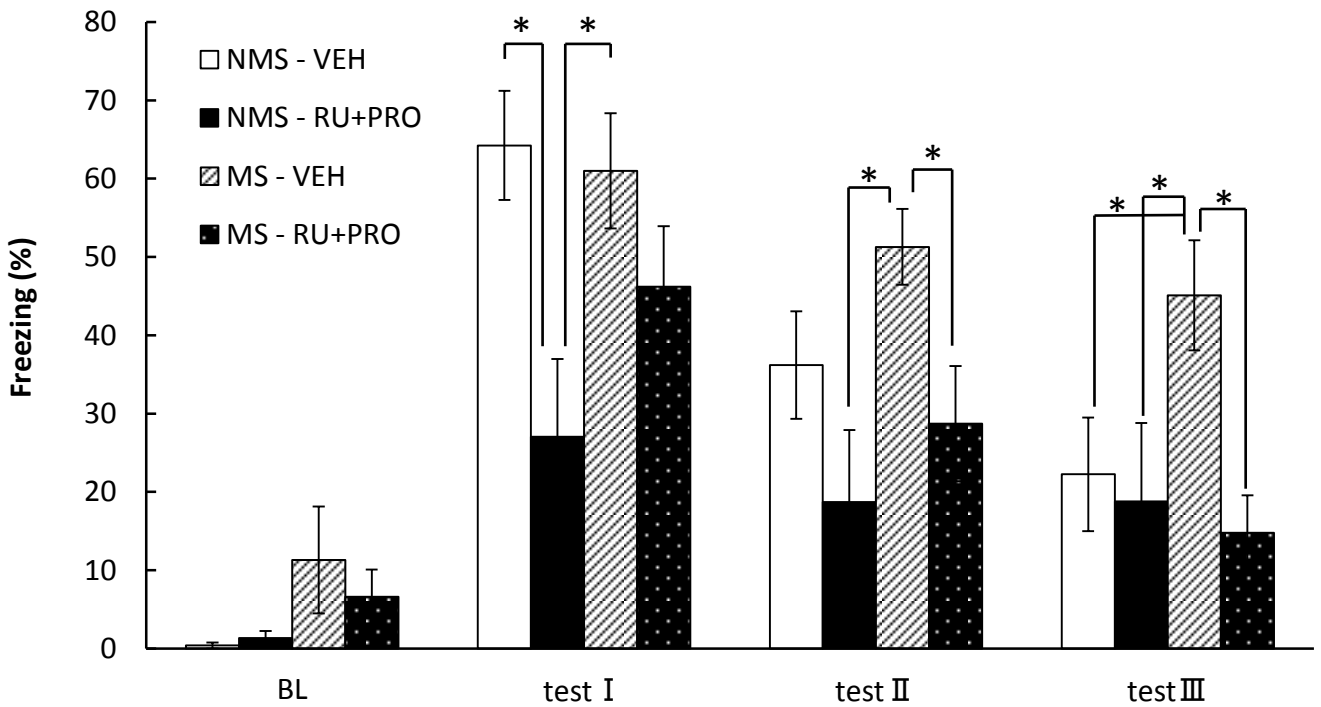


Fig. 29 MS後の文脈恐怖条件づけにおけるBL, test I, test II 及びtest IIIのフリージング率。MSの35分前にRU38486または溶媒を皮下投与し、20分前にpropranolol (PRO)または溶媒を腹腔内投与し、NMS - VEH (n = 13), NMS - RU+PRO (n = 8), MS - VEH (n = 8)または、MS - RU+PRO (n = 9)の4群にラットを振り分けた。MS処置を1日目とし、文脈恐怖条件づけ、保持テスト1, 2, 3回目はそれぞれ、15日目、16日、23日、30日に行われた。平均および±SEMを示す。  
\*p < 0.05。

他の群と比べてフリーズンクが高かった ( $p < 0.05$ )。

## 考察

本実験の結果，これまでの実験と同様に MS 処置はストレス誘発性恐怖反応増強効果を引き起こした。そのストレス誘発性恐怖反応増強効果は，GR および  $\beta$ -NER 両方の遮断によって阻害された。

MS RU+PRO 群は，test I においては NMS RU+PRO 群よりもフリージング率が高かったものの，test II および III においては NMS 群と同等のフリージング率であった。したがって，MS 時の GR および  $\beta$ -NER 両方の賦活を遮断することによって MS 誘発性恐怖反応増強効果を阻害したと考えられる。

予期せぬ結果として，NMS VEH 群は test I において高いフリージング率を示した。本研究ではこれまで一貫して，NMS 群のフリージング率はすべてのテストにおいて低かった。これは文脈条件づけ時に用いた電撃強度が非常に弱く (0.1 mA)，一般的にこの強度の電撃では恐怖条件づけはほとんど成立しないためである。それに対して，MS 群では非常に弱い電撃によっても十分な条件性恐怖反応がみられることから，本研究ではストレス誘発性恐怖反応増強として注目してきた。

本実験の NMS VEH 群で高いフリージング反応がみられた原因は不明であるが，これまでの実験と本実験の手続きで異なっていたのは MS 時の薬物投与の回数である。これまでの実験の薬物投与が一度の薬物投与であったのに対して，本実験は RU38486 皮下投与および PRO 腹腔内投与と 2 回の投与を行った。ラットは短時間に 2 度の薬物投与に曝されたことになる。薬物投与を行ったのは MS 処置の日が初めてであり，注射針を 2 度刺されることはラットにとって苦痛な経験であった可能性は否定できない。薬物投与処置自体がトラウマストレスとして働いてしまったため，MS VEH 群だけでなく NMS VEH 群においても，test I における高いフリージング率が観察されたのか

もしれない。しかしながら、test II・IIIをみると NMS VEH 群のフリージング率は急激に低下しており、MS VEH 群ほどストレスの影響は強くなかったと考えられる。また NMS RU+PRO 群はすべての保持テストで低いフリージング率を示しており、RU+PRO 投与によって 2 回の薬物投与によるストレスの影響が抑制された可能性も示唆されよう。

本実験の結果は、GR と  $\beta$ -NER の両者が補償的に作用することによって、ストレス誘発性恐怖反応増強を生起させる可能性を示唆する。MS 時に GR または  $\beta$ -NER いずれかの活性が減弱したとしても、片方の強い賦活によって、ストレス誘発性恐怖反応増強を形成しうるほどの神経伝達が生じるため、これまでの実験で検討した MET による GC 合成阻害、PRO による  $\beta$ -NER 遮断、または RU38486 による GR 遮断のいずれかの MS 前薬物処置によっても MS 誘発性条件性恐怖反応増強効果の形成に影響を及ぼさなかった可能性が考えられる。先行研究においても、単体では有効用量でなかった PRO および RU38486 の併用投与は、驚愕反射のストレスによる増強を阻害した (Adamec et al., 2007)。Adamec グループは捕食者ストレスを用いているため、本研究とストレッサーの種類が異なることに注意しなくてはならないものの、驚愕反射のストレス増強の固定に GR と  $\beta$ -NER の相乗作用が関与していることが示されており、本実験の結果は彼らの先行研究の結果を部分的に支持するものである。

GR および  $\beta$ -NER の作用発現は扁桃体 (Roosendaal, Quirarte, et al., 2002) および海馬 (Andreasen & Lambert, 1991) を介した神経伝達メカニズムの可能性が考えられる。GR は海馬 LTP を調整していると考えられており、扁桃体及び海馬における LTP の発現と持続における  $\beta$ -NER の役割が議論されているためである (Frey, Bergado-Rosado, Seidenbecher, Pape, & Frey, 2001)。ストレッサーが強くなればなるほどノルエピネフリンが上昇し、より強い  $\beta$ -NER

遮断を必要とすると予想され、実験Ⅳで用いた PRO 用量では、海馬や扁桃体でのノルエピネフリンの作用に十分拮抗できず、GR の活性化がノルエピネフリンの作用を補償したのかもしれない。

