

ストレス誘発行動からみたラットの情動システムの 発達と臨界期に関する研究

学位論文内容の要旨

ストレスに応答する脳内システムは生後発達の過程で形成されることから、幼児期に受けたストレスが、成長後における抑うつや心的外傷後ストレス障害などの精神疾患の背景となっている可能性が指摘されている。本研究は、ストレスが情動システム発達に与える影響を臨界期の点から明らかにすることを目的とし、ラット幼若期の異なった時期に曝露されたストレスが成長後における情動表出にどのような影響を与えるかについて、新奇環境ストレス、無条件恐怖および条件恐怖ストレスに対する行動学的応答性を指標として多角的に検討した。

幼若期ストレスとして、生後 2 週齢、3 週齢あるいは 6 週齢時に、嫌悪刺激である足蹠電撃ショック (FS ; 0.5mA、2 秒間、30 秒毎) を 1 日 5 回、自家繁殖した Wistar 系雄性ラットに 5 日間反復負荷した (FS 群)。成長後の認知機能、ならびに新奇環境、無条件恐怖あるいは条件恐怖ストレスに対する応答性の違いを明らかにするために、10 週齢時に、Y-maze 試験、Openfield 試験、Elevated plus-maze 試験および Contextual fear conditioning (CFC) 試験を実施し、対照群である FS(-) 群と比較検討した。また FS(-) 群、2 週齢時 FS 群および 3 週齢時 FS 群については、ストレス応答性を視床下部-下垂体-副腎 (HPA) 系の応答性から評価するために、CFC 試験前後の血中コルチコステロン濃度を測定した。さらに成長後の情動行動応答における幼若期ストレス負荷頻度依存性を検証するために、3 週齢時に FS を 1 日 3 回もしくは 5 回、5 日間負荷した群について、10 週齢時に Openfield 試験を行った。

10 週齢時における各 FS 群の体重推移については、幼若期の FS ストレス負荷時期に関わらず、FS(-) 群との間に有意差を認めなかった。認知機能を、注意力を背景とする短期記憶の評価系である Y-maze 試験を用いて評価した。等角度に位置する幅 10cm 壁 40 の 3 つの arm への進入回数を 8 分間測定した。FS(-) 群および各 FS 群の自発的交替行動率には有意差がみられず、認知機能については幼若時の FS ストレ

ス負荷による影響は認められなかった。

新奇環境ストレスに対する応答性について Openfield 試験を用いて評価した。縦横 90cm、壁高 40cm の装置内を 10cm 間隔で分割し、そのマス目を横切った回数を水平運動量として 30 分間測定した。FS(-) 群ならびに 2 週齢時 FS 群では、初めの 5 分間（探索期）での運動量が多く、その後（5-30 分；順応期）時間の経過とともに運動量が減少した。一方、3 週齢時ならびに 6 週齢時 FS 群では、FS(-) 群と比較して探索期での運動量が有意に低下し、その後の順応期では運動量の減少が認められず一定の運動量を維持した。また 3 週齢時に FS を 3 回負荷した 3WFS(3) 群では、5 回負荷した 3WFS(5) 群のような行動パターンの変化は観察されず、FS(-) 群に類似した行動パターンを示した。

無条件恐怖ストレスに対する応答性の評価には Elevated plus-maze 試験を用いた。床から 50cm の高さにある装置の壁のある enclosed arm と壁のない open arm への進入回数および滞在時間を測定した。FS 群では enclosed arm 滞在時間の減少傾向が、特に 3 週齢時 FS 群に強く認められた。また、3 週齢時 FS 群では総進入回数の増加傾向もみられた。

条件恐怖ストレスに対する応答性を CFC 試験によって評価した。10 週齢時に幼若期ストレスと同じ条件の FS を 5 回負荷し、24 時間後同じ環境に再曝露 (re-exposure) した時の行動変化を 30 分間観察した。Openfield 試験や Elevated plus-maze 試験の結果とは異なり、2 週齢時 FS 群でのみ re-exposure 時のすくみ行動発現率の低下がみられ、FS(-) 群および他の FS 群との間に有意差が認められた。

