

Bush *et al*, 2000, Trends in Cognitive Sciences, 4, p.216 より引用

図1-1. ヒト前部帯状回における機能区分と領野区分

ヒト前部帯状回（ACC）は、2つの機能区分に分けられている。吻側の24 a-c、32野、腹側の25、33野は情動領域（青線内）、24a'-c'、32'野は認知領域（赤線内）に概ね該当するとされる。

情動領域は扁桃体、線条体、視床下部などとの線維連絡があり、自律神経系、内分泌系の制御に関与するとともに、情動に関する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とされる。

認知領域は、反応の選択と認知過程に関与する痛覚情報を、内側視床核から受け取っている。また運動関連脳領域との関連が深く、一次運動野、前運動野、補足運動野などと相互に線維連絡がある。この領域は運動開始前の段階で、競合する情報、エラー情報をモニターし、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される。

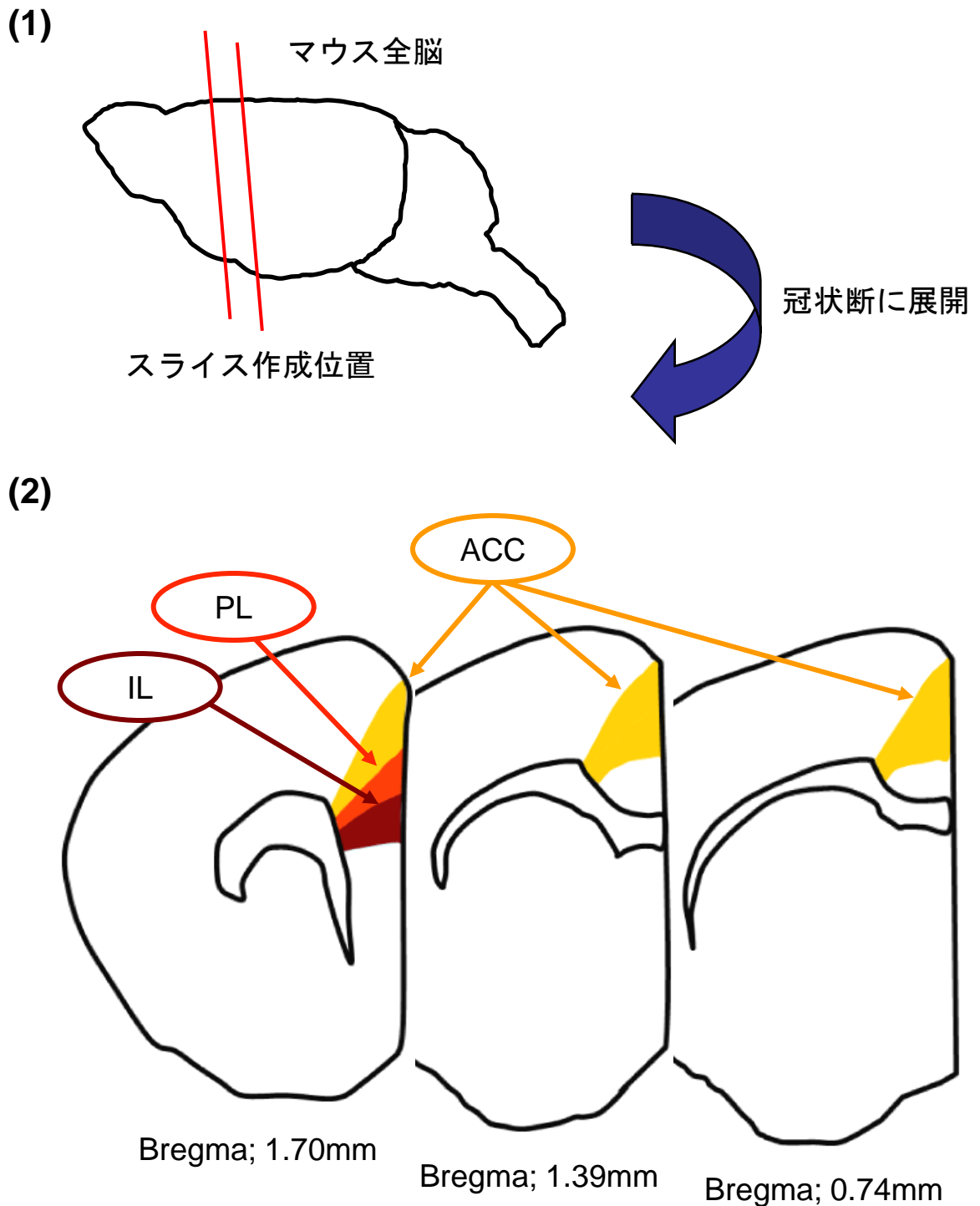


図1-2. マウス全脳とACC

- (1) マウスの全脳。おおよそBregma 0.75 - 1.7 mm (2本の赤線範囲内) でスライスを作成した。スライスの厚さは、すべて350 μ m。
- (2) 冠状断に展開したスライス。ACCは薄いオレンジ色の部分。濃いオレンジ色がPrelimbic Cortex (PL)、茶色がInfralimbic Cortex (IL) である。

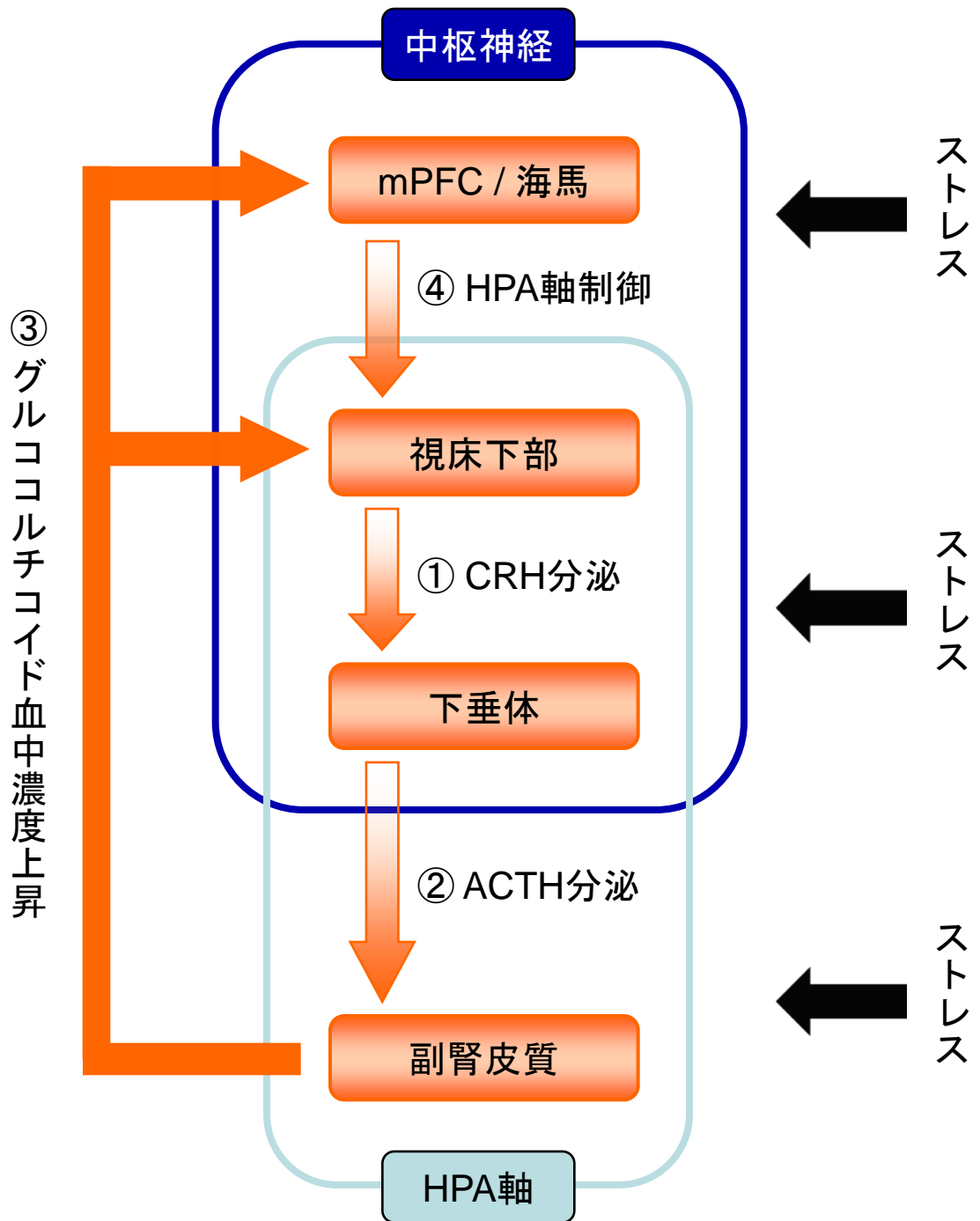


図1-3. ストレスと視床下部—下垂体—副腎系（HPA軸）

ストレスを受けると、① 視床下部室傍核（PVN）から副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン（CRH）が放出される。② それを受け、下垂体から副腎皮質刺激ホルモン（ACTH）が分泌される。③ ACTHは副腎皮質に作用し、グルココルチコイドの合成が促進される。④ 放出されたグルココルチコイドは、mPFC、海馬に作用し、このストレス反応系（HPA axis）に抑制がかかる。これをネガティブフィードバックと呼ぶ。



実験は防音室内で実施

壁面から出る赤外線で、マウスの立ち上がり回数をカウント

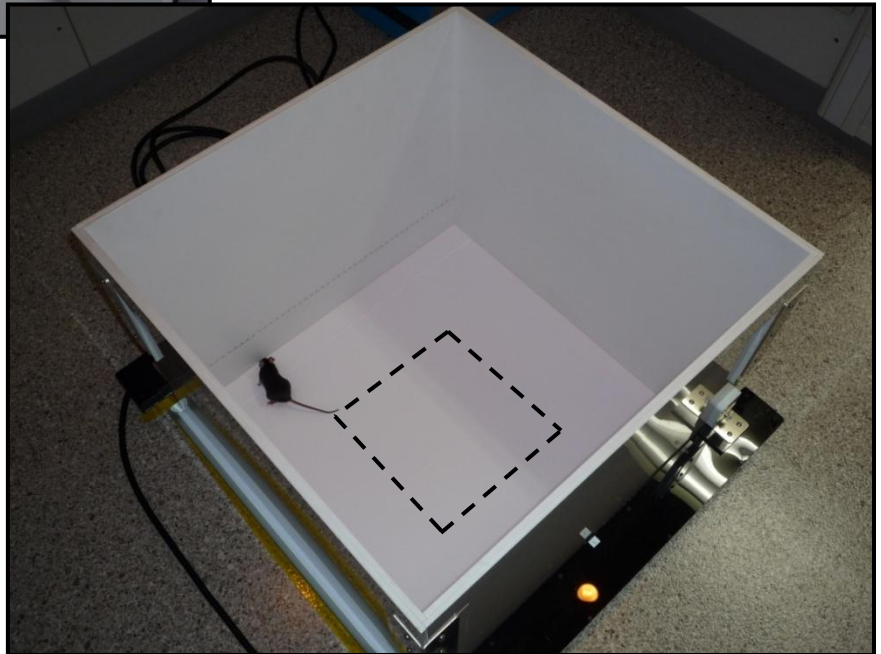
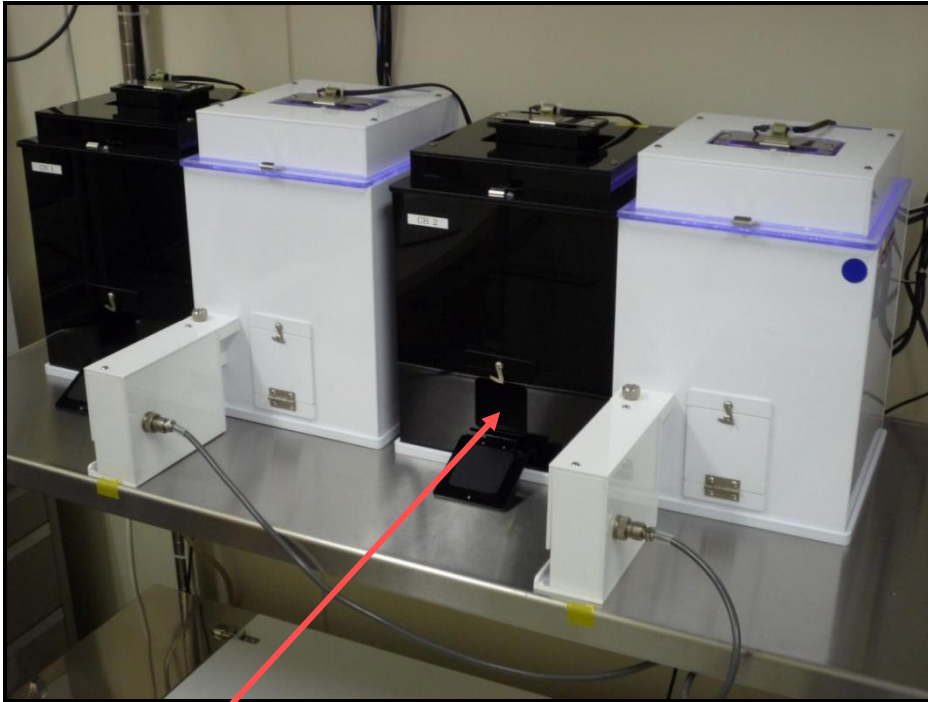


図2-1. オープンフィールドテスト

マウスの活動量や情動性を評価する。一般的に不安を感じやすいマウスは、活動量が少なく、壁際に沿って行動し、立ち上がり回数が少ないとされる。床面の破線は、おおよその中央エリア（30cm × 30cm）を示す。写真は、実際に本研究で行った日本医科大学薬理学教室の実験施設（行動実験は以下同様）。



入口

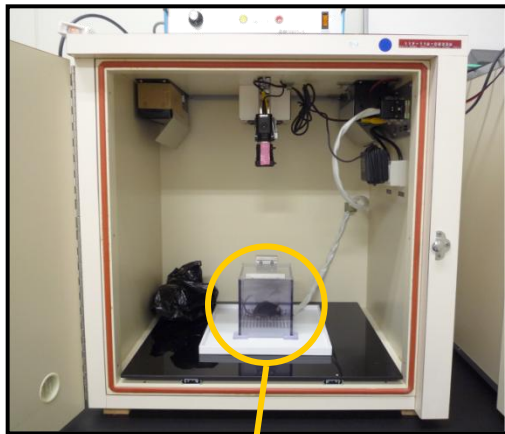


図2-2. 明暗選択テスト

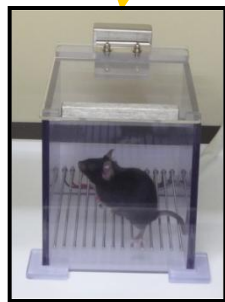
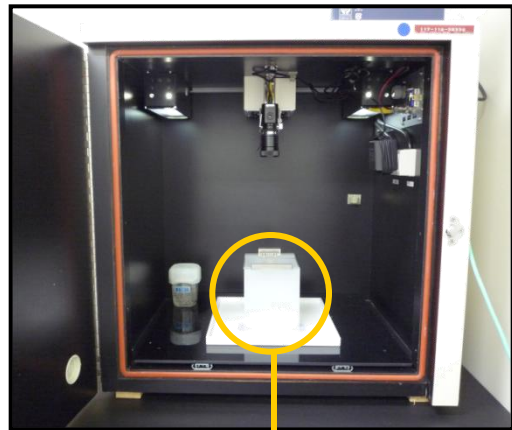
不安様行動を評価する。2つの箱の間には通路がある。黒い暗箱側面の入り口から自発的に中に入るようマウスを促す。不安を感じやすいマウスは、明箱（全体が白い箱）に入るまでの時間（潜時）が長く、明箱での滞在時間が短いとされる。