GC またはノルエピネフリンのどちらかが第一に作用しているのではなく、どちらかが欠けたとしてもどちらかの強い神経伝達が残っていれば、ストレス事象の学習が生じ、次のストレス事象に備えることができるという点は、生物が生き残るうえで有利に働くと考えられ、生物の環境適応における柔軟性を新たに発見できたと考えることもできるだろう。また、強いストレス経験時の GC とノルエピネフリンの補償作用を示したことは、PTSD 発症メカニズムの理解を高めるのに有意義な結果となったといえるのではないだろうか。

行動の変化に関与する物質またはその程度が、ストレスラーによって異なるようであり、フットショックと強制水泳を組み合わせた本研究は、フットショックのみを用いた先行研究とは異なる結果が出たとしても不思議ではない。ヒトの場合、曝露されるストレスラーは単一でない場合が多いと思われるため、ストレスラーによって行動に変化を及ぼす物質とその程度が異なるという仮説を踏まえて、様々なストレスラーを用いた動物研究を進める必要があるだろう。生体反応の解析方法が発展した現代における、ストレスラーの種類ごとの基礎研究発展の必要性が改めて提示されよう。ストレスラーの違いによる特異的ストレス反応の解明は、これからのストレス研究を進めるうえで重要なものとなるだろう。



## 第 6 章

### 全体的考察および今後の展望

本研究では、恐怖条件づけパラダイムを用いて、単回ストレス処置が長期間の行動変容を引き起こす PTSD モデルラットパラダイムの確立および、その単回ストレスによる行動変容であるストレス誘発性恐怖反応増強効果を引き起こすのに必要なストレス応答性の生理学的要因を明らかにすることを目的とした。

まず本研究は、第 2 章において、4 回のフットショック (1.0 mA, 1 sec) または 20 分間の強制水泳、あるいはフットショックと強制水泳から成る複合ストレス (MS) がその 2 週間後の文脈恐怖条件づけに及ぼす影響を検討した。その結果、強制水泳または MS による強いストレスは、その 2 週間後に行われた恐怖条件づけにおけるフリージングを増強し、その条件づけから 1 週間後及び 2 週間後に行われた保持テストにおいても同様に恐怖反応を増強することが示された。さらに、強制水泳群に比べて、MS 群は保持テスト 3 回目まで高いフリージング率を維持する傾向がみられたことから、フットショックと強制水泳を組み合わせることでより強い恐怖反応増強効果を引き起こすことが示唆された。単回ストレス処置が後の文脈恐怖条件づけを増強するためには、フットショックと強制水泳を組み合わせた MS が有用であることが示唆された。加えて、MS を想起するようリマインダー処置は、オープンフィールド行動の情動性を増すことおよび、ストレス誘発性恐怖反応の増強と維持を引き起こしたことから、MS 後にリマインダーに曝すことが、情動性亢進および MS 誘発性恐怖反応増強効果の長期間の持続を引き起こすのに、有用であることが示唆された。

つづいて第 3, 4, および 5 章において、MS 誘発性恐怖反応増強効果形成を引き起こす生理学的要因を検討した。実験的研究から得られた知見を Table. 2 に示す。第 3 章では、MS に応じて副腎から分泌さ

実験	MS 前処置	投与方法	装置馴化	保持テスト		
				1	2	3
III	MET 25 mg/kg	i.p.	↓	→	→	→
	MET 100 mg/kg	i.p.	↓↓	→	→	→
IV	PRO 20 mg/kg	i.p.	↓↓	→	→	→
V	ADX	-	→	→	→	→
VI	α/h CRF 5 μg	i.c.v.	→	→	→	→
	α/h CRF 20 μg	i.c.v.	→	→	→	→
VII	RU38486 150 ng	i.c.v.	→	→	→	→
VIII	RU38486 100 mg/kg + PRO 20 mg/kg	s.c., i.p.	↓	↓	↓↓	↓↓

Table. 2 MS 前処置が、後の文脈恐怖条件づけ装置における、装置馴化 1 試行目、保持テスト 1, 2, および 3 回目のフリージング反応に及ぼす影響。MS 群内における MS 前処置の影響を比較した。  
→変化なし, ↓ 低下傾向, ↓↓低下

れる GC およびエピネフリン・ノルエピネフリンが MS 誘発性条件性恐怖反応増強に関与しているかを検討するために、MS 前 GC 合成阻害（実験Ⅲ）、 $\beta$ -NER 遮断（実験Ⅳ）または副腎摘除（実験Ⅴ）を行ったところ、いずれの処置も後の恐怖反応増強効果に影響を与えなかった。つまり、MS に応じて分泌される GC とエピネフリン・ノルエピネフリンのいずれも後のストレス誘発性恐怖反応増強の形成に主要な役割を担っていないことが示唆された。

ストレス誘発性恐怖反応増強効果に MET または PRO の効果はみられなかった一方で、MET100 mg/kg 投与または PRO20 mg/kg 投与は、文脈恐怖条件づけ前に行う装置馴化 1 試行目における MS 群のフリージング率を低下させた。MS 群のフリージング率が装置馴化一日目に高いという現象は、MS のひとつであるフットショックを受けた時の恐怖条件づけが、後の文脈恐怖条件づけ装置に般化してしまったがために、条件づけを受ける前の装置にフリージングを示したものと考えられ、MET100 mg/kg 投与または PRO20 mg/kg 投与は、装置馴化でフリージングを生じさせるのに必要な MS における恐怖条件づけ獲得またはの保持を阻害したため、文脈恐怖条件づけ装置に般化が生じず、装置馴化 1 試行目に条件性恐怖反応（フリージング）表出を阻害させたと示唆される。MET の末梢投与は文脈恐怖条件づけでの条件性恐怖反応を減弱させ（Cordero et al., 2002）、ノルエピネフリンの BLA 投与は水迷路学習を促進させた一方で、 $\beta$ -NER 遮断薬投与は学習を阻害したことから（Hatfield & McGaugh, 1999）、GC またはノルエピネフリン・エピネフリンは、情動喚起の関与する空間学習に重要な役割を担っていると示唆される。そのため、MS 前 MET または PRO 投与は、装置馴化 1 試行目における MS 時の恐怖条件づけの般化を阻害したと考えられる。MS 時に獲得される恐怖条件づけ自体が恐怖反応増強効果に関わっているわけではなく、感覚をつかさどる部位における神経伝達の変容、あるいは、恐怖反応を引き起こす神

経伝達回路の変容が生じたために、ストレス誘発性恐怖反応増強効果が形成される可能性が示唆された。

第 4 章では、MS 時の中枢における HPA 系の賦活が MS 後の恐怖反応増強効果に関与するかを検討するために、CRFR 遮断薬または GR 遮断薬を MS 前に脳室内投与した。しかしながら、薬物処置によるストレス誘発性恐怖反応増強への影響は観察されなかった。MS 前 a/hCRF または RU38486 脳室内投与による中枢 CRFR または GR 活性の阻害は、ストレス誘発性恐怖反応増強効果に影響を与えなかったことから、CRFR および GR 活性は恐怖反応増強の形成調節の主要な因子ではない可能性が示唆された。

また CRFR において、そのサブタイプである CRFR<sub>1</sub> は不安惹起への関与を示し、CRFR<sub>2</sub> は抗不安への関与が示唆されている。本実験で用いた a/hCRF は非選択的 CRFR 遮断薬であるため、CRFR サブタイプごとの異なる作用発現を相殺したのかもしれない。本研究では明らかにされなかったが、今後、CRFR サブタイプに選択的な薬物を用いて、CRFR<sub>1</sub> 遮断による恐怖反応増強への影響を検討する必要があるだろう。

