

マウスの行動および前部帯状回シナプス機能に与える
慢性ストレスの影響

**The effects of chronic stress on behavior and synaptic function
in the anterior cingulate cortex in mice**

伊藤 浩志

目次	
略語表	4
第1章 序論	
1-1. 帯状回とは	5
1-2. 前部帯状回	5
1-2-1. 前部帯状回の2つの領域	5
1-2-2. 情動領域の機能	5
1-2-3. 認知領域の機能	6
1-3. ヒトを含む霊長類とげっ歯類の前部帯状回の比較	7
1-4. 前部帯状回とストレス	8
1-4-1. 前部帯状回とストレス	8
1-4-2. ストレスによる前部帯状回シナプス可塑性の変化	10
1-4-3. 慢性ストレスによるげっ歯類の行動変化	11
1-5. 前部帯状回の左右非対称性	12
1-6. 先行研究の問題点	13
1-7. 本研究の目的	14
第2章 実験方法	
2-1. 試薬	17
2-2. 使用動物と慢性拘束ストレス負荷実験	17
2-3. 行動実験	18
2-3-1. 行動実験の概要	18
2-3-2. オープンフィールドテスト	18
2-3-3. 明暗選択テスト	18
2-3-4. 恐怖条件付けテスト	19
2-4. 電気生理学のおよび薬理学的実験	19
2-4-1. 前部帯状回スライスの作成	19
2-4-2. 細胞外電位記録法によるフィールド興奮性シナプス後電位 (fEPSP) の解析	20
(i) Input-output relationship の測定	20
(ii) Half width の測定	21
(iii) Paired-pulse ratio (PPR) の測定	21
(iv) fEPSP の NMDA 受容体由来成分の測定	21

(v) 長期増強 (LTP) の測定.....	21
(vi) 長期抑圧 (LTD) の測定.....	22
(vii) ドーパミンによる興奮性神経伝達の修飾作用.....	22
2-4-3. ホールセルパッチクランプ法による解析.....	22
(i) 微小シナプス後電流 (mPSC) の測定.....	22
(ii) 興奮性シナプス後電流 (EPSC) の測定.....	24
(iii) NMDA 受容体由来興奮性シナプス後電流 (EPSC) の測定.....	24
2-5. 統計処理.....	24
第3章 実験結果	
— 個体および前部帯状回に対する慢性拘束ストレスの影響 —	
3-1. 体重・副腎・胸腺の重量変化.....	25
3-2. 行動実験の解析結果.....	25
3-2-1. 行動の多動化.....	25
3-2-2. 不安様行動の変化.....	25
3-2-3. すくみ行動の減少.....	25
3-3. シナプス伝達への影響.....	26
3-3-1. fEPSP における input-output relationship の測定結果.....	26
3-3-2. fEPSP での half width の拡大.....	26
3-3-3. 微小抑制性シナプス後電流 (mIPSC) 頻度の減少.....	27
3-3-4. 微小興奮性シナプス後電流 (mEPSC) の測定結果.....	27
3-4. シナプス短期可塑性への影響.....	28
3-4-1. fEPSP の PPR 増加.....	28
3-4-2. EPSC の PPR 増加.....	28
3-4-3. NMDA 受容体由来EPSC の測定結果.....	29
3-5. シナプス長期可塑性への影響.....	29
3-5-1. LTP の増強.....	29
3-5-2. LTD の促進.....	30
3-6. 興奮性シナプス伝達に対するドーパミン修飾作用の低下.....	30
3-7. GABA 神経系機能低下の左右非対称性.....	31
第4章 考察	
— 慢性拘束ストレスが個体および前部帯状回に与える影響 —	
4-1. 本研究の意義.....	33

4.2. 体重の減少・副腎肥大・胸腺の萎縮.....	34
4.3. 行動の多動化とすくみ行動の減少.....	34
4-3-1. 行動の多動化.....	34
4-3-2. 多動化・すくみ行動の減少と GABA 神経系機能低下の関連.....	35
4-3-3. 行動変化とドーパミン反応性低下の関連.....	36
4-3-4. 他の脳機能関与の可能性.....	38
4.4. シナプス可塑性の増大.....	38
4-4-1. GABA 神経系の機能低下.....	38
4-4-2. 短期可塑性の増大.....	39
4-4-3. 興奮性シナプス伝達に対する影響.....	40
4-4-4. 長期可塑性の増大.....	41
4.5. シナプスレベルで検出された脳機能の左右非対称性.....	42
4.6. 結語.....	44
参考文献.....	45

略語表

ACC : anterior cingulate cortex 前部帯状回

ACSF : artificial cerebrospinal fluid 人工脳脊髄液

CGP 55845 :
(2S)-3-[[[(1S)-1-(3,4-Dichlorophenyl)ethyl]amino-2-hydroxypropyl](phenylmethyl)phosphonic acid

CRS : chronic restraint stress 慢性拘束ストレス

D-APV : D-(-)-2-Amino-5-phosphonovaleric acid

DNQX : 6,7-dinitroquinoxaline-2,3(1H,4H)-dione

EPSC : excitatory postsynaptic current 興奮性シナプス後電流

fEPSP : field excitatory postsynaptic potential フィールド興奮性シナプス後電位

GABA : γ -aminobutyric acid

GR : glucocorticoid receptor

IL : infralimbic cortex 下辺縁皮質

IPSC : inhibitory postsynaptic current 抑制性シナプス後電流

K-S test : Kolmogorov-Smirnov test

LTD : long-term depression 長期抑圧

LTP : long-term potentiation 長期増強

mEPSC : miniature excitatory postsynaptic current 微小興奮性シナプス後電流

mIPSC : miniature inhibitory postsynaptic current 微小抑制性シナプス後電流

mPFC : medial prefrontal cortex 前頭前野内側部

mPSC : miniature postsynaptic current 微小シナプス後電流

NCAM : neural cell adhesion molecule 神経細胞接着分子

NMDA : *N*-methyl-*D*-aspartate

PFC : prefrontal cortex 前頭前野

PL : prelimbic cortex 前辺縁皮質

PPR : paired-pulse ratio

TTX : tetrodotoxin テトロドトキシン

第1章 序論

1-1. 帯状回とは

辺縁系に属する帯状回 (cingulate cortex) は、脳梁の背側を取り囲む前後に長い大脳皮質領域である。解剖学的に神経線維投射が異なっていることから、前部帯状回 (ACC: anterior cingulate cortex) と後部帯状回 (posterior cingulate cortex) に分けられている (Vogt *et al.*, 1992)。機能的には、ACCは扁桃体 (amygdala) と密接な双方向の線維連絡があることなどから、情動および情動が関与する身体運動との関連が強い部位とされる。後部帯状回は海馬傍回皮質 (parahippocampal cortex) との線維連絡があり、空間認知や記憶などへの関与が示唆されている。本研究のテーマは、ストレスによる情動関連脳部位の機能変化、および行動変化を解析することにある。よって今後は、情動、および情動が関わる身体運動との関連が強いとされる ACC 機能の説明に焦点を絞ることとする。

1-2. 前部帯状回

1-2-1. 前部帯状回の2つの領域

ヒトを含む霊長類では、細胞構築学的に Brodmann の 24a-c 野、24a' -c' 野、25 野、32 野、32' 野、33 野からなる領域を ACC としている。第IV層を欠き、第V層が発達しており、第III層の錐体細胞が大きいことが特徴である。現在では神経線維の入出力や機能から、霊長類の ACC は情動領域 (吻側の 24a-c、32 野、腹側の 25、33 野) と認知領域 (24a' -c'、32' 野) に分けられている。ヒト ACC の機能区分と領域区分を図 1-1 に示す。

1-2-2. 情動領域の機能

情動領域は脳梁より前方に位置している。扁桃体、中脳水道周囲灰白質 (periaqueductal gray)、線条体 (striatum)、視床下部 (hypothalamus)、海馬 (hippocampus)、眼窩前頭皮質 (orbitofrontal cortex) など、情動に重要な役割を果たす脳領域との線維連絡がある (Bush *et al.*, 2000)。

ヒトで ACC に損傷を受けると、無動性無言症、感情鈍麻、痛覚鈍麻などの情動性変化が起こることから、この領域が情動に関わることは早くから知られていた。精

神疾患の治療として 24 野に限定した摘出手術が行われ、強迫性障害、不安障害、攻撃的な性質が改善される一方、人格全般、知性は影響を受けないとの報告が 1950 年代ころからなされている (Vogt *et al*, 1992)。情動領域の特徴は、扁桃体との強力な線維連絡があることにある。健康な成人女性を対象とした Positron emission tomography (PET) を使った実験によると、「悲しい状態」では 25 野の血流量が増加する一方、扁桃体の血流量は減少、「幸福な状態」では 25 野の血流量が減少、扁桃体の血流量は逆に増加することが報告されている (George *et al*, 1995)。このことから ACC 情動領域と扁桃体は、相互に関連し、情動のバランスを調節している可能性が示唆されている。またラット前頭前野内側部 (mPFC: medial prefrontal cortex) のうち下辺縁皮質 (IL: Infralimbic cortex) を破壊し、無条件刺激として電気ショック、条件刺激として音刺激を加え、恐怖条件付けテストを行ったところ、IL 損傷ラットはコントロール群と比較し、有意にすくみ行動が減少した。同時に自律神経系への関与の指標として計測した呼吸数は増加、情動に関わる体内状態の表出に関連するとされる超音波発声はほとんどみられなくなった (Fryszak and Neafsey, 1991)。25 野への電気刺激で、血中のグルココルチコイド濃度が有意に上昇したとの報告があり、情動領域は内分泌系の制御にも関わっているとされる (Dunn, 1990)。

これらのことから ACC 情動領域の活動は、自律神経系、内分泌系の制御に関与、情動に関する生体の内外からの情報を評価、学習し、身体運動を含む情動反応を制御している可能性が強く示唆される (Devinsky *et al*, 1995; Bush *et al*, 2000)。

1-2-3. 認知領域の機能

認知領域は、情動領域の後方にある。情動領域と異なり、扁桃体との線維連絡は乏しい。内側視床核 (medial thalamic nuclei) から痛覚情報を受け取っている。痛覚情報は、反応の選択と認知過程に関与していると考えられている。また運動関連脳領域との関係が深く、前頭前野背外側部 (dlPFC: dorsolateral prefrontal cortex)、一次運動野 (primary motor cortex)、前運動野 (premotor area)、補足運動野 (supplementary motor area) と相互に線維連絡があり、脊髄 (spinal cord)、赤核 (red nucleus) に投射している (Devinsky *et al*, 1995; Bush *et al*, 2000)。

この領域の機能を調べるヒトを使った実験では、ストループテストがよく行われる。例えば、青色で書かれた「あか」や、赤色で書かれた「あお」の色を答えさせ、誤答数と時間を記録する課題である。このとき言葉の意味が色の認知を阻害し、正しく色を答える反応が遅くなる認知的葛藤現象が生じる。ACC に近接した頭皮に脳

波電極をつけ、課題実行中の電位を記録すると、被験者が正しく色を答えられなかった場合、誤差関連陰性電位 (ERN: error-related negativity) と呼ばれる刺激提示から 100 ミリ秒後にピークを持つ陰性の大きなふれが現れる。この現象は、dIPFC と ACC 認知領域相互の活動によって発生すると考えられているが、課題処理のスピードが上がるとこの ERN の振幅が小さくなることが知られている (Gehring *et al*, 1993)。また間違った反応をして報酬がもらえない場合の方が、エラーをして罰を受ける場合より ERN の振幅が大きくなるとの報告がある (Dikman *et al*, 2000)。これらのことから、モチベーションがエラーの発見に影響を与えていることが示唆される。そのほか、行動抑制の障害とされる注意欠陥多動性障害 (ADHD) の患者は ACC に異常があることが指摘されており、ストループテストの実行中、認知領域の血流量が低下していることが fMRI を用いた実験で示されている (Bush *et al*, 2005)。

このように認知領域は運動開始前の段階で、競合する情報、またはエラー情報をモニターし、行動の必要性や正しい反応パターンなどを選択、目的に叶った身体活動を行うための情動的認知過程に深く関わっていると考えられている (Devinsky *et al*, 1995)。

1-3. ヒトを含む霊長類とげっ歯類の前部帯状回の比較

げっ歯類の mPFC は霊長類のように十分に発達しておらず、正確な機能区分は明らかになっていない (Cardinal *et al*, 2002; Uylings *et al*, 2003; Seamans *et al*, 2008)。Seamans らは細胞構築学的な知見などから、げっ歯類 mPFC のうち、ACC、前辺縁皮質 (PL: prelimbic cortex)、IL が、霊長類の ACC および ACC と線維連絡のある dIPFC を合わせた機能を持っているとしている (Seamans *et al*, 2008)。Holmes らは、ストレス応答の観点からげっ歯類と霊長類の前頭前野 (PFC: prefrontal cortex) には機能的に共通点が多いと指摘する (Holmes and Wellman, 2009)。

生物種間の皮質領域の相同性を比較する上で重要なのは、①細胞構築学的な特徴、②他の領域との線維連絡の特徴と密度、③神経伝達物質とその受容体の分布、④胚発生、⑤機能の特徴、の5つとされる (Uylings *et al*, 2003)。以下、①から③について指摘する。

細胞構築学的には、げっ歯類 mPFC は霊長類 ACC と同様、IV層を欠いている (Seamans *et al*, 2008)。げっ歯類 mPFC と霊長類の PFC は解剖学的には、①他の皮質と比べ、痛覚情報を伝達する視床背内側核 (medial dorsal nucleus) との相互連絡が

密な皮質である、②PFC から線条体への投射があり、基底核 (basal ganglia) の出力核から視床を介して PFC へと戻る大脳皮質-基底核ループ (Cortico-basal ganglia loop) の組織分布が似通っている、③扁桃体との相互連絡がある、などが共通している (Uylings *et al*, 2003)。またドーパミン神経系の入出力関係は、生物種間で解剖学的に似ているとされるが、げっ歯類と霊長類の mPFC は、ドーパミン作動性ニューロンを投射する腹側被蓋野 (VTA: ventral tegmental area) と相互連絡がある点で共通している。(Paus, 2001; Uylings *et al*, 2003; Seamans *et al*, 2008)。青斑核由来のノルアドレナリン線維、背側および正中縫線核由来のセロトニン線維の投射先は広範な皮質領域に及ぶが、相互連絡があるのはラット、霊長類ともに PFC のみである (Uylings *et al*, 2003)。

以上からげっ歯類 mPFC と霊長類 ACC は相同性が高く、げっ歯類を用いた動物実験によって、ヒト ACC の機能を解明する上で重要な知見が得られるものと思われる。マウス全脳と ACC の領域を図 1-2 に示す。先行研究では、ACC、PI、IL と対象領域を細かく分類したものから、単に mPFC または PFC と表記するものまでさまざまである。本論文での表記は、本研究では ACC、それ以外は基本的に原著論文の表記に従った。

1-4. 前部帯状回とストレス

1-4-1. 前部帯状回とストレス

刺激に対する情動反応を制御し、適切な行動を選択する情動的認知過程に関与している ACC は、ヒトおよび動物の生存に必須な報酬 (食物など) と嫌悪刺激 (外敵など) に対する評価と、それに基づく行動発現に重要な領域といえる。このことは、ACC が環境の変化、すなわちストレスに対して敏感に反応する領域であることを物語っている。ラットを用いたグルココルチコイド投与実験では、コントロールとしてごま油を皮下注射しただけで ACC 第 II/III 層錐体細胞の樹状突起にリモデリングが起きたことが報告されている (Wellman, 2001)。海馬での同種の実験では、CA3 錐体細胞の樹状突起に形態学的な変化は起きていない (Woolley *et al*, 1990)。このことから mPFC は他の脳領域に比べ、ストレスの影響を受けやすいことが示唆される (Wellman, 2001; Holmes and Wellman, 2009)。

実際、脳機能画像研究や死後脳研究によって、ストレスが発症に関与する多くの精神疾患では、ACC の形態や機能に変化がみられることが報告されている。うつ病

患者では体積の減少、神経機能を反映するグルコース代謝の低下、グリア細胞の数と密度の減少が報告され、うつ病の責任領域として ACC が注目されている (Drevets *et al*, 2008)。ACC の体積減少は、パニック障害、心的外傷後ストレス障害 (PTSD) などでも報告がある (Damsa *et al*, 2008)。情動・認知・意欲に障害が出る統合失調症においても、機能的関連から ACC が注目され、体積減少が他の領域に比べ顕著であることや、ドーパミン D2 様受容体が存在する抑制性 GABA 介在ニューロンの減少が報告されている (Benes *et al*, 1991; Khan *et al*, 1998; Yamasue *et al*, 2004)。

げっ歯類でも、ACC を含む mPFC はストレスの影響を受けやすい部位であることが知られている。多くのストレス負荷実験により、げっ歯類 mPFC で最初期遺伝子 (immediate early gene) である c-fos mRNA や c-Fos タンパク質が顕著に発現することが報告されている (Ryabinin *et al*, 1995; Matsuda *et al*, 1996; Yokoyama and Sasaki, 1999; Hsu *et al*, 2007)。ラットに慢性的なストレスを加えたところ、mPFC (ACC、PL) の体積が減少、または錐体細胞の樹状突起先端部の萎縮および分枝の数が減少したとの報告が多数なされている (Cook and Wellman, 2004; Radley *et al*, 2004; Brown *et al*, 2005; Cerqueira *et al*, 2007a; Cerqueira *et al*, 2007b)。

