

学 位 論 文 題 名

Conditioned fear stress における  
脳内モノアミン系の役割に関する研究

学位論文内容の要旨

1 緒 言

不安神経症の治療には最近、従来の benzodiazepine 系抗不安薬に加え、serotonin (5-HT)<sub>1A</sub> アゴニスト、5-HT 再取り込み阻害剤などの 5-HT 系抗不安薬が開発され、不安の病態に 5-HT 系が大きく関与しているとする仮説が注目されてきている。この仮説の主たる根拠は、5-HT 系薬物が臨床的にもまた行動薬理学的にも有効であるという事実であるが、神経化学的検討はこれまであまりなされていない。

多くの精神症状、精神疾患の動物モデルのうち、心理学的により単純でかつ妥当性のある不安のモデルとしては、conditioned fear stress (CFS) がある。CFS にはいくつかの方法があるが、代表的なものでは、電撃ストレス負荷したラットをいったんホームケージにもどし、24時間後に電撃をうけた装置に再び置くことによって惹起される。CFS では freezing behavior が顕著に出現し、脱糞、排尿、立毛、血圧上昇などの変化も観察される。そのほか、血漿コルチコステロン濃度の増加、dopamine (DA) 代謝、noradrenaline (NA) 代謝の亢進が報告されている。このモデルの利点は、抗不安薬のスクリーニングに用いられているコンフリクト試験に比べ、水分、食餌摂取の影響を受けないこと、また前処理として電撃を使用するが、CFS 自体には電撃等の身体的侵襲を含まないことである。したがって、情動に関する神経化学的検討が容易となり、行動薬理学的にも同じモデルで検討することができる。

このような観点から本研究では、モノアミン系の中でも特に 5-HT 系に注目して、CFS におけるラット脳内モノアミン代謝、行動、内分泌に対する影響と、freezing を指標とした各種抗不安薬の行動薬理学的効果について検討した。

2 対象と方法

8週令の Sprague - Dawley 系雄性ラットを用いた。2.5mA、30分間のフット・ショックを

1日, 5日, 10日間負荷し, 最終ストレスの24時間後に同じショック箱に再びもどし, 電撃を加えずに30分間置き, CFSによって惹起される freezing behavior の観察を行った。

CFS の脳内モノアミン代謝に対する影響をみた実験では, ラットに電撃ストレスを1あるいは10日間加え, 内側前頭前野, 側坐核, 線条体, 室旁核, 外側視床下部, 扁桃体, 海馬の7脳部位について検討した。各部位の3, 4 - dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC), homovanillic acid (HVA), 5 - hydroxyindoleacetic acid (5 - HIAA) の含量を電気化学検出器付高速液体クロマトグラフィーを用いて測定した。

行動薬理学的実験では, 電撃ストレスを5日間加え, 最終ストレスの24時間後に薬物を投与し, 20分後に CFS により惹起される freezing behavior を観察した。用いた薬物は, ipsapirone, ICI 169, 369, citalopram, diazepam, ketanserin, L - 5 - hydroxytryptophan (L - 5 - HTP), DL - p - chloro - phenylalanine (PCPA) であった。なお, PCPA はテストの15時間前に投与した。

### 3 結 果

1回の電撃ストレスを加えた後の CFS により, 血漿コルチコステロン濃度の上昇, 脱糞数の増加, freezing behavior の出現が認められた。CFS により DA の代謝物である DOPAC 含量は内側前頭前野, 室旁核, 外側視床下部で, HVA 含量は内側前頭前野, 扁桃体で, 5 - HT の代謝物である 5 - HIAA 含量は内側前頭前野で各々上昇した。

電撃ストレスの反復による効果を CFS で検討したところ, 恐怖の増強を反映して, freezing は10日処置群で1日処置群より有意に増強して出現した。10日間電撃ストレスを負荷後の CFS により, DOPAC 含量は測定した7脳部位すべてで, HVA 含量は内側前頭前野, 側坐核, 扁桃体, 海馬で有意な上昇がみられた。5 - HT 代謝は内側前頭前野と室旁核で亢進がみられた。このように, 1回の電撃ストレス後の CFS では, DA 系, 5 - HT 系ともに内側前頭前野での代謝亢進が顕著であったのに対し, 反復電撃ストレス後の CFS では内側前頭前野のみならず, 他の脳部位でも代謝の亢進がみられた。