第 5 章では、ストレス反応には複数のホルモン及び神経伝達物質が関与していることに注目し、それらが相互作用することでストレス誘発性恐怖反応増強が形成されている可能性に注目した。ノルエピネフリン・エピネフリンおよび GC の相互作用が、神経可塑性および記憶固定に影響していることが明らかになりつつあるため (Joëls et al., 2011), MS 時の GR および  $\beta$ -NER の働きが相互作用して恐怖反応増強に関与しているかを検討した。MS 前 RU38486 および PRO の末梢投与は、MS による後の恐怖反応増強効果を減弱させ、恐怖反応維持を消失させた。したがって、MS 時の GR および  $\beta$ -NER 両方の賦活を遮断することによって MS 誘発性恐怖反応増強効果を阻害したと考えられる。MS 時に GR または  $\beta$ -NER いずれかの活性が減弱したと

しても、片方の強い賦活によって、ストレス誘発性恐怖反応増強を形成しうるほどの神経伝達が生じるため、これまでの実験で検討した MET, PRO または RU38486 による GC 合成・ $\beta$ -NER・GR のいずれかの阻害は、MS 誘発性条件性恐怖反応増強効果の形成に影響を及ぼさなかった可能性が考えられる。トラウマストレスは、GR と  $\beta$ -NER の両者の賦活が相乗的に作用しており、片方ずつの受容体機能を阻害したとしても、トラウマストレスによる後の行動変容を引き起こすものと考えられる。

MET または PRO 投与による文脈学習阻害を示唆する先行研究は、オープンフィールドにおける物体の弁別が求められる自発的物体再認課題や急性ストレス的な受動的回避学習課題であったため、GC またはノルエピネフリンの働きの片方を阻害するだけで阻害の影響がみられた可能性が考えられる。自発的物体再認課題はオープンフィールドへの曝露以外、動物に強制することはないため、動物にとってストレスの少ない課題であるといえる。受動的回避学習もまた、多くの場合、本研究で用いた MS よりもストレス強度は低い。そして、フットショックを受けた場所を記憶し、回避する課題であり、恐怖反応増強効果を検討する課題ではない。それらの MET または PRO 投与による文脈学習阻害を示唆する先行研究にみられる空間記憶獲得と、本研究にみられるストレス誘発性恐怖反応増強効果形成に関与する神経伝達メカニズムは異なるのではないだろうか。そうであるならば、第 3 章における、MS 前 MET または PRO のいずれかの投与による MS 時の文脈恐怖条件づけ阻害が生じた一方で、MS 誘発性恐怖反応増強は阻害できなかったという結果を矛盾なく解釈することができるかもしれない。ストレス誘発性恐怖反応増強効果形成を引き起こすのに特有な神経メカニズムが存在するため、トラウマストレスによる行動変容を阻害するためには GR と  $\beta$ -NER の両方を阻害する必要性があるのだろう。

本研究をまとめると、MS 誘発性恐怖反応増強効果は、GR および  $\beta$ -NER の介する非常に強いシグナル伝達によって形成されていることが示唆された。しかしながら、中枢におけるそれらのストレス反応が、恐怖反応増強効果形成に作用する機序を説明するには至らなかった。ストレス誘発性恐怖反応増強効果形成における中枢の機序を解明するためには、CRFR や GR 遮断薬というよりも、それらのアンチセンスやノックダウン動物を用いて再検討する必要があるかもしれない。アンチセンスやノックダウン動物を用いた実験は、治療法検討の直接的な助けになるとはいえないものの、PTSD のようなストレス関連疾患発症のメカニズムを解明するという点で有意義であると思われる。

恐怖反応増強が生じるようなトラウマストレス事象後に生じる脳部位の神経学的メカニズムは、いまだ十分に解明されてはいない。とりわけ海馬や扁桃体では、GR が豊富に存在することから、PTSD 発症メカニズムにおける HPA 系の役割、および HPA 系と他の神経伝達物質系と海馬や扁桃体との相互作用が、今後、より詳細に検証されなければならないだろう。現在、PTSD の治療薬としてセロトニン神経伝達に作用する SSRI がもっともよく使われていることから、HPA 系とセロトニン神経系の相互作用が、PTSD 発症メカニズムの解明の緒となる可能性が高いだろう。そして、中枢のメカニズムを検討するために、トラウマストレスによる脳部位特異的賦活と恐怖反応増強効果の相関を明らかにする必要があるだろう。今回は恐怖学習への関与がよく研究されている扁桃体に注目したものの、扁桃体のノルエピネフリンと、扁桃体とは別の脳部位における GC の賦活が生じることで、特定の脳領域内というよりも、脳領域間における活性化の相乗作用が、ストレス誘発性恐怖反応増強を引き起こしている可能性を捨ててはならないだろう。両脳部位の情報伝達回路を止めないかぎり、MS の恐怖反応増強効果が阻害されないという考え方もできるため、

今後の検討が必要と思われる。

また、本研究において確立された MS+リマインダーパラダイムを用いることで、ストレス誘発性恐怖反応増強形成に及ぼす恐怖記憶想起の影響を検討することのできる可能性があるだろう。PTSD は、悪夢やフラッシュバックといった幾度とないトラウマストレスの再想起が原因となっていると考えることができる。そこで、動物にリマインダーを何度も曝露することで恐怖反応増強がより強固になるのか、それとも曝露療法のようにトラウマストレスの消去として働くようになるのかを明らかにすることは、PTSD メカニズムの解明にとってとても興味深い。GR や  $\beta$ -NER といった情動記憶に関与する因子の阻害をリマインダーによるトラウマストレス想起時に行うことで、記憶想起阻害が恐怖反応増強に及ぼす影響を検討することができるだろう。これにより、臨床場面における治療の発展につながることを期待できるだろう。

トラウマストレス後の行動学的・生理学的変容を観察しようという試みがなされているものの、そこで用いられている指標はさまざまであり、得られた結果もいまだに混迷を呈している。PTSD の基礎をなすメカニズムをより正確に解明するためにも、過去に得られた結果と新たに得られた結果を照らし合わせて、明確な基準をもった動物モデルの作成を今後も続けていく必要があるだろう。PTSD 動物モデルには、まだ検討を重ねる余地が依然として残っている。PTSD 動物モデルは、PTSD の病態解明には必要不可欠な存在であり、PTSD に苦しむ人々を効果的に救う治療法の開発に貢献することが強く期待される。

## 要約

トラウマ的事象の経験直後に心理的および身体的不調が顕在化する場合は、急性ストレス障害として診断される。急性ストレス障害では、数日ないしは数週間で通常の生活を送ることのできる程度にまで症状が改善される。それに対して、トラウマ的事象経験後1か月以上経過してもなお不調が改善されない、あるいは症状の悪化、顕在化が見られる場合は心的外傷後ストレス障害（**post-traumatic stress disorder ; PTSD**）と診断される。ストレッサーに曝された動物は、ヒトの精神疾患に呈されるような精神不安状態や神経伝達物質・内分泌の異常、脳の形態学的異常と類似した症状を示すことから、精神疾患の動物モデルとしての応用が期待されている。**PTSD**の数カ月ないしは数年後までも続くという特徴から、**PTSD**動物モデルが妥当であるために、動物モデルにおけるストレスの影響が長期間持続するかどうか重要である。

第1章では、ストレス、ストレス関連疾患動物モデル、恐怖学習におけるストレス反応および**PTSD**動物モデルとしての恐怖反応増強現象を概観したのち、本研究の目的を記した。あらかじめ強いストレスに曝された動物は、後の恐怖条件づけが増強される現象が知られており、そのようなストレスへの鋭敏化現象は、**PTSD**患者にみられるような過覚醒症状と類似している。恐怖条件づけは、動物の嫌悪記憶の強度を評価するために、伝統的に用いられ、古典的条件づけを応用した学習パラダイムの一つである。

また本稿では、動物の行動的・生理的機能に多大な影響を及ぼしうる強度のストレッサーのことを、動物にとっての“トラウマストレス”と定義した。本研究は、あらかじめトラウマストレスに曝された動物が後の恐怖条件づけの増強を示す現象であるストレス誘発性恐怖反