(1)

条件付け用実験箱



Tone-dependent 用実験箱



床グリットから
電流が流れる



(2)

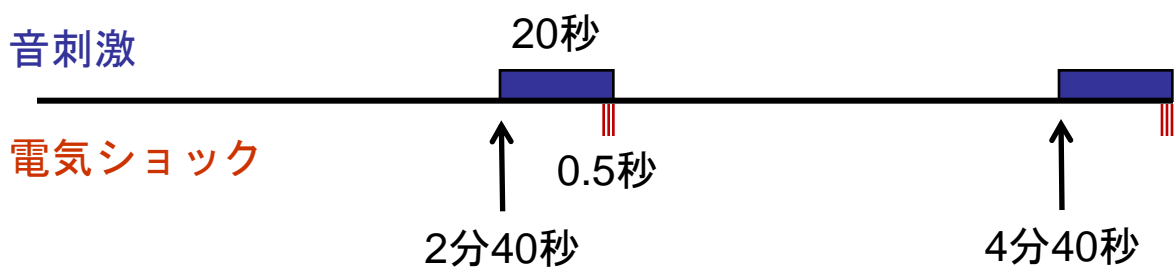
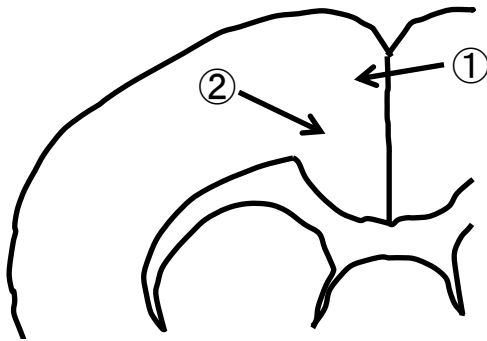


図2-3. 恐怖条件付けテスト

- (1) 情動記憶を測定する。実験箱は防音されている。tone-dependent 用実験箱は、内壁の色、マウスを収納する箱の色、触感をコンディショニング用実験箱と変え、音刺激に特化した条件付けの強さを測定する。実験箱内には、匂いの異なる芳香剤を入れてある。
- (2) 条件付けのパラダイムを示す。5分間のうち2回、2分40秒後からと4分40秒後から20秒間、70 dB、10 kHzの音を条件刺激として聞かせる。最後の0.5秒間に0.3 mAの電気ショックを無条件刺激として与える。

(1)



① 記録部位：第II/III層

② 刺激部位：深部層（第V / VI層）

(2)

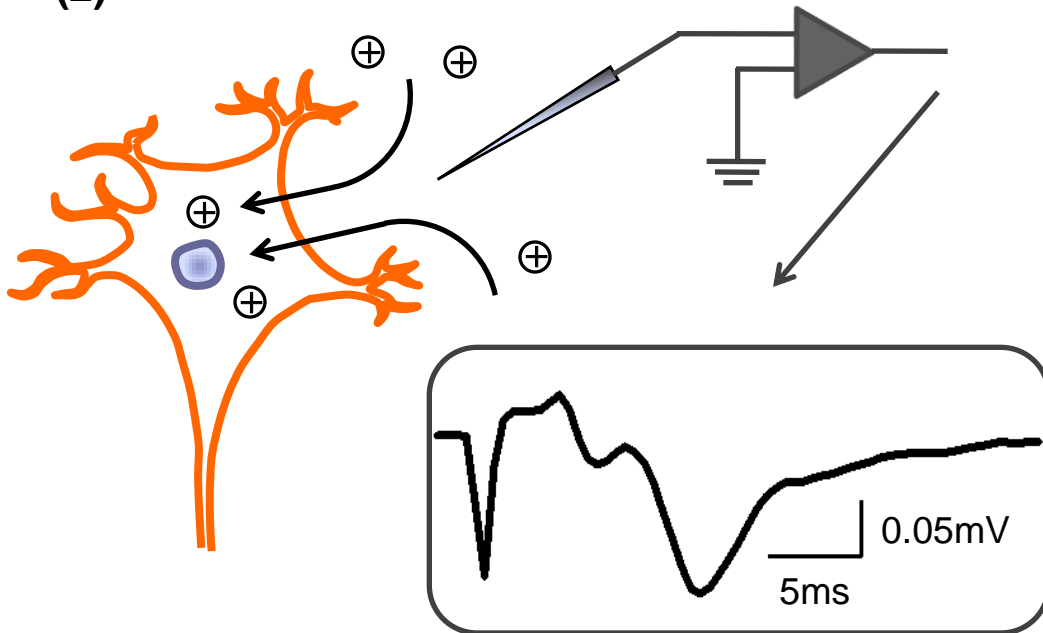
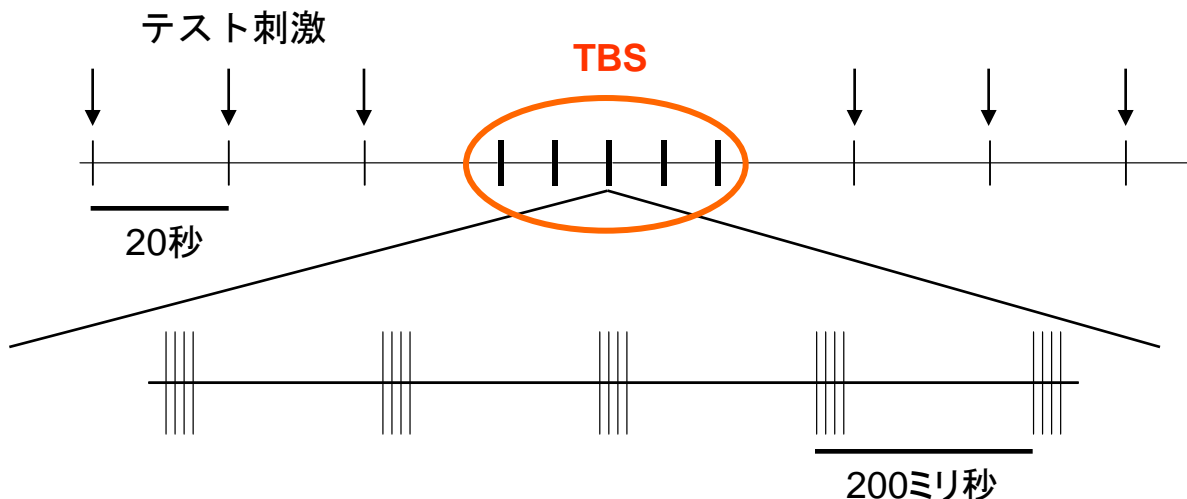


図2-4. 細胞外電位記録法による fEPSP slopeの測定

- (1) 記録電極を第II/III層に刺し、記録を取った (①)。刺激電極は、視床や他の皮質からの入力が通過する深部層に刺した (②)。
- (2) 深部層刺激により発生した活動電位により、シナプス前終末から神経伝達物質が放出される。放出された神経伝達物質は後シナプスの受容体に結合、チャネルが開口し、陽イオンが細胞内に流入することでマイナスに変化した細胞外の電場電位が、フィールド興奮性シナプス後電位 (fEPSP) として記録される。

(1) 長期増強 (LTP: long-term potentiation)



(2) 長期抑圧 (LTD: long-term depression)

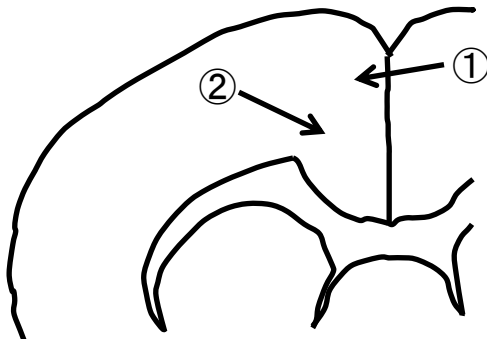
テスト刺激



図2-5. LTP、およびLTD誘発のパラダイム

- (1) LTP : 20秒間隔でテスト刺激を与え、30分以上 fEPSP slope の安定を確認後、シータバースト刺激 (TBS) 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、さらにこの刺激セットを5秒間隔で5回与え、LTPを誘発した。
- (2) LTD : 同様にテスト刺激を与え、fEPSP slope の安定を確認後、1秒間に1回 (1Hz) の刺激を15分間 (900発) 与えLTDを誘発した。

(1)



① 記録部位：第II/III層

② 刺激部位：深部層（第V / VI層）

(2)

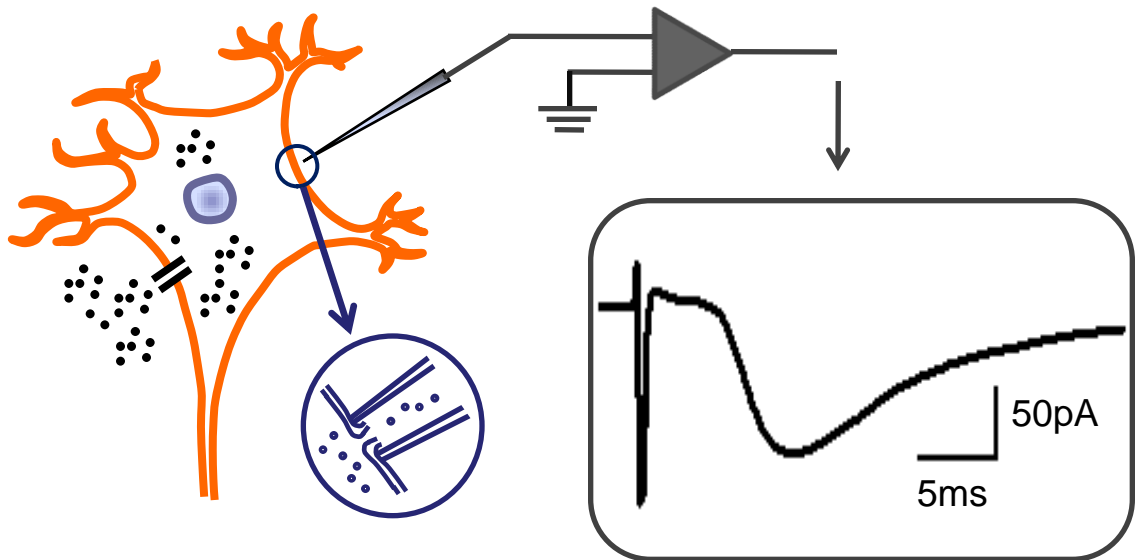


図2-6. ホールセルパッチクランプ法による測定

(1) 記録部位 (①) と刺激部位 (②) を示す。

(2) 細胞膜に圧着したガラス記録電極先端に陰圧をかけ電極内側の細胞膜（パッチ膜）を破ると、記録電極と細胞質が導通した状態となる。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定することで、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）を記録できる。右下に示した波形は、電位を -70mV に固定、深部層刺激により第II/III層錐体細胞で誘発された興奮性シナプス後電流（EPSC）。

興奮性シナプス

抑制性シナプス

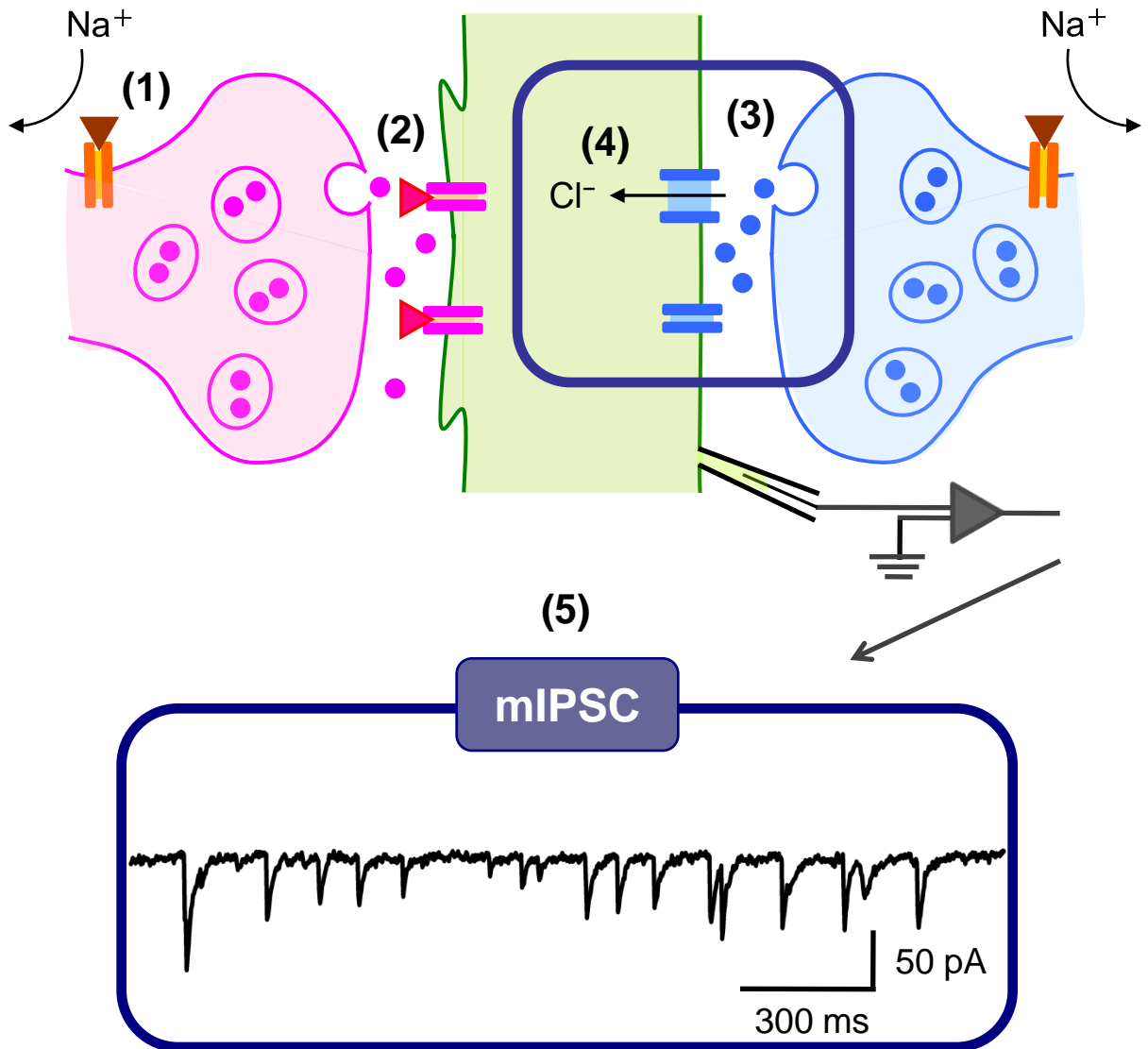


図2-7. 微小抑制性シナプス後電流（mIPSC）の測定

- (1) TTX (▼) でナトリウムチャネルをブロック、活動電位の発生を抑制する。興奮伝導が抑制され、シナプス前終末で脱分極が発生しなくなるため、多数のシナプス小胞からの神経伝達物質の同時放出が抑制される。
- (2) 非NMDA型グルタミン酸受容体拮抗薬であるDNQX (▶)、およびNMDA型グルタミン酸受容体拮抗薬、D-APV (図には示さず) でシナプス後膜にあるグルタミン酸受容体の機能を阻害する。
- (3) GABAニューロンのシナプス前終末にある個々のシナプス小胞からは、神経伝達物質GABAが自発的に放出される。
- (4) シナプス後膜にあるGABA受容体への結合によりクロライドイオンが細胞内に流入、mIPSCが発生する。
- (5) ACC第II/III層錐体細胞のmIPSCを、ホールセル電極と増幅器を介して測定する。

