博士論文（要約）

社会的相互作用を介したストレス緩和効果の持続性に関する研究

三上　香織

基礎となる学術論文

1.　2015年4月　Neuroscience　Vol. 299, pp. 79-87
“The 3-second auditory conditioned stimulus is a more effective stressor than the 20-second auditory conditioned stimulus in male rats”
(Kiyokawa, Y., Mikami, K., Mikamura, Y., Ishii, A., Takeuchi, Y., Mori, Y.)

2.　2016 年 9 月　Physiology & Behavior　Vol. 163, pp. 123-128
“Social buffering enhances extinction of conditioned fear responses in male rats”
(Mikami, K., Kiyokawa, Y., Takeuchi, Y., Mori, Y.)

目　次

第 1 章　総合緒言 1
1−1　緒言 2
1−2　社会的緩衝作用 3
1−3　恐怖条件づけ 5
1−4　恐怖条件づけをモデルとした社会的緩衝作用の研究 6
1−5　条件づけられた反応の「消去」 9
1−6　本研究の目的 10

第 2 章　研究の基礎となる実験系の確立 12
2−1　緒言 13
2−2　材料と方法 14
2−3　結果 18
2−4　考察 20
2−5　小括 22

第 3 章　社会的緩衝作用が脳に与える持続的な影響 28
3−1　緒言 29
3−2　材料と方法 32
3−3　結果 37
3−4　考察 40
3−5　小括 44

第 4 章　社会的緩衝作用の消去促進機構におけるコルチコステロンの役割 57
4−1　緒言 58
4−2　材料と方法 60
4−3　結果 64
4−4　考察 66
4−5　小括 70

第 5 章　総合考察 76
5−1　結果の要約 77
5−2　社会的緩衝作用が持続的な影響を与える脳領域 79
5−3　社会的緩衝作用の馴化促進への影響 79
5−4　社会的相互作用が脳へ持続的に与える影響 81
5−5　今後の研究 82

要　旨 85

参考文献 91

第 1 章

総合緒言

1-1　緒言

現代人が暮らす社会は、産業を発展させることが生活を豊かにするという考えのもと、生産を効率化するために科学技術を発展させてきた。例えば近年のインターネット技術やロボット産業、機械学習などの発展はめざましいものがある。しかし、生活の質の向上はこれまでの科学技術の発達のみでは成り立たないと考えられる。生活の質の向上には、健康であることが欠かせない。世界保健機関憲章の定義では、「健康とは、完全な肉体的、精神的及び社会的福祉の状態であり、単に疾病又は病弱の存在しないことではない」という。しかし、現代において人の健康は脅かされている。例えば、現代においてストレスに起因すると考えられる疾患、特に精神疾患の罹患率は年々増加しており、日本の 2011 年の統計では 320 万人以上にものぼるとされ、なかでもうつ病の増加は著しい (厚生労働省, 2015)。現在は医学的な技術によって疾患を解決しているが、これはあくまで対症療法である。動物が本来持つ生物学的なストレス緩和機構や、その持続性に注目し、それを引き出せるような生活のあり方を追求することは、問題の根本的な解決のために重要であろう。

生物は環境変化や外敵などから身を守り生き残るために、ストレスに対する適応機構を発達させてきた。例えば動物の個体内では、ストレスに曝されるとエネルギー源を確保し、迅速な逃走・闘争反応を可能とするようなストレス応答機構をもつ (Cannon, 1914)。視床下部室傍核 (PVN; paraventricular nucleus of the hypothalamus)から副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモンが分泌され、それが下垂体に作用することで副腎皮質刺激ホルモンの分泌が促される。そして分泌された副腎皮質刺激ホルモンは副腎に作用し、コルチコステロンの

分泌を促すという、いわゆる視床下部−下垂体−副腎（HPA；hypothalamic–pituitary–adrenal)軸の活性化が起こる（Axelrod & Reisine, 1984; Papadimitriou & Priftis, 2009)。しかし、ストレスが適応の範囲を超えると、胃潰瘍などの身体的な疾患や精神的な疾患が引き起こされてしまう(Roozendaal et al., 2009; Selye, 1936; Selye, 1970; Wolf, 2008)。このような個体内でのストレス応答機構だけでなく、個体間における社会的相互作用もストレスに適応するための重要な戦略の一つであると考えられる。例えばラットは、単独で捕食者臭に曝された場合には呼吸以外の動きを停止させるすくみ行動(freezing)という体勢をとり捕食者から見つかりにくいようにするが、集団で曝された場合には集合し積み重なる姿勢をとることで、密集して捕食者から見つかりにくいようにすることが知られている（Bowen et al., 2012; Kendig et al., 2011)。このように、他個体が存在することで、単独とは違ったストレスに対するより良い別の戦略が現れることが考えられる。そのため個体内でのストレス応答機構に加えて、他個体が存在することによって生じるストレス応答機構に注目し解析することは、動物が本来持つストレス緩和機構とその持続的な作用を理解する上で重要な視点であると考えられる。

1-2　社会的緩衝作用

同種他個体と一緒に嫌悪刺激に曝されると、嫌悪刺激によって引き起こされるストレス反応が緩和されることが多くの動物種で知られており、社会的緩衝作用と呼ばれている。この現象は母子間、つがい間及び前二者に含まれない、性的関係にない個体間において観察されるもので、そのメカニズムが異なるこ

とが示唆されている。例えば新生仔のラットは隔離されると distress call と呼ばれる超音波発声をするが、母親や、兄弟姉妹が一緒にいると発声が抑制される。しかし母親による発声抑制にはドーパミン受容体が関与している一方で、兄弟姉妹による発声抑制にはドーパミン受容体が関与していないことが、薬理学的研究により明らかとされた (Shair et al. 2009)。そのため、同種他個体のタイプを混同しないことが、社会的緩衝作用に関する研究を行う上で重要となるであろう。本論文における社会的緩衝作用とは、性的関係にない個体間において観察される現象を指すこととする。

これまでに、数多くの社会的緩衝作用が報告されてきた。例えば 12 日齢の仔ラットは、兄弟姉妹がいることで distress call の発声が減少することが知られている (Hofer & Shair, 1978)。また成長後の動物においても、社会的緩衝作用が新奇環境に対する HPA 軸の活性化と、それに伴う行動学的・生理学的反応を抑制することが、ニワトリ (Bryan Jones & Merry, 1988)、マウス (Klein et al., 2015)、ラット (File & Peet, 1980; Terranova et al., 1999)、モルモット (Hennessy et al., 2008)、ヒツジ (Lyons et al., 1993)、ブタ (Kanitz et al., 2014)、マーモセット (Galvão-Coelho et al., 2012)、アカゲザル (Winslow et al., 2003) において報告されている。また同様に、社会的緩衝作用が天敵や人間に対する HPA 軸の活性化を抑制することがラット (Bowen et al., 2013)、ヤギ (Lyons et al., 1988)、リスザル (Vogt et al., 1981)において報告されている。

1-3　恐怖条件づけ

条件づけは、Pavlov が 1927 年に報告した方法であり、ベルなどのそれ自体では反応を引き起こさない中性刺激と、生得的な反応（唾液の分泌)を起こす餌という無条件刺激を同時に提示すると、それ以後は中性刺激の提示によって無条件刺激が引き起こす反応を生じることが可能となる現象である。この際、中性刺激を条件刺激と呼ぶ。また条件づけのなかでも、無条件刺激として電気ショックなどの嫌悪刺激を用いるものを、特に恐怖条件づけと呼ぶ。恐怖条件づけは、防御反応や記憶の神経メカニズムを明らかとするために、長年研究対象とされてきた。例えばラットは中性刺激であるブザー音と、無条件刺激である電気ショックを同時に提示される恐怖条件づけを経験すると、条件刺激に対して freezing の継続時間の増加や、HPA 軸の活性化を示すようになる（Coover et al., 1978; Kiyokawa et al. 2007; LeDoux et al. 1984)。

この恐怖条件づけの神経メカニズムに関しては詳細な解析が行われてきており、扁桃体が重要な働きを担っていることが明らかとされている。恐怖条件づけを経験する前の被験動物では、無条件刺激は扁桃体外側核（LA; lateral amygdala)を活性化する一方で、中性刺激によって LA は活性化されない。しかし恐怖条件づけを経験すると、以降は条件刺激のみで LA が活性化されるようになり、そのシグナルが扁桃体中心核外側部（CeL ; lateral division of the central amygdala)もしくは扁桃体基底核（BA; basal amygdala)を経由して扁桃体中心核内側部（CeM ; medial division of the central amygdala)へと伝達され、CeM を活性化する。CeM は様々なストレス反応をつかさどる脳領域へと連絡しており、例えば中脳灰白質へシグナルを伝達することで freezing を引き起こし、ま

た例えば分界条床核（BNST; bed nucleus of the stria terminalis)を経由してPVN へシグナルを伝達することで HPA 軸を活性化させるなど、様々なストレス反応を引き起こすことが知られている（LeDoux, 2000; Paré et al., 2004; Peters et al., 2009; Sotres-Bayon et al., 2006）。

1-4　恐怖条件づけをモデルとした社会的緩衝作用の研究

これまで獣医動物行動学研究室では、恐怖条件づけモデルを用いてラットにおける社会的緩衝作用の研究が行われてきた。恐怖条件づけを経験したラットは条件刺激に対して freezing をはじめとした行動反応や、HPA 軸の活性化を示す。しかし条件刺激の提示の際に、条件づけられていない見知らぬラットが存在すると、これらの反応が抑制されることから、他個体の存在が社会的緩衝作用を引き起こし、条件刺激に対するストレス反応を緩和した（Kiyokawa et al., 2007)と考えられる。この社会的緩衝作用は、一重もしくは 5cm 間隔の二重の網で二個体間が仕切られた場合にも阻害されないことから、二個体間の身体的接触は必要ないことが明らかとなった（Kiyokawa et al., 2009)。さらに他個体が発する揮発性の嗅覚性シグナルのみを提示することで、他個体が存在するときと同様の社会的緩衝作用を引き起こすことが可能であることから、他個体由来の嗅覚シグナルが社会的緩衝作用を仲介していることが明らかとなった(Takahashi et al., 2013)。また同時に、社会的緩衝作用の様々な性質も明らかとなってきている。例えば他個体としてモルモット（Kiyokawa et al., 2009)や異系統のラット（Nakamura et al., 2016)を用いた場合には社会的緩衝作用が引き起こされないことや、共飼育されたことで馴染みのあるラットは見知らぬラ

ットよりも社会的緩衝作用の効果を強化すること（Kiyokawa et al., 2014b)、雌ラットにおいても同様の社会的緩衝作用が観察されること（Ishii et al., 2016）などである。