応増強効果を元に、同一個体を長期間用いた PTSD モデルラットパラダイム作成を行うことを第一の目的とした。ラットがトラウマストレスを受けてから文脈恐怖条件づけを行われるまでの間が 2 週間であり、さらに文脈恐怖条件づけの持続を 2 週間観察するという長期間にわたる検討を行った。第二の目的は、トラウマストレスによる条件性恐怖反応増強効果形成の要因を明らかにすることである。そのため本研究では、ストレス反応である視床下部－下垂体－副腎皮質（HPA）系および交感神経系に注目した。HPA 系および交感神経系の活性は代表的なストレス反応であり、情動行動の表出や情動記憶・学習に深く関与していることが多くの研究で指摘されているためである。

第 2 章では、ストレスによる情動性および条件性恐怖反応の変化を長期的に検討し、PTSD モデルラットパラダイムを確立した。まず第 1 節・実験 I では、ラットへのストレス負荷として、4 回のフットショック（1.0 mA, 1 sec）、20 分間の強制水泳または、フットショックと強制水泳を併せた複合ストレス（MS）がその 2 週間後の文脈恐怖条件づけに及ぼす影響を検討することを目的とした。この MS による恐怖反応増強効果において、フットショックと強制水泳の組み合わせが重要であるのか、それともフットショックまた強制水泳単独でも同様の効果が見られるのかどうかを検討した。Wistar-Imamichi 系雄ラット 32 匹（8 週齢）を、ストレス処置を与えられない Non-MS（NMS）群（n=4）、フットショックのみを与えられる shock 群（n=9）、強制水泳のみを与えられる swim 群（n=9）および MS を与えられる（MS）群（n=10）に振り分けた。MS 群は、電撃箱でフットショック（1.0 mA×4 回）を受けた直後に 20 分間の強制水泳を受けた。shock は、MS 群同様にフットショックを受けた後、床敷きの敷かれたプラスチックケージで 20 分間待機した。swim 群は、フットショックなしで電撃箱に曝露された後、20 分間の強制水泳を受けた。ストレス処置の 1 週間後に、ストレス処置時の実験室間の移動に用いた黒ケージ

に動物を3分間曝露するリマインダー処置を行った。ストレス処置の2週間後に、恐怖条件づけ(0.1 mA, 2 s × 2)を電撃箱とは異なる装置にて行った。条件づけの翌日、1週間後および2週間後の計3回、保持テストを行い、長期間の恐怖反応増強を検討した。実験Iの結果、ストレスから2週間後に観察されるストレス誘発性恐怖反応増強に、主に強制水泳ストレスが関わっており、フットショックのみでは、恐怖反応増強効果を引き起こさないことが示された。さらに、強制水泳群に比べてMS群は保持テスト3回目まで高いフリージング率を維持する傾向がみられたことから、フットショックと強制水泳を組み合わせることでより強い恐怖反応増強効果を引き起こすことが示唆された。先行研究により、ストレスを受けた環境(リマインダー)への曝露は、ヒトのPTSD症状におけるトラウマ記憶の再体験を疑似的に再現していることが示唆されており、本実験においても、文脈恐怖条件づけにみられるような、ストレス事象によって引き起こされる長期間の行動変容が、リマインダーを用いることで観察された。しかしながら、本実験でみられたストレス誘発性恐怖反応増強効果がMS自体によるものなのか、MSにリマインダーが加わったことによるものなのかを区別することができなかった。そのため第2節・実験IIでは、実験Iでみられた恐怖反応増強効果は、リマインダーが存在していなくとも引き起こされたのか、またはリマインダーは恐怖反応増強に必須であるのかを確かめることとした。被験体をNMS群(n=9)、MSを与えられるが1週間後にリマインダー箱に曝露しないMS+no-リマインダー(MS+NR)群(n=11)およびMS+リマインダー(MS+R)群(n=11)に振り分けた。さらに、実験開始2日目および23日目にオープンフィールドテスト(OFT)を行うことで、MSが情動性に及ぼす影響を検討した。実験IIの結果、MS後のリマインダー提示は、MSの恐怖反応増強効果をさらに強めることが明らかとなった。加えて、MS翌日に行われたOFTには影響を及ぼさなかったにもかかわらず

らず、約 3 週間後の OFT では移動活動量の低下を引き起こし、MS の直後ではなく、3 週間という期間を経て影響みられるようになるという結果は、PTSD 患者にみられるような時間が経過することでうつ症状が顕在化する傾向と類似しており、注目すべき点である。本章で得られた知見から、MS+リマインダーパラダイムを PTSD 動物ラットとして次章以降に用いることとした。

第 3 章では、MS による条件性恐怖反応増強効果形成における末梢ストレス反応の関与を検討することを目的とした。第 1 節・実験 III は、ストレス応答性グルココルチコイド (GC) 分泌が MS 誘発性条件性恐怖反応増強に及ぼすかを検討するため、GC 合成阻害薬である metyrapone (MET) (25, 100 mg/kg) MS 前腹腔内投与がその後の文脈恐怖条件づけに及ぼす影響を検討した (NMS+VEH 群 (n = 8), MS+VEH 群 (n = 8), MS+MET25 群 (n = 8), MS+MET100 群 (n = 8))。第 2 節・実験 IV は、ストレス応答性エピネフリン・ノルエピネフリン分泌の影響を検討するため、 $\beta$  アドレナリン受容体 ( $\beta$ -NER) 遮断薬である propranolol (PRO) (20 mg/kg) MS 前腹腔内投与が、その後の文脈恐怖条件づけに及ぼす影響を検討した (NMS+SAL 群 (n = 8), NMS+PRO 群 (n = 7), MS+SAL 群 (n = 14), MS+PRO 群 (n = 13))。第 3 節・実験 V は、MS 前に、GC およびエピネフリン分泌器官である副腎を摘除すること (ADX) により、副腎ストレス反応系を抑え、その後の文脈恐怖条件づけに及ぼす影響を検討した (NMS sham 群 (n = 8), NMS ADX 群 (n = 7), MS sham 群 (n = 8), MS ADX 群 (n = 6))。第 3 章の結果、MET または PRO の末梢投与または、ADX のいずれの MS 前処置も、MS 誘発性恐怖反応増強効果に影響しなかった。MS による条件性恐怖反応増強効果形成に、末梢 GC およびエピネフリン・ノルエピネフリン分泌は関与しないことが示唆された。一方で、装置馴化において、MET または PRO 投与による MS 群のフリージング低下がみられた。MS 群のフリージング率

が装置馴化一日目に高いという現象は、MS のひとつであるフットショックを受けた時の恐怖条件づけが、後の文脈恐怖条件づけ装置に般化したために、条件づけ用の装置にフリージングを示したものと考えられる。これらを併せると、MET および PRO は、装置馴化でフリージングを生じるのに必要な MS における恐怖条件づけの獲得・保持を薬物投与により阻害したため、薬物投与群は後の条件づけ装置に般化が生じず、フリージングを示さなかったと示唆された。

第 4 章では、条件性恐怖反応増強における中枢の HPA 系の関与を検討することを目的とした。第 3 章において検討した末梢の反応は、中枢からシグナルが送られることで生じるため、HPA 系の始まりである CRF 受容体 (CRFR) または中枢 GC 受容体 (GR) が恐怖反応増強に関与する可能性を検討するためである。第 1 節・実験 VI は、MS 前の CRFR 遮断薬 alpha/helical CRF (a/h CRF) (5, 20  $\mu$ g) 脳室内投与が、その後の文脈恐怖条件づけに及ぼす影響を検討した (NMS+SAL 群 (n = 8), NMS+a/hCRF5 群 (n = 7), NMS+a/hCRF20 群 (n = 7), MS+SAL 群 (n = 9), MS+a/hCRF5 群 (n = 7), MS+a/hCRF20 群 (n = 6))。第 2 節・実験 VII は、MS 前の GR 遮断薬 RU38486 (150 ng) 脳室内投与がその後の文脈恐怖条件づけに及ぼす影響について検討した (NMS+VEH 群 (n = 4), NMS+RU38486 群 (n = 4), MS+VEH 群 (n = 4), MS+RU38486 群 (n = 4))。第 4 章の結果、a/hCRF または RU38486 のいずれの MS 前脳室内投与も、MS 誘発性恐怖反応増強効果を抑制しなかったため、MS 時の中枢 HPA 系賦活は、その後の恐怖反応増強に関与しないことが示唆された。

