

強制運動が恐怖条件付けと記憶に及ぼす影響

学位論文内容の要旨

緒言

歯科治療時に不快な思いや恐怖体験をすると、再度治療を受ける際にその不快な感情を想起してストレスを感じ、これが繰り返された場合や過度になった場合に歯科恐怖症を発症することがある。このような現象を条件付け学習と呼び、不快感や恐怖感を起こさせる刺激（無条件刺激）に対して、無条件刺激を受けたときの空間や音などの（条件刺激）を結びつけて記憶が形成され、条件刺激に対する連合学習が獲得される。恐怖条件付けは動物実験によっても再現することが可能で、連合学習のメカニズムに関する研究にしばしば用いられる。最近の研究により、全身運動と記憶の関係が注目されているが、全身運動を行うことにより、条件付け学習の獲得の変化や記憶のメカニズムの中のどの過程が修飾を受けるのか、またその神経機構はいかなるものであるのかなど不明な点が多い。そこで、本研究では回転ケージを用いて強制運動を行わせることにより運動負荷を定量的にラットに与え、その際の恐怖条件づけ学習の獲得と恐怖記憶の経時的変化について調べ、全身運動が記憶の形成と消去に与える影響とそのメカニズムの一端を明らかにすることを目的とした。

材料と方法

全ての実験は国立大学法人北海道大学動物実験に関する規定に従って行った。

1) 実験動物および飼育条件

Sprague Dawley 系雄性ラット（4 週齢）を用いた。飼育条件は室温 $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、相対湿度 $50 \pm 10\%$ 、照明条件は 12 時間明暗サイクル（点灯午前 7 時、消灯午後 7 時）とし、飼料は自由摂取とした。全てのラットにおいて飲水制限（脱イオン水、30 分/日）を行った。

2) 強制運動

強制歩行運動は、Rat Forced Exercise Walking Wheel System (Lafayette Instrument 社製) を用いて、運動群と非運動群の 2 群に分けて実験を行った。5 日間の強制歩行運動トレーニング（回転速度 9 m/分）を行い、10 分間継続して歩行できるものを運動群、できないものを非運動群とした。その後 2～5 週の各群の運動スケジュールを以下に示す。

運動群：1 週間毎に回転速度を 1m/分ずつ上昇させ、12～15 m/分、60 分/日、5 日/週で 4 週間、強制運動を行った。運動後は飼育ケージへ戻し飲水させた。

非運動群：回転運動をさせていない回転ケージ内に 10 分間入れた後、飼育ケージに戻し飲水させた。

3) 恐怖条件付け

運動群、非運動群の運動スケジュールが終了した 6 週目に、以下の方法で恐怖条件付けを行った。オペラントケージ (Medical Agent 社製, 32.5cm×32cm×35cm) の床に設置された、10mm 間隔の金属棒 (直径 3mm) に、スクランブル方式で電流を流すことにより、ラットの足底に、電気ショック (2.5 mA, 29 秒間) を与え、これを無条件刺激とした。条件刺激としてブザー音 (30 秒間) を用い、無条件刺激開始の 1 秒前から無条件刺激終了まで与えた。その後、30 秒間無音、無刺激の間隔をおき、上述と同様の刺激を再度行った。これを 5 回 (合計 5 分間) 繰り返し行った。運動群は恐怖条件付け後に強制運動 (15m/分, 60 分間) を行わせた後に飼育ケージに戻し飲水させた。非運動群は強制運動させずに回転ケージへの移動のみ行い飼育ケージに戻し、飲水させた。

4) すくみ行動試験

恐怖条件付け学習の獲得について評価するために、すくみ行動 (freezing) の解析 (すくみ行動試験) を以下の方法により行った。ラットをオペラントケージに入れ、条件刺激 (ブザー音, 30 秒間を 30 秒間隔で) を計 5 回与え、ラットの行動をビデオカメラにて撮影した。その後ビデオ映像から目視にて、ラットがすくみ行動をおこしている時間を 5 秒間毎 (合計 60 ブロック) で計測した。すくみ行動の基準は、グルーミングや探索行動などを起こさず、呼吸のみ行っている状態とした。すくみ行動試験は 1 日 1 回、4 日間行った。