上記の研究と並行して、社会的緩衝作用の神経メカニズムに関する研究も進められてきた。社会的緩衝作用は被験動物の嗅上皮を傷害することによって阻害されたことから、他個体由来の嗅覚シグナルは嗅上皮にて受容されることが明らかとなった（Kiyokawa et al., 2009)。嗅上皮に存在する感覚神経はその軸索を主嗅球のみに投射していることと、条件刺激は LA や BA を含む扁桃体基底外側複合体（BLA; basolateral complex of the amygdala)を活性化することでストレス反応を引き起こしていることを勘案すると、受容された嗅覚シグナル情報は主嗅球へと伝達された後に、BLA へと伝達され、その活性化を抑制していることが考えられた。しかし一方で、主嗅球は BLA へ直接投射をしていないことが知られているため、いずれかの脳領域がこの伝達を仲介しているはずである。そこで、主嗅球から直接の投射を受けている領域の役割を検討したところ、嗅脚後内側部（pmOP; posteromedial olfactory peduncle)を破壊した時のみ社会的緩衝作用が阻害されることや、pmOP と BLA を 1 つずつ同じ脳半球内で破壊した場合は社会的緩衝作用が観察されるが、それぞれを異なる半球内で破壊すると社会的緩衝作用が阻害されることが明らかとなった（Kiyokawa et al., 2012)。このことから、pmOP が主嗅球から同側の BLA へと嗅覚シグナルを受け渡していることが示唆された。さらに電気生理学的研究や免疫組織化学的研究により、BLA の中でも LA が抑制されることで社会的緩衝作用が引き起こされていることが示唆された（Fuzzo et al., 2015)。また並行して、pmOP のうち

前嗅核後部（AOP; anterior olfactory nucleus)が社会的緩衝作用を受けた際に活性化することが明らかとなった。これらのことから、他個体からの嗅覚シグナルは被験動物の嗅上皮で受容された後に主嗅球へと伝達され、AOP を中継して同側の LA へと伝達され､その活性化を抑制することで社会的緩衝作用を引き起こしていることが明らかとなってきた。

しかしこれまでの社会的緩衝作用に関する研究は他個体が存在する間の現象に焦点が当てられていたため、他個体が存在しなくなった後にも観察されるような、持続的な影響を被験動物に与えるかに関する検討は行われてこなかった。獣医動物行動学研究室による先行研究において、被験動物は社会的緩衝作用を受けながら 5 回の条件刺激を提示された翌日に、被験動物単独で再び条件刺激を提示されたことがあったが、条件刺激に対して被験動物はストレス反応を示したことから（Fuzzo et al., 2015)、社会的緩衝作用が与える持続的な影響は観察されなかった。しかし異なる実験系で行われた他グループによる先行研究では、条件刺激に対する忌避行動が他個体の存在によって減少するとともに、他個体が存在しなくなった後もこの忌避行動の減少が継続することが報告されている（Baum, 1969; Hall, 1955)。また神経細胞間の接続部位であるシナプスの大きさは発火頻度に応じて可塑的に変化し、高頻度に発火するとシナプスが大きくなり、その伝達効率が長期にわたって増強されることが知られている。そのため、社会的緩衝作用を受けながら提示される条件刺激の回数を増やすことによって社会的緩衝作用を引き起こす神経回路が活性化される頻度を上昇させることで、社会的緩衝作用が脳に与える影響が増し、観察できる程度にまで大きくなると考えられる。

1-5　条件づけられた反応の「消去」

消去とは、あらかじめ条件づけを経験した被験動物が多数回の条件刺激に曝露される消去トレーニングを経験すると、再び条件刺激に曝露される想起テストの際に示す反応が低下する現象である。もともとは 1927 年に Pavlov が条件刺激の後に餌を提示しないことを続けることで、餌に対する欲求反応が減少し、観察されなくなることを見出した。しかし、この現象は恐怖条件づけによって生じたストレス反応に対しても観察されることから、主に心的外傷後ストレス障害といったストレス性疾患の患者のストレス反応を減弱させる治療法の研究手段として、現象自体や神経メカニズムについて注目され、長年研究が続けられてきた（Milad & Quirk, 2012; VanElzakker et al., 2014)。これまで、消去の三大特性として、消去トレーニングを経験してから長期間が経過すると、想起テストにおいて減少していた反応が元に戻ること（Brooks & Bouton, 1993; Quirk, 2002)、消去トレーニングと異なる環境で想起テストを行うと反応が減少しないこと（Bouton, 2004; Corcoran & Maren, 2001)、消去トレーニング後に本来は恐怖条件づけが成立しないような微弱な無条件刺激を加えると、想起テストにおける反応が減少しないこと（Rescorla & Heth, 1975)が知られている。このような消去の特性から、消去では消去トレーニング後も条件づけ自体は維持されており、状況に適応して条件刺激に対する反応が抑制されていることがわかる。

神経メカニズムに関してもこれまで研究が行われてきており、関与する神経核が少しずつ明らかとなってきた。消去に関わる重要な神経核として、これまで前頭前皮質辺縁下部（IL; infralimbic cortex）(Do-Monte et al., 2015;

Sierra-Mercado et al., 2011)、BA (Amano et al., 2011; Herry et al., 2008; Sierra-Mercado et al., 2011)、海馬（Sierra-Mercado et al., 2011)が報告されている。消去トレーニングを受けると IL の活性化や BA の活性化が生じ、それが GABA ニューロンである扁桃体介在細胞塊（ITC; amygdala-intercalated cells）の活性化を介して、CeM を抑制することで、ストレス反応が抑制されるようになると考えられている（Amano et al., 2010; Amano et al., 2011; Ehrlich et al., 2009; Lee et al., 2013; Likhtik et al., 2008)。一方海馬は IL や BA とは異なり、文脈を認識し消去の環境特異性を生み出すことが主な役割であると考えられている（Maren et al., 2013)。例えば消去トレーニング前に海馬の機能を薬理学的に抑制すると、消去の環境特異性が観察されなくなり、消去トレーニングと異なる環境で想起テストを行った場合でも freezing が抑制されることが示されている（Holt & Maren, 1999)。したがって、IL や BA は消去を直接的に誘導する一方で、海馬はその環境特異性を司ることで間接的に消去に関与していると考えられている。

1-6　本研究の目的

本研究の目的は、社会的緩衝作用が脳に与える持続的な影響を明らかとすることである。そのためには社会的緩衝作用を受けている被験動物に多数回の条件刺激を提示した後に、被験動物単独で再び条件刺激を提示し、その反応を観察することが必要となるが、この一連の操作は、消去の研究において行われる操作と同一である。そのため、社会的緩衝作用が消去に与える影響を検討することによって、脳へ与える持続的な影響を評価することができよう。

これまで社会的緩衝作用の研究に用いられてきた条件刺激は主に 3 秒間であったのに対し、消去の研究に用いられてきた条件刺激は主に 20 秒間であった。そこで以下の第 2 章では、両者の条件刺激を用いた場合での消去を比較することで、本研究目的に合致する条件刺激を選定し、基盤となる実験系を確立した。第 3 章では第 2 章で確立した実験系を用い、社会的緩衝作用を受けながら消去トレーニングを経験する被験動物を作製することで、社会的緩衝作用が消去に与える影響を検討した。第 4 章では、社会的緩衝作用による消去の促進におけるコルチコステロンの役割を検討した。

第 2 章

研究の基礎となる実験系の確立

2‒1　緒言

これまで獣医動物行動学研究室では、恐怖条件づけによる聴覚性条件刺激をストレッサーとして用いることで、社会的緩衝作用の研究を行ってきた。これらの研究では、3 秒の条件刺激を用い、ある特定の試験期間における様々なストレス反応の継続時間を観察してきたため、観察された反応のほとんどは条件刺激の提示されていない期間のものであった。一方で、数十秒の条件刺激が提示されている期間中の反応を解析するのが、恐怖条件づけを用いた多くの研究で用いられている方法であり、中でも 20 秒の条件刺激が広く用いられてきた (Amano et al., 2011; Lamprecht et al., 2009; Sullivan et al., 2004)。これらの反応、すなわち主として 3 秒の条件刺激が提示されていない期間の反応と、20 秒の条件刺激が提示されている期間の反応を、条件刺激の提示開始から 20 秒間の freezing を観察することで比較する予備実験を行ったところ、引き起こす反応の特性に違いが生じることが明らかとなった。すなわち、3 秒の条件刺激が引き起こすストレス反応の方がより強いことや、両者では関与する神経メカニズムが異なることである。

3 秒の条件刺激と 20 秒の条件刺激を比較すると、3 秒の条件刺激については社会的緩衝作用に関する情報が豊富である一方で、恐怖条件づけや消去に関する情報は乏しい。対照的に 20 秒の条件刺激は、長年恐怖条件づけや消去の神経メカニズムに関する研究が進められてきたのに対し、社会的緩衝作用の研究に関しての情報は乏しい。

そこで本章では、社会的緩衝作用の持続的な影響を検討する実験系を確立するにあたって、3 秒の条件刺激と 20 秒の条件刺激の、どちらの条件刺激を用い

るのがより適切かを検討した。3 秒の条件刺激を用いて恐怖条件づけられた被験動物を作製し、その翌日に条件刺激のみを提示される消去トレーニングを経験させた。対照群として、同じ時間テストケージに導入されるものの、消去トレーニングを経験しない被験動物を作製した。その翌日に想起テストを行い、条件刺激の提示開始から 20 秒間の freezing を観察することで、消去トレーニングの影響を評価した。同様の操作を 20 秒の条件刺激を用いて行い、両者の結果を比較した。

2–2　材料と方法

2–2–1 実験動物

本実験は東京大学動物実験委員会の承認のもと実施した（承認番号: P12-608)。実験には 9 週齢の Wistar 系雄ラット（日本チャールス・リバー、神奈川)を供試した。搬入したラットは温度（24 ± 1℃)、相対湿度（45 ± 5%)および明暗周期（明期：8:00～20:00、暗期：20:00～8:00)が管理された飼育室内において 2～3 頭ずつプラスチック製の飼育ケージ（28 × 44 × 20.5 cm)にて維持した。水と固形飼料（MM-3；船橋農場、千葉)は自由摂取とした。すべての動物は恐怖条件づけの 3 日前より個別飼育とし、恐怖条件づけを行う前日まで毎日 5 分間のハンドリングを行った。すべての実験は 9 時から 16 時の間に実施した。