慢性的なストレスによる ACC の形態変化は、グルココルチコイド血中濃度の上昇との関連が示唆されている。ラットへの 3 週間のグルココルチコイド皮下注射で、mPFC 第 II/III 層錐体細胞の樹状突起にリモデリングが起きているからである (Wellman, 2001)。

動物実験の結果から、mPFC にはグルココルチコイド受容体 (GR : glucocorticoid receptor) が豊富に存在しており (Ahima and Harlan, 1990; Patel *et al*: 2000)、mPFC は海馬とともにストレス応答系である視床下部-脳下垂体-副腎皮質系 (HPA 軸: hypothalamo-pituitary-adrenal axis) の制御に関与していると考えられている (図 1-3)。たとえば、①両側の ACC および IL を破壊したラットは、20 分の拘束ストレス負荷後に増加した血中グルココルチコイド濃度の正常値への戻りがコントロール群に比べ有意に遅かった。また正常なラットの ACC および IL にグルココルチコイドを直接投与した後に拘束ストレスを加えたところ、グルココルチコイドの血中濃度上昇が、コントロール群に比べ有意に抑制された (Diorio *et al*, 1993)、②ストレスによるグルココルチコイド血中濃度上昇に抑制をかけるネガティブフィードバックは、HPA 軸制御部位での GR のダウンレギュレーションが原因で機能不全が起きるとされるが、1 日 2 時間、4 週間の拘束ストレス負荷で、ラット PFC で細胞質中の GR タンパク質および mRNA 発現量が低下するとともに、PFC へのデキサメタゾン (合

成グルココルチコイド) 直接投与によるグルココルチコイド血中濃度抑制作用が低下したと報告されている (Mizoguchi *et al*, 2003)。このように ACC を含む mPFC は HPA 軸の制御に関与し、ストレスによって mPFC による制御機能が低下する可能性が強く示唆されている。

ストレスによって形態変化や HPA 軸の制御不全が起きることから、ストレスが ACC 内での神経伝達物質の放出と分子レベルでのシグナル伝達にも影響を与えることが予想される。ラットの実験では、急性ストレスで PFC のドーパミンおよびグルタミン酸の放出量は増加するが (Moghaddam and Jackson, 2004)、4 週間の慢性ストレス負荷ではドーパミン放出量が減少、ドーパミン D1 様受容体は増加することが報告されている (Mizoguchi *et al*, 2000)。PFC のグルタミン酸の放出量は一過性のストレスでは増加するが、2 時間半間隔で 3 回ストレスを負荷すると増加しないことが示されている (Moghaddam, 2002)。グルココルチコイドの慢性投与で PFC のセロトニン放出量は低下 (Luine *et al*, 1993)、1 週間のストレス負荷により PFC の第 V 層錐体細胞においてセロトニンで誘発される細胞シナプス後電流 (EPSC) が減少することが報告されている (Liu and Aghajanian, 2008)。

このような先行研究から、ヒト ACC およびげっ歯類 mPFC はストレスの影響を受けやすい領域と考えられる。

1-4-2. ストレスによる前部帯状回シナプス可塑性の変化

慢性的なグルココルチコイド投与によって、ラット PFC でシナプス構造の安定性に関与する神経細胞接着分子 (NCAM: neural cell adhesion molecule) の発現量が低下することが報告されている (Sandi and Loscertales, 1999)。このことは、慢性ストレスによってシナプス可塑性に変化が生じる可能性を示唆している。

ストレスが ACC のシナプス可塑性に与える影響については、ACC が痛覚情報を伝達する視床背内側核 (medial dorsal nucleus) との相互連絡が密なことなどから、動物実験では痛みに伴う情動の変化に焦点を当てた研究が進んでいる。①ラットの足指切断後には ACC 第 II/III 層で長期抑圧 (LTD: long-term depression) が起きなくなること (Wei *et al*, 1999)、②炎症による慢性的な痛みによって ACC の NMDA NR2B 受容体の発現量が増加すること (Wu *et al*, 2005)、③NMDA NR2B 受容体を過剰発現させたマウスでは ACC での NMDA NR2B 受容体を介したシナプス反応が増大するとともに痛み刺激に対する感受性が高まる (Wei *et al*, 2001) ことから、慢性的な痛みによる不快感および痛み増大には ACC 興奮性ニューロンの過活動が関与している

可能性が示唆されている (Zhuo, 2006)。但しこれらの研究は、すべてトロント大学 Zhuo らの一グループによるものである。

痛み刺激以外のストレスでは、急性の高所ストレスや慢性軽度ストレス負荷で、mPFC 錐体細胞の長期増強 (LTP: long-term potentiation) が起こらなくなることが報告されている (Cerqueira *et al*, 2007a; Jay *et al*, 2004; Mailliet *et al*, 2008; Maroun and Richter-Levin, 2003)。

1-4-3. 慢性ストレスによるげっ歯類の行動変化

慢性的なストレスをマウスやラットに加えることで、情動に関連した行動に変化が出るということが知られている。

1日6時間、21日間の拘束ストレスをラットに加えることで、オープンフィールドテストで活動量が低下、高架式十字迷路テストでは不安様行動が増加、恐怖条件付けテストにおけるすくみ行動が増加することが報告されている (Conrad *et al*, 1999; Wood *et al*, 2004)。1日2時間、10日間の拘束ストレス負荷でも、恐怖条件付けテストでラットのすくみ行動は増加した (Wood *et al*, 2008)。ストレスに適応しないようストレスの種類を変える慢性軽度ストレス (chronic mild stress) を28日間マウスに加え続けた実験では、オープンフィールドテストで活動量は低下、明暗選択テストで不安様行動が増加している (Strekalova *et al*, 2004)。

以上は、主としてヒトのうつ病や PTSD などの不安障害を想定したストレス負荷実験であり、慢性軽度ストレスは、学習性無力 (learned helplessness) とともにうつ病の動物実験モデルとされる (Palanza, 2001; Cryan *et al*, 2004)。活動量が低下する拘束ストレスも、頻繁に用いられるうつ病モデル (筆者注: 抑うつモデル) とされる (Palanza, 2001)。

しかし慢性ストレスによって、必ずしも実験動物の活動量が減少、不安様行動が増加するとは限らない。特にマウスの場合、慢性軽度ストレスによる行動変化はしばしば実験結果が異なり、うつ病のモデルとしての信頼性は確立していない (Cryan *et al*, 2004; Mineur *et al*, 2006)。Mineur によると、同じ条件でストレスを加えても、系統と性別、行動実験の種類によって実験結果が異なるという。3系統のマウス、C57BL/6J、BALB/cJ、DBA/2J のオスとメス2カ月齢に4週間の慢性軽度ストレスを加え、うつ病の評価モデルとして使用頻度が高い強制水泳テストを行ったところ、ストレスを加えた C57BL/6J のオスと DBA/2J のメスは不動時間が増加したが、他の系統、性別ではコントロール群と有意差はなかった (Mineur, 2006)。オープンフィ

ールドテストでは C57BL/6J と DBA/2J のメスでのみストレスによって活動量が増加、明暗選択テストでは BALB/cJ のオスとメス、DBA/2J のオスではストレスで不安様行動が増加したが、それ以外の系統、性別ではコントロール群と有意差はなかった (Mineur, 2006)。離乳直後から個別飼育を行うストレス実験、social isolation では、総じて活動量が増加することが知られている (Lapiz, 2003)。拘束ストレスでは、若年期 (6 - 8 週齢) のラットの方が成熟したラット (10 - 12 週齢) より胃潰瘍が出来やすく、休息期 (明期) より活動期 (暗期)、秋から冬にかけての方が冬から夏にかけてより胃潰瘍が出来やすいとされる (Glavin, 1994)。実験動物の種や系統、性別、ストレスの種類、ストレスを加える週齢、期間や季節、行動実験の種類などによって、ストレスによるげっ歯類の行動変化は異なってくるといえる。

1-5. 前部帯状回の左右非対称性

mPFC に対するストレス反応には、左右差があることが報告されている。

形態学的には、21 日間の拘束ストレスによって、ラットの左 ACC 第 III 層錐体細胞の先端樹状突起が右 ACC 第 III 層に比べ有意に萎縮することが示されている (Perez-Cruz *et al*, 2007)。コントロール群では左右差はなかったという。Czéh によると、成熟したラット mPFC で新生する細胞のほとんどはグリア細胞であるが、右 ACC に比べ左 ACC で有意に多くグリア細胞が新生する。5 週間ストレスを負荷すると、ACC 両側のグリア細胞新生数は減少するものの、右 ACC での減少は少なく、両側での新生数に有意差がなくなった (Czéh *et al*, 2008)。また ACC、PL、IL を含めた mPFC 全体では、コントロール群では左 mPFC で有意にグリア細胞の新生が起こるが、5 週間のストレス負荷で左右の新生数が逆転、右 mPFC で有意にグリア細胞が新生することが報告されている (Czéh *et al*, 2007)。

ストレスに対する自律神経系、内分泌系、および神経生化学的な反応にも、mPFC 機能の左右差が関与していることが報告されている。ラット右 mPFC (ACC、PL および IL) を損傷させ、5 日間の拘束ストレス後に 20 分の拘束ストレスを加えると、コントロール群および左 mPFC 損傷ラットに比べグルココルチコイドの血中濃度の上昇が有意に抑制され、寒冷化 (4°C) での 2 時間半の拘束ストレスによる胃潰瘍の発生頻度が有意に低下した (Sullivan and Gratton, 1999)。学習性無力 (learned helplessness) によって、ラット mPFC でのドーパミン代謝回転が、左脳に比べ右脳で有意に低下している (Carlson *et al*, 1993)。ラット右 mPFC (ACC、PL および IL)

のドーパミンニューロンを 6-hydroxydopamine により損傷させると、コントロール群および左 mPFC 損傷ラットと比べ有意にストレス性胃潰瘍ができやすくなる (Sullivan and Szechtman, 1995)。

このように形態学的には、mPFC ではストレスにより左 ACC 錐体細胞の樹状突起が右 ACC に比べ有意に萎縮、グリア細胞の新生数は通常とは左右差が逆転、左脳に比べ右脳で有意に増加するようになることが報告されている。右 mPFC 損傷により、ストレスによるグルココルチコイド血中濃度上昇が左 mPFC 損傷に比べ有意に抑制され、ストレス性胃潰瘍ができにくくなること、ストレスによるドーパミン代謝回転の低下率が右 mPFC で有意に低下するなど、ストレスに対する内分泌系、自律神経系、神経生化学的な反応にも mPFC で左右差があることが報告されるようになり、ストレスに対する PFC 機能の左右非対称性が注目され始めている (Sullivan and Gratton, 2002a; Czéh *et al.*, 2008)。

1-6. 先行研究の問題点

ACC は 1-4-1 で指摘したようにストレスの影響を受けやすく、うつ病やパニック障害、PTSD などの不安障害、統合失調症といったストレスが関連する精神疾患において特徴的な変化がみられる部位である。ストレスによる ACC の機能変化解明は、疾患発症の原因解明、治療法の開発にとって重要な役割を果たすと考えられる。

動物のストレスモデルを用いた先行研究は、海馬を中心に扁桃体などでも進められている (McEwen, 1994; de Kloet *et al.*, 1999; LeDoux, 2000; Lapiz, 2003; Govindarajan *et al.*, 2006; Diamond *et al.*, 2007)。しかし、ストレスが ACC を含む mPFC にどのような影響を与えるかについて着目した研究は少ない (Maroun, 2003; Charney and Manji, 2004; Cerqueira *et al.*, 2007a)。またそれらの研究の多くは形態学的、もしくは神経生化学的な解析に留まっており (1-4-1 参照)、ストレスによる ACC のシナプス可塑性の変化に関する知見は、Zhuo らのグループによる慢性的な痛みに伴う情動変化の研究など、一部に限られている (1-4-2 参照)。また PFC は扁桃体、線条体との相互連絡があることなどから、情動および報酬に関わる行動がストレスにより変化している可能性がある (Holmes and Wellman, 2009)。Cerqueira らはラットを用いた実験で、海馬刺激により IL で誘発される EPSP の LTP が慢性軽度ストレスモデルにおいて起こらなくなるとともに、ワーキングメモリーおよび行動の柔軟性が低下することを示している (Cerqueira *et al.*, 2007a)。Zhuo らのグループは、慢性的な痛み刺激をマウ

スの後肢に与えることで、ACC 第 II/III 層におけるシナプス前終末からのグルタミン酸放出確率が増加するとともに、恐怖条件付けテストにおいてすくみ行動が減少することを報告している (Zhao *et al*, 2006)。ストレスによる mPFC シナプス可塑性と行動変化の相関を解析した研究は、これら少数に限られている。

一方、脳機能の左右差について分子レベルで確認した事例としては、マウス海馬のシナプスにおける NMDA 型グルタミン酸受容体サブユニット分布に関し機能のおよび構造的な左右非対称性が存在することを明らかにした Kawakami らの研究に限られている (Kawakami *et al*, 2003; Wu *et al*, 2005)。mPFC に関しては、内分泌学的、神経生化学的、および形態学的に脳の非対称性を確認した報告はあるが、機能的な左右差をシナプスレベルで明らかにした研究はこれまでなかった。

1-7. 本研究の目的

本研究の目的は、慢性ストレスによる情動行動の変化、および情動に関わる脳部位の機能変化をシナプスレベルで解析することにある。ACC はストレスに対して脆弱で、うつ病、不安障害、統合失調症などストレスが関連するヒトの精神疾患で体積減少などが報告されている。げっ歯類では、ストレスによる行動変化に ACC が関与しているとの報告がある。にもかかわらず、慢性ストレス負荷を行った上で、行動の変化とそれと関連したニューロン機能の変化をシナプスレベルで解析した研究は、これまでほとんど行われてこなかった。そこで本研究では、ACC に焦点を絞ることにした。

慢性ストレスによるマウスの行動変化は、情動に関連する行動と考えられる活動量、不安様行動、および嫌悪刺激に対する連合学習能力の変化を、情動行動評価として頻繁に用いられる行動実験装置を使用して解析した。

ACC シナプス機能に対する慢性ストレスの影響は、電気生理学的、および薬理学的的手法を用いて解析した。ストレス負荷後、細胞外電位記録法によりフィールド細胞外興奮性シナプス後電位 (fEPSP: field excitatory postsynaptic potential)、ホールセルパッチクランプ法により誘発刺激による興奮性シナプス後電流 (EPSC: excitatory postsynaptic current)、微小抑制性シナプス後電流 (mIPSC: miniature inhibitory postsynaptic current)、および微小興奮性シナプス後電流 (mEPSC: miniature excitatory postsynaptic current) を測定し、シナプスの短期可塑性、長期可塑性、ドーパミン反応性に与える慢性ストレスの影響を解析。併せて、脳機能に対する慢性ストレスの

影響における左右非対称性について検討した。

電気生理学的実験での記録は、ACC 第 II/III 層から取った。ACC を含む mPFC はさまざまなストレスにより、c-fos などの immediate early genes が顕著に発現する部位であるが (1-4-1 参照)、特に mPFC 第 II/III 層では、immediate early gene の一種、FosB のスプライスバリエントのタンパク質合成が、慢性ストレスによって特異的に増強することが報告されている (Perrotti *et al*, 2004)。mPFC には GR が豊富に存在し、密度は海馬の 75~80% とされる (Ahima and Harlan, 1990; Meaney and Aitken, 1985)。ACC 第 II/III 層錐体細胞はグルココルチコイド投与や慢性ストレスによって樹状突起の形態が変化するが、第 V 層錐体細胞での形態変化はないと報告されている (Wellman, 2001; Radley *et al*, 2004; Cerqueira *et al*, 2007b)。1 日 10 分、1 週間の軽度な拘束ストレスでも、第 II/III 層樹状突起の形態変化が起こっている (Brown, *et al*, 2005)。シナプスの安定性に関与するとされる NCAM の発現量が、グルココルチコイドの慢性投与によって減少する部位でもある (Sandi and Loscertales, 1999)。これらのことから、第 II/III 層のシナプス機能が慢性ストレスによって変化する可能性が高いと判断し、第 II/III 層で記録を取ることにした。

測定では、ストレスによる GABA 神経系の機能変化に着目した。大脳皮質は小脳の顆粒細胞層とともに、GABA_A 受容体の発現が特に顕著な部位であることがラットで確認されている (Bowery *et al*, 1987)。行動実験では、GABA_A 受容体 KO マウスは、多動となることが知られている (Yee *et al*, 2005; Viggiano, 2008)。Social isolation stress を加えた離乳後のラットは多動を起こすとともに、大脳皮質のベンゾジアゼピン結合部位の減少が報告されている (Petkov and Yanev, 1982)。また最近、次のような報告がなされている。GABA_A 受容体の作用を亢進するベンゾジアゼピンを腹腔内投与したラットは、高架式十字迷路テストでコントロール群と比べ不安様行動が減少したが、同テストを再度行くとコントロール群も不安様行動が減少、有意差がなくなった。一方、リスク評価行動 (危険を察知して腹這いになる行動) については再テストでもベンゾジアゼピン投与群はコントロール群と比べ有意にリスク評価行動が減少しており、2 度の行動実験ともに c-fos 発現量が減少していた部位は ACC のみだったという (Albrechet-Souza *et al*, 2009)。ストレスに脆弱であるとされる統合失調症患者の死後脳研究で、ACC における GABA 神経細胞の減少が報告されているが、特に II 層での減少が顕著という (Benes *et al*, 1991)。これらの先行研究を踏まえ、GABA 神経系が関与するシナプス応答に着目した。