5) 高架式十字迷路試験 (Elevated plus maze test)

ラットの不安度を測定するために高架式十字迷路試験を行った。高架式十字迷路装置は、地上より 110 cm の高さに設置された十字に交差する架橋からなり、架橋の幅は 10 cm、長さ 120 cm でありラットは自由に走行可能となっている。架橋の一つは高さ 30 cm のアクリル壁に囲まれた走行路 (クローズアーム) であり、もう一つの架橋は壁のない走行路 (オープンアーム) となっている。

恐怖条件付け 24 時間後、ラットをアームが交叉する中央部に設置した後 5 分間、ビデオカメラにて撮影し目視にて評価した。オープンアーム滞在時間を $0t$ (秒) とし、クローズアーム滞在時間を Ct (秒) として、ラットのオープンアーム滞在時間の割合 ($(0t/0t+Ct) \times 100 : \%$) とクローズアーム滞在時間の割合、オープン・クローズアーム進入回数を算出した。

結 果

4 日間すべてにおいて運動群のすくみ行動率の平均値は非運動群と比較してより小さい値となった。統計学的には、2 日目と 3 日目のすくみ行動試験において、非運動群と比較して運動群のすくみ行動率の有意な低下が認められたが ($P < 0.05$)、1 日目と 4 日目のすくみ行動に関しては、有意差が見られなかった。

これらの結果から、運動群、非運動群ともに1日目においてはほぼ同程度の恐怖記憶の獲得がなされており、その後の時間経過とともに差が生じたことを示している。

次に、運動群のすくみ行動率が非運動群よりも有意に低い値となった原因として、精神的不安度に違いがあるのではないかと考え、これを調べるために高架式十字迷路試験を用いてラットの不安度を評価した。

運動群と非運動群の間では、全ての項目において有意差は認められなかった。この結果から、恐怖条件付け後の不安度については、運動群と非運動群の間に差が無いことが示された。

考 察

4日間すくみ行動試験を行った結果、2日目と3日目において、非運動群よりも運動群のすくみ行動が有意に減少したことにより、強制運動を負荷したことで、恐怖記憶が減弱されたことが示唆された。また、この時、ラットに電気ショックを与えたことにより非運動群だけがより強い精神的不安を感じているような状態ではないことも明らかになった。

本研究と同様に強制運動をラットに負荷すると回避行動が有意に減少したという報告がある。その研究によると、強制運動群では背側縫線核と青斑核におけるノルエピネフリン濃度が上昇し、逆に海馬と扁桃体における5-HIAAの濃度が、コントロール群と比較して30%以上も低い値となることが示されている。本研究の運動群に観察された恐怖記憶の有意な減弱が生じたことと同じ方向の行動変化であり、上述のような記憶の制御因子が関与している可能性が考えられるが、今後それらの詳細を調べる必要がある。

また、本研究においては強制的運動を用いたが、自発的運動と比較してストレスマーカーであるヒートショックプロテイン(Hsp72)の増加がみられるとの報告がある。我々の用いた方法では、ラットに負担の少ない低速度(9m/分)から運動負荷を開始し、徐々に速度を上げて適応させたため、比較的ラットにとってストレスの少ない実験条件であったと考えている。高架式十字迷路試験の結果からも運動群と非運動群のいずれにおいても、恐怖条件付けを行うことによって不安度は増強されていなかった事が示され、以前の同様の研究結果と一致していた。

結 論

強制運動を負荷することにより、著しい精神的不安を伴わない程度の恐怖記憶に対してそれを減弱する効果がある可能性が示された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 八 若 保 孝
副 査 教 授 船 橋 誠
副 査 教 授 鈴 木 邦 明