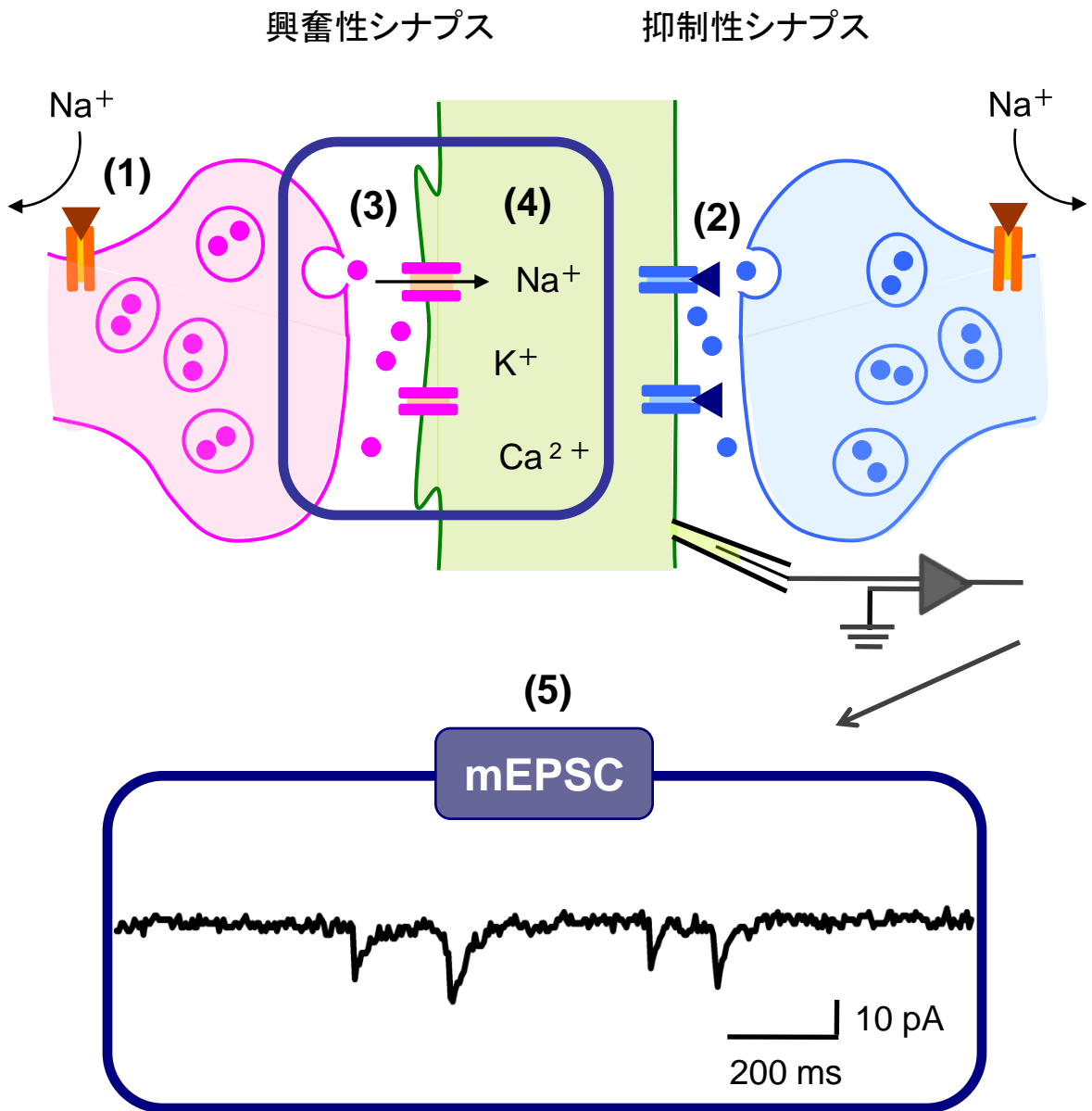


図2-8. 微小興奮性シナプス後電流（mEPSC）の測定

- (1) TTX (▼) 灌流適用は、mIPSCsと同様である。
- (2) GABA_A受容体拮抗薬であるbicuculline (◀)、およびGABA_B受容体拮抗薬、CGP 55845 (図には示さず) を灌流適用し、シナプス後膜のGABA受容体の機能を阻害する。
- (3) 興奮性錐体細胞のシナプス前終末にある個々のシナプス小胞からは、神経伝達物質グルタミン酸が自発的に放出される。
- (4) シナプス後膜にあるグルタミン酸受容体への結合により、ナトリウムイオンを中心とする陽イオンの細胞内に流入、mEPSCが発生する。
- (5) ACC第II/III層錐体細胞のmEPSCを、ホールセル電極と増幅器を介して測定する。

	Control	CRS
Body weight, BW (g)	Day 1 15.7±0.2 (n=11)	15.9±0.2 (n=10)
	Day 3 16.6±0.3 (n=11)	16.0±0.2 (n=10)
	Day 5 17.5±0.4 (n=11)	16.6±0.2* (n=10)
	Day 7 18.3±0.3 (n=11)	16.3±0.2** (n=10)
Bilateral adrenal gland weight (mg/g BW)	0.07±0.01 (n=6)	0.16±0.02** (n=6)
Thymus weight (mg/g BW)	3.5±0.1 (n=6)	2.4±0.1** (n=6)

Values are mean ± SEM, * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs. Control.

表1. CRS による体重、副腎および胸腺の重量変化

- (1) 平均体重は7日間の慢性拘束ストレスにより、CRS群で有意に増加の抑制がみられた。拘束開始3日目まではコントロール群と比べ有意差はなかったが、5日目、7日目で、有意に増加が抑制された。
- (2) 両側の副腎の平均重量は、CRS群がコントロール群に比べ有意に肥大していた。
- (3) 胸腺は、CRS群がコントロール群と比べ有意に縮小していた。

オープンフィールドテストの結果

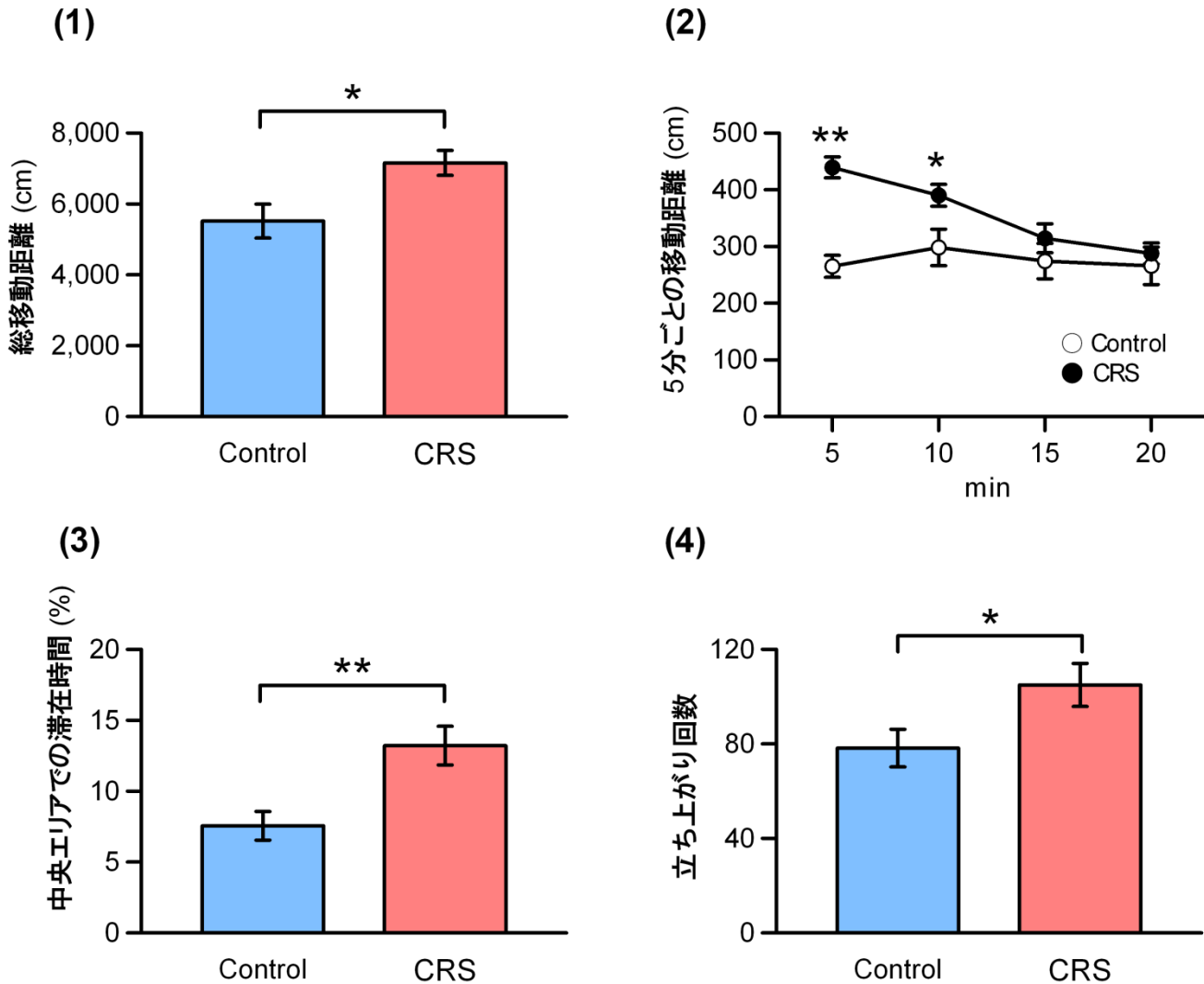
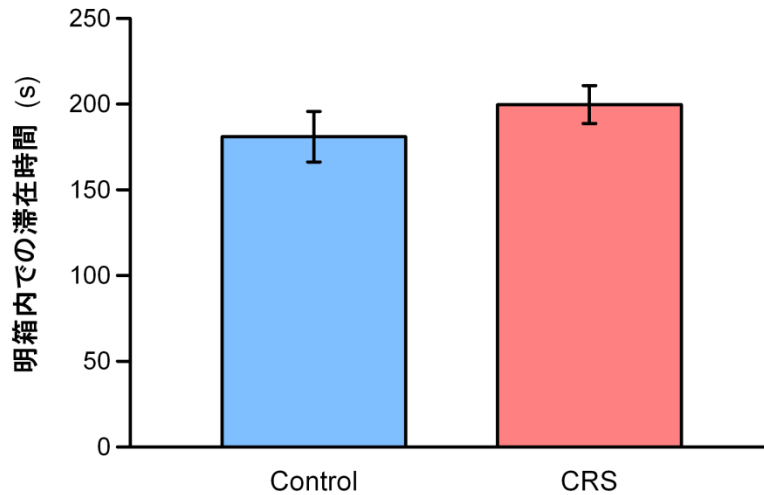


図3-1. CRSにより総移動距離が増加するなど活動量が増加した

- (1) 20分間の総移動距離は、CRS群がコントロール群に比べ有意に増加した。コントロール群 $n = 9$, CRS群 $n = 12$; * $p = 0.011$ 。
- (2) 5分ごとの移動距離は、実験開始から10分までの移動距離が、CRS群で有意に増加した。後半の10分間は両群間で、有意差はなかった。0 - 5分; ** $p = 0.000004$ 、5 - 10分; $p = 0.02$ 。
- (3) 中央エリアでの滞在時間は、CRS群がコントロール群と比べ有意に増加した。 * $p = 0.006$ 。
- (4) 立ち上がり回数は、CRS群で有意に増加した。 * $p = 0.048$ 。

明暗選択テストの結果

(1)



(2)

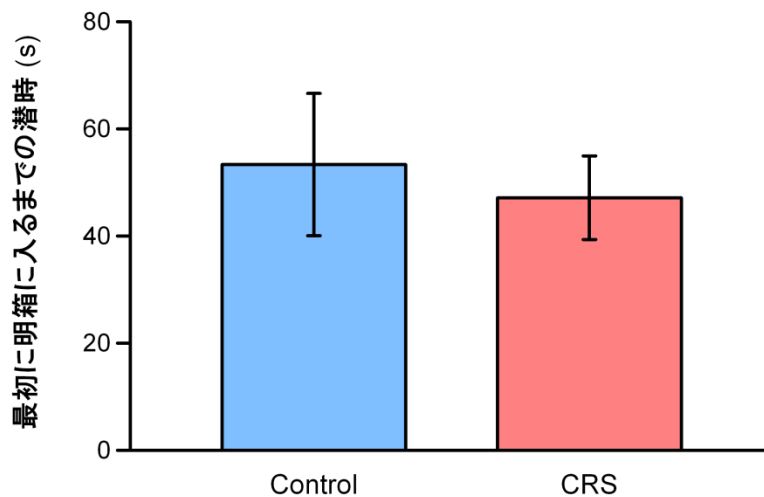
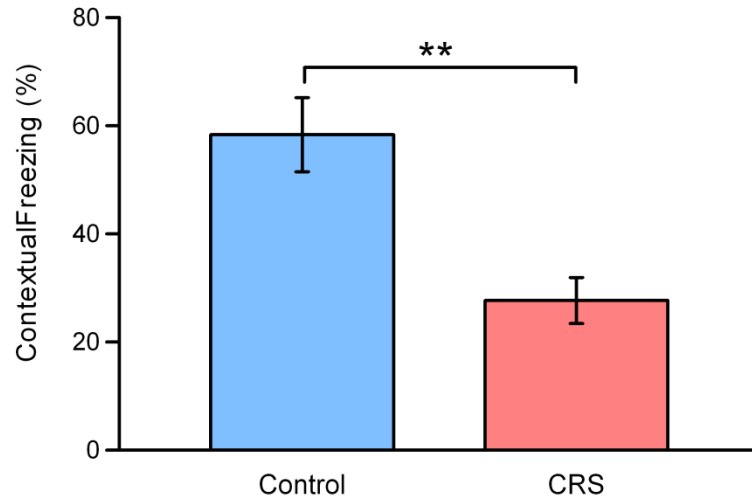


図3-2. 不安様行動には CRS の影響はなかった

- (1) 実験時間10分間のうち、明箱内での滞在時間は両群間で有意差はなかった。コントロール群 $n = 12$, CRS群 $n = 14$; $p = 0.31$ 。
- (2) 実験開始から最初に明箱に入るまでの時間（潜時）は、両群間で有意差はなかった。 $p = 0.68$ 。

恐怖条件付けテストの結果

(1)



(2)