2–2–2 実験手順

実験 1 日目に恐怖条件づけ、実験 2 日目に消去トレーニング、実験 3 日目に想起テストを行った（図 2-1)。

恐怖条件づけ（実験 1 日目）

被験動物を飼育ケージに入れたまま、飼育室から実験室に設置してある防音箱（65 × 45 × 45 cm、小原医科産業、東京)に移動させ、60 分以上静置することで移動によるストレスが実験に与える影響を軽減させた。その後、防音箱から運搬用バケツにて被験動物を移動し、電気ショック負荷用のグリッドが装着されたアクリル製の刺激箱（28 × 20 × 27 cm)に白色光下で30分間導入した（文脈A)。90 秒間以上の馴化期間を設けた後、恐怖条件づけ前にはブザー音に対して freezing を引き起こさないことを確認するために、3 秒のブザー音（8 kHz、70 dB)のみを 2 回提示した。その後にブザー音と 0.5 秒の電気ショック（0.55 mA）が同時に終了するように 7 回提示することで、恐怖条件づけを行った。その後、恐怖条件づけが成立していることを確認するために、再びブザー音のみを 2 回提示した。刺激の提示は 90~220 秒間隔でランダムとした。恐怖条件づけ中の行動はビデオカメラ（HDR-HC9；ソニー、東京)と接続されたブルーレイレコーダー（DMR-BW770；パナソニック、大阪)に録画し（図 2-2)、後に解析した。恐怖条件づけ後、被験動物は運搬用バケツを用いて防音箱内の飼育ケージに戻して静置し、すべての被験動物の条件づけが終了した後に、飼育ケージごと飼育室に戻した。刺激箱は、使用後に毎回洗剤（7X；MP Biomedicals、カリフォルニア、アメリカ)を用いて洗浄することで、残留した匂いが次の実験に与える影響を防いだ。

また同様に、20 秒のブザー音（8 kHz、70 dB)を条件刺激として用いた被験動物を作製した。

消去トレーニング（実験 2 日目）

恐怖条件づけの 24 時間後に、前日と同様に被験動物を実験室に設置してある防音箱に移動させ、60 分以上静置した後に、赤色光下で 40 分間の消去トレーニングを行った。テストケージとして、直径 8 mm の穴が 51 個開いたアクリル板を蓋としたケージ（28 × 44 × 20.5 cm)にソフトチップ（三協ラボサービス、東京)を敷いたものを用いた（文脈 B)。被験動物は飼育ケージごと防音箱から運搬し、テストケージに導入した。5 分間の馴化期間の後、条件刺激である 3 秒のブザー音を 60~120 秒間隔でランダムに 24 回提示することで消去トレーニングを行った（3 秒条件刺激：トレーニングあり群、n=7)。また、対照群として同じ時間テストケージに導入するものの、ブザー音を一度も提示しない動物、すなわち消去トレーニングを受けない動物（3 秒条件刺激：トレーニングなし群、n=8)を作製した。消去トレーニング中の行動はビデオカメラで撮影し（図 2-3)、後に行動を解析した。消去トレーニング後は被験動物を飼育ケージに戻し、防音箱内で静置した。そしてすべての被験動物のトレーニングが終了した後、飼育ケージごと飼育室に戻して維持した。テストケージは使用後に毎回洗剤を用いて洗浄することで、残留した匂いが次の実験に与える影響を防いだ。

前日に 20 秒のブザー音を条件刺激として恐怖条件づけを行った被験動物に対しても、20 秒のブザー音を用いて同様の操作を行い、消去トレーニングを受けた群（20 秒条件刺激: トレーニングあり群、n=8)と消去トレーニングを受けていない群（20 秒条件刺激: トレーニングなし群、n=9)の 2 群を作製した。

想起テスト（実験 3 日目）

消去トレーニングの 24 時間後に、前日と同様に被験動物を飼育室から実験室に設置してある防音箱に移動させて 60 分以上静置させた後に、赤色光下で想起テストを行った。前日の消去トレーニングと同様に、ソフトチップを敷いたテストケージを用いた（文脈 B)。3 秒の条件刺激を用いたトレーニングあり群とトレーニングなし群の両群に対し、5 分間の馴化期間を経て、条件刺激である 3 秒のブザー音を 90 秒間隔で 2 回提示した。その間の行動をビデオカメラで撮影し（図 2-3)、後に行動を解析した。想起テスト後は被験動物を飼育ケージに戻し、防音箱内で静置した。テストケージは使用後に毎回洗剤を用いて洗浄することで、残留した匂いが次の実験に与える影響を防いだ。

また 20 秒の条件刺激を用いたトレーニングあり群となし群に対しても、上記の方法に従い、20 秒の条件刺激を提示した。

データ解析と統計解析

すべての数値は平均値 ± 標準誤差で表し、統計の有意水準は P=0.05 とした。Microsoft Excel に組み込まれた visual basic ソフトウェアを用いて、それぞれの条件刺激の提示開始から 20 秒間における freezing の継続時間を計測し、20 秒に対する freezing の割合として算出した。

恐怖条件づけでは条件づけ前後にそれぞれ 2 回提示した条件刺激に対する freezing の割合の平均値を算出し、条件づけ前後の行動反応とした。そして、それぞれの反応を、Student’s t 検定を用いて比較した。

消去トレーニングでは、最初の条件刺激の提示開始から 90 秒前の 20 秒間の

freezing の割合を算出し、馴化期間における freezing の割合とした。消去トレーニング中に提示された 24 回の条件刺激に対する freezing の継続時間を、順次 2 回ずつの freezing の割合の平均値として算出した。また消去トレーニング中の反応を one-way repeated ANOVA を用いて比較した。

想起テストでは、最初の条件刺激の提示開始から 90 秒前の 20 秒間の freezing の割合を算出し、馴化期間における freezing の割合とし、Student's t 検定を用いて比較した。また想起テスト中に提示された 2 回の条件刺激に対する freezing の割合の平均値を算出し、Student's t 検定を用いて比較した。

また追加解析として、条件間の比較を行った。3 秒条件刺激と 20 秒条件刺激のトレーニングあり群の 2 群間において、消去トレーニング中の行動反応を two-way repeated ANOVA を用いて比較した。

2–3 結果

3 秒条件刺激において、恐怖条件づけ後の freezing の割合は、トレーニングあり群とトレーニングなし群で同程度であった（t_{13} = −1.66, P = 0.12）（図 2-4A）。消去トレーニング開始前には、トレーニングあり群の馴化期間の freezing の割合は低い状態であること（0 ± 0)を確認した。加えて、消去トレーニング開始後の freezing の割合は条件刺激の提示回数に伴って減少した（$F_{11,66}$ = 12.9, P < 0.01)（図 2-4A)。想起テスト開始前には、トレーニングあり群とトレーニングなし群の間で馴化期間の freezing の割合は同程度だった（トレーニングあり群：11.7 ± 7.1, トレーニングなし群：0 ± 0, t_{13} = 1.58, P = 0.14)。想起テストでは、トレーニングあり群とトレーニングなし群の間に freezing の割合は同程

度であった（t_{13} = −0.69, P = 0.80) (図 2-4A, 5A)。

20 秒条件刺激において、恐怖条件づけ後の freezing の割合は、トレーニングあり群とトレーニングなし群で同程度であった（t_{15} = −0.25, P = 0.12)（図 2-4B)。消去トレーニング開始前には、トレーニングあり群の馴化期間の freezing の割合は低い状態であること（0 ± 0)を確認した。加えて、消去トレーニング開始後の freezing の割合は条件刺激の提示回数に伴って減少した（$F_{11,77}$ = 13.8, P < 0.0001) (図 2-4B)。想起テスト開始前には、トレーニングあり群とトレーニングなし群の間で馴化期間の freezing の割合は同程度だった（トレーニングあり群：0 ± 0, トレーニングなし群：0 ± 0)。想起テストでは、トレーニングあり群はトレーニングなし群と比較して有意に freezing の割合が低下していた（t_{15} = −2.52, P < 0.05) (図 2-4B, 5B)。

加えて、追加解析での消去トレーニング中の 3 秒条件刺激と 20 秒条件刺激のトレーニングあり群の 2 群間比較において、条件刺激の種類による影響（$F_{1, 13}$ = 14.4, P < 0.01)、条件刺激の提示回数による影響（$F_{11, 143}$ = 25.4, P < 0.01)、これら 2 要因の交互作用による影響（$F_{11, 143}$ = 1.96, P < 0.05)が認められた。この解析より、3 秒の条件刺激は 20 秒の条件刺激と比較して消去トレーニング中の freezing の割合が高いことが示された。

2-4　考察

本実験において、3 秒の条件刺激を用いて恐怖条件づけされた被験動物では、トレーニングあり群は想起テストにおいて freezing が減少しないことが明らかとなった。一方、20 秒の条件刺激を用いて恐怖条件づけされた被験動物では、トレーニングあり群は想起テストにおいて freezing が減少することが明らかとなった。消去トレーニング時に社会的緩衝作用を受けた場合、社会的緩衝作用を受けなかった場合と比較して想起テストにおける freezing が減少することが予想される。この時 3 秒の条件刺激を用いた実験系では、トレーニングあり群は想起テストにおいて freezing を示しているため、社会的緩衝作用による低下を観察し易いことが期待される。一方 20 秒の条件刺激を用いた実験系では、トレーニングあり群は想起テストにおいて freezing の減少を示しているため、社会的緩衝作用によるさらなる減少を適切に評価できないと考えられる。そのため本実験の結果より、3 秒の条件刺激を用いた実験系の方が社会的緩衝作用の持続的な影響の評価により適していることが示唆された。

本実験において、20 秒の条件刺激では想起テストにおける freezing が減少したにも関わらず、同様の方法で行った 3 秒の条件刺激を用いた実験系では freezing が減少しなかった。この理由の一つとして、3 秒の条件刺激は 20 秒の条件刺激よりも条件づけが成立しやすいためにより強度のストレス反応を誘発したので、消去を引き起こすにはより多数回の消去トレーニングが必要であったという可能性が挙げられる。この可能性は、3 秒条件刺激のトレーニングあり群が、20 秒条件刺激のトレーニングあり群と比較して、消去トレーニング時により強い freezing を示したことからも支持される。短い条件刺激の方が、同じ

条件づけ操作にも関わらず長い条件刺激よりも強い反応を誘発するようになることは、様々な実験系で観察されている（Meltzer & Brahlek, 1970; Shipley, 1974; Waddell et al., 2006)。例えば、25 秒または 100 秒の聴覚性条件刺激による恐怖条件づけによって飲水行動が抑制されたラットでは、100 秒よりも 25 秒の条件刺激を提示した時の方が飲水行動の抑制が強く見られる（Shipley, 1974)。このような現象が生じる原因は現在のところ不明であるものの、被験動物にとって重要な音は条件づけされやすく消去されにくい可能性が挙げられる。例えば、ラットが危険を感じた時に発する超音波として知られる 22 kHz の音で恐怖条件づけを行った場合には、他の周波数や白色雑音を用いて恐怖条件づけを行った場合よりも強いストレス反応が誘発されるとともに、消去も生じにくいことが報告されている（Endres et al., 2007)。また例えば動物が危険を知らせるために発する alarm call と呼ばれる音の多くは、ミーアキャットは 1 音あたり 0.3 秒以内（Manser, 2001)、ジリスは約 0.225 秒の超音波（Wilson & Hare, 2004)、ラットは長くても 1 秒程度であること（Brudzynski et al., 1993)など、数秒に満たない長さであることが知られている。このことから、3 秒の条件刺激は 20 秒の条件刺激に比較して危険と関連づきやすかったため、より強いストレス反応を誘発したことが考えられる。

