

学位論文題名

Conditioned fear stress における
視床背内側核の役割に関する研究

学位論文内容の要旨

恐怖条件付けストレス (conditioned fear stress) は恐怖や不安の神経科学的基盤を研究する上で非常に有用な動物モデルである。恐怖条件付けによって形成された恐怖は条件恐怖と呼ばれる。恐怖条件付けの過程において、扁桃体は重要な役割を果たしている。扁桃体の他に、海馬も文脈的な条件恐怖の獲得過程と発現過程において重要な機能を果たしている。また、各種の記憶系の間相互作用という脳機能の複雑性を考えると、扁桃体と海馬の他に、他の脳部位、例えば、前頭前野や視床背内側核などが、条件恐怖の獲得過程と発現過程に関与している可能性が考えられる。これまで、視床背内側核と前頭前野及び扁桃体との間に豊富な神経線維連絡が存在していること、また、視床背内側核が学習・記憶過程において重要な役割を果たしていることが報告されてきた。しかし、視床背内側核が情動的学習・記憶のパラダイムである条件恐怖の獲得過程と発現過程に関与するかどうかについては報告がない。本研究は情動的学習・記憶における視床背内側核の機能的役割を明らかにすることを目的に、視床背内側核破壊による条件恐怖の獲得過程と発現過程に対する影響を扁桃体破壊の効果と比較検討した。

実験には 7 週齢の Sprague-Dawley 系雄性ラットを使用した。

脳局所破壊には RGF-4 lesion generator と脳定位固定装置を用いた。両側扁桃体の破壊では 60℃、75 秒の条件で、両側視床背内側核の破壊では、55℃、60 秒の条件で、それぞれ radiofrequency probe を破壊する脳部位に挿入し、加熱することにより局所脳部位を破壊した。

恐怖条件付けは 5 分間のセッションで行った。はじめの 4 分間では、footshock を与えず、最後の 1 分間には、3 秒間の電撃を 20 秒間隔で 3 回負荷した。条件恐怖の獲得実験においては、ストレス負荷の 24 時間後に、条件恐怖の発現実験においては、ストレス負荷の 11 日後にラットを同じショック箱に再び戻し、電撃を加えずに 5 分間置き、行動をビデオに記録した。Freezing (すくみ行動) と脱糞数を恐怖の指標とした。5 分間の観察期間のうち、freezing が出現した期間を百分率で示した。5 分間の観察期間に排泄された糞の数 (脱糞数) も記録した。

条件恐怖の獲得過程に関する実験では、両側扁桃体あるいは両側視床背内側核破壊後、ラットに 10 日間の回復期間を与えた後、footshock を負荷した。Footshock 負荷の 24 時間後に、ラットを再びショック箱に入れ、5 分間 freezing と脱糞数を観察した。

条件恐怖の発現過程に関する実験では、footshock 負荷の翌日、両側扁桃体あるいは両側視床背内側核を破壊した。10 日間の回復期間の後、ラットを再びショック箱に入れ、5 分間 freezing と脱糞数を観察した。

Postshock freezing に関する実験では、両側扁桃体あるいは両側視床背内側核破壊後、ラットに 10 日間の回復期間を与えた。5 分間の footshock セッションの 20 秒後、ラットをショック箱においたままとし、同じショック箱で footshock を加えずに freezing を 5 分間観察した。

痛覚感受性に関する実験では、両側扁桃体あるいは両側視床背内側核破壊後、ラットに 10 日間の回復期間を与えた後、ラットをショック箱に入れ、電流強度をセッションごとに 0.4 mA から 0.2 mA ずつ上げていき、前肢の引っ込め、後肢の引っ込め、発声の、痛みに関連した 3 種類の行動が出現する閾値を記録した。局所脳破壊の自発運動量に対する影響に関する実験では、ホームケージを自発運動量測定用の赤外線センサーの下に置き、ラットの水平方向の移動量を赤外線センサーで計測し、積算値をコンピューターに出力して記録した。

組織学的検討では、実験終了後、ラットを断頭し、脳を取り出した。脳切片を切り出し、トルイジン青で染色し、光学顕微鏡で破壊した範囲を確認した。

条件恐怖の獲得過程に関する実験では、footshock 負荷前の両側扁桃体破壊は freezing を完全に抑制し、条件恐怖による脱糞数の増加も有意に抑制した。一方、footshock 負荷前の両側視床背内側核破壊は freezing を有意に抑制したが、条件恐怖による脱糞数増加には有意な影響を与えなかった。

条件恐怖の発現過程に関する実験では、footshock 負荷後（すくみ行動を観察するテストの前）の両側扁桃体破壊は freezing を有意に抑制し、条件恐怖による脱糞数の増加も有意に抑制した。一方、footshock 負荷後の両側視床背内側核破壊は freezing を有意に抑制したが、条件恐怖による脱糞数増加には有意な影響を与えなかった。

本研究の結果は、両側視床背内側核破壊が freezing を指標とした条件恐怖の獲得過程と発現過程の両過程を抑制することを明らかにした。この結果は視床背内側核が情動的学習・記憶過程に関与していることを示唆している。また、以前の他の研究者の結果と一致して、両側扁桃体破壊は条件恐怖の獲得過程と発現過程の両過程をほぼ完全に抑制した。しかし、両側扁桃体破壊の効果とは対照的に、両側視床背内側核破壊は条件恐怖による脱糞数増加に対しては影響を与えなかった。これらの結果は扁桃体が種々の条件恐怖反応のうち行動のみならず、自律神経反応にも関与する一方、視床背内側核はすくみ行動には関与するが、少なくとも脱糞数増加という自律神経反応に対しては影響しないことを示している。