ストレスによるドーパミンに対する第 II/III 層シナプス反応の変化を検討した理由

を、以下に示す。PFC の GABA ニューロンは、ドーパミン放出のフィードバック機構の一部を担っているとされる (Karreman and Moghaddam, 1996; Doherty and Gratton, 1999)。統合失調症患者では抗精神病薬のドーパミン D₂ 受容体遮断作用と症状の改善に相関があることなどから同疾患のドーパミン過剰仮説が提唱されており、また患者脳 ACC でドーパミン D₂ 受容体結合能が有意に低下していることが報告されている (Suhara *et al*, 2002)。大脳皮質ではドーパミン D₂ 様受容体は GABA ニューロン上にも存在しており (Khan *et al*, 1998)、統合失調症患者でのドーパミン神経系の調節障害は前述した ACC での GABA 神経細胞の減少を反映している可能性がある。また GABA_A 受容体 KO マウスは、ドーパミン神経系が過活動となることが報告されている (Yee *et al*, 2005)。そこで本研究でのストレスによる行動の変化を、ACC 内 GABA 神経系の機能不全とドーパミン神経系の調節障害に関連させて検討することとした。

脳の左右非対称性の検討は、①健常者での ACC グリア細胞の密度は、左脳で右脳より有意に高く、うつ病患者では ACC グリア細胞密度の左右差は消失している (Cotter *et al*, 2001)、②健常者では左脳の方が右脳と比べ PFC 神経細胞の密度が高いが、統合失調症患者では右脳 PFC で有意に密度が高くなっており、この非対称性、および逆転現象は III 層で顕著にみられる (Cullen *et al*, 2006) など、ストレスが関連する精神疾患で右脳と左脳で非対称的な障害が報告されているにもかかわらず、1-6 で触れたように動物実験でもシナプスレベルでの研究は行われていないことから行った。

第2章 実験方法

2-1. 試薬

(2S)-3-[[[(1S)-1-(3,4-Dichlorophenyl)ethyl]amino-2-hydroxypropyl](phenylmethyl)phosphinic acid (CGP 55845)、D-(-)-2-Amino-5-phosphonopentanoic acid (D-APV)、は、Tocris Cookson (UK) から購入した。Bicuculline、tetrodotoxin (TTX)、6,7-dinitroquinoxaline-2,3(1H,4H)-dione (DNQX)、dopamine、(2-Hydroxyethyl)trimethylammonium chloride (Choline Chloride) は Sigma-Aldrich (USA) から、isoflurane は Abbott Laboratories (USA) から購入した。作成した脳スライスを乗せるポリカーボネート製シート (Nuclepore track-etched membrane) は、Whatman (USA) から、刺激電極として使用したタンゲステン製電極は FHC (USA) から購入した。

2-2. 使用動物と慢性拘束ストレス負荷実験

実験に使用した動物はすべて、近交系マウス、C57BL/6J のオスを用いた。生後3週齢を日本 SLC より購入後、コントロール群と慢性拘束ストレス群の2群に分け、1週間飼育施設の環境に慣れさせた。1ケージ当りのマウスは2-4匹とし、単独飼育は行わないようにした。単独飼育自体が、ストレスとなるためである。4週齢目より1週間、慢性拘束ストレス群に対し、1日2時間の拘束ストレスを加えた。50mLのプラスチック製試験管にマウスを入れ、試験管より一回り小さなプラスチック製の筒を挿入、マウスとの間に5mmほどの隙間を開け、試験管と筒をビニールテープで固定、寝返りを打てる程度にマウスの行動に制約を加え、これを慢性拘束ストレス (CRS: chronic restraint stress、以下適宜 CRS と略す) とした。マウスを入れた試験管に筒を挿入、常にマウスの居住空間を一定に保つことにより、個体差や1週間間の体重変化によるストレス負荷のばらつきを防止した。試験管と筒にはそれぞれ10箇所前後穴を開け、自由に呼吸できるようにした。1日おきに体重を測定した。ストレス負荷最終日の24-48時間後に胸腺と両側の副腎を摘出、重量を測定し、体重変化と合わせてストレス負荷の指標とした。行動実験は日本医科大学薬理学教室、電気生理学的実験は東京大学身体運動科学研究室で、それぞれの大学の動物実験倫理規定に従って行った。

2-3. 行動実験

2-3-1. 行動実験の概要

1週間拘束ストレス負荷を行い、その24–48時間後、5週齢目のマウスに対し行動実験を行った。マウスにとってストレスの少ないと思われる順にオープンフィールドテスト（行動実験1日目）、明暗選択テスト（同2日目）、恐怖条件付けテスト（同3–4日目）の3種類の実験を、同じマウスを使用し24時間の間隔を空けて行った。実験当日は、実験開始1時間前にマウスを飼育室から実験室に移動、実験室の環境に慣れさせた。実験室の室温は $24 \pm 1^\circ\text{C}$ に保った。1回の実験が終了するたびに、微酸性の次亜塩素酸水で洗浄、殺菌、マウスの匂いが残らないようにした。行動実験装置はすべて、小原医科産業製である。

マウスの生理的条件などを一定に保つため、それぞれの実験時間を固定した。オープンフィールドテストは午前9時から午後3時の間、明暗選択テストは午前9時から正午の間、恐怖条件付けテストは正午から午後4時半の間に行った。

2-3-2. オープンフィールドテスト

オープンフィールドテストは、マウスの活動量や情動性を測定するテストである。実験装置は箱型で、白色のプラスチック製（縦横50cm、高さ30cm）でできている。装置を図2-1に示す。マウスを置く床面は、40 lxに保った。マウスをコーナーに置き、20分間の行動を解析した。1辺50cmの正方形の床面を縦横10cmごとに分割し、中央の30cm×30cm区画を中央エリア、壁面に沿った10cm区画を周縁エリアとし情動性を評価した。マウスの活動はコンピューターに接続したビデオカメラで上方から撮影、解析ソフトNIH Image（Image OFCR software）を用い、主観が入らないよう解析を行った。解析した項目は、①移動距離、②中央エリアでの滞在時間（%）、③立ち上がり回数の3項目である。

2-3-3. 明暗選択テスト

明暗選択テストは、不安様行動を評価する行動実験である。実験装置は、同じ寸法（縦横20cm、高さ25cm）の色違いの2つの箱（白色と黒色）からなる。隣り合った2つの箱の間には幅4cm、高さ3cmの穴が開けられており、箱間を自由に移動できるようになっている。白色の明箱は、内部を任意の明るさで照らすことができる。黒色の暗箱には、明箱との通路以外から光が差し込まないようにしている。

明箱の明るさは、700 lx とした。装置を図 2-2 に示す。実験はマウスを暗箱に入れ、10 分間の活動をコンピューターに接続したビデオカメラで上方から撮影、解析ソフト NIH Image (Image J LD2 software) を用いて行った。明箱と暗箱それぞれの滞在時間 (%)、最初に明箱に入るまでの潜時の 2 項目を測定した。

2-3-4. 恐怖条件付けテスト

恐怖条件付けテストは、文脈記憶を測定する実験である。使用した装置を図 2-3 に示す。マウスを触感がツルツルした透明な塩化ビニール製の正方形の条件付け用実験箱 (一辺 10cm) に入れ、2 分 40 秒間、箱内の環境に慣れさせた後、音 (条件刺激) と電気ショック (無条件刺激) を組み合わせた刺激を与えた。1 分 40 秒後にも同様の刺激を与え、2 回の条件付けを行った。条件刺激として、70 dB、10 kHz の音刺激を 20 秒間与え、無条件刺激としては、音刺激の最後の 0.5 秒間に 0.3 mA の電流をステンレス製の床グリッドから流した。条件付け終了 30 秒後、マウスをコンディショニング用実験箱から飼育ケージに戻した。24 時間後、マウスを同じコンディショニング用実験箱に入れ、1 分間慣れさせた後、3 分間、文脈記憶の指標としてフリージングの割合を測定、これを *contextual freezing* とした。フリージングは、呼吸のため肺が動く以外、身体が動かない状態と定義した。3 時間後、マウスを触感がザラザラした乳白色の塩化ビニール製の正方形の *tone-dependent* 用実験箱 (一辺 10cm) に入れ、1 分間慣れさせた後、音刺激 (70 dB、10 kHz) を 3 分間与え、音に対する条件付けの強さの指標としてフリージングの割合を測定、これを *auditory-cue freezing* とした。解析は、コンピューターに接続したビデオカメラで上方から撮影、解析ソフト NIH Image (Image FZC software) を用いて行った。

2-4. 電気生理学的および薬理学的実験

2-4-1. 前部帯状回スライスの作成

拘束ストレス負荷最終日の 24–48 時間後、電気生理学の実験を行った。使用したマウスは、行動実験とは別のマウスを使用した。Isoflurane 吸引によりマウスに麻酔をかけ、断頭後、速やかに頭皮を切断、頭蓋骨をむき出しにし、5 秒以内に 4°C の人工脳脊髄液 (ACSF, in mM; 120 NaCl, 3 KCl, 2.5 CaCl₂, 1.3 MgCl₂, 26 NaHCO₃, 1.25 NaH₂PO₄, 15 glucose) に浸け冷却、血液を洗い流した後、別に用意した 4°C の ACSF 中で全脳を取り出した。摘出時に頭部を持つ指先、ピンセットなどの器具も 4°C の

ACSFに浸け冷却した。ACSFは、95% O₂-5% CO₂ 混合ガスで十分通気した。以上の措置は、脳組織のダメージを最小限に食い止めるためである。摘出した全脳を十分に冷却した後、ビブラトーム型スライサー (Leica、VT1000S) で、bregma 1.7mm 前後から厚さ 350 μm のスライスを冠状断にて作成した。スライス作成時の cutting 用溶液は、塩化コリンベースの Na-Choline 置換液 (in mM; 120 CholineCl, 3 KCl, 8 MgCl₂, 28 NaHCO₃, 1.25 NaH₂PO₄, 22 glucose) を用いた。作成したスライスは、ポリカーボネート製のシート上に移し、プラスチック製リカバリーチャンバー内のガラスシャーレに敷いたろ紙上に置き回復させた。1 枚目のスライスをろ紙上に置くまでの時間が、断頭から 20 分以内となるよう素早く作業を行った。シャーレは ACSF に浸し、95% O₂-5% CO₂ 混合ガスでバブルした。室温で 1 時間以上回復させた後、電気生理学的な実験を行った。

2-4-2. 細胞外電位記録法によるフィールド興奮性シナプス後電位 (fEPSP) の解析

作成したスライスをリカバリーチャンバーから顕微鏡の測定用チャンバーに移し、流速 2ml / min の速度で ACSF を灌流、室温 (24°C前後) で測定を行った。タングステン製の双極電極を刺激電極として用いた。刺激部位は ACC 深部層 (V/VI層) である。刺激は通常、0.05Hz (20 秒に 1 回) の頻度で行った。記録電極はガラス電極を使用した。ガラス電極内液には、0.5M の NaCl を用いた。記録電極を第 II/III 層に刺し、fEPSP slope を記録した。

fEPSP slope は、主に興奮性シナプス伝達によりニューロンのシナプス部位に生ずる内向き電流が細胞外に形成する電場電位を測定するものである。この fEPSP slope の測定には生体差動アンプ (DAM、World Precision Instruments) を用いた。解析には Clampfit 9.2 (Axon Instruments) ソフトウェアを用い、陰性波の最大 slope 値 (max rise slope) を fEPSP slope の大きさとした。概略を図 2-4 に示す。実際に得られた波形を図 2-4. (2) に示した。最も早い slope なのでモノシナプティックな slope と思われるが、ポリシナプティックな slope の可能性も否定できない。

(i) Input-output relationship の測定

刺激強度を増大させることに伴い、興奮が誘発される神経線維やニューロンが増加し、シナプス伝達に寄与するシナプス前成分が増加する。Input-output relationship は、刺激強度-fEPSP slope の大きさの関係をプロットすることでシナプスの伝達効率を現している。刺激強度を 20 μA、30 μA、40 μA、60 μA に振り、各刺激強度で

の fEPSP slope を測定した。

(ii) Half width の測定

細胞外電位記録法を用いて得られる fEPSP slope の最大振幅の半分の値における波形の時間幅 (ms) を、half width として計測した。

(iii) Paired-pulse ratio (PPR) の測定

PPR とは、ごく短時間の間隔で入力繊維を 2 回刺激すると、2 発目刺激によるシナプス応答が 1 発目刺激によるシナプス応答と比較し増減する現象である。この短期可塑性は、一般的にはシナプス前終末での神経伝達物質の放出確率に依存すると考えられているが、本実験では 1 発目の刺激で動員される GABA ニューロンの抑制作用の関与を見ることに利用した。2 発刺激の間隔を 500 ミリ秒、100 ミリ秒、50 ミリ秒に振り、それぞれの刺激間隔での 1 発目刺激による fEPSP slope の大きさに対する 2 発目刺激の fEPSP slope の大きさの割合 (2 発目 fEPSP slope の値 / 1 発目 fEPSP slope の値) を PPR として測定した。刺激強度は、閾値の 1.5 倍とした。

GABA_A 受容体を介した抑制性伝達の関与を調べるため、GABA_A 受容体拮抗薬、bicuculline (600nM) 灌流適用下で PPR を測定した。一方、記録電極内液に bicuculline (1mM) を適用し、PPR を測定する実験も行った。これは 5 μM 以上の濃度で bicuculline を灌流適用すると、スライス全体が過興奮状態 (いわゆるてんかん発作様の状態) となり fEPSP slope が測定不能となってしまうことから、2 つのアプローチを用いて GABA ニューロンの機能変化の確認を補い合った。

(iv) fEPSP の NMDA 受容体由来成分の測定

NMDA 受容体の選択的拮抗薬である D-APV (50 μM) を ACSF を介して灌流適用し、適用前後の fEPSP slope の half width の変化を測定した。刺激強度は、閾値の 1.5 倍とした。

(v) 長期増強 (LTP) の測定

げっ歯類 ACC で LTP を誘発させた先行研究は、極めて限られている。本研究では、トロント大学 Zhuo らの方法 (Wei *et al*, 2003) を改変して LTP を誘発した。20 秒間隔でテスト刺激を与え基底状態の fEPSP サイズが完全に変動しなくなるまで待った (通常 4 時間以上)。その上でさらに 30 分以上の安定を確認し、条件刺激とし

てシータバースト刺激を与えた。すなわち、10 ミリ秒間隔 (100Hz) 4 回のバースト刺激を、200 ミリ秒間隔 (5Hz) で5回、さらにその刺激セットを5秒間隔で5回与えた。テスト刺激の刺激強度は閾値の1.5倍、シータバースト刺激の刺激強度はテスト刺激の1.5倍とした。概要を図2-5.1に示す。

ストレスによるGABAニューロンの機能変化がLTPに与える影響を調べるため、GABA_A受容体拮抗薬、bicuculline (600nM) 灌流適用下で、同様の条件刺激を与えた。

(vi) 長期抑圧 (LTD) の測定

LTP同様、げっ歯類ACCでLTDを誘発させた先行研究は、極めて限られている。トロント大学Zhuoらの方法(Wei et al, 2003)に従い、1秒間に1回(1Hz)の刺激を15分間(900発)与えLTDを誘発した。刺激強度はテスト刺激、LTD誘発刺激ともに閾値の1.5倍とした。概要を図2-5.2に示す。

(vii) ドーパミンによる興奮性神経伝達の修飾作用

20秒間に1回の間隔でテスト刺激を与え、30分以上の安定を確認後、ドーパミンを3, 30, 100 μM (各15ml)の3段階の濃度で累加的に灌流適用し、fEPSP slopeに与える影響を測定した。刺激強度は閾値の1.5倍とした。

2-4-3. ホールセルパッチクランプ法による解析

細胞外電位記録法による実験結果を踏まえ、ホールセルパッチクランプ法を用い、より詳細にストレスによるシナプス機能変化の解析を行った。

ホールセルパッチクランプ法とは、ガラス電極により単一神経細胞の細胞膜全体を通過する電流または細胞内電位を測定する方法である。ガラス電極先端を細胞膜に圧着し、電極に陰圧をかけ電極内側の細胞膜(パッチ膜)を破ると、電極と細胞質が導通した状態になる。この状態で細胞内電位を一定に保つのに要する電流を測ることで、細胞膜上のイオンチャネルを流れる電流の総和(ホールセル電流)を記録することができる(voltage-clamp法)。概略を図2-6に示す。また本研究では用いていないが、膜電流が生起させる起電力により変化する膜電位を記録することも可能である(current-clamp法)。