もう一つの理由として、3 秒の条件刺激では 20 秒の条件刺激と比較して消去トレーニングの効果が弱かった可能性が挙げられる。本実験にて 3 秒の条件刺激では 20 秒の条件刺激と比較して消去トレーニングにおける freezing の減少が緩やかであったことは、この可能性を支持するものである。その原因として、本実験の消去トレーニングにおいて消去を誘導する神経メカニズムを活性化す

るには、3 秒の条件刺激では短かった可能性が挙げられる。消去には扁桃体基底核BAが重要な役割を果たしていることが報告されている（Amano et al., 2011)。例えば、当初は条件刺激によってその活動が抑制されるが、繰り返し条件刺激に曝されると活性化されるようになる神経細胞が BA に存在することが知られている（Amano et al., 2011; Herry et al., 2008)。また BA には、条件刺激の提示開始から数秒後に初めて活性化され始め、その活性化が 20 秒の条件刺激の提示後まで継続される神経細胞も存在することが知られている（Amano et al., 2011)。そのため 3 秒の条件刺激では、消去を誘導するのに重要な役割を担っている BA の神経細胞を活性化したり、その活性化を維持するには短すぎたりすることが考えられる。

2-5　小括

本章では、社会的緩衝作用が脳へ与える持続的な影響を解明するために必要な実験系を検討した。3 秒の条件刺激を用いると、消去トレーニングを経験しても想起テストにおける freezing が減少しないことが明らかとなった。一方で、20 秒の条件刺激を用いると、消去トレーニングによって想起テストにおける freezing が減少した。消去トレーニング時に社会的緩衝作用を受けると、想起テストにおける freezing がさらに減少することが期待されるため、3 秒の条件刺激を用いた実験系の方が本研究目的により適していることが示唆された。