学 位 論 文 題 名

強制運動が恐怖条件付けと記憶に及ぼす影響

審査は、審査担当者全員の出席の下に行われた。まず申請者に提出論文の概要の説明を求め、次いでその内容および関連分野について試問を行った。

審査論文の概要は以下の通りである。

歯科治療時に不快な思いや恐怖体験をすると、再度治療を受ける際にその不快な感情を想起してストレスを感じることがある。このような現象を条件付け学習と呼び、不快感や恐怖感を起こさせる刺激（無条件刺激）に対して、無条件刺激を受けたときの空間や音などの（条件刺激）を結びつけて記憶が形成され、条件刺激に対する連合学習が獲得される。最近の研究により、全身運動と記憶の関係が注目されているが、不明な点が多い。そこで、本研究では回転ケージを用いて強制運動を行わせることにより運動負荷を定量的にラットに与え、その際の恐怖条件づけ学習の獲得と恐怖記憶の経時的変化について調べ、全身運動が記憶の形成と消去に与える影響とそのメカニズムの一端を明らかにすることを目的とした。

SD 系雄性ラット（生後 4 週齢）を用い、すべてのラットに 23.5 時間/日の飲水制限下にて、以下の実験群に分けて実験を行った。運動群：4 週間の強制運動（回転速度 12~15 m/分、60 分/日、5 日/週で回転ケージ内を歩行）させた群、非運動群：運動はさせず回転ケージ内に 10 分間入れた後飼育ケージに戻した（4 週間）群、において運動スケジュール終了後に恐怖条件付けを行った。恐怖条件付けはオペラントケージ(Medical Agent 社製)を用いて条件刺激をブザー音 30 秒、無条件刺激を足底への電気刺激(2.5 mA、29 秒、5 回/5 分)として行った。その後恐怖条件付け学習の獲得について評価するために、条件刺激(ブザー音)に対するすくみ行動を解析した。また、運動群と非運動群の精神的不安度に差が無いかを調べるために、高架十字迷路試験を用いて評価を行った。恐怖条件付け 24 時間後、ラットをアームが交叉する中央部に設置した後 5 分間、ビデオカメラにて撮影し目視にて評価した。オープンアーム滞在時間を Ot (秒) とし、クローズアーム滞在時間を Ct (秒) として、ラットのオープンアーム滞在時間の割合 ($(Ot/Ot+Ct) \times 100 : \%$) と、オープンアーム

進入回数を算出した。

4 日間すべてにおいて運動群のすくみ行動率の平均値は非運動群と比較してより小さい値となった。1 日目と 4 日目に関しては有意差を認めなかったが、運動群の 2 日目($11.7\% \pm 3.8$, $n=5$)と 3 日目($0.3\% \pm 0.3$, $n=5$)に対して非運動群では 2 日目($42.7\% \pm 5.1$, $n=5$)、3 日目($22.7\% \pm 7.9$, $n=5$)であり、非運動群と比較して運動群のすくみ行動率の有意な低下が認められた。次に、運動群のすくみ行動率が非運動群よりも有意に低い値となった原因として、精神的不安度に違いがあるのではないかと考え、これを調べるために高架式十字迷路試験を用いてラットの不安度を評価した。運動群と非運動群の間では、全ての項目において有意差は認められなかった。この結果から、恐怖条件付け後の不安度については、運動群と非運動群の間に差が無いことが示された。

本研究の結果から、恐怖条件付けを行ったラットに強制運動を負荷することで、恐怖記憶が減弱されたことが示された。また、この時運動群と非運動群において精神的不安度に差が無いことも示唆された。以上により、全身運動を行うことによって、恐怖記憶などの不快な記憶が減弱される可能性が示された。

口頭試問では、本論文の内容とそれに関連した学問分野について質疑応答がなされた。主な質問事項は、

1. 強制運動に関して、ラットにとっての速度と運動群、非運動群の振り分けについて
2. 電気ショックに関して、刺激強度および刺激時のラットの様子について
3. すくみ行動の説明および評価の基準点について
4. 条件反応消去に関して、結果の解釈とヒトへの応用について
5. 高架式十字迷路試験の評価方法、今回の結果について
6. 強制運動を行った際の、体内の生理的動態について
7. 本研究に対する今後の展望について

などであった。

上記の質問に対して、申請者から適切かつ明快な回答が得られた。審査担当者との質疑応答を通して、申請者が本研究ならびに関連分野に対する理解が十分になされており、幅広い知識を有していることが明らかになった。また、研究内容に関して今後のさらなる発展が期待された。

以上の審査により、審査担当者全員において、本研究が学位論文に十分に値し、申請者は博士（歯学）の学位を授与する十分な学識・資質を有していることが認められた。