(i) 微小シナプス後電流(mPSC)の測定

ACC 第 II/III 層の錐体細胞から mIPSC と mEPSC の測定、対照実験として視覚野第 II/III 層の錐体細胞から mIPSC の測定を行った。いずれの皮質でも第 II/III 層の錐体細胞は楕円形か錐体形をしており、皮質表面に向かう顕著な樹状突起を有し、比較的細胞体大きいことから、CCD カメラに接続したモニター画面で錐体細胞と推定することができる。

mPSC (miniature postsynaptic current) は、シナプス前終末から自発的に放出されるシナプス小胞を素量単位とした神経伝達物質の作用を反映しており、その頻度は終末からの神経伝達物質の放出確率を反映、振幅はシナプス後膜の神経伝達物質受容体の感受性を反映する。mPSC の測定により、シナプス機能に対するストレスの影響がシナプス前性か、シナプス後性かを判断することができる。

mPSC の測定には、テトロドトキシン (TTX, $1\mu\text{M}$) を灌流適用する。TTX は電位依存性ナトリウムチャンネルを選択的に阻害し、活動電位の発生を抑えシナプス前終末で脱分極が発生しなくなるため、電位依存性カルシウムチャンネルの開口が抑制され、細胞内へのカルシウムイオンの流入が起こらなくなる。そのためカルシウムによる多数のシナプス小胞の一斉のシナプス前膜への融合が起こらなくなり、神経伝達物質の同期的放出が抑制される。

mIPSC の測定にはさらに、DNQX ($10\mu\text{M}$)、D-APV ($50\mu\text{M}$) を灌流適用した。DNQX は、非 NMDA 型グルタミン酸受容体の拮抗薬で、AMPA 受容体とカイニン酸受容体の両者を阻害する。D-APV は、NMDA 型グルタミン酸受容体の拮抗薬である。自発的なシナプス活動のうちの mEPSC 成分を阻害し、mIPSC のみを測定した (図 2-7)。

mEPSC の測定には、TTX、bicuculline ($2\mu\text{M}$)、CGP 55845 (100nM) を灌流適用した。Bicuculline は GABA_A 受容体の拮抗薬、CGP 55845 は GABA_B 受容体の拮抗薬である。自発的なシナプス活動のうちの mIPSC 成分を阻害し、mEPSC のみを測定した (図 2-8)。

ガラス記録電極の電極抵抗は $4-6\text{M}\Omega$ 、内液はセシウム塩を基本としたものを使用した (in mM; 150 CsCl, 5 KCl, 0.1 Cs-EGTA, 5 Cs-HEPES, 3 Mg-ATP, 0.4Na-GTP, pH 7.4)。測定用チャンバー上の温度は、 $28 \pm 1^\circ\text{C}$ に保った。mIPSC は膜電位 -65mV 、mEPSC は -75mV で測定した。記録電極を通じて過分極性のパルス電圧を与え電流変化を記録、記録時のシリーズ抵抗を $20-30\text{M}\Omega$ に保ち、実験中の変化が 30% 以内の記録で解析を行った。信号には 1kHz のフィルターをかけ、 5kHz でサンプルを取った。

(ii) 興奮性シナプス後電流 (EPSC) の測定

ストレスによる興奮性シナプス伝達に対する影響を単一ニューロンでより直接的に解析するため、誘発刺激による ACC 第 II/III 層錐体細胞の EPSC を測定した。

ガラス記録電極の電極抵抗は 4–6M Ω とし K-methanesulphonate を基本とした内液 (in mM; 150 K-methanesulphonate, 5 KCl, 1 K-EGTA, 5 Na-HEPES, 3 Mg-ATP, 4Na-GTP, pH 7.4) を使用した。測定用チャンバー上の温度は、 $28 \pm 1^\circ\text{C}$ に保った。刺激電極は 0.5 M の NaCl を充填したガラス電極を使用し、ACC 深部層 (第 V/VI 層) を 50 ミリ秒間隔で刺激、刺激 1 発目の EPSC の振幅と PPR を測定した。膜電位固定は -45mV と -70mV で行った。膜電位 -45mV では EPSC は内向き電流、抑制性シナプス後電流 (IPSC: inhibitory postsynaptic current) は外向き電流となる。一方、クロライドイオンの平衡電位に近い -70mV に膜電位を固定すると、GABA_A 受容体を介したクロライドイオン流入による IPSC は発生せずコンダクタンスが増加するのみとなる。そのため、EPSC 単独の PPR 計測に近い結果を得られる。併せて bicuculline 灌流下で、膜電位を -45mV 、 -70mV に固定し、PPR を計測する実験も行った。

(iii) NMDA 受容体由来興奮性シナプス後電流 (EPSC) の測定

興奮性シナプス機能のうちで NMDA 受容体に依存する成分に対するストレスの影響を確認するため、NMDA 受容体由来の EPSC を直接測定した。

ガラス記録電極の tip resistance は 4–6M Ω とし、内液はセシウムベースの内液 (in mM; 150 CsCl, 5 KCl, 0.1 Cs-EGTA, 5 Cs-HEPES, 3 Mg-ATP, 0.4Na-GTP, pH 7.4) を使用した。膜電位は $+30\text{mV}$ に固定した。DNQX (10 μM)、bicuculline (10 μM)、CGP 55845 (100nM) を灌流適用し、NMDA 成分のみを取り出した。

2-5. 統計処理

2 群間の検定では、正規分布に従い、かつ等分散の場合は Student's *t*-test を用い、正規分布に従わない場合は Mann-Whitney *U*-test を用いた。3 群以上の検定には、Tukey-Kramer の多重比較検定を用いた。mPSC の頻度および振幅の分布の違いは、Kolmogorov-Smirnov test (K-S test) を用いて検定した。有意水準は 5% とした。Mann-Whitney *U*-test のデータは中央値 (四分位範囲) で示し、それ以外は平均値 (±標準誤差) で表記した。サンプル数 *n* は電気生理学的実験では測定したスライス数、行動実験ではマウスの個体数を示している。

第3章 実験結果

－ 個体および前部帯状回に対する慢性拘束ストレスの影響 －

3-1. 体重・副腎・胸腺の重量変化

慢性拘束ストレス（CRS）群の平均体重は拘束ストレス負荷開始1日目と3日目ではコントロール群と有意差はなかったが、5日目と7日目では有意に体重増加が抑制された（表1）。CRS群は両側の副腎が有意に肥大し、胸腺は有意に萎縮していた（表1）。

3-2. 行動実験の解析結果

3-2-1. 行動の多動化

オープンフィールドテストでは、CRS群の総移動距離が、コントロール群に対し有意に増加した（control、5515 ± 478 cm、n=9；CRS、7156 ± 353 cm、n=12； $p=0.011$ 、図3-1.1）。20分間の実験時間を5分ごとに区切って移動距離を解析した結果が、図3-1.2である。CRS群は実験開始から5分間と5-10分間の移動距離がコントロール群に対し有意に増加していたが、後半の10分間は両群間に有意差は見られなかった（開始から5分間：control、265 ± 19 cm；CRS、439 ± 19 cm； $p=0.000004$ 、5-10分間：control、298 ± 32 cm；CRS、390 ± 19 cm； $p=0.02$ ）。また、中央エリア内での滞在時間が、CRS群で有意に増加していた（control、7.6 ± 1.0 %；CRS、13.2 ± 1.4 %； $p=0.0056$ 、図3-1.3）。立ち上がり回数も、CRS群で有意に増加していた（control、78 ± 8 times；CRS、105 ± 9 times； $p=0.048$ 、図3-1.4）。

3-2-2. 不安様行動の変化

不安様行動の評価に用いられる明暗選択テストでは、明箱での滞在時間は両群間で有意差はなかった（control、180 ± 14 s、n=12；CRS、200 ± 14 s、n=14； $p=0.31$ 、図3-2.1）。暗箱から最初に明箱に入る潜時にも、両群間で有意差はなかった（control、53 ± 13 s；CRS、47 ± 8 s； $p=0.68$ 、図3-2.2）。

3-2-3. すくみ行動の減少

恐怖条件付けテストとして、contextual fear conditioning（文脈記憶に依存する恐怖条件付け）と auditory-cue fear conditioning（聴覚刺激に依存する恐怖条件付け）の2種類を行った。条件付け1日後に同じ条件付け用実験箱にマウスを入れ、すくみ行動を測定した。contextual freezing では、CRS 群で有意にすくみ行動が減少した（control、 $58.3 \pm 6.9\%$ 、 $n=11$ ；CRS、 $27.7 \pm 4.3\%$ 、 $n=14$ ； $p=0.0006$ 、図 3-3.1）。材質と色を変えた tone-dependent 用実験箱で行った auditory-cue freezing の測定でも、CRS 群で有意にすくみ行動が減少した（control、 $65.2 \pm 4.4\%$ ；CRS、 $47.2 \pm 4.1\%$ ； $p=0.007$ 、図 3-3.2）。

3-3. シナプス伝達への影響

3-3-1. fEPSP における input-output relationship の測定結果

細胞外電位記録法を用いて、CRS が ACC 第 II/III 層シナプス機能にどのような影響を与えるかについて解析を行った。まず input-output relationship を測定した（図 3-4.1）。ACC 深部層（第 V/VI 層）を刺激、刺激強度を $20 \mu A$ 、 $30 \mu A$ 、 $40 \mu A$ 、 $60 \mu A$ と振り、第 II/III 層で記録を取ったが、コントロール群と CRS 群の間で有意差はみられなかった（ $20 \mu A$: control、 0.03 ± 0.003 、 $n=20$ (14 匹)；CRS、 0.03 ± 0.002 、 $n=19$ (15 匹)； $p=0.7$ 、 $30 \mu A$: control、 0.06 ± 0.004 ；CRS、 0.07 ± 0.005 ； $p=0.4$ 、 $40 \mu A$: control、 0.09 ± 0.005 ；CRS、 0.09 ± 0.006 ； $p=0.5$ 、 $60 \mu A$: 0.13 ± 0.009 ；CRS、 0.14 ± 0.007 ； $p=0.4$ 、図 3-4.2）。

3-3-2. fEPSP での half width の拡大

Input-output relationship の測定中、ACC 深部層に低強度の刺激（ $20 \mu A$ 、 $30 \mu A$ ）を与えた場合、fEPSP slope の回復が延長している例が見られた（図 3-5.1）。そこで、振幅の中央値の時間幅（half width）を計測した。その結果、刺激強度 $30 \mu A$ の場合、CRS 群で有意に half width が広がっていることが分かった（control、 5.3 (2.4) ms、 $n=35$ (28 匹)；CRS、 7.4 (6.6)、 $n=37$ (30 匹)； $p=0.04$ 、図 3-5.2）。 $20 \mu A$ の刺激強度でも CRS 群で有意に half width が広がっていた（control、 7.0 ± 0.3 ；CRS、 8.2 ± 0.5 ； $p=0.048$ ）。高強度（ $40 \mu A$ 、 $60 \mu A$ ）の刺激では、有意差はなかった（2 倍 : control、 4.9 ± 0.2 ；CRS、 4.7 ± 0.3 ； $p=0.7$ 、3 倍 : control、 4.2 ± 0.2 ；CRS、 3.9 ± 0.1 ； $p=0.2$ ）。

CRS 群で half width が有意に広がった原因として、NMDA 受容体由来成分を含む

EPSP 増大が可能性の一つとして考えられるが、CRS による GABA 神経系の機能低下も予想された。抑制性の入力となる神経伝達物質 GABA は、興奮性神経伝達物質グルタミン酸に比べそもそもの作用時間が遅く、また、複数のシナプスを介して第 II/III 層錐体細胞へ到達する成分を多く含むために GABA 神経系からの抑制性の入力、fEPSP slope 後半の基線へと戻る波形に影響を与えている可能性がある。つまり GABA 神経系の機能が低下していれば、half width の幅は広がることになる。

GABA_A 受容体拮抗薬、bicuculline を灌流適用したところ、コントロール群で half width の幅が広がり CRS 群との有意差はなくなった (control, 8.2 (3.0) ms, n=8 (5 匹) ; CRS, 8.8 (4.0), n=9 (5 匹) ; $p=0.9$ 、図 3-5.3)。

3-3-3. 微小抑制性シナプス後電流 (mIPSC) 頻度の減少

GABA_A 受容体阻害により fEPSP の half width に両群間の有意差がなくなったことから、GABA を伝達物質とする抑制性シナプス機能に変化があることが疑われた。そこでホールセルパッチクランプ法を用いて、より直接的に CRS による GABA ニューロンの機能変化を解析することとした (図 3-6.1)。

ACC 第 II/III 層錐体細胞で観察された mIPSC の累積データから隣り合う mIPSC の間隔の発生頻度について累積ヒストグラムを作成したところ、頻度分布に有意差があることが分かった ($p=0.005$ 、K-S test、図 3-6.2)。各実験ごとの平均値の比較では、CRS 群の頻度がコントロール群に対し有意に減少していることが分かった (control, 13.5 ± 1.2 Hz, n=11 (7 匹) ; CRS, 8.8 ± 1.4 Hz, n=11 (7 匹) ; $p=0.02$ 、図 3-6.4)。一方、振幅の累積分布に違いはなかった ($p=0.3$ 、K-S test、図 3-6.3)。各実験ごとの振幅の平均値でも両群間で有意差はないことが分かった (control, 29.6 ± 3.0 pA, n=11 (7 匹) ; CRS, 29.1 ± 1.6 pA, n=11 (7 匹) ; $p=0.8$ 、図 3-6.5)。

3-3-4. 微小興奮性シナプス後電流 (mEPSC) の測定結果

次に、CRS による興奮性神経伝達への影響を調べるため、ACC 第 II/III 層錐体細胞で mEPSC を計測した (図 3-7.1)。累積データから累積ヒストグラムを作成、頻度分布、振幅分布ともに違いはなかった (頻度 : $p=0.2$ 、図 3-7.2 ; 振幅 : $p>0.5$ 、K-S test、図 3-7.3)。中央値の比較では、頻度は両群間に有意差はないことが分かった (control, 3.7 (2.6) Hz, n=7 (4 匹) ; CRS, 4.7 (1.6) 1.4 Hz, n=7 (3 匹) ; $p=0.3$ 、図 3-7.4)。振幅の中央値でも、両群間で有意差はないことが分かった (control, 8.4 (2.9) pA, n=7 (4 匹) ; CRS, 7.8 (1.6) pA, n=7 (3 匹) ; $p=0.9$ 、図 3-7.5)。

3-4. シナプス短期可塑性への影響

3-4-1. fEPSP の PPR 増加

CRS によるシナプス短期可塑性への影響を調べるため、細胞外電位記録法により ACC 第 II/III 層で PPR を測定した (図 3-8-1. 1)。ACC 深部層刺激では、CRS 群の PPR が 2 発刺激間のインターバル 50 ミリ秒および 100 ミリ秒でコントロール群に対して有意に大きかった (50 ms : control, 0.7 ± 0.1 , $n = 20$ (14 匹) ; CRS, 1.2 ± 0.1 , $n = 19$ (15 匹) ; $p = 0.000002$; 100 ms : control, 0.9 ± 0.1 ; CRS, 1.1 ± 0.1 ; $p = 0.0013$, 図 3-8-1. 2)。

3-3-2 で示したように、CRS 群ではコントロール群に比べ fEPSP の half width が大きく、GABA_A 受容体阻害により有意差が消失したことから GABA 神経系の機能低下が示唆されたが、CRS 群での PPR 増加についても同じ理由で説明できる可能性がある。つまり 1 発目刺激で放出される GABA の抑制成分は 50 ミリ秒後、100 ミリ秒後まで第 II/III 層錐体細胞の興奮性に影響を及ぼすと仮定すれば、CRS で GABA 神経系の機能が低下し、1 発目刺激で放出される GABA の抑制成分が 2 発目刺激による fEPSP に与える影響が減少、その結果として PPR が増加した可能性がある。このことを確認するため、bicuculline で GABA_A 受容体を阻害した上で PPR を測定した。

Bicuculline 灌流下で PPR を測定したところ、CRS 群とコントロール群間の有意差はなくなった (50 ms : control, 1.4 ± 0.2 , $n = 11$ (7 匹) ; CRS, 1.4 ± 0.1 , $n = 11$ (7 匹) ; $p = 0.8$; 100 ms : control, 1.2 ± 0.2 ; CRS, 1.3 ± 0.2 ; $p = 0.5$, 図 3-8-2. 1)。記録電極内液に bicuculline を充填した場合も、両群間の有意差はなくなった (50 ms : control, 1.1 ± 0.05 , $n = 10$ (匹) ; CRS, 1.2 ± 0.09 , $n = 10$ (9 匹) ; $p = 0.8$; 100 ms : control, 1.2 ± 0.07 ; CRS, 1.2 ± 0.07 ; $p = 0.7$, 図 3-8-2. 2)。

3-4-2. EPSC の PPR 増加

ホールセルパッチクランプ法を用いて、細胞外電位記録法による PPR の測定結果を再検討した。ACC 深部層 (第 V/VI 層) を閾値の 1.5 倍の刺激強度で刺激、第 II/III 層単一錐体細胞の EPSC を誘発し PPR を測定した。刺激間隔は 50 ミリ秒とした。

1 発目の EPSC の振幅は、膜電位を -45mV に固定した場合、膜電位を -70mV で固定した場合、ともに両群間で有意差はなかった (-45mV : control, 46.5 ± 7.5 , $n = 10$ (6 匹) ; CRS, 36.5 ± 11.1 , $n = 9$ (5 匹) ; $p = 0.5$, 図 3-9-1. 2, -70mV : control,