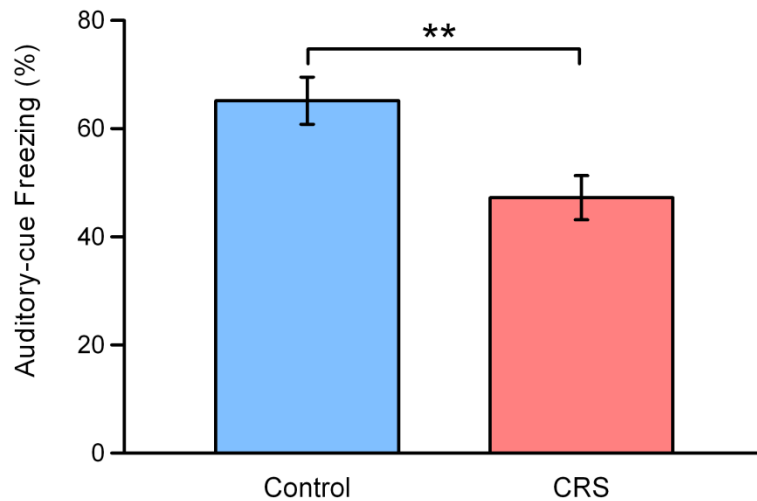


図3-3. CRS によりすくみ行動が減少した

- (1) Contextual freezingでは、CRS群がコントロール群に比べ有意にすくみ行動が減少した。コントロール群 $n = 11$, CRS群 $n = 14$, ** $p = 0.0006$ 。
- (2) Auditory-cue freezingでも、CRS群がコントロール群と比べ有意にすくみ行動が減少した。** $p = 0.007$ 。

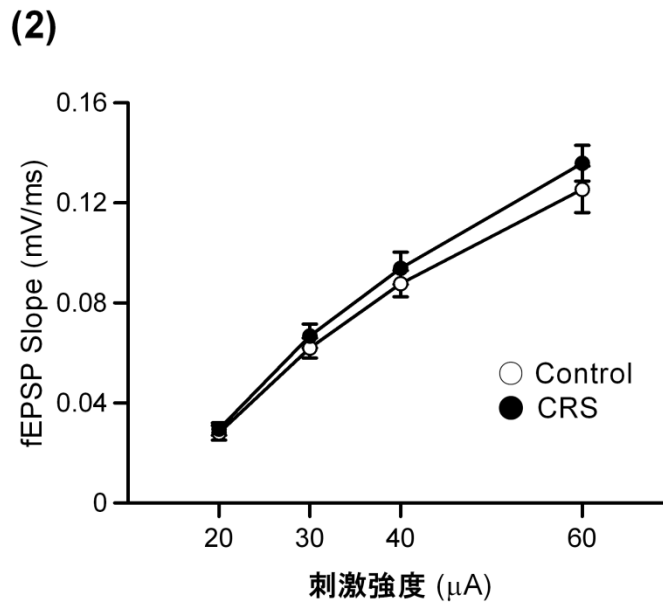
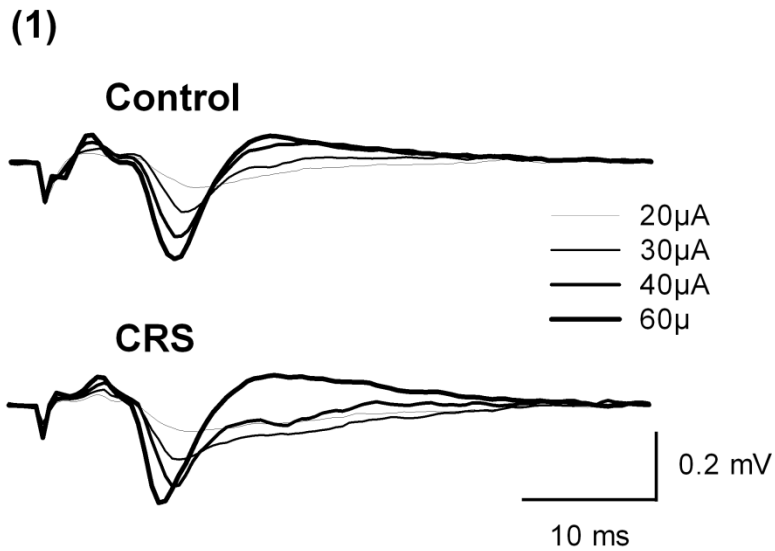
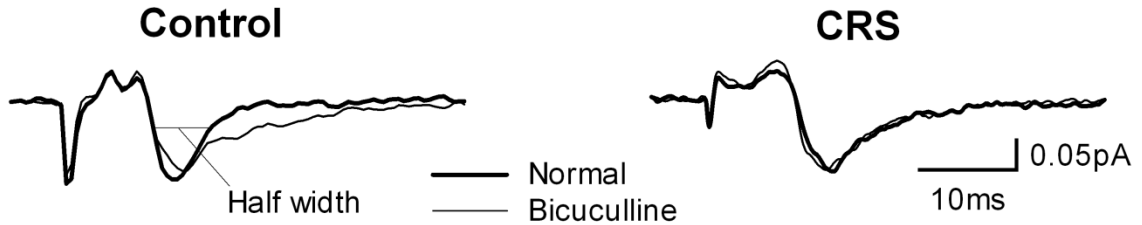


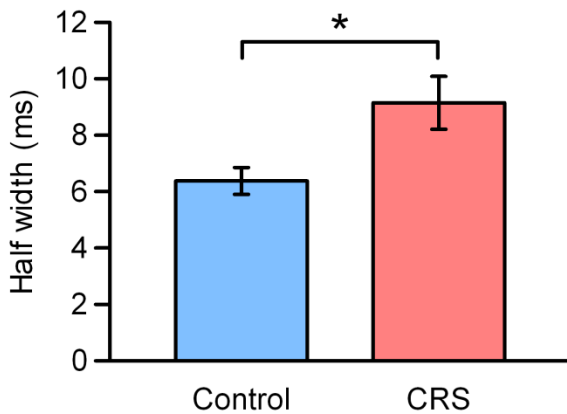
図3-4. Input-output relationship に対するCRS の影響はなかった

- (1) 20 μ A、30 μ A、40 μ A、60 μ Aの刺激強度でのコントロール群、およびCRS群のfEPSP slope。
- (2) いずれの刺激強度でもコントロール群とCRS群の間で有意差はなかった。コントロール群 n = 20, CRS群 n = 19, 20 μ A; p = 0.7, 30 μ A; p = 0.4, 40 μ A; p = 0.5, 60 μ A; p = 0.4。

(1)



(2) Normal ACSF



(3) Bicuculline 灌流適用

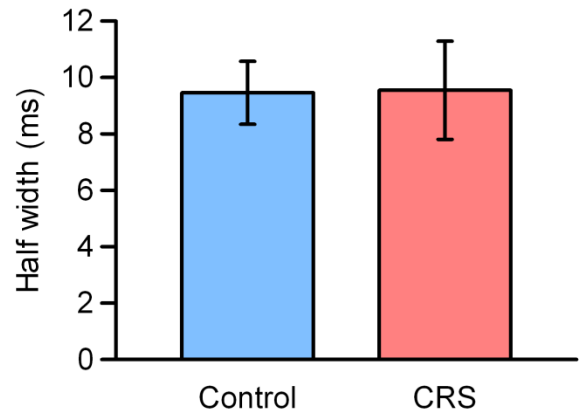


図3-5. CRS により half width が拡大した

- (1) コントロール群およびCRS群の fEPSP slope。太線が normal ACSF 灌流下での half width (最大振幅の中央値での時間幅)。細線は bicuculline 灌流下での half width を示している。
- (2) normal ACSF 灌流下では、CRS群がコントロール群に対して有意に half width の幅が広がった。コントロール $n = 35$, CRS $n = 37$; $* p = 0.04$ 。
- (3) Bicuculline 灌流下では、両群間での有意差はなくなった。コントロール $n = 8$, CRS $n = 9$; $p = 0.9$ 。

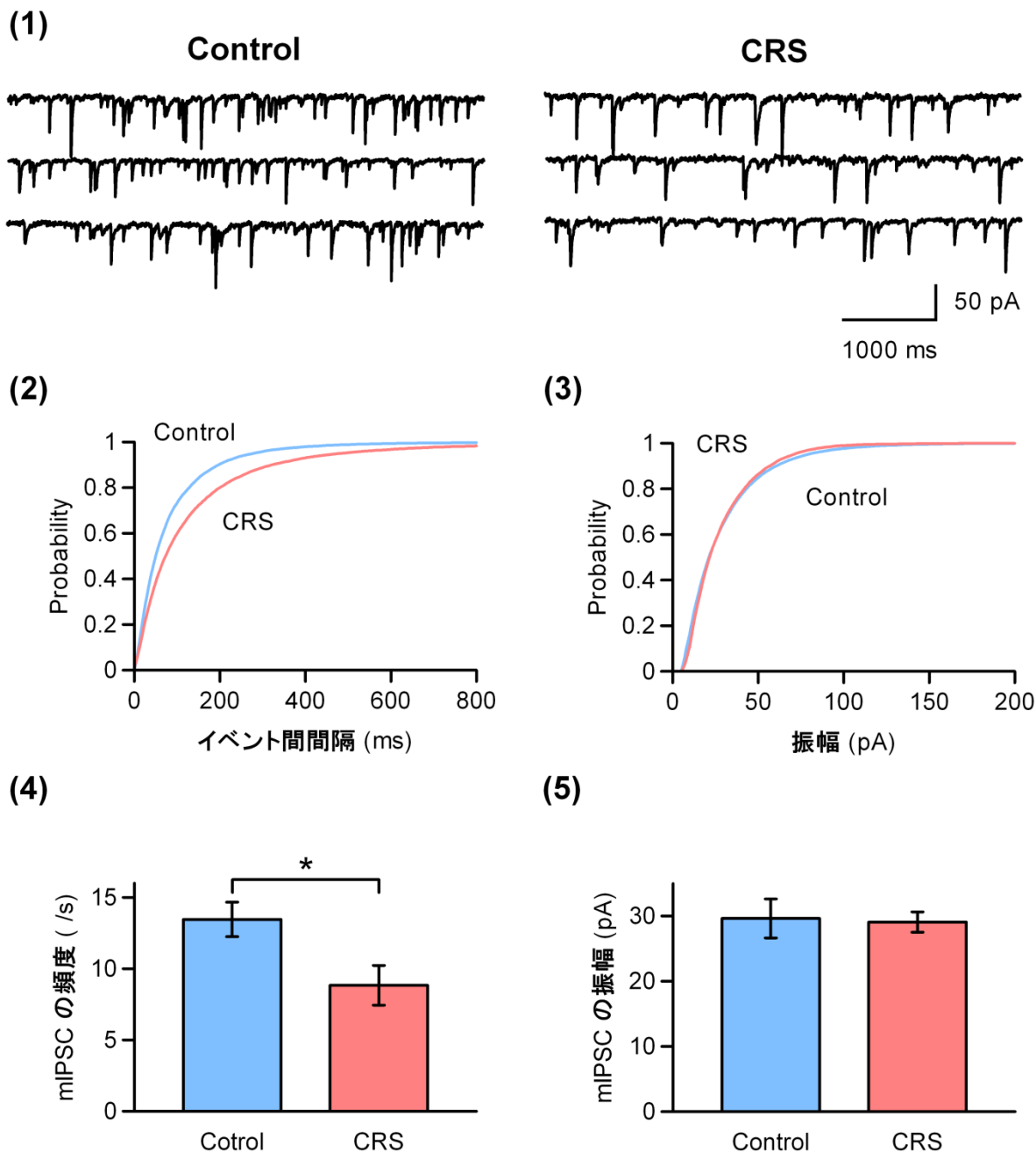


図3-6. CRS により mIPSC の発生頻度が減少した

- (1) コントロール群およびCRS群のmIPSC。
- (2) 両群におけるイベント間間隔（各 mIPSC 間の間隔）の累積ヒストグラム。
- (3) 両群における振幅の累積ヒストグラム。
- (4) mIPSC の頻度は、CRS群でコントロール群に対し、有意に mIPSC の発生頻度が減少した。コントロール群 $n = 11$, CRS群 $n = 11$; * $p = 0.02$ 。
- (5) mIPSC の振幅は、両群間で有意差はなかった。 $p = 0.3$ 。

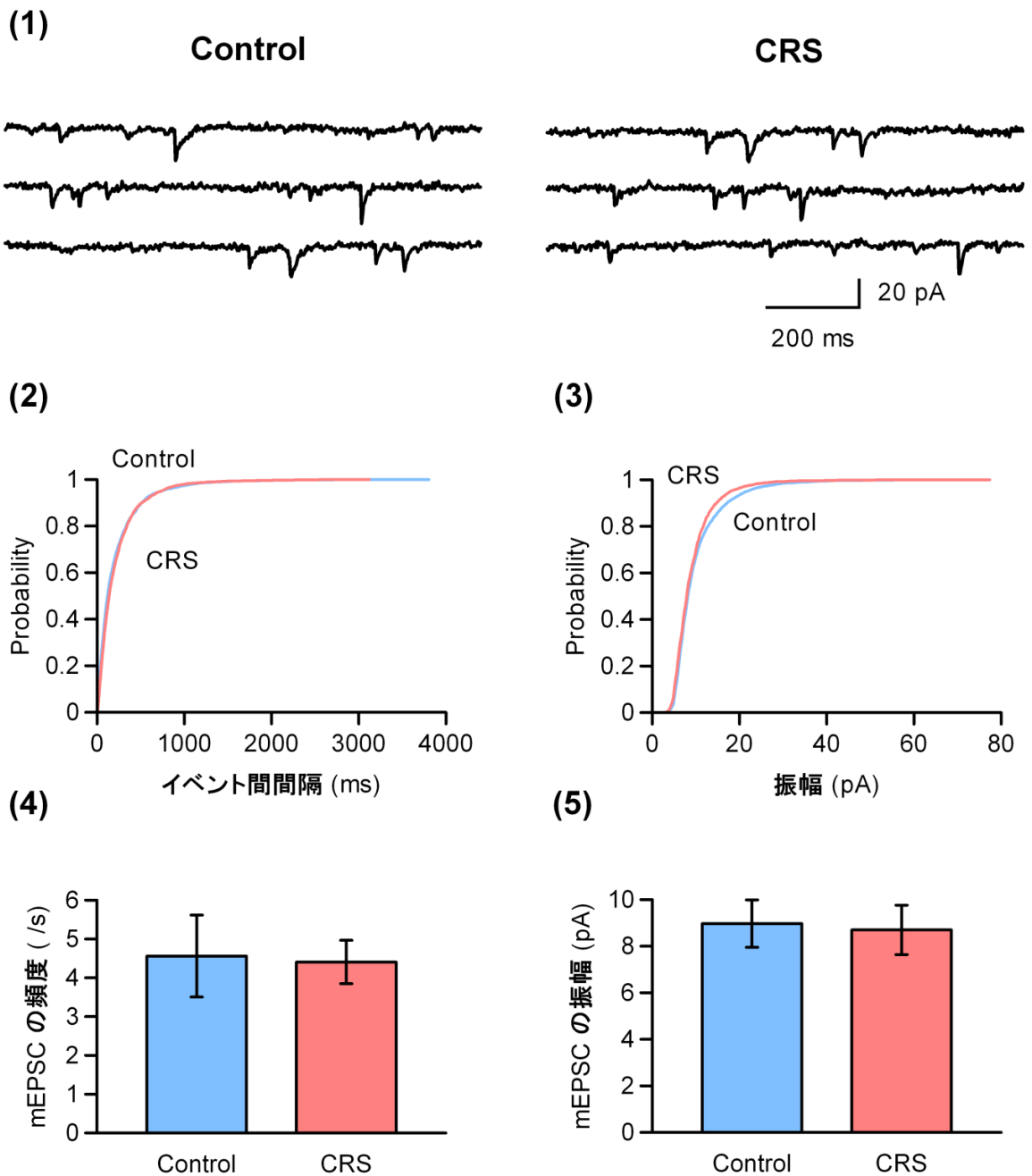


図3-7. mEPSC の発生頻度、および振幅には CRS の影響はなかった

- (1) コントロール群およびCRS群の mEPSC。
- (2) 両群におけるイベント間隔（各 mEPSP 間の間隔）の累積ヒストグラム。
- (3) 両群における振幅の累積ヒストグラム。
- (4) mEPSC の頻度は、両群間で有意差はなかった。コントロール群 $n = 7$, CRS 群 $n = 7$; $p = 0.3$ 。
- (5) mEPSCs の振幅は、両群間で有意差はなかった。 $p = 0.9$ 。