さらに行動薬理学的な検討により, 5 - HT 系に種々の作用をもつ薬物と diazepam の freezing に対する効果を検討した。Benzodiazepine 系抗不安薬である diazepam (1mg/kg) と選択的な 5 - HT<sub>1A</sub> アゴニストである ipsapirone (0.5-10mg/kg) は有意に freezing を抑制した。5 - HT の前駆物質である L - 5 - HTP と選択的な 5 - HT 再取り込み阻害剤である citalopram も freezing の減弱をもたらした。5 - HT<sub>2</sub> アンタゴニストである ICI169, 369 と

ketanserin, tryptophan hydroxylase 阻害剤である PCPA (200mg/kg) は freezing に影響を及ぼさなかった。

#### 4 考 察

検討した 7 脳部位のうち、内側前頭前野の DA および 5-HT 代謝が CFS により顕著な亢進を示したが、この代謝の亢進は DA および 5-HT 作動性神経の活動亢進を反映していると考えられる。さらに、CFS 前の電撃ストレスの回数を多くすることにより、活動の亢進する部位が DA と 5-HT 系で拡大していくことから、部位の拡大は恐怖条件付けの増強と関連を有していると思われる。これらの結果から恐怖、不安において DA、5-HT 系が重要な役割をはたしていることが示唆されるが、特に 5-HT 系は最近治療面からも不安との関連が注目されており興味深い。しかし、これらの変化が不安の諸症状の発現に関わっているのか、あるいは不安に対する生体の適応反応をあらわしているのかは神経化学的結果からは結論することができない。

そこでさらに行動薬理学的方法により、5-HT 系の活動に影響を与える種々の薬物を投与し、CFS により惹起される freezing に対する影響を検討した。代表的な benzodiazepine 系抗不安薬である diazepam が freezing を有意に抑制したことは、CFS が不安のモデルとして妥当であることを示している。Tryptophan hydroxylase 阻害剤である PCPA は影響しなかったが、選択的な 5-HT<sub>1A</sub> 受容体アゴニストである ipsapirone、5-HT の前駆物質である L-5-HTP、選択的な 5-HT の再取り込み阻害剤である citalopram など、5-HT 系の活動を増強する薬剤が freezing を抑制したことから、5-HT 系は不安の際の適応的な側面になっている可能性が考えられる。これらの結果から、5-HT 系の活動を増強することが不安に対して治療的に働くことが示唆される。CFS は薬物の抗不安作用および不安と 5-HT の関連を検討する上で有用なものと思われる。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 山 下 格

副 査 教 授 斎 藤 秀 哉

副 査 教 授 本 間 研 一

不安の治療には最近、セロトニン（5-HT）<sub>1A</sub>アゴニスト、5-HT再取り込み阻害剤などの5-HT系抗不安薬が開発され、不安の病態における5-HT系の関与が注目されている。本研究の目的は不安の動物モデルとしてconditioned fear stress（CFS）を用い、不安におけるモノアミンの役割について検討し、治療、病態について考察することである。CFSは以前に電撃をうけた装置に再び置く操作によって惹起される。CFSによりfreezing behavior、脱糞、排尿、立毛、血圧上昇などの変化が出現することがこれまでに知られている。本研究では、CFSにおけるラット脳内ドパミン（DA）、5-HT代謝、行動、内分泌に対する影響と、freezingを指標とした各種抗不安薬の行動薬理学的効果について検討した。