また、postshock freezing に関する実験では、両側扁桃体破壊は postshock freezing を有意に抑制したが、両側視床背内側核破壊は postshock freezing に有意な影響を与えなかった。これらの結果は両脳部位の恐怖条件獲得過程における機能的役割の差異を示している。すなわち、扁桃体が条件恐怖獲得過程に必須な役割を果たしているのに対して、視床背内側核は短期的にはいったん獲得された条件恐怖記憶が、長期的に維持されるための過程に関与しているといえる。

両側視床背内側核破壊は痛みに関連した 3 種類の行動のいずれにも有意な影響を示さなかったが、両側扁桃体破壊は後肢の引っ込め、発声といった痛みに関連した行動が出現する閾値を有意に上昇させた。これらの結果は、条件恐怖の獲得過程に対する両側視床背内側核破壊の抑制作用が痛覚に対する抑制作用を介していないことを示唆している。一方、両側扁桃体破壊による条件恐怖の獲得過程抑制作用の少なくとも一部が footshock の痛覚閾値を上昇させていることによる可能性を完全に除外することはできないと考えられる。

さらに、両側視床背内側核破壊及び両側扁桃体破壊は自発運動量に有意な影響を与えなかった。したがって、両脳部位破壊の条件恐怖の獲得過程と発現過程に対する効果は破壊

の非特異的な自発運動量に対する影響によってもたらされた効果ではないことが示唆される。

以上の結果から、視床背内側核は恐怖記憶の獲得、比較的長期的な貯蔵および発現過程に関与していることが明らかにされた。視床背内側核は文脈的条件恐怖の獲得・発現過程において、重要な役割を果たしていると考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 山 司
副 査 教 授 本 間 研 一
副 査 教 授 渡 辺 雅 彦

学 位 論 文 題 名

Conditioned fear stress における 視床背内側核の役割に関する研究

恐怖条件付けストレス (conditioned fear stress) は恐怖や不安の神経科学的基盤を研究する上で非常に有用な動物モデルである。これまで、視床背内側核が学習・記憶過程において重要な役割を果たしていることが報告されてきた。しかし、視床背内側核が情動的学習・記憶のパラダイムである恐怖条件付けに関与するかどうかについては報告がない。本研究は情動的学習・記憶における視床背内側核の機能的役割を明らかにすることを目的に、条件恐怖の獲得過程と発現過程に対する視床背内側核破壊の影響を扁桃体破壊の効果と比較検討した。

両側扁桃体破壊は条件恐怖の獲得過程と発現過程の両過程における不安・恐怖行動としての freezing を有意に抑制し、条件恐怖による脱糞数の増加も有意に抑制した。一方、両側視床背内側核破壊は両過程における freezing を有意に抑制したが、脱糞数増加には有意な影響を与えなかった。これらの結果は、扁桃体とは対照的に、視床背内側核は条件恐怖におけるすくみ行動には関与するが、自律神経反応である脱糞数増加に対しては影響しないことを示している。また、postshock freezing に関する実験では、両側扁桃体破壊は postshock freezing を有意に抑制したが、両側視床背内側核破壊は postshock freezing に有意な影響を与えなかった。これらの結果は扁桃体が条件恐怖獲得過程に必須な役割を果たしているのに対して、視床背内側核は短期的にはいったん獲得された条件恐怖記憶が、長期的に維持されるための過程に関与していると考えられる。

以上の結果から、視床背内側核が恐怖記憶の獲得、長期的な貯蔵および発現過程に関与していることが明らかとなった。視床背内側核は文脈的条件恐怖の獲得・発現過程において、重要な役割を果たしていると考えられる。

質疑応答では本間教授から、脳局所破壊の効果が神経細胞と通過線維のいずれに対する影響を介しているのかという点、脳局所破壊後、ラットに回復期間を長く与えた場合、生体の代償作用によって条件恐怖に対する影響が変化する可能性、また、不安・恐怖行動である freezing と自律神経の指標である脱糞数増加に対する影響に関連して、指標による効果の解離を統一的に説明することが可能かという点について質問があった。これに対して、申請者は主として神経細胞を破壊する NMDA による扁桃体基底外側核破壊が条件恐怖を抑制したという報告があり、扁桃体の神経細胞自体が恐怖条件付けの過程において重要な役割を果たしていると考えられる。一方、視床背内側核

については、条件恐怖に関する NMDA による破壊研究はこれまでなく、神経細胞の破壊を介しているのか、神経線維の破壊を介しているのかについては不明であり、今後検討したいこと、また、生体の代償作用によって条件恐怖に対する脳局所破壊の効果が変化するかについてはこれまで報告がないため不明であること、さらに、視床背内側核破壊は条件恐怖による脱糞数増加に影響を与えなかったもので、freezing だけに関与すると考えられが、今後、他の自律神経の指標を用いて、さらに検討したいことを回答した。次いで、渡辺教授から、radiofrequency 破壊の方法の特徴、freezing と脱糞数以外に他の指標を用いる可能性、また、視床背内側核と海馬や扁桃体の間の線維連絡に関するこれまでの研究結果について質問があった。これに対して、申請者は、radiofrequency 破壊は神経細胞を確実にかつ再現性よく破壊し、また境界は明瞭であり、出血や他の組織部位に対する損傷が見られず、妥当な方法と考えられること、また、今後、行動の指標としては、fear-potentiated startle を、自律神経の指標としては、血圧、心拍数などを用いて検討していきたいこと、さらに、視床背内側核と海馬との線維連絡はないが、視床背内側核と扁桃体との線維連絡はラットとサル両方において証明されていることを回答した。

この論文は視床背内側核が文脈的条件恐怖の獲得・発現過程において、重要な役割を果たしていることを証明した点で高く評価された。今後、行動薬理的、神経化学的研究への進展が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院研究科における研鑽と併せ、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。