10 週齢時の CFC 試験前に測定した血中コルチコステロン濃度基礎値については、FS(-) 群および各 FS 群間に有意差はみられず、また、いずれの群も re-exposure によって基礎値と比較して有意の上昇を示した。しかし、FS(-) 群および 3 週齢時 FS 群では re-exposure 後の血中コルチコステロン濃度は基礎値の約 3~4 倍まで上昇したのに対して、2 週齢時 FS 群では基礎値の約 2 倍の上昇にとどまり、FS(-) 群との間に有意差が認められた。

自発運動量解析に用いられる Openfield 試験は時間的・空間的行動パターンを解析することにより、新奇環境下における不安や恐怖などの情動的側面を同時に解析できる評価系である。3 週齢時 FS 群にみられた時間的行動パターンの違いは新奇環境ストレスに対する情動応答の変化を示していると考えられる。Elevated plus-maze 試験においても、3 週齢時 FS 群では、総進入回数が FS(-) 群と比較し増加していたが相対的に増加するはずの enclosed arm 滞在時間が短縮傾向を示したことから、無条件恐怖に対する応答性が幼若期ストレスにより変化したこと、すなわち不安水準の低下が

推測された。環境に対して条件付けられた恐怖記憶を背景とした不安の評価系である CFC 試験に関しては、2 週齢時 FS 群においてのみ、すくみ行動の有意な抑制がみられた。これは条件恐怖に対する不安水準の低下を意味している。この CFC 試験における行動応答変化に一致して、2 週齢時 FS 群では、re-exposure 後の血中コルチコステロン値の上昇反応が FS(-) 群に比較して有意に減弱していた。これらの事実は、2 週齢時 FS 群では HPA 系を含む情動表出に関わる脳内システムに何らかの変化が生じた可能性を示唆している。

本研究で用いた幼若期ストレスとしての嫌悪刺激 FS は可変定量的な刺激であり、ストレスと行動応答との関連性を定量的に評価することが可能である。実際、Openfield 試験において FS 頻度に依存して行動パターンの変化がみられ、新奇環境ストレスに対する行動応答は幼若期ストレスの刺激強度に依存していることが明らかとなった。このような幼若期ストレスの種類、強さあるいは負荷時期による影響の違いが、本研究において認められた成長後のストレス誘発行動における多様性の背景になっている可能性がある。

以上の結果から、幼若ラットに対するストレス負荷は、成長後のストレスに対する情動応答を変化させることが明らかとなった。ストレスの種類や負荷時期に依存して多様な情動応答の変化が認められたことから、情動表出に関わる脳内システムには発達臨界期が存在することが示唆された。

学位論文審査の要旨

主査	教授	鈴木邦明
副査	教授	赤池忠
副査	教授	福島和昭
副査	助教授	白川哲夫
副査	助教授	富樫廣子

学位論文題名

ストレス誘発行動からみたラットの情動システムの 発達と臨界期に関する研究

審査は、全審査委員出席のもと行い、まず学位申請者に対して提出論文の内容の説明を求めた。学位申請者からは以下の内容の論述がなされた。

ストレスに応答する脳内システムは生後発達の過程で形成される。本研究は、ストレスが中枢機能発達に与える影響を臨界期の点から明らかにすることを目的とし、ラットの幼若期の異なった時期に曝露されたストレスが成熟後の情動表出に与える影響について、行動学的応答性を指標として検討を行った。