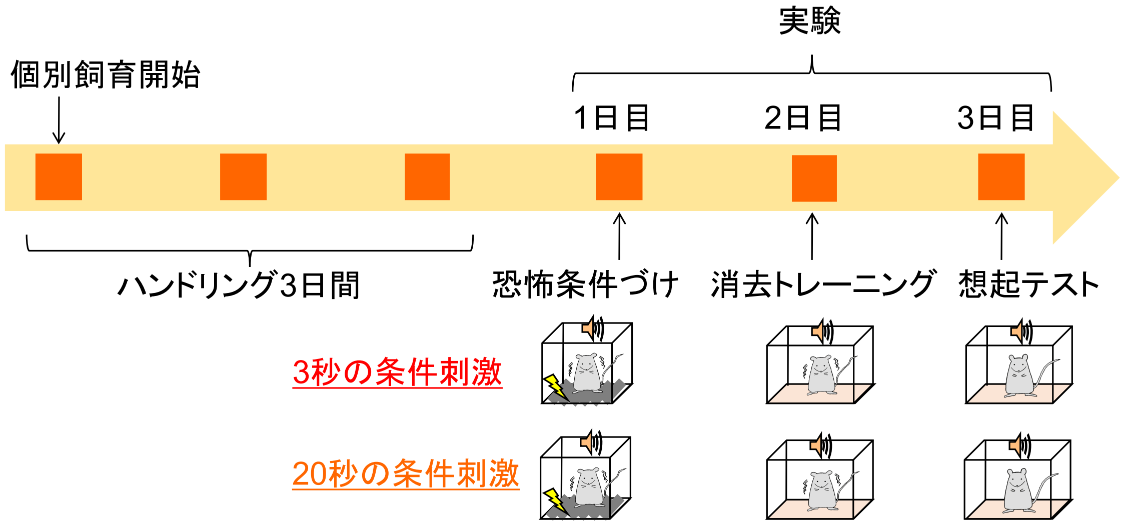

実験
個別飼育開始
1日目
2日目
3日目
ハンドリング3日間
恐怖条件づけ
消去トレーニング
想起テスト
3秒の条件刺激
20秒の条件刺激

図 2-1、実験概要

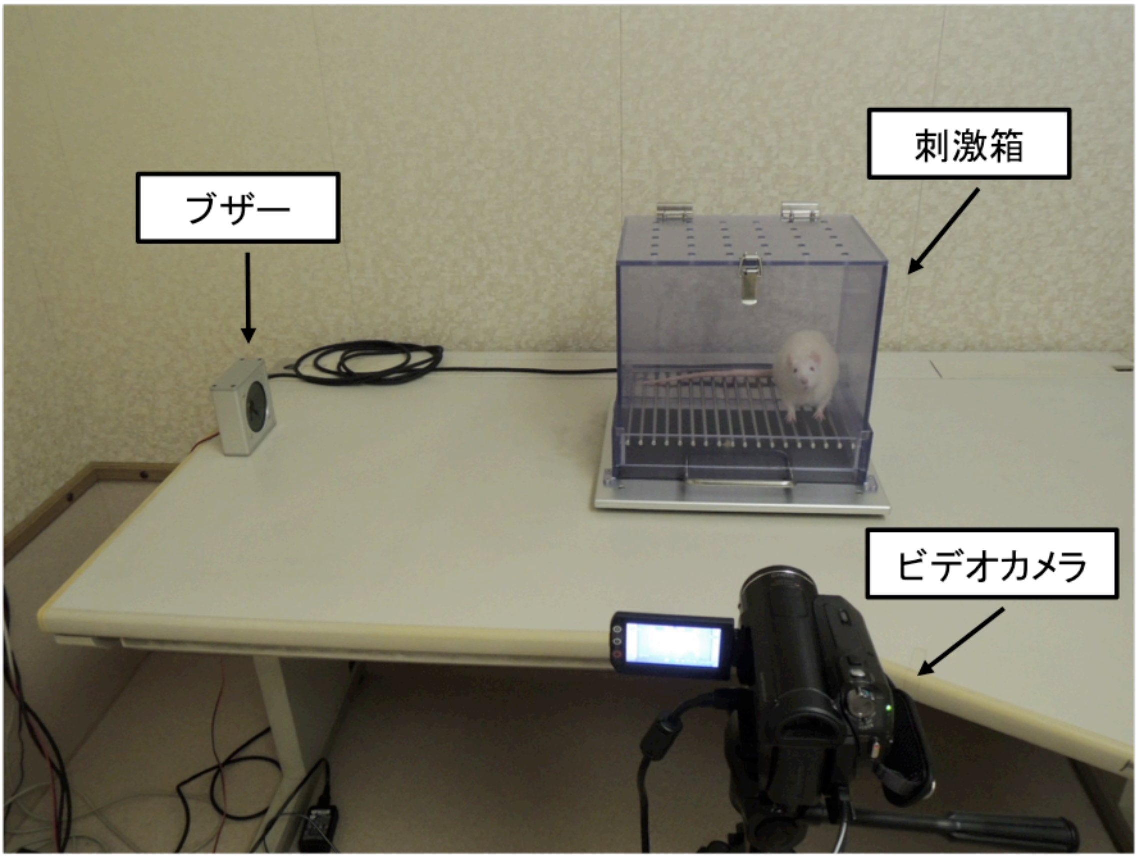


図 2-2、恐怖条件づけの様子

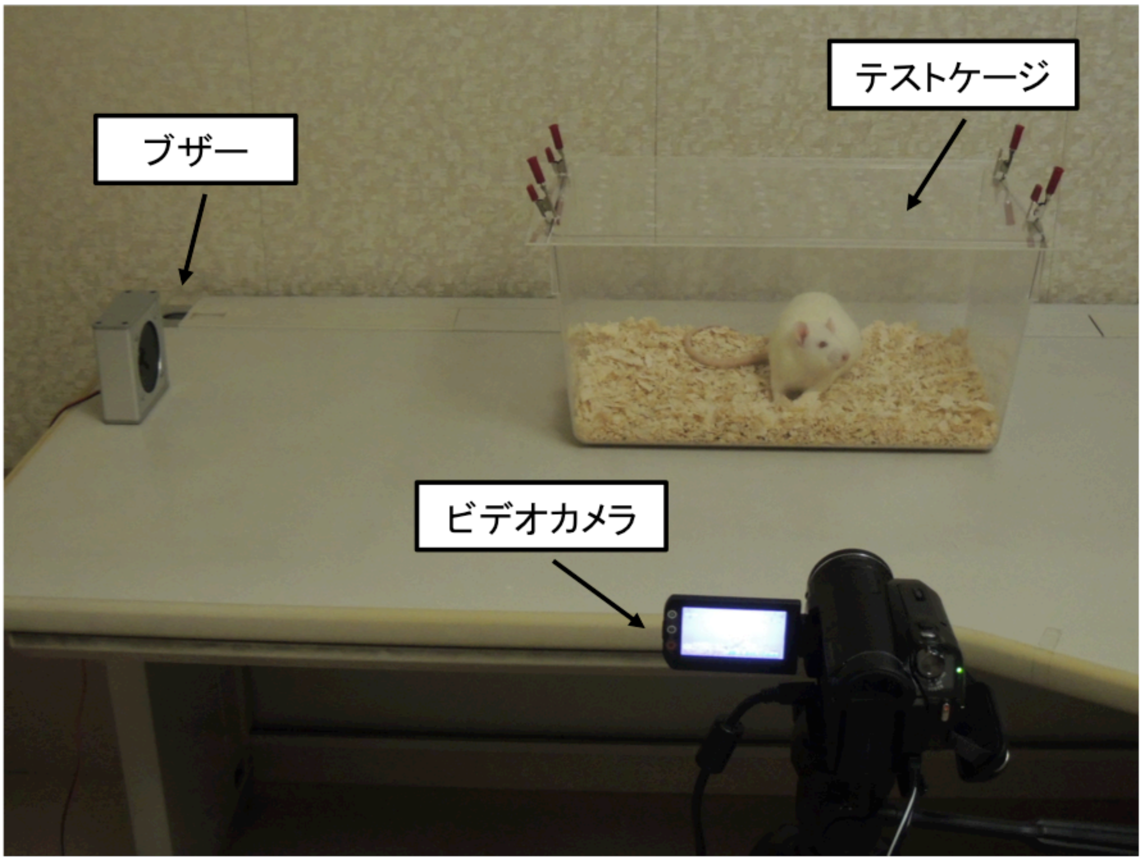


図 2-3、消去トレーニングと想起テストの様子
実際には赤色光下で行った。

freezing

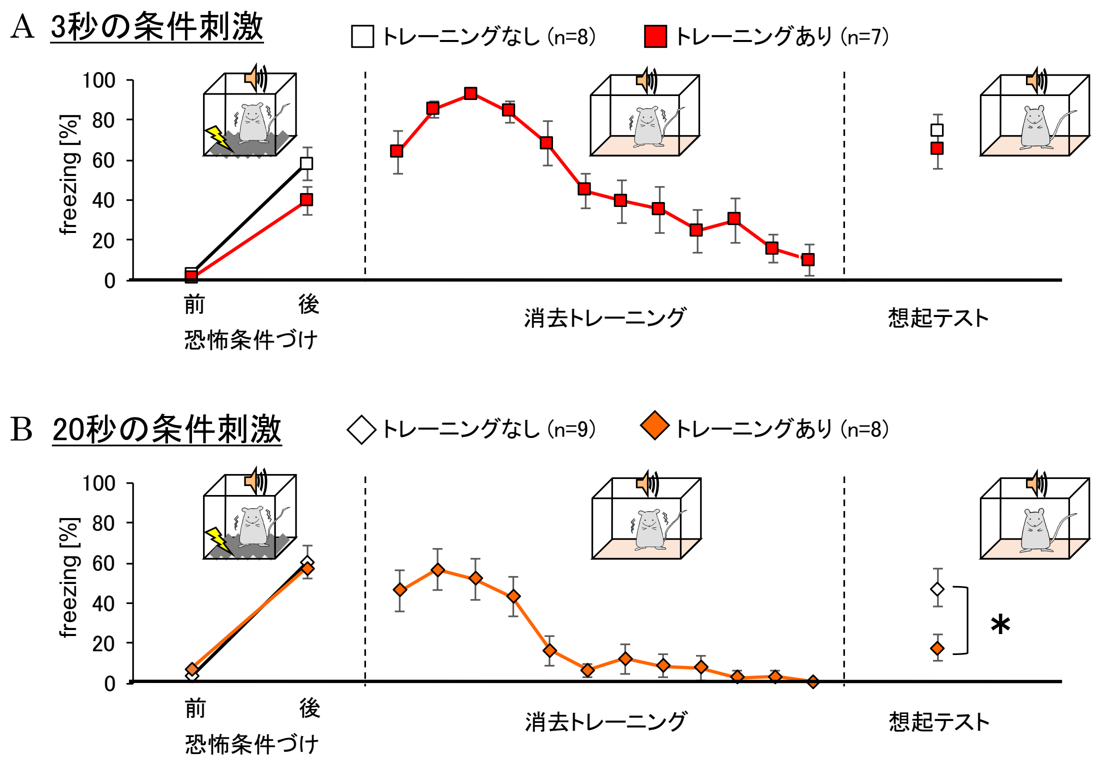
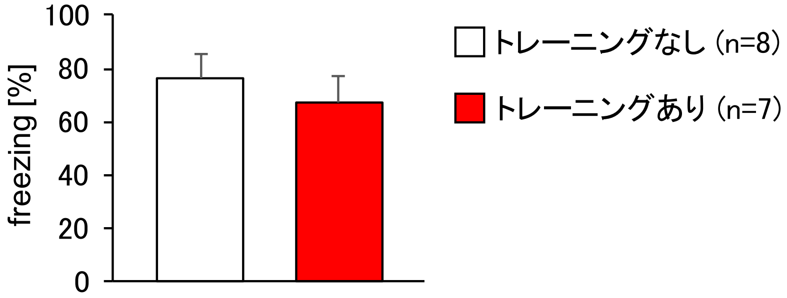


図 2-4、3 秒の条件刺激(A)または 20 秒の条件刺激(B)を用いた時の
恐怖条件づけ、消去トレーニング、想起テストにおける freezing の割合
1 点は 2 回の条件刺激に対する freezing の割合の平均値を示す。
(Mean ± SEM, ＊: $P < 0.05$)

想起テストにおけるfreezing

A 3秒の条件刺激



B 20秒の条件刺激

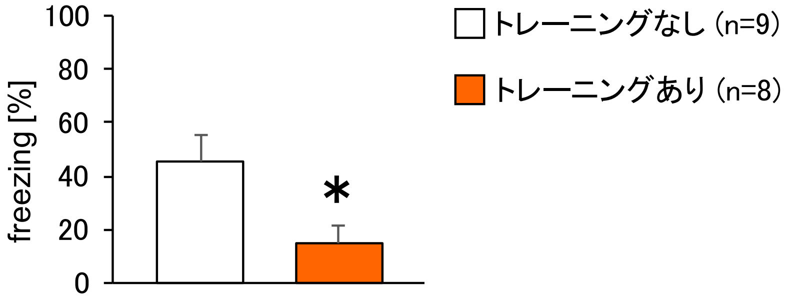


図 2-5、3 秒の条件刺激(A)または 20 秒の条件刺激(B)を用いた時の
想起テストにおける freezing の割合
想起テストの結果(図 2-4)を棒グラフにて示した。(Mean ± SEM, ＊: $P < 0.05$)

第 3 章

社会的緩衝作用が脳に与える持続的な影響

3-1　緒言

第 2 章の研究結果より、3 秒の条件刺激を用いて消去を観察する実験系は本研究目的に適した実験系であることが示唆された。そこで本章では、第 2 章で確立した実験系を用いて、社会的緩衝作用が脳に与える持続的な影響を検討することとした。

消去は、消去トレーニング中のストレスレベルによって影響を受けることが知られている。例えば消去トレーニングの直前に電気ショック（Maren & Chang, 2006)や高所ストレス（Akirav & Maroun, 2007)を曝露すると、想起テストにおける freezing の減少が観察されなくなることから、消去トレーニング時のストレスレベルが高いと消去が阻害されることが示唆されている。このことから、消去トレーニングを経験した時の被験動物のストレスレベルが低いと、消去が逆に促進されることが考えられる。そのため社会的緩衝作用によって消去トレーニング中のストレスが軽減されると、消去が促進されるという仮説が立てられる。すなわち、消去トレーニング時の社会的緩衝作用は消去を誘導するために必要な脳内変化を促進し、その影響が想起テスト時にも持続するため、想起テストおいて観察される freezing がさらに減少するということである。

条件刺激に対するストレス反応には、扁桃体が重要な働きを担っていることが知られている。恐怖条件づけを経験すると、恐怖条件づけ後に再び条件刺激に曝されると LA が活性化し、そのシグナルが CeL もしくは BA を経由して CeM へと伝達され、CeM が活性化することで、freezing を含めた様々なストレス反応を示すようになる（LeDoux, 2000; Paré et al., 2004; Peters et al., 2009; Stores-Bayon et al., 2006)。また消去は、消去トレーニングを経験することによ

って想起テスト時の扁桃体の活性化が抑制されるために誘起されることが知られている（Pare & Duvarci, 2012)。そのため、消去トレーニング時の社会的緩衝作用が消去を促進することで想起テストにおけるストレス反応を抑制した場合には、想起テスト時の扁桃体の活性化が抑制されると考えられる。

消去の特性の 1 つとして、想起テストを消去トレーニングと同じ環境で行った場合にのみ観察されるという、環境特異性が知られている（Bouton, 2004; Maren et al., 2013)。例えば、消去トレーニングを赤色光下で床がスチール板の黒い箱にて行った場合、想起テストを消去トレーニングと同じ環境で行うと freezing が減少するが、白色光下で床がゴムでできた灰色の筒状の箱にて行うと freezing が減少しないことが知られている（Corcoran et al., 2005)。このような環境特異性は、条件づけられた記憶自体の消失と呼ばれる現象の場合には観察されないことが知られている（Monfils et al., 2009; Myers et al., 2006; Nader et al., 2000; Quirk et al., 2010)。例えば、恐怖条件づけから 24 時間後に一度だけ条件刺激に曝されてから、その 1 時間後に消去トレーニングを経験したラットは、想起テストにおいて示す freezing が減少することが知られている (Monfils et al., 2009)。しかしこの freezing の減少は、想起テストを消去トレーニングと異なる環境で行っても観察されること（Monfils et al., 2009)から、消去ではなく条件づけられた記憶自体の消失と考えられる。そのため、消去トレーニング時の社会的緩衝作用が消去を促進した場合には、想起テストが消去トレーニングと同じ環境で行われた場合にのみ、freezing を含めたストレス反応の減少が観察されると考えられる。

そこで本章では 2 つの実験を行った。まず実験 1 では消去トレーニング中に社会的緩衝作用を受けると消去が促進されるという仮説を検証するとともに、想起テスト時の扁桃体の活動を検討した。恐怖条件づけられた被験動物に単独で、もしくは条件づけられていない他の雄ラット (他個体)と共に消去トレーニングを経験させた。対照群として、同じ時間テストケージに単独でもしくは他個体と共に導入されるものの、消去トレーニングを経験しない被験動物をそれぞれ作製した。その翌日に想起テストを行い、被験動物単独に条件刺激を提示し、条件刺激に対する行動反応として freezing と、HPA 軸の反応として PVN において神経活動のマーカーとなる Fos 蛋白質発現 (Kovács, 1998)を解析した。また同時に、扁桃体においても Fos 蛋白質発現を解析した。続く実験 2 では、実験 1 で観察された現象の環境特異性を検討した。恐怖条件づけられた被験動物を他個体と共に消去トレーニングを経験させた。その翌日に行う想起テストを消去トレーニングと同じ環境もしくは異なる環境で行い、条件刺激に対する freezing を解析した。

3–2　材料と方法

3–2–1 実験動物

本実験は東京大学動物実験委員会の承認のもと実施した（承認番号: P13-788、P14-897)。実験には 9 週齢の Wistar 系雄ラット（日本チャールス・リバー、神奈川)を供試した。搬入したラットは温度（24 ± 1℃)、相対湿度（45 ± 5%)および明暗周期（明期：8:00〜20:00、暗期：20:00〜8:00)が管理された飼育室内において 2〜3 頭ずつプラスチック製の飼育ケージ（28 × 44 × 20.5 cm)にて維持した。水と固形飼料（MM-3；船橋農場、千葉)は自由摂取とした。すべての動物は恐怖条件づけの 3 日前より個別飼育とし､恐怖条件づけを行う前日まで毎日 5 分間のハンドリングを行った。また被験動物にはハンドリングの 1 日目に尾の根元に黒色の油性マジックで印をつけることで、他個体と区別できるようにした。すべての実験は 9 時から 16 時の間に実施した。

3–2–2 実験手順

実験手順は第 2 章に従った（図 3-1)。

【実験 1】

恐怖条件づけ（実験 1 日目）

被験動物を飼育室から実験室に設置してある防音箱に移動させて 60 分以上静置させた後に、白色光下で恐怖条件づけを行った。刺激箱に 30 分間導入し（文脈 A)、90 秒間以上の馴化期間を設けた後、3 秒のブザー音（8 kHz、70 dB)のみを 2 回提示することで、恐怖条件づけ前にはブザー音に対して freezing を引