82.0 ± 12.8, n=8 (6匹) ; CRS、75.1 ± 13.5, n=8 (5匹) ; $p=0.7$ 、図 3-9-2.2)。一方、PPR は膜電位を -45mV に固定した場合、CRS 群でコントロール群に対し有意に増加、細胞外電位記録法と同様の結果が得られた (control、1.3 (0.5)、n=10 (6匹) ; CRS、2.7 (2.6)、n=9 (5匹) ; $p=0.007$ 、図 3-9-1.3)。膜電位 -70mV では PPR は両群間で有意差がなく、細胞外電位記録法による bicuculline 適用下での PPR 計測結果と似た結果となった (control、1.4 ± 0.2, n=8 (6匹) ; CRS、1.5 ± 0.2, n=8 (5匹) ; $p=0.7$ 、図 3-9-2.3)。膜電位を -70mV に固定した場合、EPSC は抑制性電流の影響をほとんど受けないためと考えられる。さらに GABA 作用を薬理的に完全に阻害した状態での PPR を計測した結果、膜電位が -45mV および -70mV とともに両群間の有意差は見られなかった ($V_m = -45mV$: control、1.4 ± 0.4, n=6 (5匹) ; CRS、1.3 ± 0.2, n=5 (3匹) ; $p=0.8$ 、図 3-9-3.A-2、 $V_m = -70mV$: control、1.2 (0.9), n=6 (3匹) ; CRS: 1.2 (0.3), n=7 (4匹) ; $p=0.9$ 、図 3-9-3.B-2)。

3-4-3. NMDA 受容体由来 EPSC の測定結果

CRS の NMDA 成分への影響を確認した。

膜電位を +30mV に固定し、bicuculline により GABA_A 受容体、CGP 55845 により GABA_B 受容体、DNQX により AMPA 受容体およびカイニン酸受容体を阻害した条件下で、ACC 深部層を閾値の 1.5 倍の刺激強度で刺激、第 II/III 層錐体細胞で誘発された NMDA 受容体由来の EPSC を計測した結果、CRS 群とコントロール群の間で有意差はなかった (control、64.8 ± 8.2, n=9 (3匹) ; CRS、58.4 ± 7.7, n=8 (2匹) ; $p=0.5$ 、図 3-10-1.2)。bicuculline、CGP 55845、DNQX に加え、D-APV を灌流適用したところ EPSC は完全に消失、計測した EPSC が NMDA 受容体由来であることが確認された (図 3-10-1.2 上図)。

間接的ではあるが、細胞外電位記録法でも CRS による NMDA 成分への影響を検討した。D-APV 灌流適用前後で fEPSP slope の half width を計測した。D-APV 灌流適用下の half width を灌流直前の fEPSP slope の half width で割り算した相対値を比較した結果、CRS 群とコントロール群の間で有意差がないことを確認した (control、0.9 ± 0.06, n=6 (2匹) ; CRS、0.9 ± 0.06, n=6 (2匹) ; $p=0.6$ 、図 3-10-2)。

3-5. シナプス長期可塑性への影響

3-5-1. LTP の増強

細胞外電位記録法を用いて LTP を誘発し、CRS によるシナプス長期可塑性への影響を調べた。ACC 深部層を刺激し、第 II/III 層で記録を取った。図 3-11-1. 1 のグラフは、シータバースト刺激を与える直前の 5 分間の fEPSP slope の平均値を 100% に標準化しプロットした。LTP 増強率を比較する場合は、シータバースト刺激後 25 - 30 分間の fEPSP slope の平均値を刺激直前の 5 分間の平均値で割り算したものを LTP 増強率とした。

その結果、シータバースト刺激によって CRS 群、コントロール群ともに、刺激直前と比較し有意に fEPSP slope が増加、LTP を確認できた (control、 $121.5 \pm 2.7\%$ 、 $n=7$ (7 匹)、 $p=0.0008$; CRS、 $141.2 \pm 5.7\%$ 、 $n=8$ (8 匹)、 $p=0.000002$ 、図 3-11-1. 1)。LTP 増強率を両群間で比較したところ、CRS 群で有意に LTP が増強されていることが分かった ($p=0.0014$ 、図 3-11-1. 3)。

次に、CRS 群での LTP の増強と GABA 神経系の機能低下との関連を確認するため、bicuculline 灌流下で LTP を誘発した。3-3-2 の実験により、bicuculline の灌流適用で half width が拡大することが分かっていることから、half width の拡大を実験経過中にモニター画面上で確認した上で、30 分以上 fEPSP slope を安定させてからシータバースト刺激を与えた。その結果、両群ともに刺激直前と比較し 25 - 30 分後に有意に fEPSP slope が増加、LTP が確認できた (control、 $138.7 \pm 1.4\%$ 、 $n=8$ (4 匹)、 $p=0.000002$; CRS、 $139.9 \pm 0.1\%$ 、 $n=8$ (4 匹)、 $p=0.000002$ 、図 3-11-2. 1)。さらに両群間で LTP 増強率に有意差がないことが明らかとなった ($p=0.12$ 、図 3-11-2. 3)。

3-5-2. LTD の促進

CRS によるシナプス長期可塑性への影響を確認するため、LTP と併せて LTD 誘発実験を行った。コントロール群では 1Hz、900 発刺激により短期的な fEPSP slope の抑制は起こったものの、刺激後 25 - 30 分間の fEPSP slope は、刺激直前 5 分間と比較し同程度で有意差はなかった ($104.8 \pm 5.0\%$ 、 $n=6$ (6 匹)、 $p=0.75$ 、図 3-12. 1)。一方、CRS 群では有意に fEPSP slope が抑制され、LTD が確認できた ($85.5 \pm 4.7\%$ 、 $n=6$ (6 匹)、 $p=0.03$ 、図 3-12. 1)。刺激後 25 - 30 分間の fEPSP slope 抑制率を両群間で比較したところ、CRS 群で有意に fEPSP slope が抑制されていた ($p=0.0037$ 、図 3-12. 3)。

3-6. 興奮性シナプス伝達に対するドーパミン修飾作用の低下

細胞外電位記録法により、CRSによるドーパミン神経系機能への影響を確認した。ACC深部層を刺激し、第II/III層で記録を取った。ドーパミンに対する反応率の比較は、ドーパミン灌流適用直前の5分間のfEPSP slopeの平均値を100%に規格化して行った。すなわち、累加的に与えた各濃度(3 μ M、30 μ M、100 μ M)でのドーパミン灌流終了直前の5分間のfEPSP slopeの平均値を、刺激直前の5分間の平均値で割り算した相対的fEPSP slopeを用いた。

コントロール群ではドーパミン適用濃度に依存しfEPSP slopeが抑制された(3 μ M: 94.5 \pm 3.5%, n=8 (6匹)、 $p=0.99$; 30 μ M: 73.2 \pm 3.5%, n=8 (6匹)、 $p=0.00008$; 100 μ M: 69.1 \pm 4.6%, n=8 (6匹)、 $p=0.000005$ 、洗浄後: 80.4 \pm 6.2%, n=7 (5匹)、 $p=0.02$ 、図3-13.2)。CRS群では、すべての濃度でfEPSPs slopeに目立った変化はなく、灌流直前と比較し反応率に有意差はなかった(3 μ M、101.5 \pm 2.8%, n=10 (7匹)、 $p=0.76$; 30 μ M、91.9 \pm 2.7%, n=10 (7匹)、 $p=0.8$; 100 μ M、86.4 \pm 3.0%, n=10 (7匹)、 $p=0.1$ 、洗浄後: 106.2 \pm 5.3%, n=7 (7匹)、 $p=0.97$ 、図3-13.2)。さらにCRS群はコントロール群と比較し、濃度30 μ M、100 μ M、および洗浄後(灌流液を通常のACSFに戻してから25–30分の間)で有意にfEPSP slopeの抑制が少ないことが分かった(各有意差: $p=0.01$ 、 $p=0.02$ 、 $p=0.0002$ 、図3-13.2)。

3-7. GABA神経系機能低下の左右非対称性

CRSによるACCのGABA神経系機能への影響について、右脳と左脳で違いがないかを検討した。ACC深部層を刺激、第II/II層で記録を取ったfEPSP slopeのPPR、mIPSCについて、これまでのCRS群、コントロール群それぞれの測定結果を右脳と左脳に分けて検定を行ったところ、CRSの影響に左右差がある傾向がみられた。追加実験で観察数を増やした結果、CRS群でのfEPSP slopeのPPR増加、mIPSCの頻度増加は、コントロール群と比較して右脳のみに見られる現象であることが明らかになった。なお左右差の検定は、すべてコントロール群およびCRS群の右脳と左脳の4群をTukey-Kramerの多重比較検定を用いて行った。

PPRに関しては、2発刺激間のインターバル50ミリ秒および100ミリ秒でCRS群右脳がコントロール群右脳に対して有意に増加していた(50 ms: control、0.8 \pm 0.06, n=30 (26匹); CRS、1.2 \pm 0.06, n=29 (25匹)、 $p=0.000008$; 100 ms: control、1.0 \pm 0.06; CRS、1.2 \pm 0.06、 $p=0.02$ 、図3-14.1)。左脳では両群間で有意差はなかった(50 ms: control、0.9 \pm 0.06, n=30 (24匹); CRS、1.1 \pm 0.06, n=30

(22 匹)、 $p=0.06$; 100 ms : control、 1.1 ± 0.06 ; CRS、 1.2 ± 0.05 、 $p=0.5$ 、図 3-14.1)。

Bicuculline 灌流適用下で PPR を計測したところ、右脳両群間での有意差はなくなった (50 ms : control、 1.3 ± 0.1 、 $n=6$ (5 匹) ; CRS、 1.5 ± 0.3 、 $n=5$ (4 匹) 、 $p=0.8$ 、100 ms : control、 1.2 ± 0.2 ; CRS、 1.5 ± 0.3 、 $p=0.8$ 、図 3-14.2)。記録電極内液に bicuculline を充填し計測した PPR も、右脳両群間の有意差はなかった (50 ms : control、 1.1 ± 0.04 、 $n=5$ (4 匹) ; CRS、 1.1 ± 0.09 、 $n=5$ (5 匹) 、 $p=0.98$ 、100 ms : control、 1.1 ± 0.08 ; CRS、 1.2 ± 0.1 、 $p=0.9$ 、図 3-14.3)。

mIPSC に関しては各群の代表的な波形を図 3-15-1.1、および図 3-15-2.1 に示すが、累積ヒストグラムから頻度分布が両群右脳間で明らかに異なっていた (図 3-15-1.2)。頻度の平均値は、CRS 群右脳でコントロール群右脳に対して有意に減少していることが分かった (control、 13.6 ± 1.1 、 $n=14$ (6 匹) ; CRS、 8.6 ± 0.9 、 $n=16$ (6 匹) 、 $p=0.02$ 、図 3-15-1.3)。左脳では、両群間の頻度に有意差はなかった (control、 13.0 ± 1.5 、 $n=14$ (5 匹) ; CRS、 11.3 ± 1.2 、 $n=16$ (5 匹) 、 $p=0.7$ 、図 3-15-2.3)。振幅分布は、累積ヒストグラムからほぼ一致していることが分かった (図 3-15-3.2)。振幅は右脳、左脳ともに両群間で有意差はなかった (右脳 : control、 31.0 ± 2.4 ; CRS、 30.7 ± 1.8 、 $p=1.0$ 、左脳 : control、 31.4 ± 2.1 ; CRS、 32.2 ± 2.2 、 $p=1.0$ 、図 3-15-3.3)。

スライス作成時あるいは計測時における手技等の影響が左右差の記録に影響を及ぼしていないことを確認するため、対照実験としてストレスの影響が現れないと考えられる視覚野において第 II/III 層錐体細胞で mIPSC を測定した。頻度は右脳、左脳ともに、コントロール群と CRS 群の間で有意差はなかった (右脳 : control、 5.7 ± 1.0 、 $n=10$ (3 匹) ; CRS、 6.8 ± 1.4 、 $n=10$ (4 匹) 、 $p=0.9$ 、左脳 : control、 5.2 ± 0.7 、 $n=11$ (3 匹) ; CRS、 5.0 ± 0.7 、 $n=11$ (4 匹) 、 $p=1.0$ 、図 3-16.1)。振幅も右脳、左脳ともに、コントロール群と CRS 群の間で有意差はなかった (右脳 : control、 24.5 ± 2.4 ; CRS、 27.1 ± 2.3 、 $p=0.9$ 、左脳 : control、 29.3 ± 2.2 ; CRS、 26.2 ± 3.5 、 $p=0.8$ 、図 3-16.2)。

第4章 考察

– 慢性拘束ストレスが個体および前部帯状回に与える影響 –

4-1. 本研究の意義

序章 1-6 で指摘したように、辺縁系シナプス機能に対するストレスの影響に関する研究は、海馬と扁桃体を中心に進められてきた。ACC を含む mPFC は、精神疾患患者に対する脳機能画像研究や死後脳研究、動物実験によって、ストレスの影響を受けやすい部位であることが明らかになっている。それにもかかわらず、mPFC のシナプス機能へのストレスの影響に焦点を絞った研究は、非常に少ない。中でも ACC に関しては、Zhuo らのグループが、慢性的な末梢痛み刺激によって ACC のシナプス機能に変化が生じることを示している以外、ほとんど研究が行われていないのが現状である。ストレスによる ACC の機能変化と、行動変化の相関を解析した研究もほとんどない。

本研究は、慢性拘束ストレス (CRS) をマウスに加えることで、ACC シナプスの短期可塑性と長期可塑性が増大し、その変化は GABA 神経系の機能低下を介したものであることを初めて明らかにした (図 4-1)。個体レベルでは、不安様行動が増加する通常のストレス負荷実験とは異なり多動となった。恐怖条件付けテストでは、すくみ行動が減少することを明らかにした。個体レベルでのこれらの変化は、CRS によって ACC での GABA 神経系の機能が低下、その結果、出力細胞である錐体細胞の興奮性が高まり、シナプス可塑性が増大したことが一因となっている可能性が示唆された。

またストレスによる辺縁系機能の変化に左右差があることを、シナプスレベルで確認した。序章 1-6 で指摘したように、これまでの脳の左右差研究は、形態学的、神経生化学的、および生理学的な研究により、ストレスに対する脳機能の非対称性は報告されているものの、シナプスレベルでの成果は報告されていない (Sullivan, 2004; Czéh *et al.*, 2008)。

今回、*in vitro* の実験系により分子レベルで検出可能な脳の非対称性を発見したことにより、今後マクロレベルでの脳の非対称性がいつ、どのように生じるのか、ストレスが関連する精神疾患の発症に脳の非対称性がどのように関わっているのかについて、物質的な基盤に基づいた研究を行う足がかりを得ることができると考えられる。この点もまた本研究の大きな意義と考える。

以下、実験結果について詳しい考察を行う。

4-2. 体重の減少・副腎肥大・胸腺の萎縮

本研究では、慢性ストレスとして、1日2時間の拘束ストレスを1週間加え続けた。1日おきに体重の変化を測定した結果、ストレス負荷開始から5日目と7日目にCRS群で体重増加の有意な抑制がみられた。またストレス負荷最終日の24 - 48時間後（電気生理学的実験でのスライス作成時）に両側の副腎と胸腺を摘出、重量を測定した結果、CRS群で有意に副腎の肥大、胸腺の萎縮がみられた。先行研究により、体重増加の抑制、副腎肥大、および胸腺の萎縮は慢性ストレスによる影響と考えられ、今回の慢性ストレス負荷パラダイムが有効であったと考えられる（Moraska *et al*, 2000）。

4-3. 行動の多動化とすくみ行動の減少

4-3-1. 行動の多動化

オープンフィールドテストでは、CRS群で移動距離がコントロール群に対して有意に増加していることが分かった。また中央エリア内での滞在時間が、CRS群で有意に増加していた。立ち上がり回数も、コントロール群に対しCRS群で有意に増加していた。これらの行動変化に対しては、CRSによって不安様行動が増加したか、または多動となったか、という2つの解釈が可能である。不安様行動の評価に特化した行動実験、明暗選択テストでは、明箱での滞在時間、および暗箱から明箱に最初に入る潜時には、両群間で有意差はなく、CRSによって不安様行動は増加していないことが示唆された。このことからオープンフィールドテストの結果は、不安様行動が増加したのではなく、CRSによって多動となったと解釈する方が妥当であると考えられる。さらに実験開始から10分間の活動量が増加していることから、CRSによって単に行動が多動となったのではなく、新奇の環境における探索行動が増加したと考えられる。

多くの先行研究では慢性ストレスによって不安様行動は増加し、活動量が減少することが示されている（Conrad *et al*, 1999; Strelakova *et al*, 2004; Wood *et al*, 2004; Wood *et al*, 2008）。本研究での実験結果は、これらの先行研究とは正反対の結果となった。原因は、実験に用いたマウスの週齢の違いによる可能性がある。マウスおよびラッ

トの思春期は、おおむね離乳（生後3週）後から生後60日の間とされている（Spear, 2000; Laviola *et al*, 2003; Hefner, 2007）。本研究では、思春期に当る4週齢のマウスに1週間の拘束ストレスを加え、5週齢目に行動実験を行った。本研究と異なる結果が得られた先行研究は、成熟後もしくは成熟期に近いげっ歯類にストレスを加えた上で行動実験を行っている。Strekalovaらは4カ月齢のオスマウス、Woodらは成熟後のラット（体重約270gのオス）、Conradらは成熟期に近いラット（体重200–250gのオス）を使用している。思春期のげっ歯類に対する慢性ストレスのモデルとして離乳後に行われるsocial isolationでは本研究と同様、行動が多動となり、恐怖条件付けテストですくみ行動が減少したとの実験結果が報告されている（Vöikar *et al*, 2005; Pascual *et al*, 2006; Levine *et al*, 2007）。これらのことから、脳の発達段階のどの時期にストレスを加えるかによって、脳機能に異なった影響が出る可能性がある。①思春期ラット（生後33–43日齢）の安静時のグルココルチコイド血中濃度は、成熟後（生後60日齢以上）に比べ有意に高い（Adriani and Laviola, 2000）、②ラットmPFCでのドーパミン神経線維の密度が成熟期に達するのは、生後50–60日ごろである（Benes *et al*, 2000）、③ラット線条体でのドーパミンD₁受容体の密度は生後28日から40日の間に最大となり、成熟期に向かって減少する（Laviola, 2003）、④ラットの前頭前野、海馬などのNMDA受容体の密度は思春期前半で最大となり、その後減少する（Insel, 1990）などの報告がなされているからである。