第 5 章 (実験 VIII) では、これまでの章で単一のストレス反応のみの恐怖反応増強効果への関与を検討してきたが、ストレス反応は複数のホルモン及び神経伝達物質が賦活することがすでに知られているため、それらが相互作用することでストレス誘発性恐怖反応増強が形成さ

れている可能性に注目した。RU38486 (100 mg/kg) および PRO (20 mg/kg) の両方を MS 前に末梢投与することで、恐怖反応増強効果形成に GR および  $\beta$ -NER 賦活が相互作用しているかどうかを検討した (NMS VEH 群 (n = 13), NMS RU+PRO 群 (n = 8), MS VEH 群 (n = 8), MS RU+PRO 群 (n = 9))。RU38486 および PRO の末梢併用投与は、恐怖反応増強を抑制し、恐怖反応の維持を消失させた。これは、GR と  $\beta$ -NER の両遮断が、恐怖反応増強効果の抑制に相乗的に作用していると示唆される。MS 時に GR または  $\beta$ -NER いずれかの活性が減弱したとしても、片方の強い賦活によって、ストレス誘発性恐怖反応増強させるほどの神経伝達が生じるため、これまでの実験で検討した単一のストレス反応阻害は、MS 誘発性条件性恐怖反応増強効果の形成に影響を及ぼさなかったと考えられる。トラウマストレスは、GR と  $\beta$ -NER の両者の賦活が相補的に作用しており、片方ずつの受容体を阻害したとしても、トラウマストレスによる後の行動変容を引き起こすことが示唆される。

## 引用文献

- Adamec, R. E., Burton, P., Shallow, T., & Budgell, J. (1999). NMDA receptors mediate lasting increases in anxiety-like behavior produced by the stress of predator exposure--implications for anxiety associated with posttraumatic stress disorder. *Physiology & Behavior*, *65*(4-5), 723-37.
- Adamec, R. E., & Shallow, T. (1993). Lasting effects on rodent anxiety of a single exposure to a cat. *Physiology & Behavior*, *54*(1), 101-9.
- Adamec, R. E., Shallow, T., & Budgell, J. (1997). Blockade of CCK(B) but not CCK(A) receptors before and after the stress of predator exposure prevents lasting increases in anxiety-like behavior: implications for anxiety associated with posttraumatic stress disorder. *Behavioral Neuroscience*, *111*(2), 435-49.
- Adamec, R., Muir, C., Grimes, M., & Pearcey, K. (2007). Involvement of noradrenergic and corticoid receptors in the consolidation of the lasting anxiogenic effects of predator stress. *Behavioural Brain Research*, *179*(2), 192-207.
- Adamec, Robert, Burton, P., Blundell, J., Murphy, D. L., & Holmes, A. (2006). Vulnerability to mild predator stress in serotonin transporter knockout mice. *Behavioural Brain Research*, *170*(1), 126-40.
- Adamec, Robert, Fougere, D., & Risbrough, V. (2010). CRF receptor blockade prevents initiation and consolidation of stress effects on affect in the predator stress model of PTSD.

*The International Journal of Neuropsychopharmacology*,  
13(06), 747–757.

American Psychiatric Association. (2000). *Diagnostic criteria from DSM- IV -TR*. Washington, DC: American Psychiatric Association.

Andreasen, M., & Lambert, J. D. (1991). Noradrenaline receptors participate in the regulation of GABAergic inhibition in area CA1 of the rat hippocampus. *The Journal of Physiology*, 439(1), 649–669.

Armario, A., Escorihuela, R. M., & Nadal, R. (2008). Long-term neuroendocrine and behavioural effects of a single exposure to stress in adult animals. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 32(6), 1121–1135.

Belda, X., Fuentes, S., Nadal, R., & Armario, A. (2008). A single exposure to immobilization causes long-lasting pituitary-adrenal and behavioral sensitization to mild stressors. *Hormones and Behavior*, 54(5), 654–61.

Belda, X., Márquez, C., & Armario, A. (2004). Long-term effects of a single exposure to stress in adult rats on behavior and hypothalamic-pituitary-adrenal responsiveness: comparison of two outbred rat strains. *Behavioural Brain Research*, 154(2), 399–408.

Berridge, C. W., & Dunn, A. J. (1989). Restraint-stress-induced changes in exploratory behavior appear to be mediated by norepinephrine-stimulated release of CRF. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 9(10), 3513–3521.

Beylin, A. V., Gandhi, C. C., Wood, G. E., Talk, A. C., Matzel, L. D.,

- & Shors, T. J. (2001). The Role of the Hippocampus in Trace Conditioning: Temporal Discontinuity or Task Difficulty? *Neurobiology of Learning and Memory*, 76(3), 447–461.
- Beylin, A. V., & Shors, T. J. (2003). Glucocorticoids are necessary for enhancing the acquisition of associative memories after acute stressful experience. *Hormones and Behavior*, 43(1), 124–131.
- Bialik, R. J., Pappas, B. A., & Roberts, D. C. (1984). Deficits in conditioned avoidance responding following adrenalectomy and central norepinephrine depletion are dependent on postsurgical recovery period and phase of the diurnal cycle. *Behavioral neuroscience*, 98(5), 847–857.
- Blundell, J., & Adamec, R. (2006). Elevated pCREB in the PAG after exposure to the elevated plus maze in rats previously exposed to a cat. *Behavioural Brain Research*, 175(2), 285–95.
- Bohus, B., Benus, R. F., Fokkema, D. S., Koolhaas, J. M., Nyakas, C., van Oortmerssen, G. A., Prins, A.J., de Ruiter, A.J., Scheurink, A.J., & Steffens, A. B. (1987). Neuroendocrine states and behavioral and physiological stress responses. *Progress in Brain Research*, 72, 57–70.
- Brandão, M. L., Zanoveli, J. M., Ruiz-Martinez, R. C., Oliveira, L. C., & Landeira-Fernandez, J. (2008). Different patterns of freezing behavior organized in the periaqueductal gray of rats: Association with different types of anxiety. *Behavioural Brain Research*, 188(1), 1–13.
- Brennan, F. X., Beck, K. D., Ross, R. J., & Servatius, R. J. (2005). Stress-induced increases in avoidance responding: an



- animal model of post-traumatic stress disorder behavior? *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, *1*(1), 69–72.
- Bruijnzeel, A. W., Stam, R., & Wiegant, V. M. (2001). Effect of a benzodiazepine receptor agonist and corticotropin-releasing hormone receptor antagonists on long-term foot-shock-induced increase in defensive withdrawal behavior. *Psychopharmacology*, *158*(2), 132–9.
- Brunet, A., Orr, S. P., Tremblay, J., Robertson, K., Nader, K., & Pitman, R. K. (2008). Effect of post-retrieval propranolol on psychophysiologic responding during subsequent script-driven traumatic imagery in post-traumatic stress disorder. *Journal of Psychiatric Research*, *42*(6), 503–506.
- Bush, D. E. A., Caparosa, E. M., Gekker, A., & LeDoux, J. (2010). Beta-adrenergic receptors in the lateral nucleus of the amygdala contribute to the acquisition but not the consolidation of auditory fear conditioning. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *4*, 154.
- Cai, W.-H., Blundell, J., Han, J., Greene, R. W., & Powell, C. M. (2006). Postreactivation glucocorticoids impair recall of established fear memory. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *26*(37), 9560–6.
- Cameron, N. M., Champagne, F. A., Parent, C., Fish, E. W., Ozaki-Kuroda, K., & Meaney, M. J. (2005). The programming of individual differences in defensive responses and reproductive strategies in the rat through variations in maternal care. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *29*(4-5), 843–65.