き起こさないことを確認した。その後にブザー音と0.5秒の電気ショック（0.55 mA)が同時に終了するように 7 回提示することで、恐怖条件づけを行った。その後、恐怖条件づけが成立していることを確認するために、再びブザー音のみを2回提示した。刺激の提示は90~220秒間隔でランダムとした。

消去トレーニング（実験2日目）

恐怖条件づけの24時間後に、被験動物を飼育室から実験室に設置してある防音箱に移動させて60分以上静置させた後に、赤色光下で消去トレーニングを行った（図 3-2)。被験動物を単独で（単独でのトレーニング： トレーニングあり群、n=9)、もしくは他個体とともに（他個体とのトレーニング: トレーニングあり群、n=9)テストケージに40分間導入し（文脈B)、5分間の馴化期間の後、条件刺激である3秒のブザー音を60~120秒間隔でランダムに24回提示した。また、対照群としてトレーニングなし群（単独でのトレーニング：n=9、他個体: n=9)をそれぞれ作製した。

想起テスト（実験3日目）

消去トレーニングの24時間後に、被験動物を飼育室から実験室に設置してある防音箱に移動させて60分以上静置させた後に、赤色光下で想起テストを行った。すべての被験動物を単独でテストケージに導入し（文脈 B)、5 分間の馴化期間を経た後、条件刺激である3秒のブザー音を90秒間隔で2回提示した。

免疫染色

想起テストの60分後、被験動物にペントバルビタールナトリウム（ソムノペンチル；共立製薬、東京)を腹腔内投与することで深麻酔し、4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝溶液を用いて全身灌流固定した。採材した脳は4℃にて同固定液に一晩浸漬することで固定し、その後30％スクロース・リン酸溶液に浸漬した状態で保存した。脳をO.C.T Compound (サクラファインテックジャパン、東京)で包埋し凍結後、クライオスタット（Leica；CM1850、ヘッセン、ドイツ)を用いて、PVN (Bregma −1.80mm)、LA、BA、CeL、 CeM (Bregma −2.76mm)の各領域を観察できるよう、それぞれの神経核に対して厚さ30 μmの6枚の連続切片を作製した。0.3%過酸化水素リン酸緩衝生理食塩水と30分間反応させることで、内因性ペルオキシターゼを失活させた後、30分間のブロッキングを行い、Fos蛋白質に対する一次抗体（ABE457, Merck Millipore、マサチューセッツ、アメリカ；8000倍希釈)と65時間反応させた。その後、二次ビオチン化抗ウサギIgG抗体（BA-1000; Vector Laboratories、カリフォルニア、アメリカ)およびアビジン–ビオチン化複合体とそれぞれ2時間反応させた。この一連の作業にはVECTASTAIN ABC kit (Vector Laboratories)を用いた。その後、3, 3’-ジアミベンジジン（DAB)およびニッケルを用いて発色させた。染色した切片はスライドガラスに貼り付けた後、脱水封入した。

データ解析と統計解析

第 2 章の方法に従った。恐怖条件づけと想起テストにおいて、2 回の条件刺激に対する freezing の平均値を Student's t 検定を用いて比較した。また消去トレーニング中の反応を one-way repeated ANOVA を用いて比較した。

また追加解析として、想起テストの馴化期間の活動量として後肢を踏み換える数 (歩数)を計測した。そして、トレーニングあり群が示す歩数を、単独でのトレーニング条件と他個体とのトレーニング条件間で、Student's t 検定を用いて比較した。

PVN、LA、BA、CeL、CeM において、デジタルカメラ (DP30DW、オリンパス、東京)を備え付けた顕微鏡を用いて撮影した。それぞれの領域において、Scion image Beta 4.0.2 を用いて 6 枚の切片上で 0.5mm 四方内の Fos 蛋白質発現細胞数を脳切片の両側で計測した。0.5mm 四方内よりも領域が小さい場合には、領域内のみを計測した。ただし、技術的な問題で、いくつかの領域が失われたため、すべての群は解析可能だった 6〜9 頭分を解析した。Fos 蛋白質発現は単独でのトレーニングと他個体とのトレーニングのそれぞれの条件内で Student's t 検定を用いて比較した。

【実験 2】

恐怖条件づけ（実験 1 日目）

実験 1 の方法に従い、刺激箱にて恐怖条件づけを行った（文脈 A)。

消去トレーニング（実験 2 日目）

実験 1 の方法に従い、テストケージにて消去トレーニングを行った（文脈 B)。他個体とのトレーニング条件のみを作製した。

想起テスト（3 日目）

実験 1 の方法に従い想起テストを行った（同じ環境：トレーニングあり群：n=8、トレーニングなし群、n=8)。ただし異なる環境（異なる環境：トレーニングあり群 : n=5、トレーニングなし群、n=6)では、前日の消去トレーニングとは異なり、白色光下でステンレス製の金網状の蓋のついた、紙製の床敷（パルソフト；オリエンタル酵母工業、東京)を敷いた円筒形のアクリル製容器（28 × 28 × 25 cm)を用いた（文脈 C) (図 3-3)。

データ解析と統計解析

実験 1 の方法に従った。恐怖条件づけと想起テストにおいて、2 回の条件刺激に対する freezing の平均値を Student's t 検定を用いて比較した。

3–3　結果

【実験 1】

単独でのトレーニング条件において、恐怖条件づけ後の freezing の割合は、トレーニングあり群とトレーニングなし群で同程度であった（t_{16} = 0.27, P = 0.79) (図 3-4A)。消去トレーニング開始前には、トレーニングあり群の馴化期間の freezing の割合は低い状態であること（1.95 ± 1.95)を確認した。加えて、消去トレーニング開始後の freezing の割合は条件刺激の提示回数に伴って減少した（$F_{11,88}$ = 5.32, P < 0.01) (図 3-4A)。想起テスト開始前には、トレーニングあり群とトレーニングなし群の間で馴化期間の freezing の割合は同程度だった (トレーニングあり群 : 9.75 ± 7.55, トレーニングなし群 : 1.23 ± 1.23, t_{16} = 1.11, P= 0.28)。想起テストでは、トレーニングあり群とトレーニングなし群の間の freezing の割合は同程度であった（t_{16} = −0.36, P = 0.72) (図 3-4A, 5A)。

単独でのトレーニング条件において、想起テスト後に脳の各領域における Fos 蛋白質発現を観察したところ、PVN (t_{12} = −0.28, P = 0.78) (図 3-6A)、LA (t_{13} = 0.38, P = 0.71) (図 3-7A)、BA (t_{13}= −0.93, P = 0.37) (図 3-8A)、CeL (t_{13} = 0.18, P = 0.86)および CeM (t_{13} = −0.28, P = 0.78) (図 3-9A)においてトレーニングあり群とトレーニングなし群は同程度であった（図 3-10A)。

他個体とのトレーニング条件において、恐怖条件づけ後の freezing の割合は、トレーニングあり群とトレーニングなし群で同程度であった（t_{16} = −0.26, P= 0.80) (図 3-4B)。消去トレーニング開始前には、トレーニングあり群の馴化期間の freezing の割合は低い状態であること（0 ± 0)を確認した。加えて、消去トレーニング開始後の freezing の割合は条件刺激の提示回数に関係なく低い値を保

っていた ($F_{11,88}$ = 1.14, P = 0.32) (図 3-4B)。想起テスト開始前には、トレーニングあり群とトレーニングなし群の間で馴化期間の freezing の割合は同程度だった（トレーニングあり群 : 0 ± 0, トレーニングなし群 : 8.64 ± 7.52, t_{16} = −1.15, P= 0.27)。想起テストでは、トレーニングあり群はトレーニングなし群と比較して有意に freezing の割合が低下していた（t_{16} = −5.04, P < 0.01) (図 3-4B, 5B)。

他個体とのトレーニング条件において、想起テスト後に脳の各領域における Fos 蛋白質発現を観察したところ、トレーニングあり群はトレーニングなし群と比較して PVN (t_{16} = −2.46, P < 0.05) (図 3-6B)と LA (t_{13} = −3.73, P < 0.05) (図 3-7B)において有意に減少していた。一方、BA (t_{13} = −0.51, P = 0.617) (図 3-8B)、CeL (t_{13} = −0.51, P = 0.617)および CeM (t_{13} = −1.34, P = 0.20) (図 3-9B)における Fos 蛋白質発現はトレーニングあり群とトレーニングなし群は同程度であった (図 3-10B)。

本実験では、活動性に影響が出ることが考えられたため、追加解析を行った。トレーニングあり群が想起テスト時の馴化期間に示した歩数を解析したところ、単独でのトレーニング条件と他個体とのトレーニング条件では同程度であった (単独条件: 61.9 ± 10.2, 他個体条件: 81.9 ± 8.3, t_{16} = 1.52, P = 0.15)。

【実験 2】

同じ環境条件において、恐怖条件づけ後の freezing の割合は、トレーニングあり群とトレーニングなし群で同程度であった（t_{14} = −0.07, P = 0.94）(図 3-11A)。消去トレーニング開始前には、トレーニングあり群の馴化期間の freezing の割合は低い状態であること (0 ± 0)を確認した。加えて、消去トレー

ニング開始後の freezing の割合は条件刺激の提示回数に関係なく低い値を保っていた（$F_{11,77}$ = 1.27, P = 0.26) (図 3-11A)。想起テスト開始前には、トレーニングあり群とトレーニングなし群の間で馴化期間の freezing の割合は同程度だった（トレーニングあり群：1.90 ± 1.90, トレーニングなし群：0.92 ± 0.92, t_{14} = 0.47, P = 0.65)。想起テストでは、トレーニングあり群はトレーニングなし群と比較して有意に freezing の割合が低下していた（t_{14} = −2.34, P < 0.05) (図 3-11A, 12A)。

異なる環境条件において、恐怖条件づけ後の freezing の割合は、トレーニングあり群とトレーニングなし群で同程度であった（t_9 = −0.44, P = 0.67) (図 3-11B)。消去トレーニング開始前には、トレーニングあり群の馴化期間の freezing の割合は低い状態であること（0 ± 0)を確認した。加えて、消去トレーニング開始後の freezing の割合は条件刺激の提示回数に関係なく低い値を保っていた（$F_{11,44}$ = 0.58, P = 0.84) (図 3-11B)。想起テスト開始前には、トレーニングあり群とトレーニングなし群の間で馴化期間の freezing の割合は同程度だった（トレーニングあり群 : 0 ± 0, トレーニングなし群 : 0 ± 0)。想起テストでは、トレーニングあり群とトレーニングなし群の間の freezing の割合は同程度であった（t_9 = 0.69, P = 0.50) (図 3-11B, 12B)。