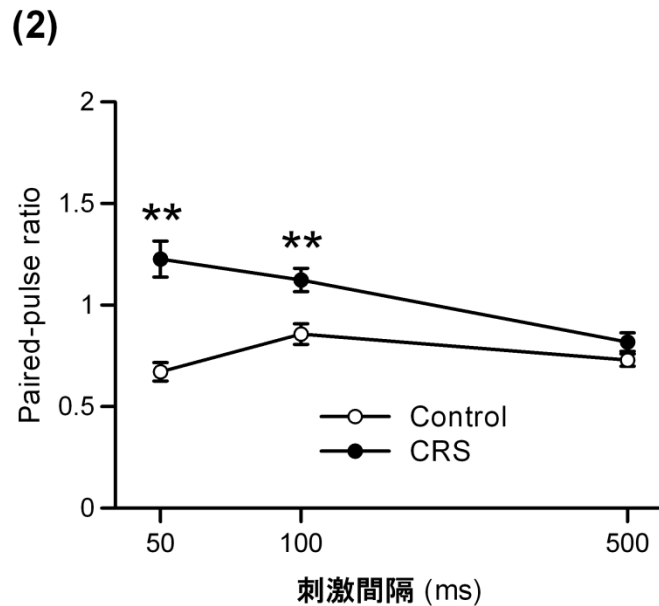
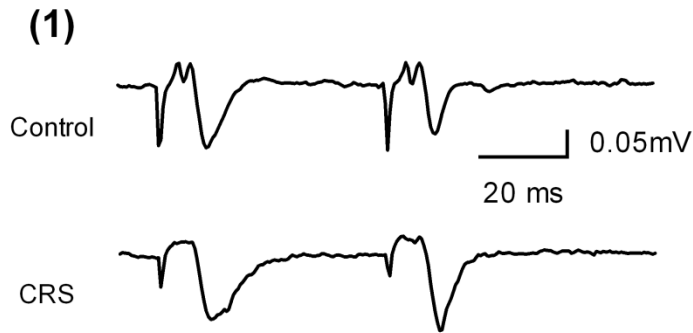
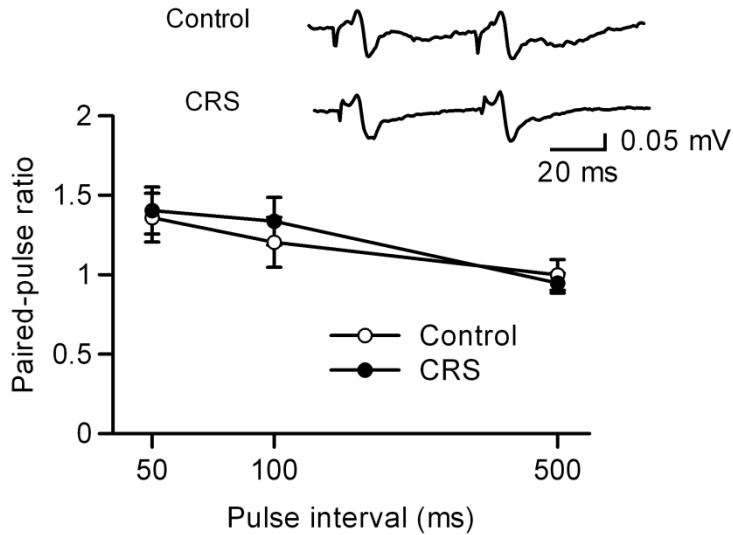


図3-8-1. CRS によりfEPSP slopeの PPR が増大した

- (1) コントロール群およびCRS群の fEPSP slope。刺激間隔は50ミリ秒。
- (2) 刺激間隔50ミリ秒、100ミリ秒で、CRS群の PPR が、コントロール群に対して有意に増大した（それぞれ ** $p = 0.000002$, ** $p = 0.0013$ ）。コントロール群 $n = 20$, CRS群 $n = 19$ 。

(1) Bicuculline灌流適用



(2) Bicucullineを記録電極内液に適用

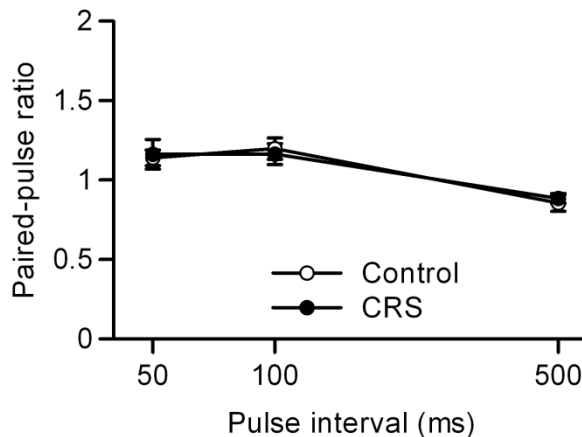
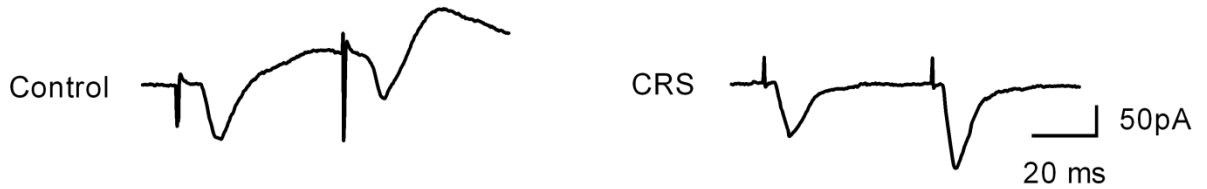


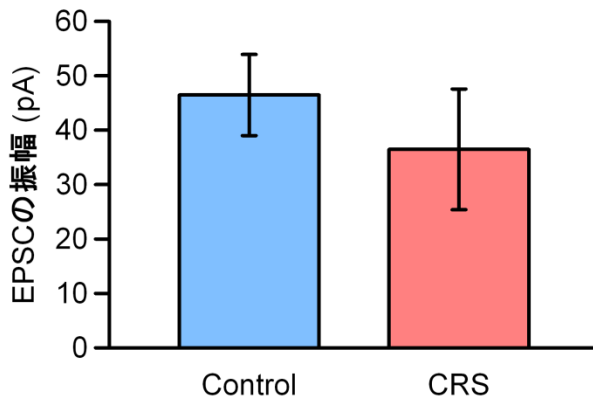
図3-8-2. Bicuculline の適用で PPR における両群間の有意差はなくなった

- (1) Bicuculline灌流適用によってコントロール群のPPRが増加、いずれの刺激間隔でもCRS群間との有意差が消失した。右上は両群の fEPSP slope。コントロール群 $n = 11$, CRS群 $n = 11$; 刺激間隔50ミリ秒, $p = 0.8$; 刺激間隔100ミリ秒, $p = 0.5$ 。
- (2) 記録電極内液に bicuculline を充填した場合も、両群間の有意差が消失した。コントロール群 $n = 10$, CRS群 $n = 10$; 刺激間隔50ミリ秒, $p = 0.8$; 刺激間隔100ミリ秒, $p = 0.7$ 。

(1)



(2)



(3)

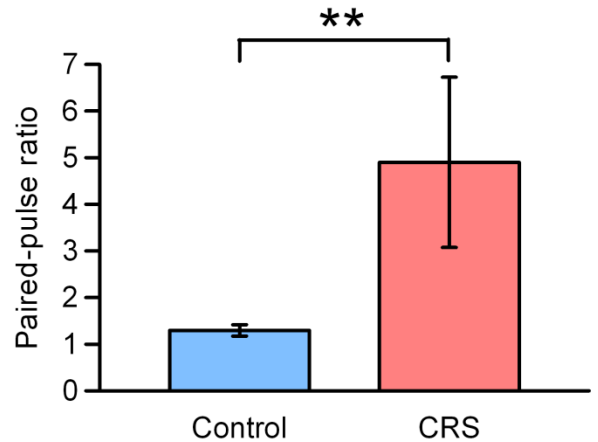


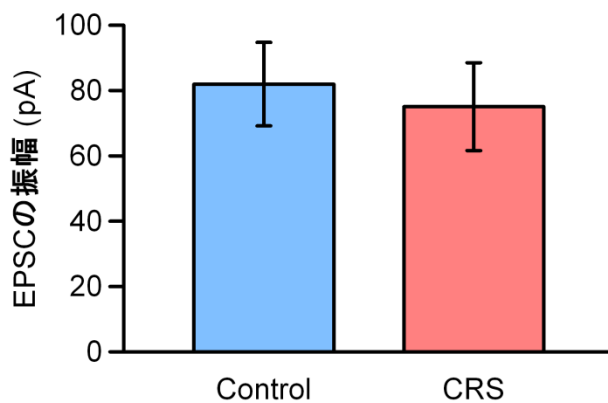
図3-9-1. 膜電位 -45mV では、CRS群で EPSC の PPR が増大した

- (1) Normal ACSF灌流下で、膜電位を -45mV に電位固定した場合のコントロール群、およびCRS群のEPSC。刺激間隔は50ミリ秒。
- (2) 1発目 EPSC の振幅の最大値は、コントロール群とCRS群の間で有意差がなかった。コントロール群 $n = 10$, CRS群 $n = 9$; $p = 0.5$ 。
- (3) 刺激間隔50ミリ秒でのPPR。CRS群はコントロール群に対し、有意にPPRが増加した。 ** $p = 0.007$ 。

(1)



(2)



(3)

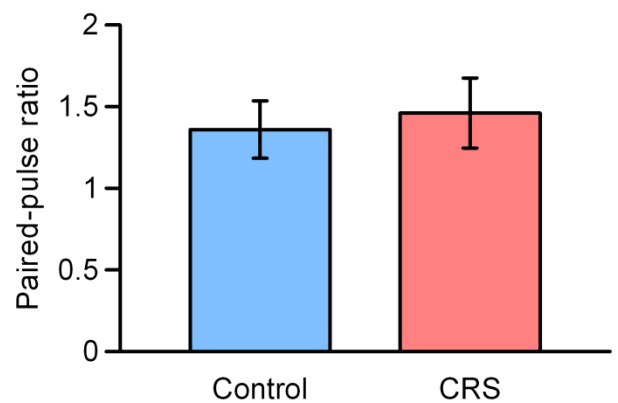
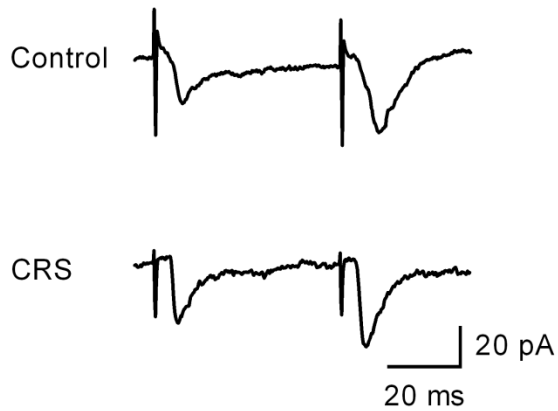


図3-9-2. 膜電位 -70 mV では、両群間で PPR に有意差はなかった

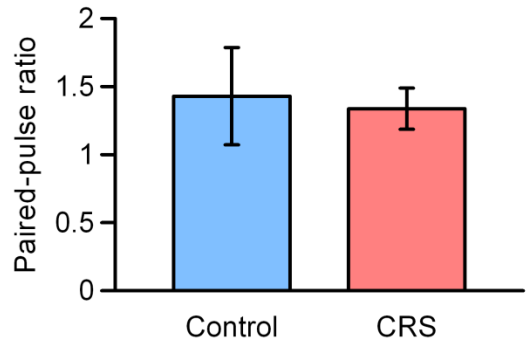
- (1) Normal ACSF灌流下で、膜電位を -70 mV に電位固定した場合のコントロール群、およびCRS群の EPSC。刺激間隔は50ミリ秒。
- (2) 1発目 EPSC の振幅の最大値は、コントロール群とCRS群の間で有意差がなかった。コントロール群 $n = 8$, CRS群 $n = 8$; $p = 0.7$ 。
- (3) 刺激間隔50ミリ秒での PPR。両群間の有意差はなかった。 $p = 0.7$ 。

A. $V_m = -45mV$

(1)



(2)



B. $V_m = -70mV$

(1)



(2)

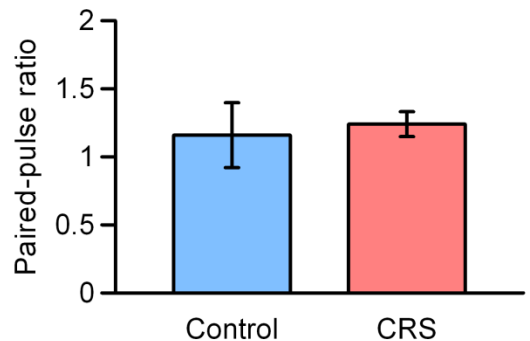


図3-9-3. GABA_A受容体を阻害すると、PPRは両群間で有意差がなくなった

- A(1) 膜電位を $-45mV$ に固定した場合のコントロール群、およびCRS群の EPSC。
(2) 刺激間隔50ミリ秒での PPR。両群間で有意差はなかった。コントロール群 $n = 6$, CRS群 $n = 5$; $p = 0.8$ 。
- B(1) 膜電位を $-70mV$ に固定した場合の両群の EPSC。
(2) 刺激間隔50ミリ秒での PPR。両群間で有意差はなかった。コントロール群 $n = 6$, CRS群 $n = 7$; $p = 0.9$

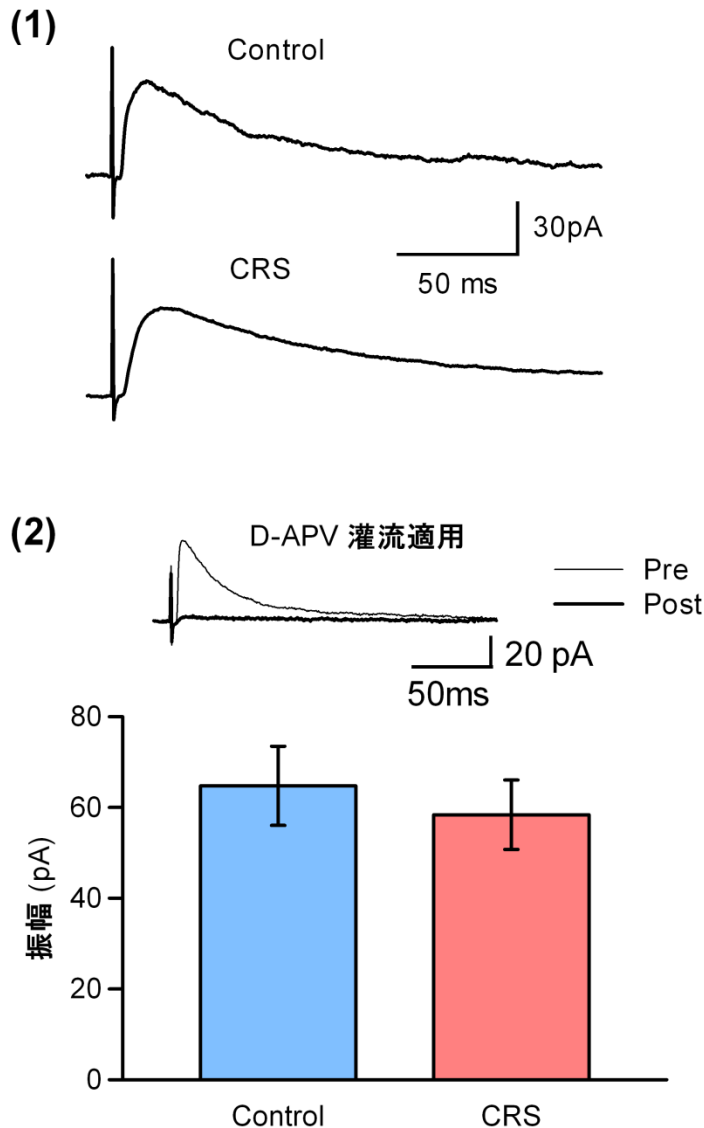


図3-10-1. NMDA 受容体由来 EPSC に与える CRS の影響はなかった

- (1) コントロール群、およびCRS群の NMDA受容体由来EPSC。Bicuculline、CGP 55845、DNQX を灌流適用し、膜電位は +30mV に固定した。
- (2) D-APV を ACSF 灌流液に追加適用したところ、NMDA成分が完全に消失。計測した波形が NMDA 受容体由来EPSC であることを確認した。コントロール群と CRS群の間で、NMDA受容体由来EPSC の振幅の最大値に有意差はなかった。コントロール群 $n = 9$, CRS $n = 8$, $p = 0.5$ 。