- Chalmers, D. T., Lovenberg, T. W., Grigoriadis, D. E., Behan, D. P., & De Souza, E. B. (1996). Corticotrophin-releasing factor receptors: from molecular biology to drug design. *Trends in Pharmacological Sciences*, *17*(4), 166–172.
- Cohen, H., Benjamin, J., Kaplan, Z., & Kotler, M. (2000). Administration of high-dose ketoconazole, an inhibitor of steroid synthesis, prevents posttraumatic anxiety in an animal model. *European Neuropsychopharmacology: The Journal of the European College of Neuropsychopharmacology*, *10*(6), 429–35.
- Cohen, H., Kaplan, Z., & Kotler, M. (1999). CCK-antagonists in a rat exposed to acute stress: implication for anxiety associated with post-traumatic stress disorder. *Depression and Anxiety*, *10*(1), 8–17.
- Cordero, M I, & Sandi, C. (1998). A role for brain glucocorticoid receptors in contextual fear conditioning: dependence upon training intensity. *Brain Research*, *786*(1-2), 11–17.
- Cordero, M Isabel, Kruyt, N. D., Merino, J. J., & Sandi, C. (2002). Glucocorticoid involvement in memory formation in a rat model for traumatic memory. *Stress (Amsterdam, Netherlands)*, *5*(1), 73–9.
- Cordero, M. Isabel, Venero, C., Kruyt, N. D., & Sandi, C. (2003). Prior exposure to a single stress session facilitates subsequent contextual fear conditioning in rats: Evidence for a role of corticosterone. *Hormones and Behavior*, *44*(4), 338–345.
- Cui, H., Sakamoto, H., Higashi, S., & Kawata, M. (2008). Effects of single-prolonged stress on neurons and their afferent inputs

- in the amygdala. *Neuroscience*, 152(3), 703–12.
- Dal-Zotto, S., Martí, O., & Armario, A. (2003). Glucocorticoids are involved in the long-term effects of a single immobilization stress on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Psychoneuroendocrinology*, 28(8), 992–1009.
- De Quervain, D. J.-F., Aerni, A., Schelling, G., & Roozendaal, B. (2009). Glucocorticoids and the regulation of memory in health and disease. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 30(3), 358–370.
- Deak, T., Nguyen, K. T., Ehrlich, A. L., Watkins, L. R., Spencer, R. L., Maier, S.F., Licinio, J., Wong, M.-L., Chrousos, G.P., Webster, E., & Gold, P. W. (1999). The Impact of the Nonpeptide Corticotropin-Releasing Hormone Antagonist Antalarmin on Behavioral and Endocrine Responses to Stress. *Endocrinology*, 140(1), 79 –86.
- Diehl, L. A., Silveira, P. P., Leite, M. C., Crema, L. M., Portella, A. K., Billodre, M.N., Nunes, E., Henriques, T.P., Fidelix-da-Silva, L.B., Heis, M.D., Gonçalves, C.A., Quillfeldt, J.A., & Dalmaz, C. (2007). Long lasting sex-specific effects upon behavior and S100b levels after maternal separation and exposure to a model of post-traumatic stress disorder in rats. *Brain Research*, 1144, 107–16.
- Duman, R. S., Strada, S. J., & Enna, S. J. (1989). Glucocorticoid administration increases receptor-mediated and forskolin-stimulated cyclic AMP accumulation in rat brain cerebral cortical slices. *Brain Research*, 477(1–2), 166–171.
- Fanselow, M. S., & Bolles, R. C. (1979). Naloxone and shock-elicited freezing in the rat. *Journal of Comparative*

*and Physiological Psychology*, 93(4), 736–744.

- Fanselow, M. S., DeCola, J. P., & Young, S. L. (1993). Mechanisms responsible for reduced contextual conditioning with massed un signaled unconditional stimuli. *Journal of Experimental Psychology. Animal Behavior Processes*, 19(2), 121–137.
- Fiad, T. M., Duffy, J., & McKenna, T. J. (1994). Multiple spuriously abnormal thyroid function indices due to heterophilic antibodies. *Clinical Endocrinology*, 41(3), 391–395.
- File, S. E., Vellucci, S. V., & Wendlandt, S. (1979). Corticosterone -- an anxiogenic or an anxiolytic agent? *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 31(5), 300–305.
- Frey, S., Bergado-Rosado, J., Seidenbecher, T., Pape, H.-C., & Frey, J. U. (2001). Reinforcement of Early Long-Term Potentiation (Early-LTP) in Dentate Gyrus by Stimulation of the Basolateral Amygdala: Heterosynaptic Induction Mechanisms of Late-LTP. *The Journal of Neuroscience*, 21(10), 3697–3703.
- Gallagher, J. P., Orozco-Cabal, L. F., Liu, J., & Shinnick-Gallagher, P. (2008). Synaptic physiology of central CRH system. *European Journal of Pharmacology*, 583(2-3), 215–225.
- Halliday, M. S. (1966). Effect of previous exploratory activity on the exploration of a simple maze [48]. *Nature*, 209(5021), 432–433.
- Hatfield, T., & McGaugh, J. L. (1999). Norepinephrine Infused into the Basolateral Amygdala Posttraining Enhances Retention in a Spatial Water Maze Task. *Neurobiology of Learning and*

*Memory*, 71(2), 232–239.

Hikichi, T., Akiyoshi, J., Yamamoto, Y., Tsutsumi, T., Isogawa, K., & Nagayama, H. (2000). Suppression of conditioned fear by administration of CRF receptor antagonist CP-154,526. *Pharmacopsychiatry*, 33(5), 189–193.

Hirani, K., Sharma, A. N., Jain, N. S., Ugale, R. R., & Chopde, C. T. (2005). Evaluation of GABAergic neuroactive steroid 3alpha-hydroxy-5alpha-pregnane-20-one as a neurobiological substrate for the anti-anxiety effect of ethanol in rats. *Psychopharmacology*, 180(2), 267–278.

Iwamoto, Y., Morinobu, S., Takahashi, T., & Yamawaki, S. (2007). Single prolonged stress increases contextual freezing and the expression of glycine transporter 1 and vesicle-associated membrane protein 2 mRNA in the hippocampus of rats. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 31(3), 642–51.

Joels, M., & Baram, T. Z. (2009). The neuro-symphony of stress. *Nat Rev Neurosci*, 10(6), 459–466.

Joëls, M., Fernandez, G., & Roozendaal, B. (2011). Stress and emotional memory: a matter of timing. *Trends in Cognitive Sciences*, 15(6), 280–288.

Kabitzke, P. A., Silva, L., & Wiedenmayer, C. (2011). Norepinephrine mediates contextual fear learning and hippocampal pCREB in juvenile rats exposed to predator odor. *Neurobiology of Learning and Memory*, 96(2), 166–172.

Kalin, N. H., & Takahashi, L. K. (1990). Fear-motivated behavior induced by prior shock experience is mediated by

- corticotropin-releasing hormone systems. *Brain Research*, 509(1), 80–84.
- Katagiri, H., Kagaya, A., Nakae, S., Morinobu, S., & Yamawaki, S. (2001). Modulation of serotonin<sub>2A</sub> receptor function in rats after repeated treatment with dexamethasone and L-type calcium channel antagonist nimodipine. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 25(6), 1269–1281.
- Khan, S., & Liberzon, I. (2004). Topiramate attenuates exaggerated acoustic startle in an animal model of PTSD. *Psychopharmacology*, 172(2), 225–9.
- Kikusui, T., Takeuchi, Y., & Mori, Y. (2000). Involvement of corticotropin-releasing factor in the retrieval process of fear-conditioned ultrasonic vocalization in rats. *Physiology & Behavior*, 71(3–4), 323–328.
- Kitanaka, I., & Ueno, K. (1975). Experimental Study on Emotionality in the General Behavior of Rats in the Course of Repeated Open-field Tests. *Journal of Japanese Psychosomatic Society*, 15(2), 98–105.
- Koba, T., Kodama, Y., Shimizu, K., Nomura, S., Sugawara, M., Kobayashi, Y., & Ogasawara, T. (2001). Persistent behavioural changes in rats following inescapable shock stress: a potential model of posttraumatic stress disorder. *The World Journal of Biological Psychiatry: The Official Journal of the World Federation of Societies of Biological Psychiatry*, 2(1), 34–7.
- Kohda, K., Harada, K., Kato, K., Hoshino, A., Motohashi, J., Yamaji, T., Morinobu, S., Matsuoka, N., Kato, N. (2007).