また本研究でのストレス負荷期間は、1週間と他の慢性ストレス実験と比べ比較的短い。多動化、すくみ行動の減少は過渡的な行動変化で、ストレス負荷期間を2週間、3週間と延長することにより先行研究と同様、活動量が減少し、すくみ行動が増加することも考えられる。今後の検討課題といえる。

その他、系統、性別、ストレスの種類、動物飼育施設、行動実験装置、行動実験室の環境の違いなどによって、実験結果が異なった可能性も考えられる。

4-3-2. 多動化・すくみ行動の減少とGABA神経系機能低下の関連

CRS群はコントロール群に対して、恐怖条件付けテストでのすくみ行動が減少していた。これらの結果から、CRSにより情動学習機能が低下したと言う解釈がまず考えられるが、それとは別にCRSによる行動の多動化がすくみ行動の減少につながった可能性がある。

後述するように本研究での電気生理学的実験により、CRSでACCでのGABA神経系の抑制機能が低下したことが確認された。GABA受容体ノックアウトマウスは、

多動となることが知られている (Viggiano, 2008)。Serra らによると、離乳直後から social isolation を施したラットは、集団飼育したラットに比べ新奇の環境における探索行動と活動量が増加する一方、同様の処置によって、ラット大脳皮質 GABA_A 受容体のジアセパムに対する感受性が低下、細胞内へのクロライドイオンの流入が減少することが報告されている (Serra *et al*, 2007)。Pillai-Nair らによると、NCAM を過剰発現させたマウスでは、帯状回の GABA 神経系の機能が低下、行動レベルでは多動となるとともに、恐怖条件付けテストですくみ行動が減少した (Pillai-Nair *et al*, 2005)。ラットに 5 日間コカイン投与をすることで、mPFC の GABA_A 受容体発現量が減少、錐体細胞の興奮性が高まり LTP が誘発されやすくなるとともに行動が多動となった (Huang *et al*, 2007)。ラット mPFC への bicuculline 投与により、すくみ行動は減少した (Matsumoto *et al*, 2005)。これらの先行研究はいずれも、ACC を含む mPFC での GABA 神経系の機能低下、それを介した興奮性ニューロンの活動の亢進が、行動の多動化、および恐怖条件付けテストにおけるすくみ行動の減少と関連があることを示唆している。これらのことから、CRS によって ACC の GABA 神経系の抑制機能が低下、ACC 錐体細胞の興奮性が増加した結果、行動が多動化し、多動化の反映としてすくみ行動が減少した可能性が示唆される。

また恐怖条件付けテストにおいて、扁桃体は記憶の獲得 (acquisition) と保持 (storage) に関わっており、mPFC のうち IL から扁桃体への興奮性の入力、fear extinction (新たな学習による恐怖記憶の消去) に関与しているとされる (Sotres-Bayon *et al*, 2004)。一方、ACC を含めた mPFC を損傷させると、ラットのすくみ行動は増加することが報告されている (Morgan and LeDoux, 1995)。Rosenkranz と Grace は、mPFC を電気刺激することで、条件付け時に活性化するはずの扁桃体基底外側核の興奮性ニューロンの活動が抑制されること、この活性化の抑制は mPFC 電気刺激による扁桃体基底外側核の GABA ニューロンの活性化を介していることを麻酔下のラットで行った実験で示している (Rosenkranz and Grace, 2002; Rosenkranz *et al*, 2003)。ACC から扁桃体への興奮性入力は、記憶の獲得や保持に関与しているのかもしれない。今後、ACC で誘発される LTP や LTD それ自体が果たす情動学習における機能を明らかにする研究が、期待される。

4-3-3. 行動変化とドーパミン反応性低下の関連

本研究での電気生理学的実験で、CRS により ACC 第 II/III 層シナプスのドーパミンに対する反応性が低下することが分かった。ドーパミンに対する ACC シナプス反

応の低下が、行動の多動化に関与している可能性がある。

PFC は、腹側被蓋野からのドーパミン作動性ニューロンの主要な投射先である (Seamans and Yang, 2004)。Seamans らによると、PFC には D1 様受容体、D2 様受容体が存在し、両者とも錐体細胞、GABA ニューロン上にある。PFC での主要なドーパミン受容体は D1 様受容体で、錐体細胞の樹状突起先端部の AMPA/NMDA 受容体近傍に存在するが、ドーパミン作動性ニューロンとはシナプスを形成していないという。機能的には、D1 様受容体はグルタミン酸の放出量を減少させる一方、GABA ニューロンの興奮性を高めるとされる。一方、D2 様受容体は GABA の放出量を増加させることで、錐体細胞の IPSC を増加させるという (Seamans and Yang, 2004)。またラット PFC に GABA_A 受容体拮抗薬、bicuculline を直接投与すると線条体でのドーパミン放出量が増加する一方、PFC に bicuculline、腹側被蓋野に活動電位の発生を抑制する TTX を同時投与すると線条体でのドーパミン放出量増加が抑制されることなどから、PFC の GABA ニューロンはドーパミン放出のフィードバック機構の一部を担っていると考えられている (Karreman and Moghaddam, 1996)。

Jones らによると、思春期のラットに対して Social isolation を行ったところ、活動量が増加するとともに PFC でのドーパミン放出量が増加した (Jones *et al*, 1992)。一方、成熟したラットでは、慢性的なストレスによって PFC でのドーパミン放出量が減少することが示されている (Mizoguchi *et al*, 2004; Mizoguchi *et al*, 2008)。これらの先行研究から、思春期のげっ歯類では、慢性ストレスによって PFC でドーパミンが過剰放出されることが予想される。本研究での CRS 群でのドーパミン反応性の低下は、ストレスによってドーパミンが過剰放出され、ドーパミン受容体がダウンレギュレーションを起こした結果である可能性がある。

また Matsumoto らによると、PFC の GABA_A 受容体は線条体でのドーパミン放出の制御と行動の多動化に関わっている。PFC への bicuculline 投与で、線条体でのドーパミン放出量が増加、行動が多動となる一方、GABA_A 受容体作動薬、muscimol 投与で線条体でのドーパミン放出量が減少、行動の多動化は起こらなかった (Matsumoto *et al*, 2003)。これらのことから、本研究での CRS による行動の多動化は、ACC での GABA 神経系の機能低下とドーパミン過剰放出が関与していることが示唆される。4-3-1 で示したようにほとんどの先行研究でストレスによって活動量が減少、不安様行動が増加したのは、ストレスによって PFC でのドーパミン放出量が減少する成熟したげっ歯類で実験を行ったためであることが考えられる。

CRS 群でのすくみ行動の減少にも、CRS によるドーパミン反応性の変化が関与し

ている可能性がある。マウスに高濃度の amphetamine を投与したところ、すくみ行動が減少したとの報告がある (Wood *et al*, 2008)。Pezze らによると、ラット PFC へのドーパミン受容体拮抗薬、cis-flupenthixol によっても、逆に間接的作動薬、D-amphetamine の投与によっても、ともにすくみ行動が減少した (Pezze *et al*, 2003)。これらの先行研究は、恐怖条件付けテストにとって、PFC でのドーパミン受容体はいわゆる inverted-U-shape の機能を有していることを反映しているのかもしれない。すなわち、PFC でのドーパミン受容体の過剰な活性化もしくは抑制によって、正常なすくみ行動が阻害されるということである。本研究では ACC でのドーパミン反応性が低下するとともに、すくみ行動が減少した。反応性の低下は、ドーパミン過剰放出によりドーパミン受容体のダウンレギュレーションが起きたことを示唆している。先行研究より、本研究でのすくみ行動の減少は、CRS による ACC でのドーパミン過剰放出と関連がある可能性がある。

4-3-4. 他の脳機能関与の可能性

先行研究によると、30 日間の social isolation で多動となったラットでは、海馬の細胞骨格に変化が起きていた (Bianchi *et al*, 2006)。Social isolation によって多動となったラットに恐怖条件付けテストを行ったところ、条件付け時、および文脈記憶測定時ともに側坐核でのドーパミンおよび 5-HT の放出量が集団飼育群に比べ有意に増加していたとの報告もある (Lapiz *et al*, 2003)。本研究では ACC 以外の脳機能は解析していない。唯一、左右差の対照実験として視覚野における mIPSC を検討し何ら影響がないことを見たに留まる。よって CRS による行動変化は、ACC 以外の脳機能の変化も関与している可能性は十分に考えられると言わねばならない。

また、CRS による行動およびシナプス機能の変化に、セロトニン神経系が関与している可能性もある。拘束ストレスを加える際に選択的セロトニン再取り込み阻害薬 (SSRI) を投与し、CRS の影響を比較する追加実験を行うなどして確認する必要がある。

4-4. シナプス可塑性の増大

4-4-1. GABA 神経系の機能低下

本研究では、ACC 第 II/III 層で記録した fEPSP slope の half width が CRS 群で拡大していた。第 3 章の実験結果 3-3-2 で指摘したように、fEPSP slope 後半の基線にま

で戻る部分は、抑制性シナプス伝達が間接的に影響し波形に影響を与えている可能性がある。CRS 群での half width の拡大は、抑制性成分が減少し、基線への戻りが遅くなった結果と考えることができる。事実、GABA_A 受容体拮抗薬である bicuculline 灌流適用により、コントロール群の half width は拡大、CRS 群との有意差はなくなった。すなわち half width の拡大は、CRS により GABA 神経系の機能が低下したことを示唆している。

このことは、ACC 第 II/III 層で計測した mIPSC の計測結果によっても支持される。CRS 群では、mIPSC の頻度がコントロール群と比べ有意に低下していた。振幅には、両群間で有意差はなかった。この実験結果は、シナプス機能に対する CRS の影響がシナプス前性で、第 II/III 層錐体細胞に入力する GABA 神経系の機能が低下していることを強く示唆している。mPSC は、シナプス前終末から自発的に放出される神経伝達物質の素量単位を反映しており、その頻度はシナプス結合の絶対数や、神経終末からの伝達物質の放出確率を反映、振幅はシナプス後膜の神経伝達物質受容体の感受性を反映するとされるからである。ただし、GABA 神経系の機能低下が、CRS によって GABA ニューロン自体の数、もしくはシナプス前終末が減少した結果なのか、シナプス数には変化がなく神経伝達物質の放出確率が減少した結果なのかは、本研究では明らかにすることはできなかった。

4-4-2. 短期可塑性の増大

細胞外電位記録法による fEPSP slope の測定、およびホールセルパッチクランプ法で膜電位を -45mV に固定した場合での EPSC の振幅の測定で、ACC 第 II/III 層の PPR が、CRS 群でコントロール群に対し有意に増加していることが分かった。PPR 増加には、2つの可能性が考えられる。

第一に考えられるのは、興奮性ニューロンのシナプス前終末からの興奮性神経伝達物質（グルタミン酸）の放出確率が、ストレスによって減少した可能性である。放出確率の減少によってシナプス前終末に残存したカルシウムイオンが、2 発目刺激による放出確率の増加をもたらした可能性である。しかしそもそも 1 発目の EPSP/C の大きさについては、fEPSP slope の入出力関係に関しても、ホールセル記録での EPSC の振幅でも両群間で有意差がなかった。また mEPSC の計測では、頻度に変化がなかったことからストレスによるシナプス前性の変化はないことが分かっている。これらのことから、ストレスによって前終末からの放出確率が低下したとは考えにくい。

もう一つの可能性として、GABA 神経系からの抑制性の入力が増加したことにより、2 発目の刺激による ACC 深部層から第 II/III 層への興奮性の入力が増加したことが考えられる。深部層への刺激によって活性化されるのは、白質から上行する求心性線維だけでなく、第 II/III 層に軸索を伸ばしシナプス前終末を形成する深部層の興奮性ニューロンおよび抑制性の GABA ニューロンであると予想される。しかし GABA 性の IPSC は EPSC に比べそれ自体の時間経過が遅く、また GABA ニューロンの多くは求心性線維入力によっても間接的に多シナプスで活性化される。そのため、記録している第 II/III 層錐体細胞への GABA ニューロンからの抑制性入力は、単シナプス性の興奮性入力よりも時間的に遅くなる。そのため、2 発刺激のうちの 1 発目の刺激による fEPSP slope および EPSC の振幅は、GABA ニューロンからの抑制性の入力の影響を受けにくいものと予想される。一方、2 発目の刺激による fEPSP slope および EPSC の振幅は、刺激間のインターバルが短い (fEPSP slope では 50 ミリ秒と 100 ミリ秒、EPSC の振幅では 50 ミリ秒) 場合、1 発目刺激による GABA ニューロンから遅れてやってくる抑制性成分の影響を受けている可能性がある。Paired-pulse depression であったコントロール群の PPR が、fEPSP slope では bicuculline 適用下で、EPSC の振幅では膜電位を -70mV に固定した場合、および bicuculline 適用下で paired-pulse facilitation となったことが、このことを裏付けている。そしてコントロール群の PPR が bicuculline 適用下、および膜電位を -70mV に固定した場合、CRS 群と有意差がなくなったことは、CRS 群の興奮性シナプス伝達は、抑制性成分の影響を受けていないことを意味しており、CRS 群で mIPSC 頻度減少の測定結果と一致している。

これらのことから、ACC 第 II/III 層の PPR が CRS 群でコントロール群に対し有意に増加した原因は、CRS により GABA 神経系の機能が低下、抑制性の入力が増加したことによる結果であることが強く示唆される。

4-4-3. 興奮性シナプス伝達に対する影響

すでに述べたように、深部層刺激により誘発される第 II/III 層 EPSC の振幅、および mEPSC 頻度は両群間で有意差がなかった。Bicuculline 灌流下での fEPSP slope および EPSC の振幅の PPR も、両群間で有意差がなかった。これらの実験結果から、少なくとも本研究での条件下では、ACC におけるイオンチャンネル型グルタミン酸受容体を介した興奮性シナプス伝達は、CRS の影響を受けなかったといえる。

4-4-4. 長期可塑性の増大

CRS 群で ACC 第 II/III 層錐体細胞の LTP が増大、LTD が促進されたことから、ストレスにより ACC 第 II/III 層興奮性シナプスの長期可塑性が増大したといえる。

先行研究によると、ACC での LTP は NMDA 型グルタミン酸受容体と共に、L 型電位依存性カルシウムチャネルの活性化が必要とされる (Liauw *et al*, 2005)。一方、LTD は NMDA 型グルタミン酸受容体には依存せず、代謝型グルタミン酸受容体の活性化、および L 型電位依存性カルシウムチャネルの活性化が必要とされる (Wei *et al*, 1999)。

本研究では、bicuculline の灌流適用でコントロール群の LTP が増大、CRS 群との有意差がなくなった。このことは、ストレスによる LTP の増大が、GABA 神経系の機能低下による興奮性増大の結果であることを物語っている。CRS 群では、TBS 直後から fEPSP slope が増大しているが、原因は不明である。CRS によって、GABA 神経系の機能低下以外の変化が起きた可能性も否定できない。

先行研究では、GABA_A 受容体をブロックすることで、モルモット歯状回の LTP が促進されるとの報告がある (Wigström and Gustafsson, 1983)。Matsuyama らによると、bicuculline 腹腔内投与により濃度に依存してマウス歯状回で LTP 様の興奮性の増強が起きた (Matsuyama *et al*, 2008)。Rodríguez Manzanares らの研究によると、ストレスを加えたラットの扁桃体基底外側核で 1 回の高頻度刺激によって誘発される LTP が、GABA_A 受容体の作用を亢進するミダゾラムの事前投与によって起こらなくなった (Rodríguez Manzanares *et al*, 2005)。これらのことから、CRS 群での LTP の増大は、ストレスによる GABA 神経系の機能低下によって ACC 第 II/III 層錐体細胞への抑制性の入力が増加、錐体細胞の興奮性が高まったことによるものと考えられる。

ストレスによるシナプス可塑性の増大には、GABA 神経系からの抑制性の入力の減少に加えさらにドーパミンによる調節作用の減少の両者が関与している可能性がある。Otani らによると、ラット PFC にドーパミン灌流下でテタヌス刺激を加えたところ LTD が誘発された (Otani *et al*, 1999)。コカインの繰り返しの投与により D1 様受容体が活性化するとともに、GABA_A 受容体を介した抑制作用が減少した結果、PFC 錐体細胞の興奮性が亢進、LTP が誘発されるようになったとの報告もある (Huang *et al*, 2007)。本研究で、ストレスにより GABA 神経系の機能が低下するとともに、ACC 第 II/III 層シナプスのドーパミンに対する反応性も低下することが分かった。ストレスにより ACC 第 II/III 層シナプスでの興奮性と抑制性のバランスが変化した結果、シナプス後膜で脱分極が起こりやすくなり、カルシウムイオンの細胞