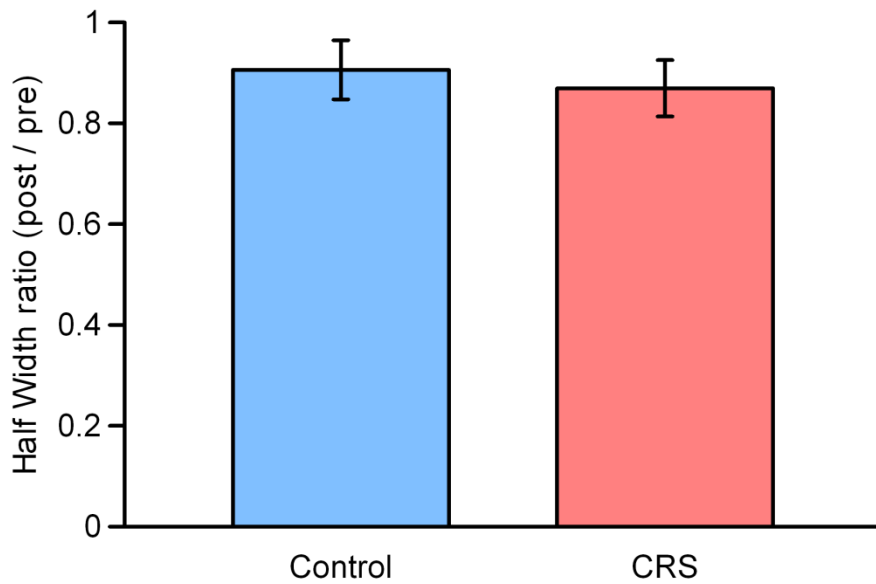
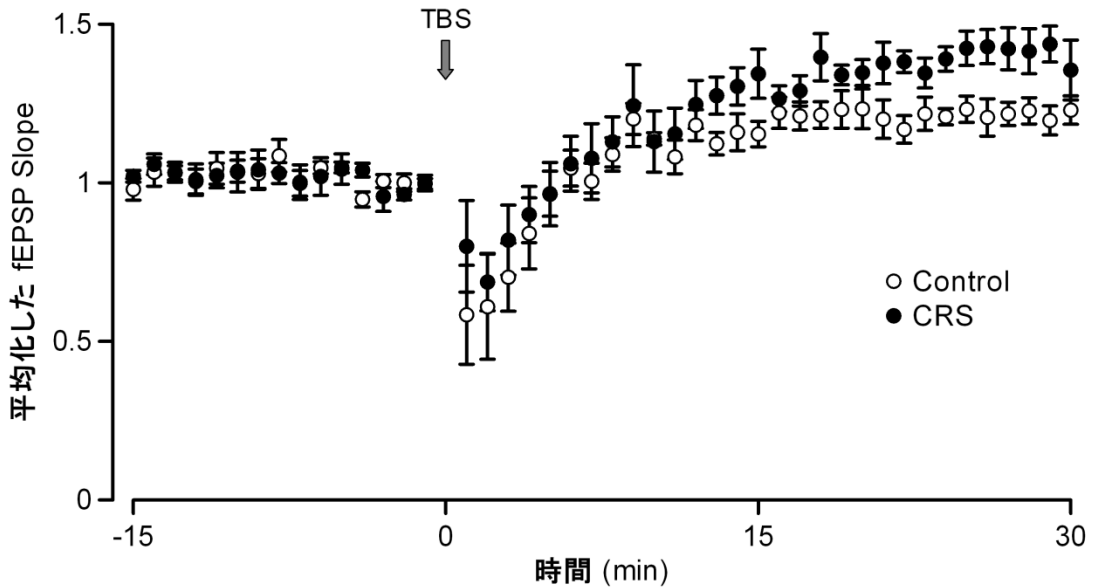


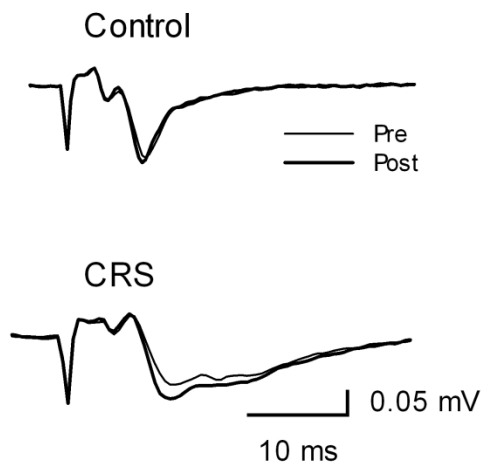
図3-10-2. CRS は fEPSP slopeにおけるNMDA成分に影響を与えなかった

(1) D-APV 灌流適用による fEPSP slopeのhalf width 減少率は、コントロール群と CRS群の間に有意差がなかった。コントロール群 n = 6, CRS群 n = 6; $p = 0.6$ 。

(1)



(2)



(3)

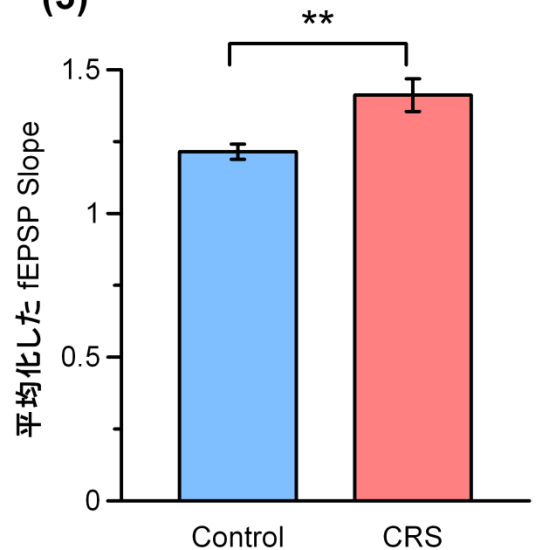


図3-11-1. CRSによってLTPが増強した

- (1) fEPSP slope の時系列。TBS 直後を 0 分とした。TBS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、LTD誘発実験では、以下同様)。
- (2) コントロール群、およびCRS群の fEPSP slope。細線はTBS直前の5分間の平均波形、太線はTBS後、25 – 30分間の平均波形を示している。
- (3) CRS群は、コントロール群に比べ有意にLTP増強率が增大した。コントロール群 $n = 7$, CRS群 $n = 8$; ** $p = 0.000002$ 。

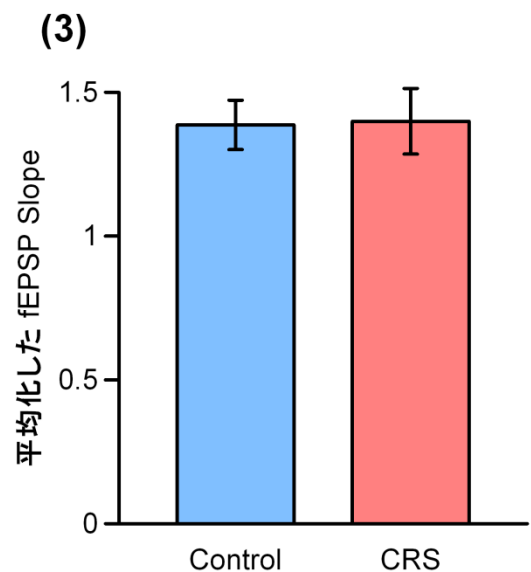
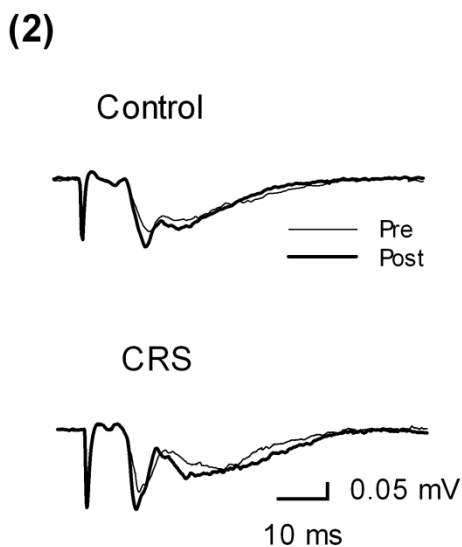
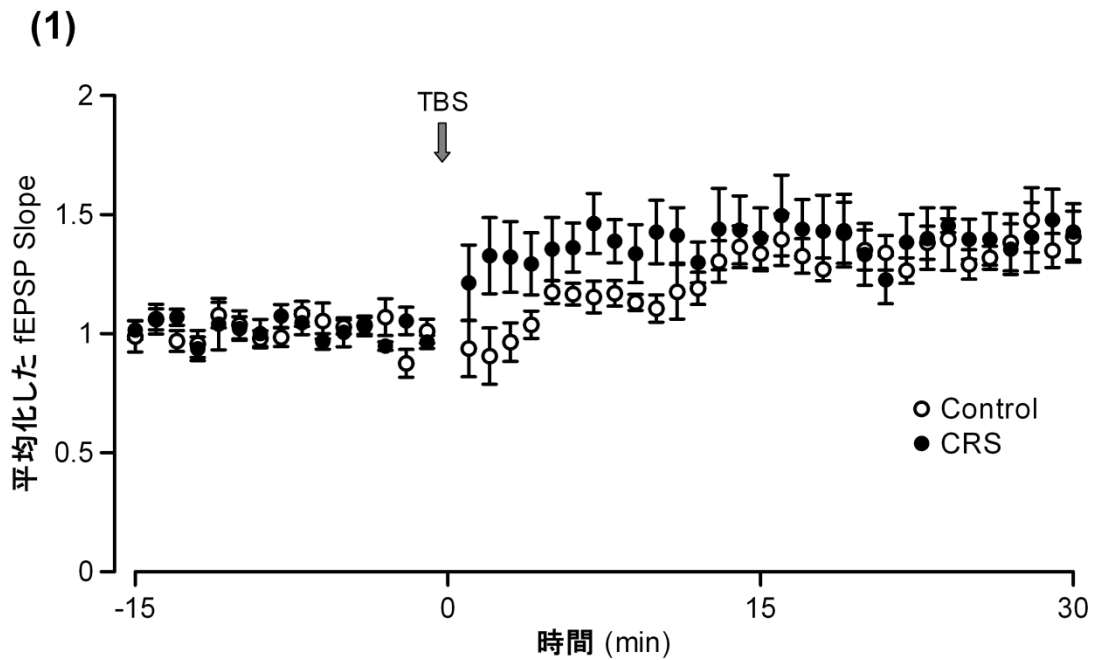


図3-11-2. Bicuculline の灌流適用で、LTP 増強率に有意差はなくなった

- (1) fEPSP slope 測定の時系列。
- (2) コントロール群、およびCRS群の fEPSP slope。細線はTBS直前の5分間の平均波形、太線はTBS後、25 – 30分間の平均波形を示している。
- (3) Bicuculline 灌流適用で、両群間の LTP 増強率に有意差はなくなった。コントロール群 $n = 8$, CRS群 $n = 8$; $p = 0.12$ 。

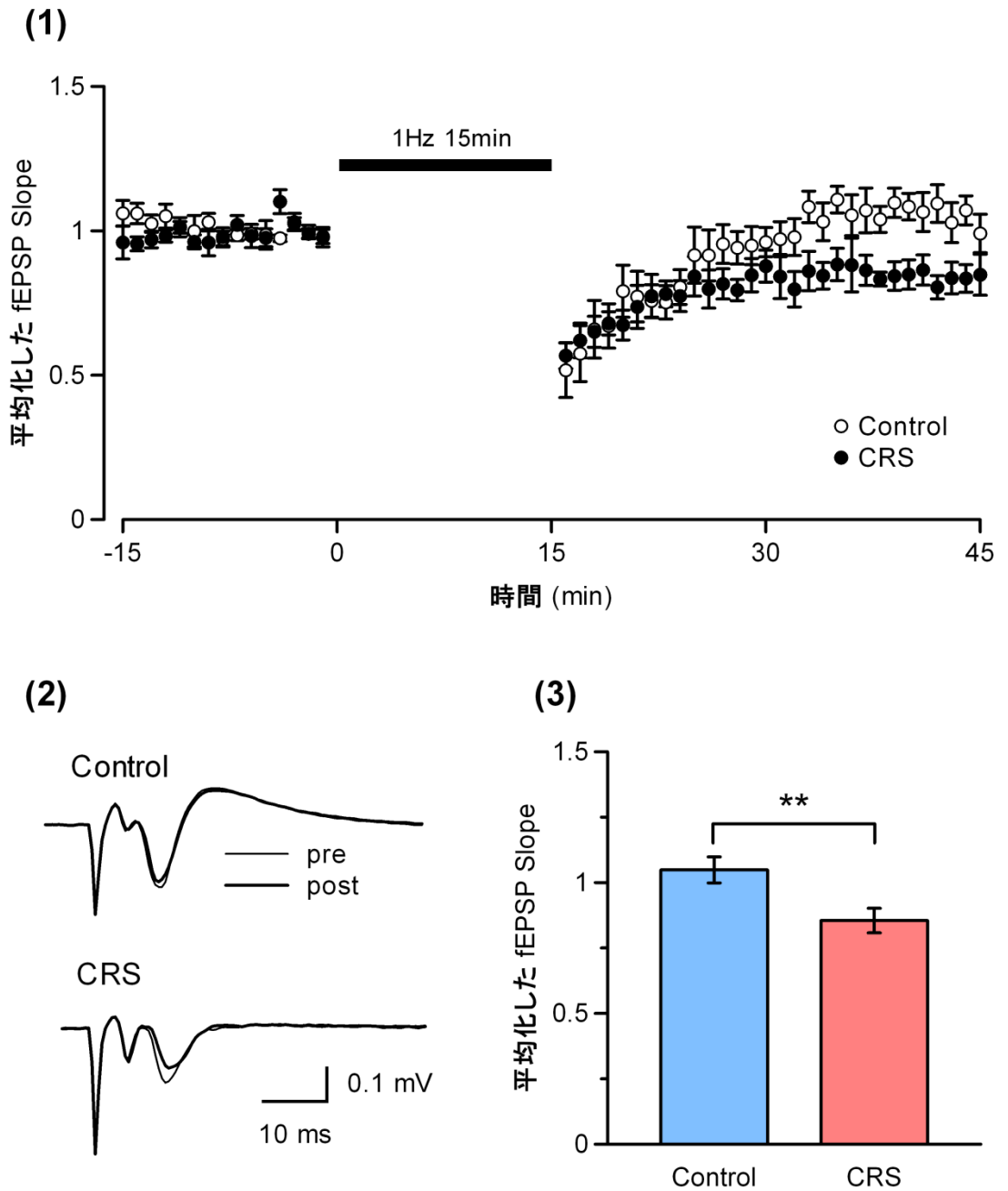


図3-12. CRSによって LTD が誘発されやすくなった

- (1) fEPSP slope 測定の時系列。LTD 誘発刺激開始時を0分とした。
- (2) コントロール群、およびCRS群の fEPSP slope。細線はTBS直前の5分間の平均波形、太線はTBS後、25 – 30分間の平均波形を示している。
- (3) コントロール群は、LTD が誘発されなかった。CRS群では LTD が誘発された。コントロール群 $n = 6$, CRS群, $n = 6$: ** $p = 0.0037$ 。