- Glucocorticoid receptor activation is involved in producing abnormal phenotypes of single-prolonged stress rats: a putative post-traumatic stress disorder model. *Neuroscience*, *148*(1), 22–33.
- Koolhaas, J. M., Meerlo, P., De Boer, S. F., Strubbe, J. H., & Bohus, B. (1997). The temporal dynamics of the stress response. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *21*(6), 775–782.
- Korte, S. M., Bouws, G. A. H., Koolhaas, J. M., & Bohus, B. (1992). Neuroendocrine and behavioral responses during conditioned active and passive behavior in the defensive burying/probe avoidance paradigm: Effects of ipsapirone. *Physiology & Behavior*, *52*(2), 355–361.
- Korte, S. M., de Boer, S. F., de Kloet, E. R., & Bohus, B. (1995). Anxiolytic-like effects of selective mineralocorticoid and glucocorticoid antagonists on fear-enhanced behavior in the elevated plus-maze. *Psychoneuroendocrinology*, *20*(4), 385–394.
- Lebow, M., Neufeld-Cohen, A., Kuperman, Y., Tsoory, M., Gil, S., & Chen, A. (2012). Susceptibility to PTSD-Like Behavior Is Mediated by Corticotropin-Releasing Factor Receptor Type 2 Levels in the Bed Nucleus of the Stria Terminalis. *The Journal of Neuroscience*, *32*(20), 6906–6916.
- Levine, S. (2001). Primary social relationships influence the development of the hypothalamic--pituitary--adrenal axis in the rat. *Physiology & Behavior*, *73*(3), 255–60.
- Levine, Seymour, Madden IV, J., Conner, R. L., Moskal, J. R., & Chris Anderson, D. (1973). Physiological and behavioral effects of prior aversive stimulation (preshock) in the rat.

*Physiology & Behavior*, 10(3), 467–471.

- Liang, K. C., Juler, R. G., & McGaugh, J. L. (1986). Modulating effects of posttraining epinephrine on memory: involvement of the amygdala noradrenergic system. *Brain research*, 368(1), 125–133.
- Liberzon, I., Krstov, M., & Young, E. A. (1997). Stress-restress: effects on ACTH and fast feedback. *Psychoneuroendocrinology*, 22(6), 443–53.
- Louvard, H., Maccari, S., Ducrocq, F., Thomas, P., & Darnaudéry, M. (2005). Long-term behavioural alterations in female rats after a single intense footshock followed by situational リマインダーs. *Psychoneuroendocrinology*, 30(4), 316–24.
- Lupien, S. J., McEwen, B. S., Gunnar, M. R., & Heim, C. (2009). Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. *Nat Rev Neurosci*, advanced online publication.
- Maier, S. F. (2001). Exposure to the stressor environment prevents the temporal dissipation of behavioral depression/learned helplessness. *Biological Psychiatry*, 49(9), 763–73.
- Marinelli, M., Le Moal, M., & Piazza, P. V. (1996). Acute pharmacological blockade of corticosterone secretion reverses food restriction-induced sensitization of the locomotor response to cocaine. *Brain Research*, 724(2), 251–255.
- Maroun, M., & Akirav, I. (2008). Arousal and stress effects on consolidation and reconsolidation of recognition memory. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 33(2), 394–



405.

- Martí, O., García, A., Vallès, A., Harbuz, M. S., Armario, A., & Vellès, A. (2001). Evidence that a single exposure to aversive stimuli triggers long-lasting effects in the hypothalamus-pituitary-adrenal axis that consolidate with time. *The European Journal of Neuroscience*, *13*(1), 129–36.
- McEwen, B. S. (2000). The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. *Brain Research*, *886*(1-2), 172–189.
- McGaugh, J. L., & Roozendaal, B. (2002). Role of adrenal stress hormones in forming lasting memories in the brain. *Current Opinion in Neurobiology*, *12*(2), 205–210.
- Menzaghi, F., Howard, R. L., Heinrichs, S. C., Vale, W., Rivier, J., & Koob, G. F. (1994). Characterization of a novel and potent corticotropin-releasing factor antagonist in rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *269*(2), 564 – 572.
- Montgomery, K. C. (1955). The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory drive. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, *48*(4), 254–260.
- Oitzl, M. S., Fluttert, M., Sutanto, W., & De Kloet, E. R. (1998). Continuous blockade of brain glucocorticoid receptors facilitates spatial learning and memory in rats. *European Journal of Neuroscience*, *10*(12), 3759–3766.
- Owens, M. J., & Nemeroff, C. B. (1991). Physiology and pharmacology of corticotropin-releasing factor. *Pharmacological reviews*, *43*(4), 425–473.
- Paxinos, G., & Watson, C. (1998). The rat brain in stereotaxic coordinates. Vol. *Academic Press, San Diego*.

- Pilc, A., & Enna, S. J. (1986). Activation of alpha-2 adrenergic receptors augments neurotransmitter-stimulated cyclic AMP accumulation in rat brain cerebral cortical slices. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *237*(3), 725–730.
- Porsolt, R. D., Anton, G., Blavet, N., & Jalfre, M. (1978). Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *European journal of pharmacology*, *47*(4), 379–391.
- Pugh, C. R., Tremblay, D., Fleshner, M., & Rudy, J. W. (1997). A selective role for corticosterone in contextual-fear conditioning. *Behavioral Neuroscience*, *111*(3), 503–511.
- Pynoos, R. S., Ritzmann, R. F., Steinberg, A. M., Goenjian, A., & Prisecaru, I. (1996). A behavioral animal model of posttraumatic stress disorder featuring repeated exposure to situational リマインダーs. *Biological Psychiatry*, *39*(2), 129–34.
- Rau, V., DeCola, J. P., & Fanselow, M. S. (2005). Stress-induced enhancement of fear learning: an animal model of posttraumatic stress disorder. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *29*(8), 1207–23.
- Rau, V., & Fanselow, M. S. (2009). Exposure to a stressor produces a long lasting enhancement of fear learning in rats. *Stress (Amsterdam, Netherlands)*, *12*(2), 125–133.
- Risbrough, V., Hauger, R., Pelleymounter, M., & Geyer, M. (2003). Role of corticotropin releasing factor (CRF) receptors 1 and 2 in CRF-potentiated acoustic startle in mice. *Psychopharmacology*, *170*(2), 178–187.

- Romero, L. M., & Butler, L. K. (2007). Endocrinology of Stress. *International Journal of Comparative Psychology, 20*, 89–95.
- Roozendaal, B., Bohus, B., & McGaugh, J. L. (1996). Dose-dependent suppression of adrenocortical activity with metyrapone: Effects on emotion and memory. *Psychoneuroendocrinology, 21*(8), 681–693.
- Roozendaal, B., Brunson, K. L., Holloway, B. L., McGaugh, J. L., & Baram, T. Z. (2002). Involvement of stress-released corticotropin-releasing hormone in the basolateral amygdala in regulating memory consolidation. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 99*(21), 13908–13913.
- Roozendaal, B., McEwen, B. S., & Chattarji, S. (2009). Stress, memory and the amygdala. *Nature Reviews Neuroscience, 10*, 423–433.
- Roozendaal, B., Okuda, S., Van der Zee, E. A., & McGaugh, J. L. (2006). Glucocorticoid enhancement of memory requires arousal-induced noradrenergic activation in the basolateral amygdala. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 103*(17), 6741–6746.
- Roozendaal, B., Quirarte, G. L., & McGaugh, J. L. (2002). Glucocorticoids interact with the basolateral amygdala  $\beta$ -adrenoceptor–cAMP/cAMP/PKA system in influencing memory consolidation. *European Journal of Neuroscience, 15*(3), 553–560.
- Sapolsky, R. M., Romero, L. M., & Munck, A. U. (2000). How Do Glucocorticoids Influence Stress Responses? Integrating Permissive, Suppressive, Stimulatory, and Preparative Actions. *Endocr Rev, 21*(1), 55–89.