3-4　考察

実験 1 より、単独でのトレーニング条件のトレーニングあり群では想起テストにおける freezing や Fos 蛋白質発現は減少しないことが明らかとなった。このことから、本実験で行った消去トレーニングは想起テストにおける反応を減少させないという第 2 章の結果が確認された。一方、他個体とのトレーニング条件のトレーニングあり群では、想起テストにおける freezing が減少し、PVN および LA における Fos 蛋白質発現が低下することが明らかとなった。また実験 2 より、異なる環境条件ではトレーニングあり群においても想起テストにおける freezing は減少しないことが明らかとなった。以上の結果より、社会的緩衝作用は脳に持続的な影響を与え、消去を促進することが示唆された。

実験 1 で行った Fos 蛋白質の解析では、その発現細胞数は freezing の強度を単純に反映していないと考えられる。例えば他個体とのトレーニング条件のトレーニングなし群は、単独でのトレーニング条件のトレーニングなし群とトレーニングあり群よりも Fos 蛋白質発現が高かったが、この 3 群はみな同程度の freezing 強度を示していた。同様に他個体とのトレーニング条件のトレーニングあり群は、単独でのトレーニング条件のトレーニングなし群やトレーニングあり群と同程度の Fos 蛋白質発現を示すものの、両群とは異なり freezing 強度は弱いものだった。この理由として、消去トレーニングにおける他個体との社会的相互作用が、想起テストにおける Fos 蛋白質発現の基底レベルに影響を与えたことが挙げられる。このことは、社会的遊び行動により LA における Fos 蛋白質発現が増加するという報告から支持される（van Kerkhof et al., 2014）。しかし本章の実験は、単独でのトレーニング条件の実験を終了した後に他個体

とのトレーニング条件の実験を行うというように、特定の条件におけるトレーニングあり群は常に同条件のトレーニングなし群と共に作製された。そのため、単独でのトレーニング条件と他個体とのトレーニング条件間で Fos 蛋白質発現を比較するよりも、同条件内のトレーニングなし群とトレーニングあり群との間で比較する方が、より適切な比較であると考えられる。以上のことから、消去トレーニング時に社会的緩衝作用を受けると、想起テスト時の PVN や LA が抑制されると解釈できよう。

今回、他個体とのトレーニング条件のトレーニングあり群では LA の抑制が観察されたが、その他の扁桃体領域においては抑制が観察されなかった。この理由として、例えば BA にはストレス反応の発現に関与する細胞群と消去の誘導に関与する細胞群が混在していること（Herry et al., 2008)が挙げられる。また同様に、CeL においてもストレス反応の発現に関わる細胞群と消去の誘導に関わる細胞群の存在が示唆されている（Duvarci et al., 2011)。そのためこれらの領域では、たとえストレス反応の発現に関わる細胞群の活性化が抑制されていても、その代わりに消去の誘導に関わる細胞群が活性化したため、トレーニングなし群と同程度の Fos 蛋白質発現細胞数になったと考えられる。一方で CeM にはストレス反応の発現に関わる細胞群しか存在していないため、その活性化度合いがストレス反応の強度を反映すると考えられる。しかし先行研究においても、消去による Fos 蛋白質発現の抑制は観察されなかった（Knapska & Maren, 2009)ことから、Fos 蛋白質発現を用いて消去における CeM の活動を評価することは困難であるのかもしれない。

実験 1 の結果より、消去トレーニング中に社会的緩衝作用を受けると想起テ

ストにおいて、PVN と LA の活性化の抑制とともに、条件刺激に対する freezing の抑制が観察された。またこの freezing の抑制は環境特異的であることが、実験 2 において確認された。そのため本結果は、社会的緩衝作用は消去を促進したことが示唆された。その理由として、本実験の結果が消去の特性と一致していることが挙げられる。例えば実験 1 にて観察された LA の抑制は、消去が誘導されたことによって freezing が減少した際に観察される現象であることが、先行研究にて報告されている（Hobin et al., 2003; Knapska & Maren, 2009)。また実験 2 において確認された環境特異性は、消去の主要な特性の一つであることが知られている（Bouton, 2004; Maren et al., 2013)。また同時に、本実験結果を引き起こしうる他の可能性が低いことも挙げられる。第一に、消去トレーニング中に社会的緩衝作用を受けたことにより、条件づけられた記憶自体の消失が誘導された可能性が挙げられる（Monfils et al., 2009; Myers et al., 2006; Nader et al., 2000; Quirk et al., 2010)。しかし実験 2 において、異なる環境条件ではストレス反応が観察されたことから、この可能性は否定される。第二に、消去トレーニング時に社会的緩衝作用によるストレスの緩和がテストケージと関連づけられた結果、想起テストにおいてストレス反応が抑制された可能性が挙げられる（Mohammadi et al., 2014; Rogan et al., 2005)。しかし、他個体とのトレーニング条件のトレーニングなし群においてストレス反応が確認されたことから、この可能性は否定される。第三に、消去トレーニング時に他個体の存在による活動量の増加がテストケージと関連づけられたために、想起テストにおいて活動量が増加し、その結果静止していることが必要となる freezing が減少した可能性が挙げられる。しかし想起テストにおける馴化期間

の活動量は、単独でのトレーニング条件のトレーニングあり群と他個体とのトレーニング条件のトレーニングあり群とで同程度であったため、この可能性も否定された。以上のことから、単独でのトレーニング条件では誘導されなかった消去が、消去トレーニング中の社会的緩衝作用によって引き起こされるようになったと考えられる。

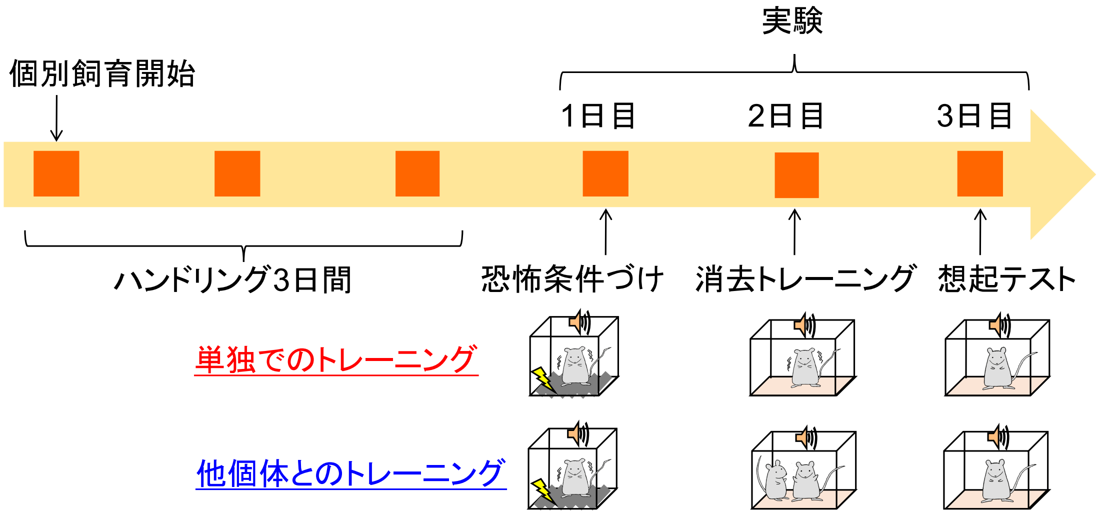
本実験では想起テストの後に Fos 蛋白質発現を観察したため、想起テスト時に LA が抑制されることは明らかとしたものの、消去トレーニング時に活性化される消去を誘導する神経メカニズムに関する情報を得ることはできなかった。社会的緩衝作用が消去を促進するためには、消去を誘導する神経メカニズムが消去トレーニング時に活性化されることを促進する必要がある。消去を誘導する神経メカニズムには BA (Amano et al., 2011; Herry et al., 2008; Sierra-Mercado et al., 2011)と IL (Do-Monte et al., 2015; Sierra-Mercado et al., 2011)が重要な役割を担っていることが示唆されている。そして、社会的緩衝作用はこれらの領域に対して、その活性化を促進する可能性が挙げられる。例えば BA は pmOP から直接の投射を受けているため (Kiyokawa et al., 2012)、社会的緩衝作用を受けた際に他個体からの嗅覚シグナルが pmOP から BA へと伝達され、活性化された可能性が考えられる。また IL に関しては、ストレス反応性が高い系統のラットは、ストレス反応性が低い系統のラットに消去を誘導する消去トレーニングを経験しても消去を示さず、また消去トレーニングによる IL における Fos 蛋白質発現も少ないことが知られている (Landgraf et al., 1999; Muigg et al., 2008)。これらのことから社会的緩衝作用によってストレスが緩和されると、同じ消去トレーニングを経験しても IL がより活性化された可

能性が考えられる。今後、これらの可能性を検討していく必要があるだろう。

3-5　小括

社会的緩衝作用がもたらす影響が持続する可能性について検討した。消去トレーニングを単独で経験すると、想起テストにおける freezing や Fos 蛋白質発現は減少しないことが明らかとなったことから、消去トレーニングは想起テストにおける反応を減少させないという結果が確認された。一方で、他個体と一緒にトレーニングを経験することでトレーニング中に社会的緩衝作用を受けると、想起テストにおける freezing が減少し、PVN および LA における Fos 蛋白質発現が低下することが明らかとなった。またこの効果は、消去トレーニングが行われた環境特異的に引き起こされることも確認された。以上の結果より、社会的緩衝作用は脳に持続的な影響を与え、消去を促進することが示唆された。