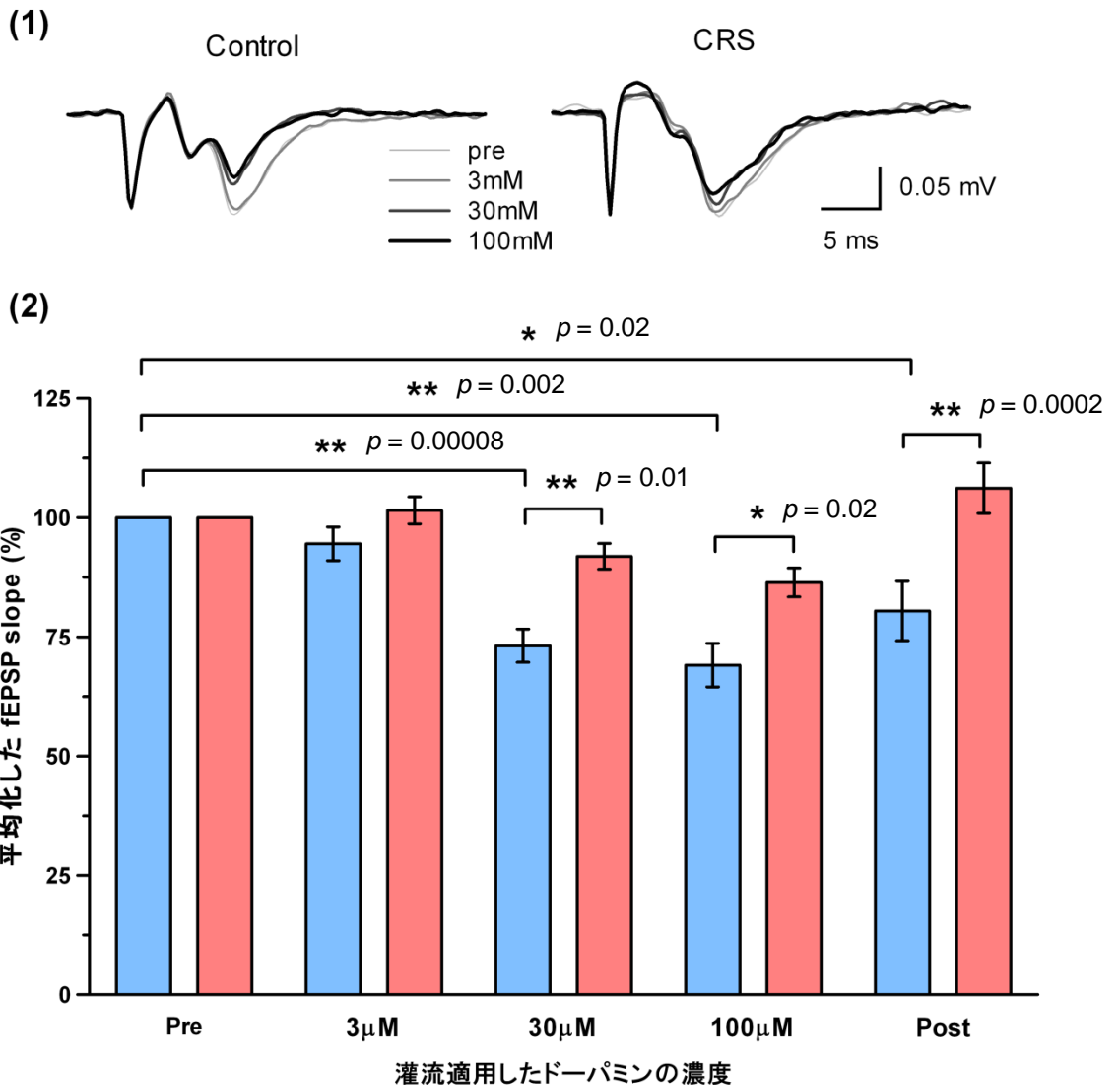
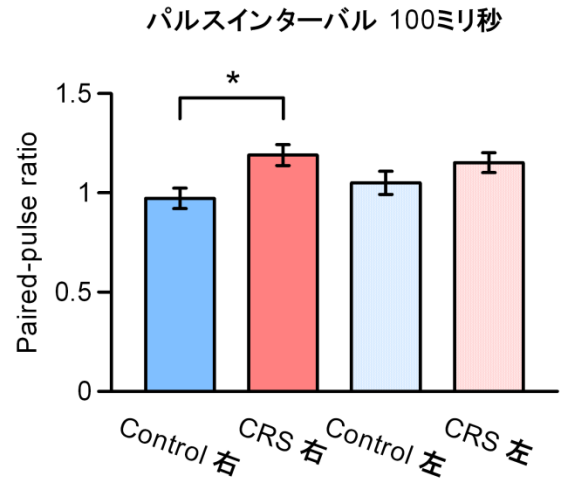
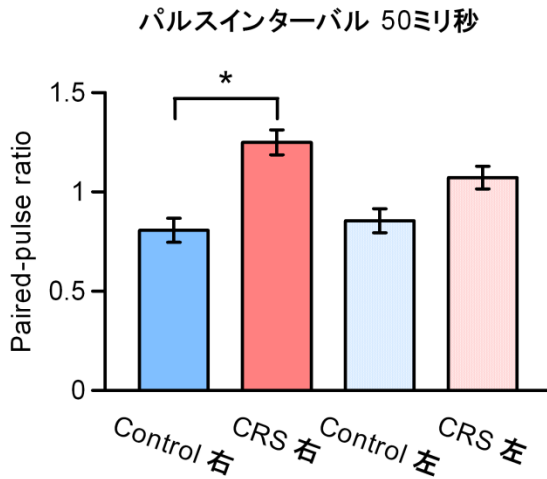


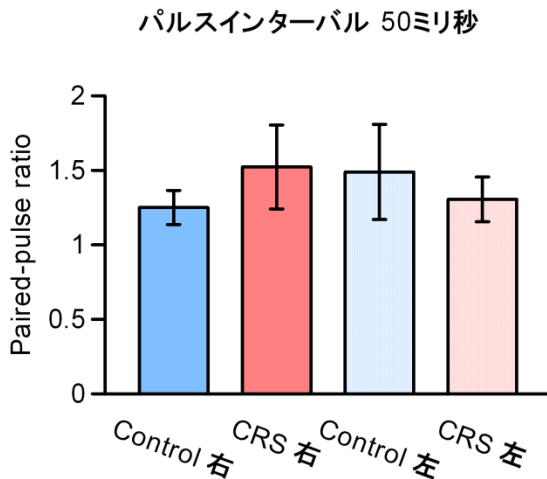
図3-13. CRS によってドーパミンに対する反応性が低下した

- (1) コントロール群、および CRS 群の fEPSP slope。Normal ACSF 灌流下 (pre) の波形は、ドーパミン灌流直前の 5 分間の平均波形。それぞれのドーパミン濃度での波形は、灌流終了直前の 5 分間の平均波形。
- (2) コントロール群は、ドーパミン適用濃度に依存して fEPSP slope が抑制された。CRS 群は、すべての濃度で fEPSP slope に有意な変化はなかった。濃度 30 μ M、100 μ M、および洗浄後で、CRS 群とコントロール群の間に有意差があった。コントロール群 $n = 8$, CRS 群 $n = 8$ 。

(1) Normal ACSF



(2) Bicuculline 灌流適用



(3) Bicuculline 電極内液に適用

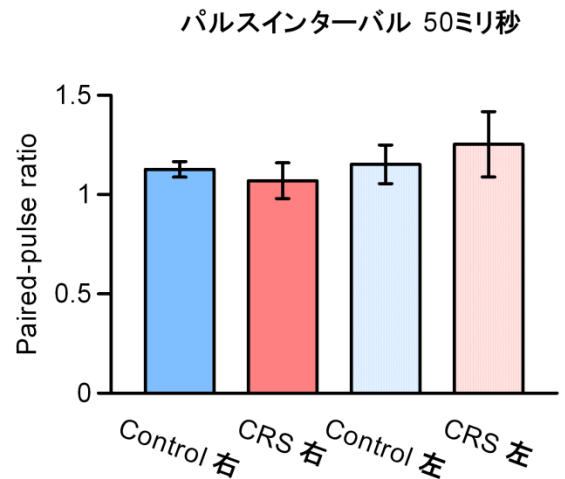


図3-14. CRSにより右脳のみ fEPSP slopeにおける PPR が有意に増大した

- (1) Normal ACSF 灌流下では、刺激間隔 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、有意に PPR が増大した（それぞれ $** p = 0.00008$, $* p = 0.02$ ）。左脳では、両群間に有意差はなかった。コントロール群 $n = 30$, CRS 群 $n = 29$ 。
- (2) Bicuculline 灌流適用により、コントロール群右脳と CRS 群右脳の有意差はなくなった。コントロール群 $n = 6$, CRS 群 $n = 5$ 。
- (3) Bicuculline を記録電極内液に適用した場合も、コントロール群右脳と CRS 群右脳間での有意差はなくなった。コントロール群 $n = 5$, CRS 群 $n = 5$ 。

※ すべて Tukey-Kramer 多重比較検定により解析した。

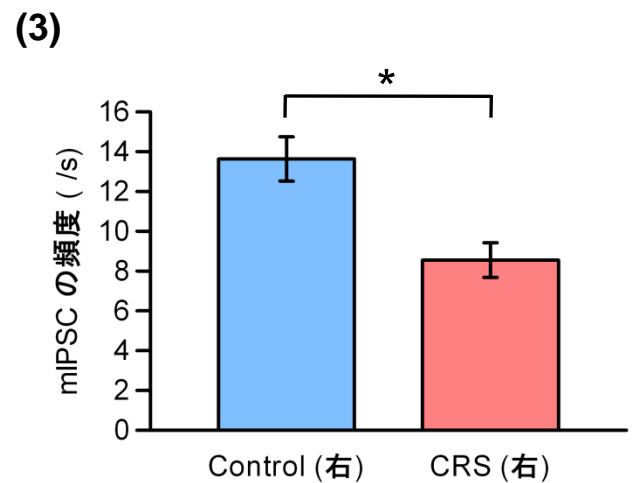
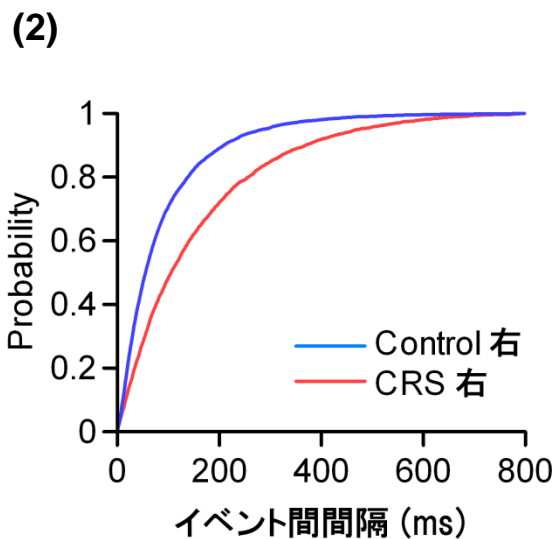
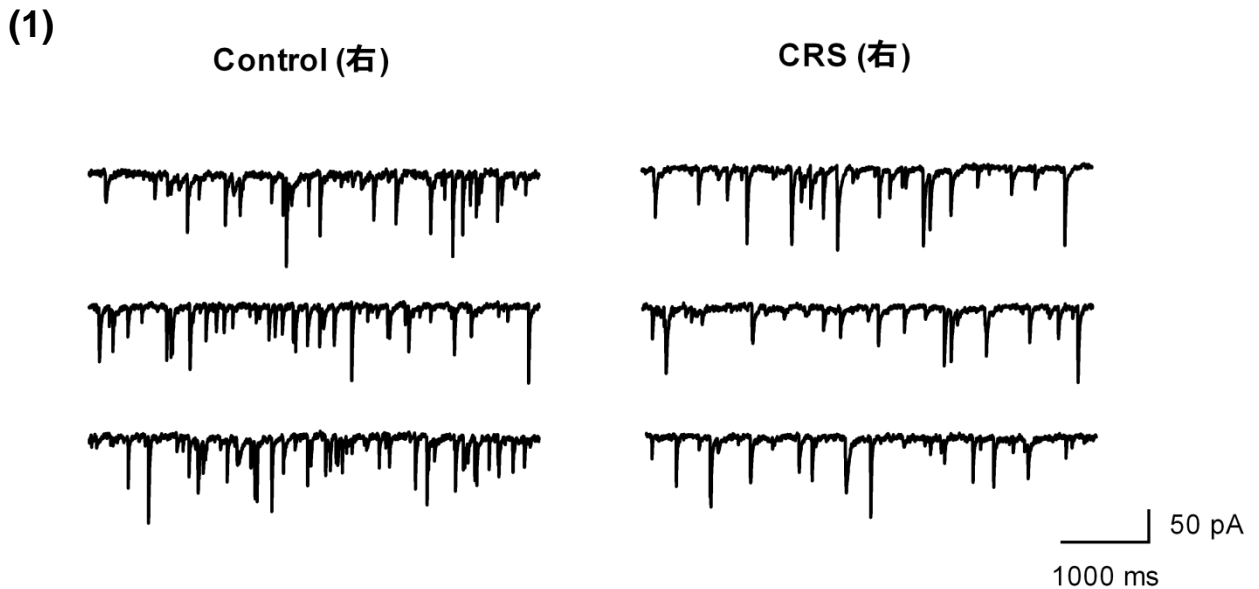
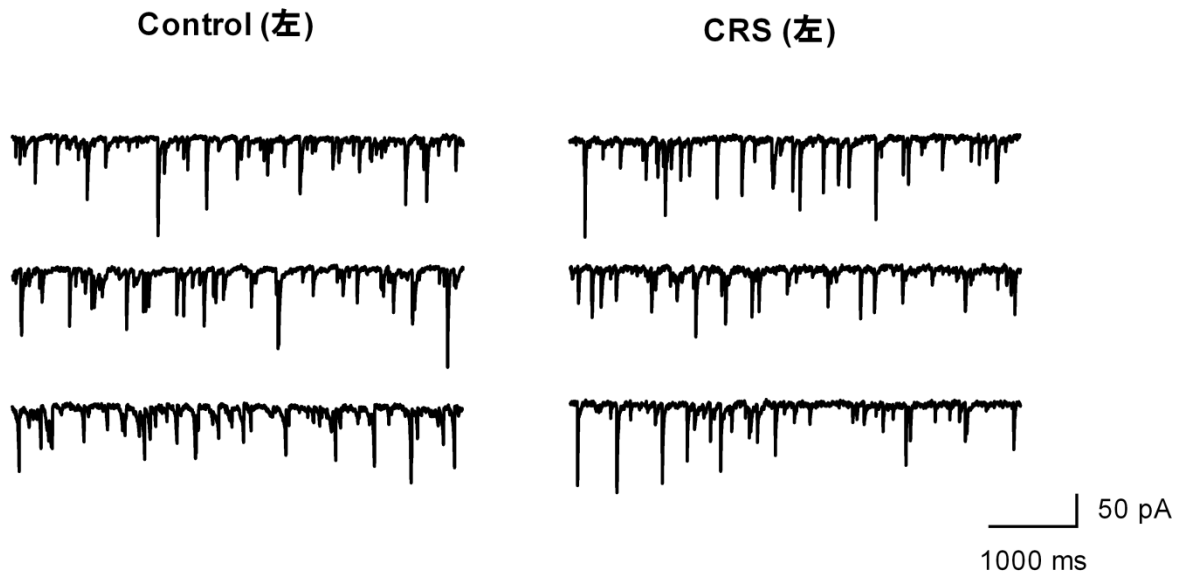