内への流入が促進され、長期可塑性が増大した可能性がある。

慢性ストレスにより LTD が誘発されやすくなる原因は不明だが、LTD は LTP とは異なるレベルながらある一定の興奮性や細胞内カルシウム濃度の上昇を必要とする。またその影響は単に神経細胞の興奮性を増加させることではなく、選択的に特定の入力情報をゲイティングすることにより神経回路における、より効率的な情報処理を可能としていると期待される。よって LTP が増大するだけでなく LTD も誘発されやすくなることにより慢性的なストレスに適応することが可能となるのかもしれない。先行研究によると、ラット mPFC におけるドーパミン灌流下でのテタヌス刺激による LTD 誘発は、ドーパミンによる代謝型グルタミン酸受容体（グループ I およびグループ II）の活性化を介していると考えられる (Otani *et al*, 1999)。本研究では、CRS により ACC 第 II/III 層興奮性シナプスでのドーパミン修飾作用が低下することが分かった。このことから、CRS によりドーパミンが過剰放出された結果、ドーパミン受容体がダウンレギュレーションを起こしたことが示唆される。CRS 群で LTD が誘発されやすくなったのは、ドーパミン過剰放出により代謝型グルタミン酸受容体が活性化したことによるのかもしれない。しかしこのことを証明するためには、ドーパミンおよび代謝型グルタミン酸受容体拮抗薬灌流下で LTD 誘発実験を行う必要がある。現時点では、あくまでも可能性の一つに過ぎない。

一方、本研究では NMDA 受容体を介した EPSC の振幅には、CRS 群とコントロール群で有意差はなかった。fEPSP slope の NMDA 受容体由来成分にも、両群間で有意差はなかった。このことから本研究での CRS による LTP の増大には、興奮性伝達における NMDA 受容体由来成分は関与していないと考えられる。

4-5. シナプスレベルで検出された脳機能の左右非対称性

本研究によって、ACC に対する CRS の影響に左右脳間で非対称性があり、右 ACC のみ GABA 神経系の機能低下が起きることが明らかになった。

げっ歯類では一部の研究を除き、ストレスの影響に関する mPFC 機能の非対称性について、これまでほとんど考慮されてこなかった。わずかに mPFC 機能の非対称性が行動に影響を与えることが、以下の実験などで示されている。ラット右 mPFC (PL、IL) の損傷により、コントロール群及び左 mPFC 損傷群と比べ不安様行動が減少（高架式十字迷路テストでの open arm 滞在時間が有意に増加）し、また情動学習が低下（忌避物質を混ぜたミルクに対する味覚嫌悪が両群と比べ有意に減少）し

た (Sullivan and Gratton, 2002b)。内分泌系の反応では、ラット mPFC (ACC、PL 及び IL) 損傷実験で、両側の損傷によりグルココルチコイドの血中濃度が低下、左 mPFC 損傷では急性の拘束ストレス負荷によりコントロール群と同程度の血中濃度上昇がみられたが、右 mPFC 損傷ラットでは血中濃度の上昇幅はそれらに比べ有意に少ないことが報告されている (Sullivan and Gratton, 1999)。この実験では、右 mPFC 損傷ラットのみ低温下での拘束ストレスによる胃潰瘍の発生頻度が有意に低下していた。Sullivan はこれらの実験結果から、右 mPFC はストレスに対して適切に対処するための正常な情動行動、HPA 軸の活性化、自律神経系の活性化にとって重要な役割を果たしていると考えられている (Sullivan, 2004)。

また、序章 1-3 で指摘したように、①ラットに慢性ストレスを与えることにより左 ACC III 層錐体細胞の先端樹状突起は右 ACC に比べ有意に萎縮 (Perez-Cruz *et al*, 2007)、②右に比べ左 ACC 第 III 層で有意に多かったグリア細胞の新生数が慢性ストレスで有意差がなくなった (Czeh *et al*, 2008)、③mPFC 全体では慢性ストレスによって左右のグリア細胞新生数が逆転、右脳で有意に新生していた (Czeh *et al*, 2007)、と報告されている。これらの実験結果について、Czeh らは、①錐体細胞樹状突起の萎縮は、ストレスによる興奮性神経伝達物質グルタミン酸の過剰放出による興奮毒性から神経細胞を保護するために必要で、その結果として左 ACC への興奮性の入力低下している可能性がある、②グリア細胞の新生が左脳から右脳にシフトするのは、通常の状態では左脳優位だった mPFC の活動が、慢性ストレスによって右 mPFC が常に過活動の状態になったことを反映している可能性がある、と指摘している (Czeh *et al*, 2008)。同様の結果は、ヒトの死後脳研究でも報告されている。健常者での ACC グリア細胞の密度は、左脳の方が右脳より有意に高く、うつ病患者では ACC グリア細胞密度の左右差は消失しているという (Cotter *et al*, 2001)。健常者では左脳の方が右脳と比べ PFC 神経細胞の密度が高いが、統合失調症患者では右脳 PFC で有意に密度が高くなっており、この非対称性、および逆転現象は第 III 層で顕著にみられるとの報告もある (Cullen *et al*, 2006)。

これらの先行研究から、PFC には形態学および機能的な左右非対称性があり、その非対称性の喪失または逆転が、ストレスが関与する精神疾患の発症と関連があると考えられる。本研究で明らかになった右 ACC での特異的な GABA 神経系の機能低下は、先行研究と同様に CRS によって右 ACC が左 ACC に比べ、相対的に過活動となったことを示していると考えられる。今後の課題の一つはなぜ、ストレスによって左右非対称性が生じるかの原因を解明することにある。HPA 軸の制御に関わ

る mPFC には、GR が海馬の 75–80% の密度と豊富に存在している。一つの可能性として、GABA ニューロン上にある GR を介したストレス反応によるシナプス前終末の減少、もしくは GABA ニューロン自体の減少が右 ACC で顕著であることが考えられる。しかし GR が GABA ニューロン上に存在するのか、具体的な局在は明らかになっていない。免疫組織化学的な手法を使い、ACC 内での GR の局在、CRS 後の GABA ニューロンの形態および GR 発現量の変化を定量する必要があるだろう。

4-6. 結語

慢性ストレスにより ACC における GABA 神経系の機能が低下、ACC 興奮性シナプス伝達の短期および長期可塑性が増大することが本研究で明らかになった。行動実験により示された個体レベルでの多動化とすくみ行動の減少といった行動変化は、ACC での GABA 神経系の機能低下により出力細胞である錐体細胞の興奮性が高まり、加えて ACC でのシナプス可塑性が増大したことと関連している可能性が示唆される。多動化のメカニズムとしてはさらに中脳からのドーパミン投射の調節作用の亢進的变化が関与し、その点にも GABA ニューロン抑制系の変化が関係する可能性が考えられる。

さらに ACC 右脳においてのみ mIPSC の頻度が慢性ストレスによって減少、脳機能に対する慢性ストレスの影響に、左右非対称性があることが明らかになった。今回、*in vitro* の実験系によりシナプスレベルで検出可能な脳の非対称性を発見したことにより、今後マクロレベルでの脳の非対称性がいつ、どのように生じるのか、ストレスが関連する精神疾患の発症に脳の非対称性がどのように関わっているのかについて、物質的な基盤に基づいた研究を行う足がかりが得られた。この点もまた本研究の大きな意義と考える。

参考文献

- Adriani, W., and Laviola, G., 2000. A unique hormonal and behavioral hyporesponsivity to both forced novelty and d-amphetamine in periadolescent mice. *Neuropharmacology* 39, 334-346.
- Ahima, R. S., and Harlan, R. E., 1990. Charting of type II glucocorticoid receptor-like immunoreactivity in the rat central nervous system. *Neuroscience* 39, 579-674.
- Albrechet-Souza, L., Borelli, K. G., Carvalho, M. C., Brandão, M. L., 2009. The anterior cingulate cortex is a target structure for the anxiolytic-like effects of benzodiazepines assessed by repeated exposure to the elevated plus maze and fos immunoreactivity. *Neuroscience* 164, 387-397.
- Benes, F. M., McSparren, J., Bird, E., D., SanGiovanni, J. P., Vincent, S. L., 1991. Deficits in small interneurons in prefrontal and cingulate cortices of schizophrenic and schizoaffective patients. *Arch Gen Psychiatry* 48, 996-1001.
- Benes, F.M., Taylor, J.B., Cunningham, M.C., 2000. Convergence and plasticity of monoaminergic systems in the medial prefrontal cortex during the postnatal period: implications for the development of psychopathology. *Cereb Cortex* 10, 1014-1027.
- Bianchi, M., Fone, K. F. C., Azmi, N., Heldbreder, C. A., Hagan, J.J., Marsden, C. A., 2006. Isolation rearing induces recognition memory deficits accompanied by cytoskeletal alterations in rat hippocampus. *Eur J Neurosci* 24, 2894-2902.
- Bowery, N. G., Hudson, A. L., Price, G.W., 1987. GABA_A and GABA_B receptor site distribution in the rat central nervous system. *Neuroscience* 20, 365-383.
- Brown, S. M., Henning, S., Wellman, C. L., 2005. Mild, Short-term stress alters dendritic morphology in rat medial prefrontal cortex. *Cereb cortex* 15, 1714-1722.
- Bush, G., Luu, P., Posner, M. I., 2000. Cognitive and emotional influences in anterior cingulate cortex. *Trends Cogn Sci* 4, 215-222.
- Bush, G., Valera, E. M., Seidman, L. J., 2005. Functional neuroimaging of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder: a review and suggested future directions. *Biol Psychiatry* 57, 1273-1284.
- Cardinal, R. N., Parkinson, A., Hall, J., Everitt, B. J., 2002. Emotion and motivation: the role of the amygdala, ventral striatum, and prefrontal cortex. *Neurosci Biobehav Rev* 26, 321-352.
- Carlson, J. N., Fitzgerald, L. W., Keller Jr, R. W., Glick, S. D., 1993. Lateralized changes in

- prefrontal cortical dopamine activity induced by controllable and uncontrollable stress in the rat. *Brain Res* 630, 178-187.
- Cerqueira, J.J., Mailliet, F., Almeida, O. F. X., Jay, T. M., Sousa, N., 2007a. The prefrontal cortex as a key target of the maladaptive response to stress. *J Neurosci* 27, 2781-2787.
- Cerqueira, J.J., Taipa, R., Uylings, H.B.M., Almeida, O.F.X., Sousa, N., 2007b. Specific configuration of dendritic degeneration in pyramidal neurons of the medial prefrontal cortex induced by differing corticosteroid regimens. *Cereb Cortex* 17, 1998-2006.
- Charney, D., and Manji, H. K., 2004. Life stress, genes, and depression: multiple pathways lead to increased risk and new opportunities for intervention. *Sci STKE* 225, re5.
- Conrad, C.D., LeDoux, J.E., Magariños, A.M., McEwen, B.S., 1999. Repeated restraint stress facilitates fear conditioning independently of causing hippocampal CA3 dendritic atrophy. *Behav Neurosci* 113, 902-913.
- Cook, S. S., and Wellman, C. L., 2004. Chronic stress alters dendritic morphology in rat medial prefrontal cortex. *J Neurobiol* 60, 236-248.
- Cotter, D., Mackay, D., Landau, S., Kerwin, R., Everall, I., 2001. Reduced cell density and neuronal size in the anterior cingulate cortex in major depressive disorder. *Arch Gen Psychiatry* 58, 545-553.
- Cryan, J. F., and Mombereau, C., 2004. In search of a depressed mouse: utility of models for studying depression-related behavior in genetically modified mice. *Mol Psychiatry* 9, 326-357.
- Cullen, T. J., Walker, M. A., Eastwood, S. L., Esiri, M. M., Harrison, P. J., Crow, T. J., 2006. Anomalies of asymmetry of pyramidal cell density and structure in dorsolateral prefrontal cortex in schizophrenia. *Br J Psychiatry* 188, 26-31.
- Czéh, B., Müller-Keuker, J. I., Rygula, R., Abumaria, N., Hiemke, C., Domenici, E., Fuchs, E., 2007. Chronic social stress inhibits cell proliferation in the adult medial prefrontal cortex: hemispheric asymmetry and reversal by fluoxetine treatment. *Neuropsychopharmacology* 32, 1490-1503.
- Czéh, B., Perez-Cruz, C., Fuchs, E., Flugge, G., 2008. Chronic stress-induced cellular changes in the medial prefrontal cortex and their potential clinical implications: does hemisphere location matter? *Behav Brain Res* 190, 1-13.
- Damsa, C., Kosel, M., Moussally, J., 2008. Current status of brain imaging in anxiety disorders. *Curr Opin Psychiatry* 22, 96-110.
- de Kloet, E.R., Oitzl, M.S., Joëls, M., 1999. Stress and cognition: are corticosteroids good or

- bad guys? Trends Neurosci 22, 422-426.
- Devinsky, O., Morrell, M. J., Vogt, B. A., 1995. Contributions of anterior cingulate cortex to behaviour. Brain 118, 279-306.
- Diamond, D.M., Campbell, A.M., Park, C.R., Halonen, J., Zoladz, P., 2007. The temporal dynamics model of emotional memory processing: A synthesis on the neurobiological basis of stress-induced amnesia, flashback and traumatic memories, and the Yerkes-Dodson Law. Neural Plast 2007, 60803.
- Dikman, Z. V., and Allen, J. J. B., 2000. Error monitoring during reward and avoidance learning in high- and low-socialized individuals. Psychophysiology 37, 43-54.
- Diorio, D., Viau, V., Meaney, M. J., 1993. The role of the medial prefrontal cortex (cingulate gyrus) in the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. J Neurosci 13, 3839-3847.
- Doherty, M. D., Gratton, A., 1999. Effects of medial prefrontal cortical injections of GABA receptor agonists and antagonists on the local and nucleus accumbens dopamine responses to stress. Synapse 32, 288-300.
- Drevets, W. C., Price, J. L., Furey, M. L., 2008. Brain structural and functional abnormalities in mood disorders: Brain Struct Funct 213, 93-118.
- Dunn, J. D., 1990. Plasma corticosterone responses to electrical stimulation of the medial frontal cortex. Neurosci Res Commun 7, 1-7.
- Fryszak, R. J., and Neafsey, E. J., 1991. The effect of medial frontal cortex lesions on respiration, "freezing," and ultrasonic vocalizations during conditioned emotional responses in rats. Cereb Cortex 1, 418-425.
- Gehring, W. J., Goss, B., Coles, M. G. H., Meyer, D. E., Donchin, E., 1993. A neural system for error detection and compensation. Psychol Sci 4, 385-190.
- George, M. S., Ketter, T. A., Parekh, P. I., Horwits, B., Herscovitch, P., Post, R. M., 1995. Brain activity during transient sadness and happiness in healthy women. Am J Psychiatry 152, 341-351.
- Gravin, G. B., Paré, W. P., Sandbak, T., Bakke, H. K., Murison, R., 1994. Restraint stress in biomedical research: an update. Neurosci Biobehav Rev 18, 223-249.
- Govindarajan, A., Rao, B. S. Nair, D., Trinh, M., Mawjee, N., Tonegawa, S., Chattarji, S., 2006. Transgenic brain-derived neurotrophic factor expression causes both anxiogenic and antidepressant effects. Proc Natl Acad Sci U S A 103, 13208- 13213.
- Hefner, K., and Holmes, A., 2007. Ontogeny of fear-, anxiety- and depression-related behavior

- across adolescence in C57BL/6J mice. *Behav Brain Res* 176, 210-215.
- Holmes, A., and Wellman, C. L., 2009. Stress-induced prefrontal reorganization and executive dysfunction in rodents. *Neurosci Biobehav Rev* 33, 773-783.
- Hsu, H. R., Chen, T. Y., Chan, M. H., Chen, H. H., 2007. Acute effects of nicotine on restraint stress-induced anxiety-like behavior, c-Fos expression, and corticosterone release in mice. *Eur J Pharmacol* 566, 124-131.
- Huang, C.C., Lin, H.J., Hsu, K.S., 2007. Repeated cocaine administration promotes long-term potentiation induction in rat medial prefrontal cortex. *Cereb Cortex* 17, 1877-1888.
- Insel, T. R., Miller, L. P., Gelhard, R. E., 1990. The ontogeny of excitatory amino acid receptors in rat forebrain-I. N-methyl-D-aspartate and quisqualate receptors. *Neuroscience* 35, 45-51.
- Jay, T. M., Rocher, C., Hotte, M., naudon, L., Gurden, H., Spedding, M., 2004. Plasticity at hippocampal to prefrontal cortex synapses is impaired by loss of dopamine and stress: importance for psychiatric diseases. *Neurotox Res* 6, 233-244.
- Jones, G. H., Hernandez, T. D., Kendall, D. A., Marsden, C. A., Robbins, T. W., 1992. Dopaminergic and serotonergic function following isolation rearing in rats: study of behavioural responses and postmortem and in vivo neurochemistry. *Pharmacol Biochem Behav* 43, 17-35.
- Karreman, M., and Moghaddam, B., 1996. The prefrontal cortex regulates the basal release of dopamine in the limbic striatum: an effect mediated by ventral tegmental area. *J Neurochem* 66, 589-598.
- Kawakami, R., Shinohara, Y., Kato, Y., Sugiyama, H., Shigemoto, R., Ito, I., 2003. Asymmetrical allocation of NMDA receptor epsilon2 subunits in hippocampal circuitry. *Science* 300, 990-994.
- Khan, Z. U., Gutiérrez, A., Martín, R., Peñafiel, A., Rivera, A., De La Calle, A., 1998. Differential regional and cellular distribution of dopamine D2-like receptors: an immunocytochemical study of subtype-specific antibodies in rat and human brain. *J Comp Neurol* 402, 353-371.
- Lapiz, M. D., Fulford, A., Muchimapura, S., Mason, R., Parker, T., Marsden, C.A., 2003. Influence of postweaning social isolation in the rat on brain development, conditioned behavior, and neurotransmission. *Neurosci Behav Physiol* 33, 13-29.
- Laviola, G., Macri, S., Morley-Fletcher, S., Adriani, W., 2003. Risk-taking behavior in adolescent mice: psychobiological determinants and early epigenetic influence. *Neurosci*