実験には8週齢のSprague-Dawley系雄性ラットを用いた。フット・ショックを負荷し、24時間後に同じショック箱に再びもどし、電撃を加えずに30分間置き、CFSにより惹起されるfreezingの観察を行った。CFSの脳内モノアミン代謝に対する影響をみた実験では、内側前頭前野、側坐核、線条体、室旁核、外側視床下部、扁桃体、海馬の7脳部位について検討した。各部位の3, 4-dihydroxyphenylacetic acid（DOPAC）、homovanillic acid（HVA）、5-hydroxyindoleacetic acid（5-HIAA）の含量を電気化学検出器付き高速液体クロマトグラフィーを用いて測定した。行動薬理学的実験では、電撃ストレスを5日間加え、最終ストレスの24時間後に薬物を投与し、freezingに対する影響をみた。

CFSにより血漿コルチコステロン濃度の上昇、脱糞数の増加、freezingの出現がみられた。また、DOPAC含量は内側前頭前野、室旁核、外側視床下部で、HVA含量は内側前頭前野、扁桃体で、5-HIAA含量は内側前頭前野で各々増加した。これらの結果はCFSによって特に内側前頭前野のDAおよび5-HT系の活動が亢進することを示唆している。電撃ストレスの反復による効果をCFSで検討したところ、恐怖の増強を反映して、freezingは反復により有意に増強して出現した。10日間電撃ストレスを負荷後のCFSにより、DOPAC含量は7脳部位すべてで、HVA含量は内側前頭前野、側坐核、扁桃体、海馬で有意な増加がみられた。5-HT代謝は内側前頭前野と室旁核で亢進がみられた。活動の亢進する部位がDAと5-HT系で拡

大していくことは恐怖条件付けの増強と関連を有していると思われる。特に 5-HT 系は最近臨床的にも不安の治療の観点から注目されており、本結果は不安の 5-HT 仮説を支持するものである。さらに行動薬理学的な検討では、benzodiazepine 系抗不安薬である diazepam と選択的な 5-HT<sub>1A</sub> アゴニストである ipsapirone が有意に freezing を抑制し、5-HT の前駆物質、5-HT 再取り込み阻害剤による 5-HT 系の活動の増強も freezing の減弱をもたらした。5-HT<sub>2</sub> アンタゴニストと tryptophan hydroxylase 阻害剤は freezing に影響を及ぼさなかった。5-HT 系の活動を増強する薬物が freezing を抑制することから、5-HT 系のうち特に後シナプスの 5-HT<sub>1A</sub> 受容体が不安の際の適応反応に関与していることが考えられる。

以上の発表に際し斎藤秀哉教授より 4 点質問を受け回答した。(1) 5-HT 代謝亢進に対する薬物の影響はみたか。－検討していない。(2) 薬物の効果は 5-HT 作動性神経の前と後シナプスのどちらへの作用が考えられるか。－後シナプスが考えられる。(3) 5-HT<sub>2</sub> か 5-HT<sub>3</sub> アゴニストは検討したか。－検討していない。(4) 5-HT<sub>1A</sub> アゴニストは adenylate cyclase に一般にどのように作用するか。－抑制的に作用する。本間研一教授より 4 点質問を受け回答した。(1) 副腎皮質ホルモンの反応は 1 日電撃負荷群と 10 日負荷群で異なるか。－どちらも分泌亢進がおこるが、両者を比べた実験はしていない。(2) 電撃箱に入れただけでも血中コルチコステロンは上昇するのでは。－上昇するが CFS はさらに有意に上昇させる。(3) Freezing は電撃をうけた箱で特異的に出現するのか。－他の研究者によれば特異的であるといわれている。(4) 薬物の知覚、運動などに及ぼす非特異的効果は考慮しなくてよいのか。－本研究で検討した薬物では大きな影響を与えないことを確認している。

本研究は、現在最も純粋な情動刺激といえる conditioned fear stress を用いて、不安刺激によるセロトニンの代謝の変化をドパミンと対比させながら脳内各部位について検討し、さらに各種セロトニン作用薬物の行動薬理学的な特性を調べ、その結果、不安における生体の適応反応のひとつとして脳内セロトニンの代謝亢進が生ずる可能性を指摘したもので、不安の生理機制的説明および臨床的応用に寄与するところが大きく、博士の学位に値するものと判定された。