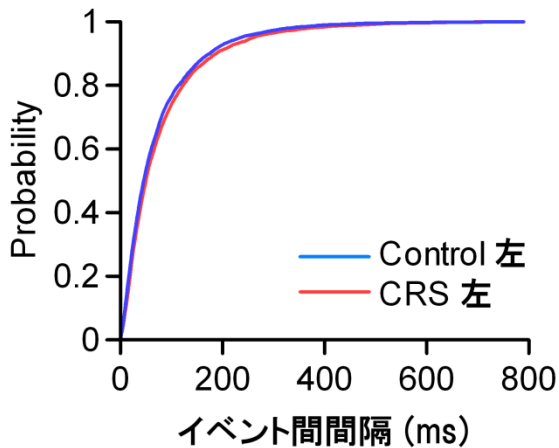
図3-15-1. CRS により右脳の mIPSC 頻度が減少した

- (1) コントロール群、およびCRS 群右脳の ACC 第II/III層錐体細胞で測定したmIPSC の代表的な 波形を示す。
- (2) イベント間隔の累積ヒストグラム。コントロール群 n = 14, CRS 群 n = 16。
- (3) CRS群右脳の mIPSC 頻度が、コントロール群右脳に比べ有意に減少した。* $p = 0.02$ 。(Tukey-Kramer 多重比較検定により両群の左右4群で比較)

(1)



(2)



(3)

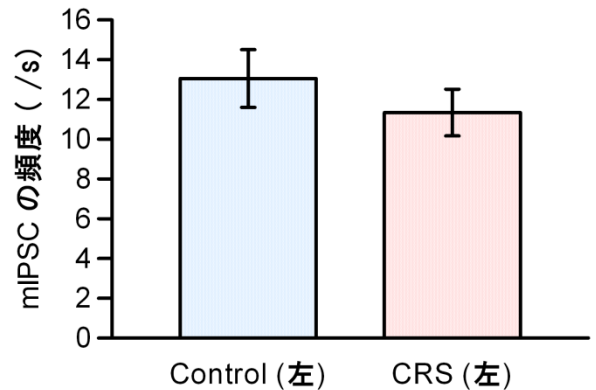
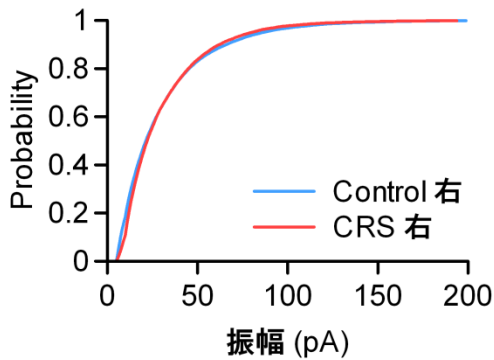


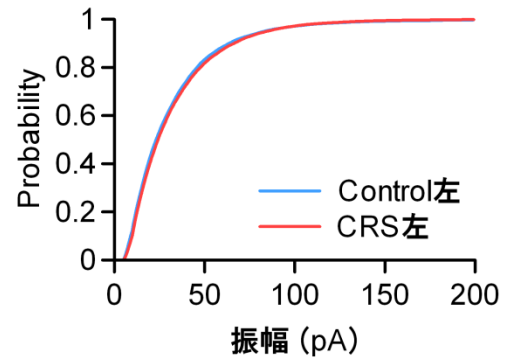
図3-15-2. 左脳では両群間に有意差はなかった

- (1) コントロール群、およびCRS 群左脳の ACC 第II/III層錐体細胞で測定したmIPSC の代表的な 波形を示す。
- (2) イベント間間隔の累積ヒストグラム。コントロール群 n = 14, CRS 群 n = 16。
- (3) 左脳の mIPSC 頻度は、両群間で有意差はなかった。(Tukey-Kramer 多重比較検定により両群の左右4群で比較)

(1)



(2)



(3)

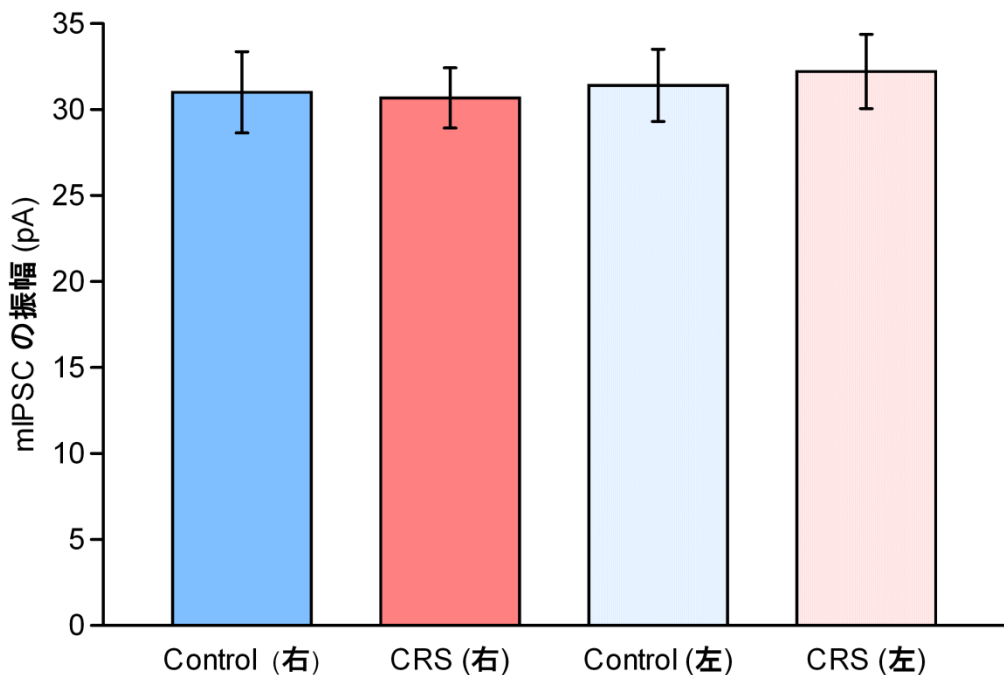
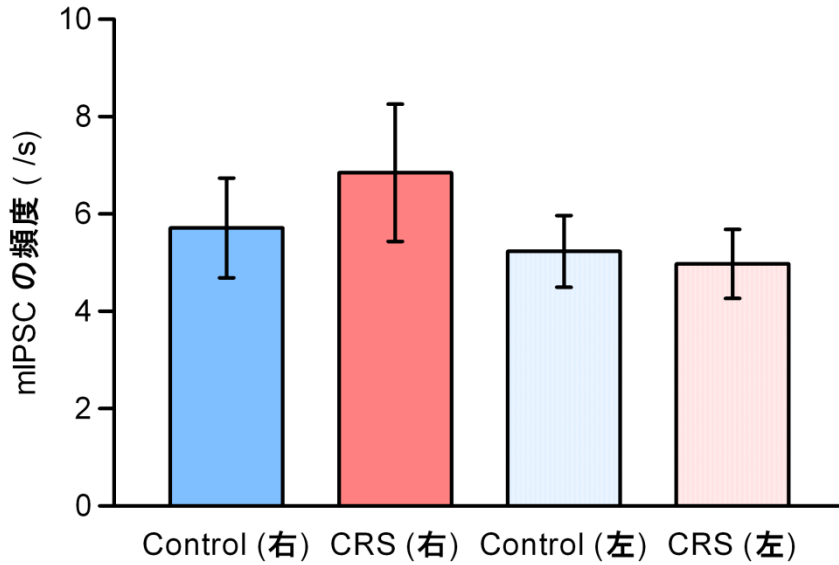


図3-15-3. mIPSC の振幅には CRS による影響、および左右差はなかった

- (1) コントロール群および CRS 群右脳における振幅の累積ヒストグラム。すべてのデータを集計した。
- (2) コントロール群および CRS 群左脳における振幅の累積ヒストグラム。すべてのデータを集計した。
- (3) コントロール群、CRS 群における mIPSC の平均振幅を右脳、左脳に分け、4 群間で比較した。Tukey-Kramer 多重比較検定により、すべての群間で有意差がないことが分かった。

(1)



(2)

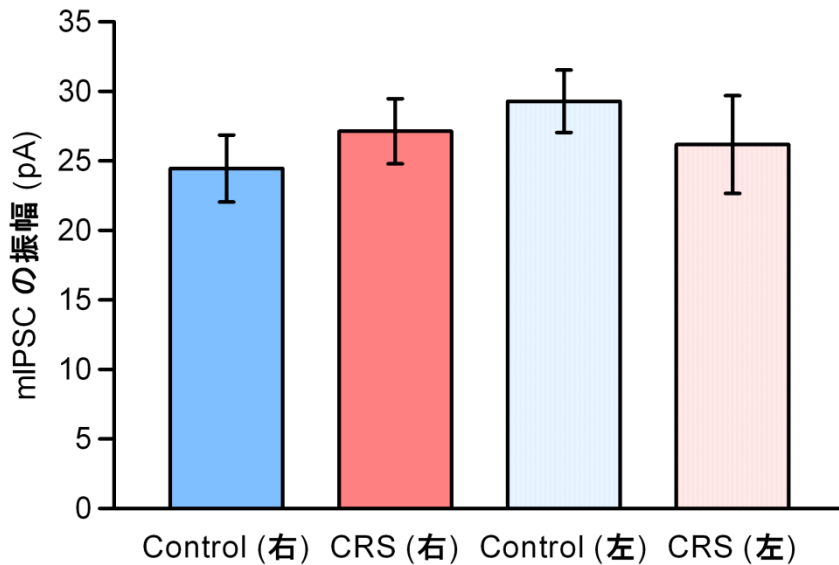


図3-16. 視覚野第II/III層の mIPSC には CRS の影響、左右差はなかった

(1) コントロール群、およびCRS群の視覚野第II/III層で、右脳と左脳に分け mIPSC を測定した。頻度は、4群間で有意差はなかった (Tukey-Kramer 多重比較検定)。コントロール群右脳 n = 10, コントロール群左脳 n = 10, CRS群右脳, n = 11, CRS群左脳 n = 11。

(2) mIPSCの振幅にも、4群間で有意差はなかった (Tukey-Kramer 多重比較検定)。

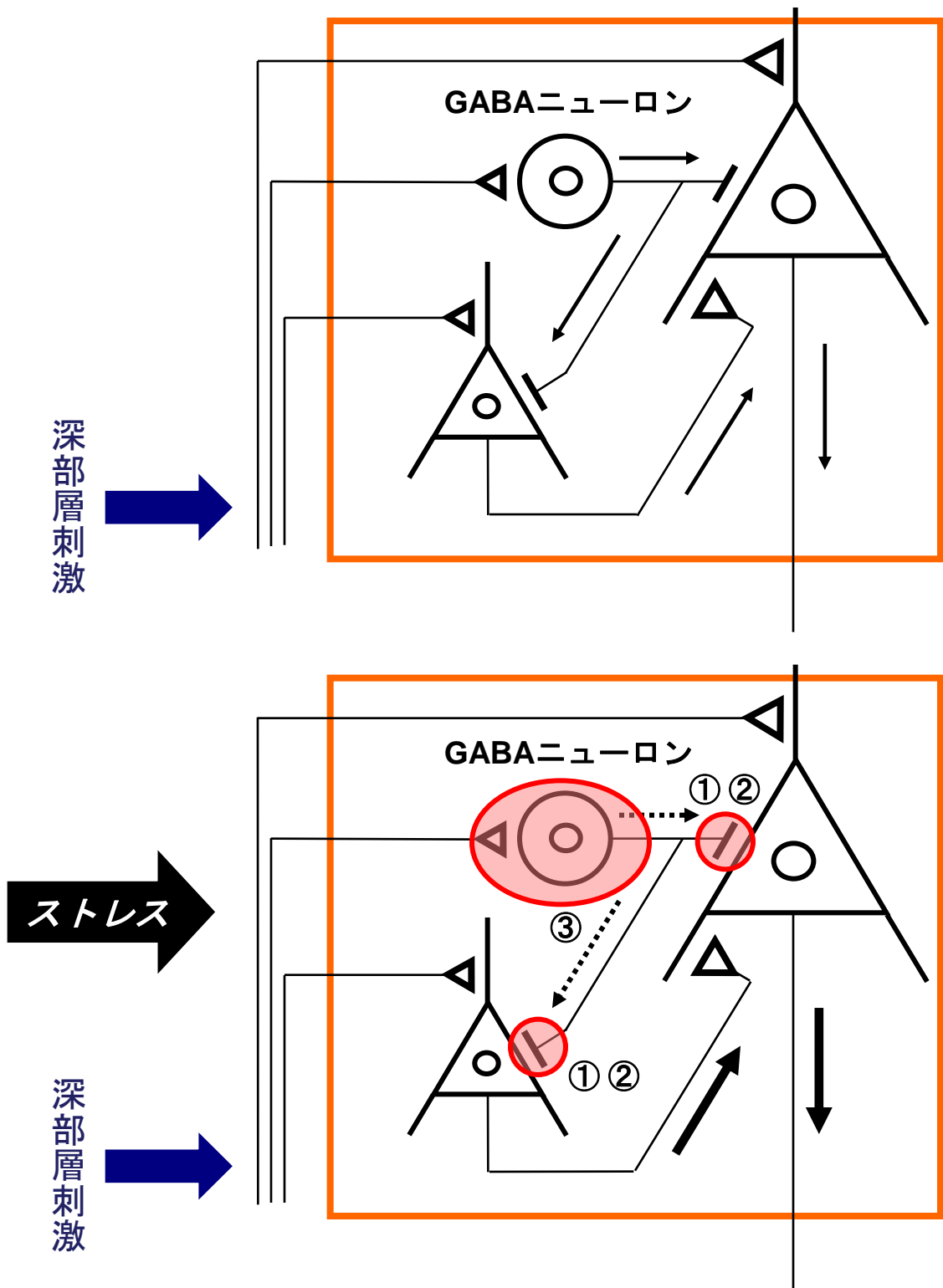


図4-1. CRS によるACC第II/III層GABA神経系機能低下のモデル

慢性ストレスにより、ACC第II/III層におけるGABA神経系の機能が低下、興奮性ニューロンへの抑制性の入力が増加。その結果として、短期可塑性および長期可塑性が増大した。

可能性として、①神経伝達物質放出確率の減少、② GABAニューロンのシナプス前終末の減少、③ GABAニューロン自体の減少が考えられる。