幼若期ストレスとして、生後2、3あるいは6週齢時に、嫌悪刺激である足蹠電撃ショック(FS)を5回、5日間、Wistar系雄性ラットに反復負荷した。10週齢時に成熟後の認知機能、ならびに新奇環境、無条件恐怖あるいは条件恐怖への曝露に対する応答性の違いを明らかにするために各種試験を実施し、対照群であるFS(-)群と比較検討した。また10週齢時、及びcontextual fear conditioning試験後に血中コルチコステロン濃度を測定した。さらにストレス負荷頻度の影響を調べるため、3週齢時のFS負荷を3及び5回とした群で10週齢時にopenfield試験を行い比較した。

認知機能を調べるY-maze試験ではFS(-)群および各FS群に有意差がみられず、幼若時のFSによる認知機能に対する影響は認められなかった。

新奇環境下における不安や恐怖を解析するopenfield試験では、FS(-)群ならびに2週齢時FS群では探索期の運動量が多くその後の順応期では減少したが、3週及び6週齢時FS群では探索期での運動量が有意に低下し、不安に対する応答の変化と考えられた。また3週齢時のFS3回負荷群は5回負荷群とは異なってFS(-)群に類似した行動パターンを示し、新奇環境ストレスに対する行動応答は幼若期の刺激頻度に依存することが示唆された。

無条件恐怖ストレスに対する応答性を調べるelevated plus-maze試験において、total arm entriesは3週齢時FS群では増加、6週齢時FS群で低下した。またtime spent in enclosed armではFS群に減少傾向がみられ、特に3週齢時FS群では強く認められた。この結果は、無条件恐怖に対する応答性が幼若期ストレスにより変化し不安水準が低下したことを示唆する。

条件恐怖ストレスを負荷するcontextual fear conditioning試験は記憶を背景とした不安水準を反映する。Re-exposure時に2週齢時FS群では他の群と比較してすくみ行動の発現が抑制され、恐怖条件に対する不安水準の低下を示した。10週齢時における血中コルチコステロンの基礎値はFS(-)群と各FS群において有意差は認められなかったが、re-exposure後の値はいずれの群も基礎値と比較し上昇した。しかしFS(-)群および3週齢時FS群は基礎値の3~4倍まで上昇したのに対して、2週齢時FS群では基礎値の約2倍の上昇にとどまり、FS(-)群との間に有意差が認められた。この結果は、freezingの抑制という行動の変化と一致し、2週齢時FS群はHPA系を含む情動表出に関わる脳内システムに変化が生じた可能性を示唆する。

以上の結果から、幼若ラットに対するストレス負荷は成熟後のストレスに対する情動応答を変化させることが明らかとなり、ストレスの種類や時期に依存して多様な情動行動の変化が認められたことから、情動表出に関わる脳内システムにはそれぞれの情動に応じた臨界期の存在することが示唆された。

以上の論述に引き続き、各審査委員より提出論文の内容ならびにそれに関連のある学術について口頭により質疑および試問が行われた。主な試問内容としては、

- 1) 実験条件の設定に関して、刺激の頻度及び強さ、ストレスのタイプおよび明暗環境と結果との関連、
- 2) 選択したストレス負荷時期と、ラットの脳内情報伝達系の発達との関連、
- 3) Elevated plus-maze 試験の結果の解釈について、
- 4) 条件恐怖ストレスにより2週齢で不安閾値が低下する理由について、
- 5) 実験結果とラットの情動発達の臨界期との関連について、
- 6) 用いた統計学的処理の妥当性

など、多岐にわたったが、いずれの質問に対しても学位申請者から適切かつ明快な回答が得られた。また、行動の解析から、セロトニン受容体および Fos タンパク質の発現等物質レベルへの解析を進めていく計画を持ち、今後の研究の方向性と将来の展望などについても明確な方針が示された。

本論文の内容は高いレベルにあり、今後のこの分野の研究の発展に大きく寄与するものと考えられた。加えて、試問の結果より学位申請者は専攻分野の専門領域のみならず関連分野についても十分な学識を有していることが認められた。従って、学位申請者は、博士(歯学)の学位を授与されるのにふさわしいと認められた。