- Sawamura, T., Shimizu, K., Nibuya, M., Wakizono, T., Suzuki, G., Tsunoda, T., Takahashi, Y., Nomura, S. (2004). Effect of paroxetine on a model of posttraumatic stress disorder in rats. *Neuroscience Letters*, *357*(1), 37–40.
- Stam, R., de Lange, R. P. J., Graveland, H., Verhave, P. S., & Wiegant, V. M. (2007). Involvement of group II metabotropic glutamate receptors in stress-induced behavioural sensitization. *Psychopharmacology*, *191*(2), 365–375.
- Sullivan, R. M., Wilson, D. A., & Leon, M. (1989). Norepinephrine and learning-induced plasticity in infant rat olfactory system. *The Journal of Neuroscience*, *9*(11), 3998–4006.
- Tachibana, T. (1980). The open-field test: An approach from multivariate analysis. *Animal Learning and Behavior*, *8*(3), 465–467.
- Tachibana, T. (1982). A comment on confusion in open-field studies: Abuse of null-hypothesis significance test. *Physiology and Behavior*, *29*(1), 159–161.
- Takahashi, T., Morinobu, S., Iwamoto, Y., & Yamawaki, S. (2006). Effect of paroxetine on enhanced contextual fear induced by single prolonged stress in rats. *Psychopharmacology*, *189*(2), 165–73.
- Todorovic, C., Radulovic, J., Jahn, O., Radulovic, M., Sherrin, T., Hippel, C., & Spiess, J. (2007). Differential activation of CRF receptor subtypes removes stress - induced memory deficit and anxiety. *European Journal of Neuroscience*, *25*(11), 3385–3397.
- Tronel, S., & Alberini, C. M. (2007). Persistent Disruption of a Traumatic Memory by Postretrieval Inactivation of

- Glucocorticoid Receptors in the Amygdala. *Biological Psychiatry*, 62(1), 33–39.
- Vallès, A., Martí, O., García, A., & Armario, A. (2000). Single exposure to stressors causes long-lasting, stress-dependent reduction of food intake in rats. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 279(3), R1138–44.
- Van der Kolk, B., Greenberg, M., Boyd, H., & Krystal, J. (1985). Inescapable shock, neurotransmitters, and addiction to trauma: toward a psychobiology of post traumatic stress. *Biological Psychiatry*, 20(3), 314–25.
- Wakizono, T., Sawamura, T., Shimizu, K., Nibuya, M., Suzuki, G., Toda, H., Hirano, J., Kikuchi, A., Takahashi, Y., Nomura, S. (2007). Stress vulnerabilities in an animal model of post-traumatic stress disorder. *Physiology & Behavior*, 90(4), 687–95.
- Wang, W., Liu, Y., Zheng, H., Wang, H. N., Jin, X., Chen, Y.C., Zheng, L.N., Luo, X.X., Tan, Q.R. (2008). A modified single-prolonged stress model for post-traumatic stress disorder. *Neuroscience Letters*, 441(2), 237–41.
- Weber, M., Watts, N., & Richardson, R. (2003). High illumination levels potentiate the acoustic startle response in preweanling rats. *Behavioral neuroscience*, 117(6), 1458–1462.
- Weiss, J. M., & Glazer, H. I. (1975). Effects of acute exposure to stressors on subsequent avoidance-escape behavior. *Psychosomatic Medicine*, 37(6), 499–521.
- WELKER, W. I. (1959). Escape, exploratory, and food-seeking

- responses of rats in a novel situation. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 52(1), 106–111.
- Williams, C. L., & McGaugh, J. L. (1993). Reversible lesions of the nucleus of the solitary tract attenuate the memory-modulating effects of posttraining epinephrine. *Behavioral neuroscience*, 107(6), 955–962.
- Williams, C. L., Men, D., Clayton, E. C., & Gold, P. E. (1998). Norepinephrine release in the amygdala after systemic injection of epinephrine or escapable footshock: contribution of the nucleus of the solitary tract. *Behavioral neuroscience*, 112(6), 1414–1422.
- Willner, P. (1986). Validation criteria for animal models of human mental disorders: learned helplessness as a paradigm case. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 10(6), 677–90.
- Yamamoto, S., Morinobu, S., Fuchikami, M., Kurata, A., Kozuru, T., & Yamawaki, S. (2008). Effects of single prolonged stress and D-cycloserine on contextual fear extinction and hippocampal NMDA receptor expression in a rat model of PTSD. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 33(9), 2108–16.
- Yang, Y.-L., Chao, P.-K., Ro, L.-S., Wo, Y.-Y. P., & Lu, K.-T. (2007). Glutamate NMDA receptors within the amygdala participate in the modulatory effect of glucocorticoids on extinction of conditioned fear in rats. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 32(5), 1042–51.

- Yehuda, R., & Antelman, S. M. (1993). Criteria for rationally evaluating animal models of posttraumatic stress disorder. *Biological Psychiatry, 33*(7), 479–86.
- Yehuda, R., & McFarlane, A. C. (1995). Conflict between current knowledge about posttraumatic stress disorder and its original conceptual basis. *The American Journal of Psychiatry, 152*(12), 1705–13.
- Yehuda, R., Southwick, S. M., Krystal, J. H., Bremner, D., Charney, D. S., & Mason, J. W. (1993). Enhanced suppression of cortisol following dexamethasone administration in posttraumatic stress disorder. *The American Journal of Psychiatry, 150*(1), 83–6.
- Yoshii, T., Sakamoto, H., Kawasaki, M., Ozawa, H., Ueta, Y., Onaka, T., Fukui, K., Kawata, M. (2008). The single-prolonged stress paradigm alters both the morphology and stress response of magnocellular vasopressin neurons. *Neuroscience, 156*(3), 466–74.
- Zhang, L., Li, H., Su, T. P., Barker, J. L., Maric, D., Fullerton, C.S., Webster, M.J., Hough, C.J., Li, X.X., Ursano, R. (2008). p11 is up-regulated in the forebrain of stressed rats by glucocorticoid acting via two specific glucocorticoid response elements in the p11 promoter. *Neuroscience, 153*(4), 1126–1134.

## 謝辞

本研究を遂行し、学位論文を作成するにあたり、指導教員である山田一夫先生、研究室教授の一谷幸男先生に多大なご支援とご指導を賜りまわりました。ここに記し、心より御礼申し上げます。本論文の審査を快く引き受けてくださった、主査の志賀隆先生、副査の綾部早穂先生、宇野彰先生、野上晴雄先生には中間指導から本審査まで、丁寧に根気強くご指導賜りまして深く御礼申し上げます。本研究の遂行および学術論文投稿にあたり、多大なるご助言ご支援を賜りました、筑波大学・人間系・教授、兼 The Rockefeller University・Associate Professor の Pavlides, Constantine 先生に深く感謝申し上げます。Pavlides 先生には根気強くお話をお聞きくださり、多くのご支援賜り、そのような機会を与えてくださり、修士論文の主査をお引き受け下さった小川園子先生に深く御礼申し上げます。本研究の立ち上げ。遂行をご協力くださった、卒論生の西田頼子様、榎美緒様および研究法の学生様に、心より御礼申し上げます。

コルチコステロン定量に用いた ELISA におきましては、多くのご支援とご指導を賜りました、麻布大学・獣医学部・教授の菊水健先生、学生の佐藤亜衣様に深く感謝申し上げます。

博士前期課程から博士取得までお世話になりました、筑波大学院・人間総合科学研究科・感性認知脳科学専攻の先生方、みなさまに深く御礼申し上げます。

最後に、学生・研究生活を日々送るにあたり、充実した時間を過ごすことができたのは、一谷研究室に所属する院生・学類生のみなさまのおかげであり、ここに感謝の意を表して謝辞と致します。

領家梨恵