- Biobehav Res 27, 19-31.
- LeDoux, J.E., 2000. Emotion circuits in the brain. *Annu Rev Neurosci* 23, 155-184.
- Levine, J.B., Youngs, R.M., MacDonald, M.L., Chu, M., Leeder, A.D., Berthiaume, F., Konradi, C., 2007. Isolation rearing and hyperlocomotion are associated with reduced immediate early gene expression levels in the medial prefrontal cortex. *Neuroscience* 145, 42-55.
- Liauw, J., Wu, L.J., Zhuo, M., 2005. Calcium-stimulated adenylyl cyclases required for long-term potentiation in the anterior cingulate cortex. *J Neurophysiol* 94, 878-882.
- Liu, R. J., and Aghajanian, G. K., 2008. Stress blunts serotonin- and hypocretin- evoked EPSCs in prefrontal cortex: role of corticosterone-mediated apical dendritic atrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 359-364.
- Luine, V. N., Spencer, R. L., McEwen, B. S., 1993. Effects of chronic corticosterone ingestion on spatial memory performance and hippocampal serotonergic function. *Brain Res* 616, 65-70.
- Mailliet, F., Qi, H., Rocher, C., Spedding, M., Svenningsson, P., Jay, T. M., 2008. Protection of stress-induced impairment of hippocampal/prefrontal LTP through blockade of glucocorticoid receptors: implication of MEK signaling. *Exp Neurol* 211, 593-596.
- Maroun, M., and Richter-Levin, G., 2003. Exposure to acute stress blocks the induction of long-term potentiation of the amygdala-prefrontal cortex pathway *in vivo*. *J Neurosci* 23, 4406-4409.
- Matsuda, S., Peng, H., Yoshimura, H., Wen, T. C., Fukuda, T., Sakanaka, M., 1996. Persistent c-fos expression in the brains of mice with chronic social stress. *Neurosci Res* 26, 157-170.
- Matsumoto, M., Kanno, M., Togashi, H., Ueno, K., Otani, H., Mano, Y., Yoshioka, M., 2003. Involvement of GABA_A receptors in the regulation of the prefrontal cortex on dopamine release in the rat dorsolateral striatum. *Eur J Pharmacol* 482, 177-184.
- Matsumoto, M., Togashi, H., Kaku, A., Kanno, M., Tahara, K., Yoshioka, M., 2005. Cortical GABAergic regulation of dopaminergic responses to psychological stress in the rat dorsolateral striatum. *Synapse* 56, 117-121.
- Matsuyama, S., Taniguchi, T., Kadoyama, K., Matsumoto, A., 2008. Long-term potentiation-like facilitation through GABA_A receptor blockade in the mouse dentate gyrus *in vivo*. *Neuroreport* 19, 1809-1813.
- McEwen, B.S., 1994. Corticosteroids and hippocampal plasticity. *Ann N Y Acad Sci* 746,

- 134-142.
- Meaney, M. J., and Aitken, D. H., 1985. [³H]Dexamethasone binding in rat frontal cortex. *Brain Res* 328, 176-180.
- Mineur, Y. S., Mizoguchi, K., Ishige, A., 2006. Effects of unpredictable chronic mild stress on anxiety and depression-like behavior in mice. *Behav Brain Res* 175, 43-50.
- Mizoguchi, K., Ishige, A., Aburada, M., Tabira, T., 2003. Chronic stress attenuates glucocorticoid negative feedback: involvement of the prefrontal cortex and hippocampus. *Neuroscience* 119, 887-897.
- Mizoguchi, K., Ishige, A., Takeda, S., Aburada, M., Tabira, T., 2004. Endogenous glucocorticoids are essential for maintaining prefrontal cortical cognitive function. *J Neurosci* 24, 5492-5499.
- Mizoguchi, K., Shoji, H., Ikeda, R., Tanaka, Y., Tabira, T., 2008. Persistent depressive state after chronic stress in rats is accompanied by HPA axis dysregulation and reduced prefrontal dopaminergic neurotransmission. *Pharmacol Biochem Behav* 91, 170-175.
- Mizoguchi, K., Yuzurihara, M., Ishige, A., Sasaki, H., Chui, DH., Tabira, T. 2000. Chronic stress induces impairment of spatial working memory because of prefrontal dopaminergic dysfunction. *J Neurosci* 20, 1568-1574.
- Moghaddam, B., 2002. Stress activation of glutamate neurotransmission in the prefrontal cortex: implications for dopamine-associated psychiatric disorders. *Biol Psychiatry* 51, 775-787.
- Moghaddam, B., and Jackson, M., 2004. Effect of stress on prefrontal cortex function. *Neurotox Res* 6, 73-78.
- Moraska, A., Deak, T., Spencer, R.L., Roth, D., Fleshner, M., 2000. Treadmill running produces both positive and negative physiological adaptations in Sprague-Dawley rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279, R1321-1329.
- Morgan, M. A., and LeDoux, J. E., 1995. Differential contribution of dorsal and ventral medial prefrontal cortex to the acquisition and extinction of conditioned fear in rats. *Behav Neurosci* 109, 681-688.
- Otani, S., Auclair, N., Desce, J. M., Roisin, M. P., Crépel, F., 1999. Dopamine receptors and groups I and II mGluRs cooperate for long-term depression induction in rat prefrontal cortex through converging postsynaptic activation of MAP kinases. *J Neurosci* 19, 9788-9802.
- Palanza, P., 2001. Animal models of anxiety and depression: how are females different?

- Neurosci Biobehav 25, 219-233.
- Pascual, R., Zamora-Leòn, SP., Valero-Cabrè, A., 2006. Effects of postweaning social isolation and re-socialization on the expression of vasoactive intestinal peptide (VIP) and dendritic development in the medial prefrontal cortex of the rat. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 66, 7-14.
- Patel, P. D., Lopez, J. F., Lyons, D. M., Burke, S., Wallace, M., Schatzberg, A. F., 2000. Glucocorticoid and mineralocorticoid receptor mRNA expression in squirrel monkey brain. *J Psychiatr Res* 34, 383-392.
- Paus, T., 2001. Primate anterior cingulate cortex: where motor control, drive and cognition interface. *Nat Rev Neurosci* 2, 417-424.
- Perez-Cruz, C., Müller-Keuker, J. I., Heilbronner, U., Fuchs, E., Flügge, G., 2007. Morphology of pyramidal neurons in the rat prefrontal cortex: lateralized dendritic remodeling by chronic stress. *Neural Plast* 2007, 46276.
- Perrotti, L. I., Hadeishi, Y., Ulery, P. G., Barrot, M., Monteggia, L., Duman, R. S., Nestler, E. J., 2004. Induction of deltaFosB in reward-related brain structures after chronic stress. *J Neurosci* 24, 10594-10602.
- Petkov, V.V., and Yanev, S., 1982. Brain benzodiazepine receptor changes in rats with isolation syndrome. *Pharmacol Res Commun* 14, 739-744.
- Pezze, M. A., Bast, T., Feldon, J., 2003. Significance of dopamine transmission in the rat medial prefrontal cortex for conditioned fear. *Cereb Cortex*. 13, 371-380.
- Pillai-Nair, N., Panicker, AK., Rodriguiz, R.M., Gilmore, K.L., Demyanenko, GP., Huang, J.Z., Wetsel, W.C., Maness, P.F., 2005. Neural cell adhesion molecule-secreting transgenic mice display abnormalities in GABAergic interneurons and alterations in behavior. *J Neurosci* 25, 4659-4671.
- Radley, J.J., Sisti, H.M., Hao, J., Rocher, A.B., McCall, T., Hof, P.R., McEwen, B.S., Morrison, J.H., 2004. Chronic behavioral stress induces apical dendritic reorganization in pyramidal neurons of the medial prefrontal cortex. *Neuroscience* 125, 1-6.
- Rodríguez Manzanares, P. A., Isoardi, N. A., Carrer, H. F., Molina, V. A., 2005. Previous stress facilitates fear memory, attenuates GABAergic inhibition, and increases synaptic plasticity in the rat basolateral amygdala. *J Neurosci* 25, 8725-34.
- Rosenkranz, J. A., and Grace, A. A., 2002. Cellular mechanisms of infralimbic and prelimbic prefrontal cortical inhibition and dopaminergic modulation of basolateral amygdala neurons in vivo. *J Neurosci* 22, 324-337.

- Rosenkranz, J. A., Moore, H., Grace, A. A., 2003. The prefrontal cortex regulates lateral amygdala neuronal plasticity and responses to previously conditioned stimuli. *J Neurosci* 23, 11054-11064.
- Ryabinin, A. E., Melia, K. R., Cole, M., Bloom, F. E., Wilson, M. C., 1995. Alcohol selectively attenuates stress-induced c-fos expression in rat hippocampus. *J Neurosci* 15, 721-730.
- Sandi, C., and Loscertales, M., 1999. Opposite effects on NCAM expression in the rat frontal cortex induced by acute vs. chronic corticosterone treatments. *Brain Res* 828, 127-134.
- Seamans, J. K., Lapish, C. C., Durstewitz, D., 2008. Comparing the prefrontal cortex of rats and primates: insights from electrophysiology. *Neurotox Res* 14, 249-262.
- Seamans, J.K., and Yang, C.R., 2004. The principal features and mechanisms of dopamine modulation in the prefrontal cortex. *Prog Neurobiol* 74, 1-57.
- Serra, M., Sanna, E., Mostallino, M. C., Biggio, G., 2007. Social isolation stress and neuroactive steroids. *Eur Neuropsychopharmacol* 17, 1-11.
- Sotres-Bayon, F., Bush, D. E., LeDoux, J. E., 2004. Emotional perseveration: an update on prefrontal-amygdala interactions in fear extinction. *Learn Mem* 11, 525-535.
- Spear, L.P., 2000. The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neurosci Biobehav Rev* 24, 417-463.
- Strekalova, T., Spanaql, R., Bartsch, D., Henn, F.A., Gass, P., 2004. Stress-induced anhedonia in mice is associated with deficits in forced swimming and exploration. *Neuropsychopharmacology* 29, 2007-2017.
- Suhara, T., Okubo, Y., Yasuno, F., Sudo, Y., Inoue, M., Ichimiya, T., Nakashima, Y., Nakayama, K., Tanada, S., Suzuki, K., Halldin, C., Farde, L., 2002. Decreased dopamine D2 receptor binding in the anterior cingulate cortex in schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 59, 25-30.
- Sullivan, R. M., 2004. Hemispheric asymmetry in stress processing in rat prefrontal cortex and the role of mesocortical dopamine. *Stress* 7, 131-143.
- Sullivan, R. M., and Gratton, A., 1999. Lateralized effects of medial prefrontal cortex lesions on neuroendocrine and autonomic stress responses in rats. *J Neurosci* 19, 2834-2840.
- Sullivan, R. M., and Gratton, A., 2002a. Prefrontal cortical regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal function in the rat and implications for psychopathology: side matters. *Psychoneuroendocrinology* 27, 99-114.
- Sullivan, R. M., and Gratton, A., 2002b. Behavioral effects of excitotoxic lesions of ventral medial prefrontal cortex in the rat are hemisphere-dependent. *Brain Res* 927, 69-79.
- Sullivan, R. M., and Szechtman, H., 1995. Asymmetrical influence of mesocortical dopamine

- depletion on stress ulcer development and subcortical dopamine systems in rats: implications for psychopathology. *Neuroscience* 65, 757-767.
- Uylings, H. B., Groenewegen, H. J., Kolb, B., 2003. Do rats have a prefrontal cortex? *Behav Brain Res* 146, 3-17.
- Viggiano, D., 2008. The hyperactive syndrome: metanalysis of genetic alterations, pharmacological treatments and brain lesions which increase locomotor activity. *Behav Brain Res* 194, 1-14.
- Vogt, B. A., Finch, D. M., Olson, C. R., 1992. Functional heterogeneity in cingulate cortex: the anterior executive and posterior evaluative regions. *Cereb Cortex* 2, 435-443.
- Võikar, V., Polus, A., Vasar, E., Rauvala, H., 2005. Long-term individual housing in C57BL/6J and DBA/2 mice: assessment of behavioral consequences. *Genes Brain Behav* 4, 240-252.
- Wei, F., Li, P., Zhuo, M., 1999. Loss of synaptic depression in mammalian anterior cingulate cortex after amputation. *J Neurosci* 19, 9346-9354.
- Wei, F., Wang, G. D., Kerchner, G. A., Kim, S. J., Xu, H. M., Chen, Z. F., Zhuo, M., 2001. Genetic enhancement of inflammatory pain by forebrain NR2B overexpression. *Nat Neurosci* 4, 164-169.
- Wei, F., Xia, X. M., Tang, J., Ao, H., Ko, S., Liauw, J., Qiu, C. S., Zhuo, M., 2003. Calmodulin regulates synaptic plasticity in the anterior cingulate cortex and behavioral responses: a microelectroporation study in adult rodents. *J Neurosci* 23, 8402-8409.
- Wellman, C.L., 2001. Dendritic reorganization in pyramidal neurons in medial prefrontal cortex after chronic corticosterone administration. *J Neurobiol* 49, 245-253.
- Wigström, H., and Gustafsson, B., 1983. Large long-lasting potentiation in the dentate gyrus in vitro during blockade of inhibition. *Brain Res* 275, 153-158.
- Wood, G.E., Norris, E.H., Waters, E., Stoldt, J.T., McEwen, B.S., 2008. Chronic immobilization stress alters aspects of emotionality and associative learning in the rat. *Behav Neurosci* 122, 282-292.
- Wood, G.E., Young, L.T., Reagan, L.P., Chen, B., McEwen, B.S., 2004. Stress-induced structural remodeling in hippocampus: Prevention by lithium treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 3973-3978.
- Woolley, C. S., Gould, E., McEwen, B. S., 1990. Exposure to excess glucocorticoids alters dendritic morphology of adult hippocampal pyramidal neurons. *Brain Res* 531, 225-2231.

- Wu, Y., Kawakami, R., Shinohara, Y., Fukaya, M., Sakimura, K., Mishina, M., Watanabe, M., Ito, I., Shigemoto, R., 2005. Target-cell-specific left-right asymmetry of NMDA receptor content in schaffer collateral synapses in epsilon1/NR2A knock-out mice. *J Neurosci* 25, 9213-9226.
- Wu, L. J., Toyoda, H., Zhao, M. G., Lee, Y. S., Tang, J., Ko, S. W., Jia, Y. H., Shum, F. W., Zerbinatti, C. V., Bu, G., Wei, F., Xu, T. L., Muglia, L. J., Chen, Z. F., Auberson, Y. P., Kaang, B. K., Zhuo, M., 2005. Upregulation of forebrain NMDA NR2B receptors contributes to behavioral sensitization after inflammation. *J Neurosci* 25, 11107-11116.
- Yamasue, H., Iwanami, A., Hirayasu, Y., Yamada, H., Abe, O., Kuroki, N., Fukuda, R., Tsujii, K., Aoki, S., Ohtomo, K., Kato, N., Kasai, K., 2004. Localized volume reduction in prefrontal, temporolimbic, and paralimbic regions in schizophrenia: an MRI parcellation study. *Psychiatry Res* 131, 195-207.
- Yee, B. K., Keist, R., von Boehmer, L., Studer, R., Benke, D., Hagenbuch, N., Dong, Y., Malenka, R. C., Fritschy, J. M., Bluethmann, H., Feldon, J., Möhler, H., Rudolph, U., 2005. A schizophrenia-related sensorimotor deficit links $\alpha 3$ -containing GABA_A receptors to a dopamine hyperfunction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 17154-17159.
- Yokoyama, C., and Sasaki, K., 1999. Regional expressions of Fos-like immunoreactivity in rat cerebral cortex after stress: restraint and intraperitoneal lipopolysaccharide. *Brain Res* 816, 267-275.
- Zhao, M. G., Ko, S. W., Wu, L. J., Toyoda, H., Xu, H., Quan, J., Li, J., Jia, Y., Ren, M., Xu, Z. C., Zhuo, M., 2006. Enhanced presynaptic neurotransmitter release in the anterior cingulate cortex of mice with chronic pain. *J Neurosci* 26, 8923-8930.
- Zhuo, M., 2006. Molecular mechanisms of pain in the anterior cingulate cortex. *J Neurosci Res* 84, 927-933.

謝辞

指導教官の村越先生には、本研究の機会を与えて下さり、実験から論文作成まで丁寧にご指導頂いたことを深く感謝致します。東京医科歯科大学を卒業された秦さん、東京大学村越研究室の大城さん、東京大学川戸研究室の向井さん、北條さん、村上さん、大石さんらには、実験手法の手引き、研究に関する議論等、様々な面でご指導頂きありがとうございました。また共同研究をして頂いた鈴木先生、永野先生をはじめ日本医科大学薬理学教室の皆様にご指導を頂き、本研究を支えて下さったおかげで、投稿論文および博士論文を仕上げることができたことをここに謹んで感謝致します。また研究以外の面で支えて下さった皆様に心から感謝致します。本研究を通して学んだことを、今後活かしていけるよう精進していく所存です。