実験1



実験2

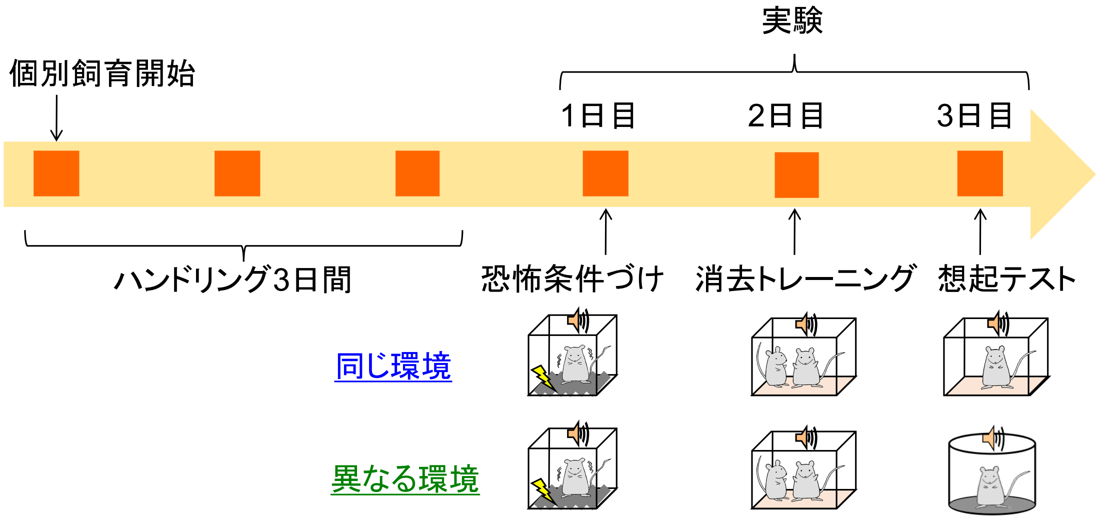


図 3-1、実験概要

図 3-2、他個体との消去トレーニングの様子
実際には赤色光下で行った。

図 3-3、消去トレーニングと異なる環境で想起テストを行った時の様子

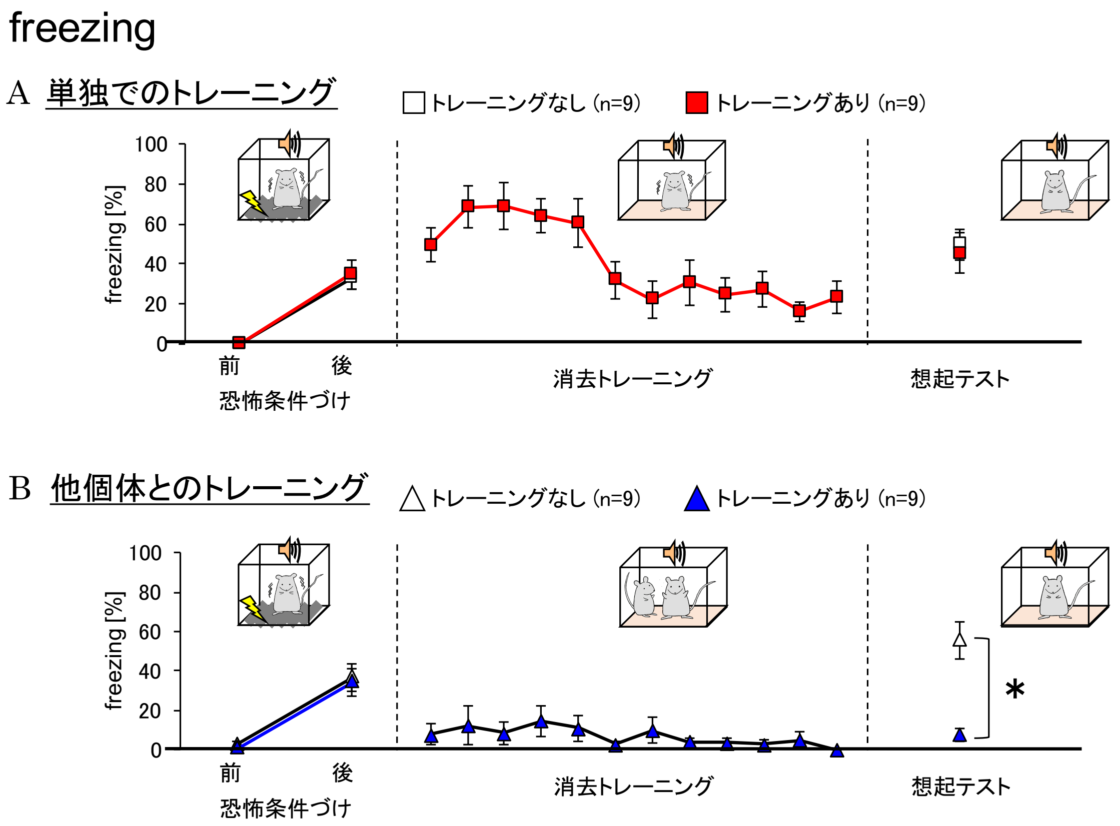
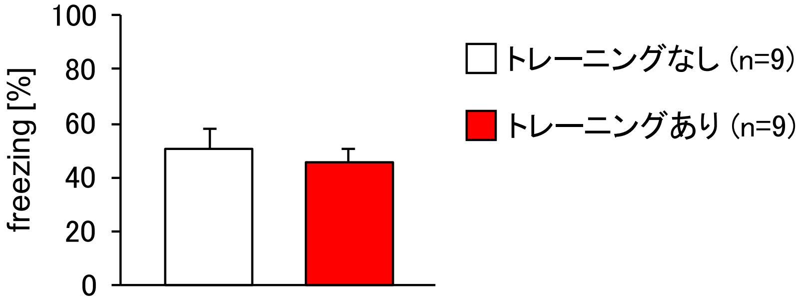


図 3-4、単独でのトレーニング(A)または他個体とのトレーニング(B)条件での恐怖条件づけ、消去トレーニング、想起テストにおける freezing の割合
1 点は 2 回の条件刺激に対する freezing の割合の平均値を示す。
(Mean ± SEM, ＊: $P < 0.05$)

想起テストにおけるfreezing

A 単独でのトレーニング



B 他個体とのトレーニング

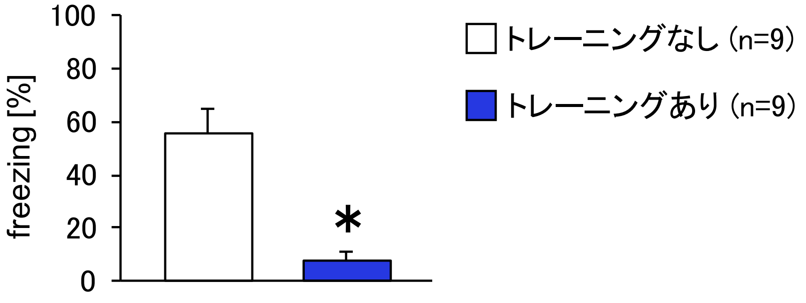
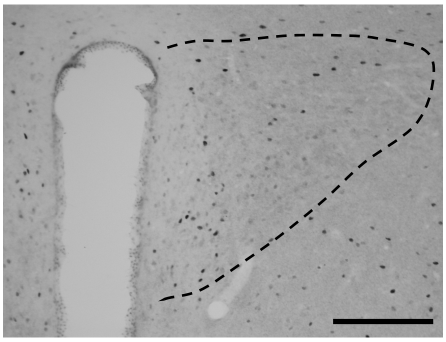


図 3-5、単独でのトレーニング(A)または他個体とのトレーニング(B)条件での想起テストにおける freezing の割合

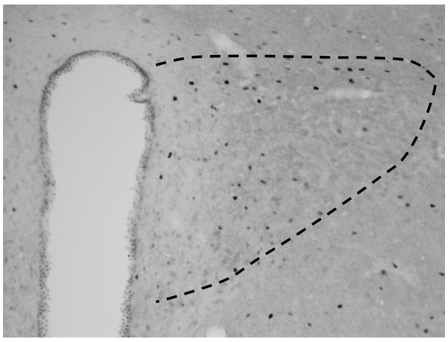
想起テストの結果(図 3-4)を棒グラフにて示した。(Mean ± SEM, ＊: P < 0.05)

PVNにおけるFos蛋白質の発現

A 単独でのトレーニング

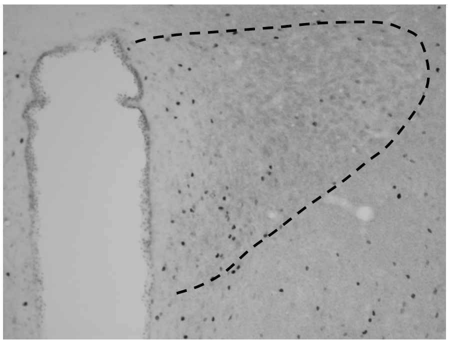


トレーニングなし

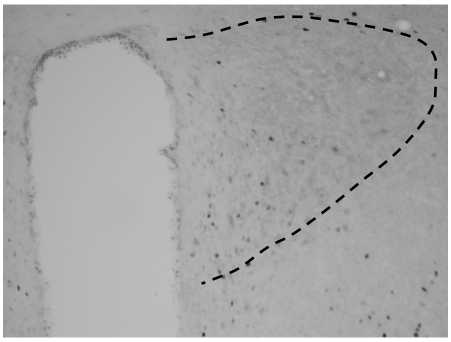


トレーニングあり

B 他個体とのトレーニング



トレーニングなし

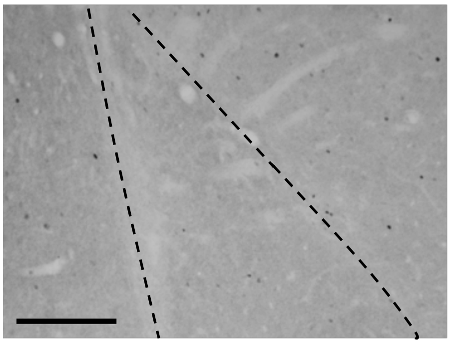


トレーニングあり

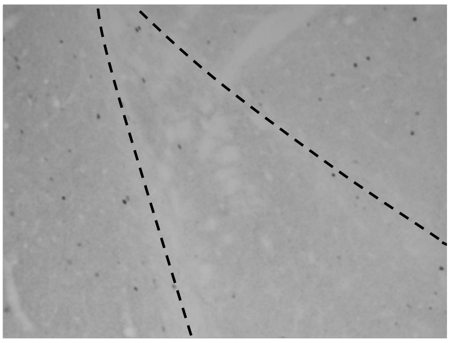
図 3-6、単独でのトレーニング(A)または他個体とのトレーニング(B)条件における想起テスト後の PVN における Fos 蛋白質の発現
点線は領域を示した。Scale bar = 200 μm

LAにおけるFos蛋白質の発現

A 単独でのトレーニング

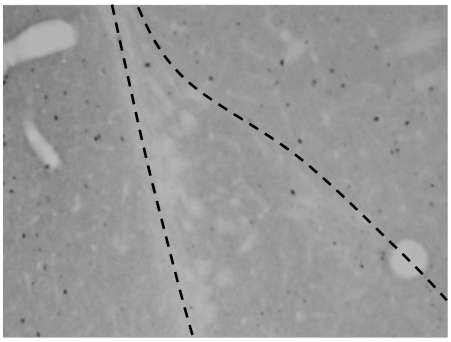


トレーニングなし

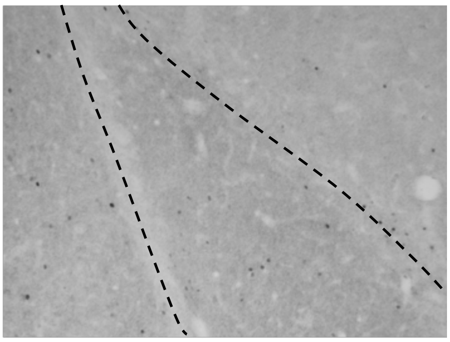


トレーニングあり

B 他個体とのトレーニング



トレーニングなし



トレーニングあり

図 3-7、単独でのトレーニング(A)または他個体とのトレーニング(B)条件における想起テスト後の LA における Fos 蛋白質の発現
点線は領域を示した。Scale bar = 200 µm

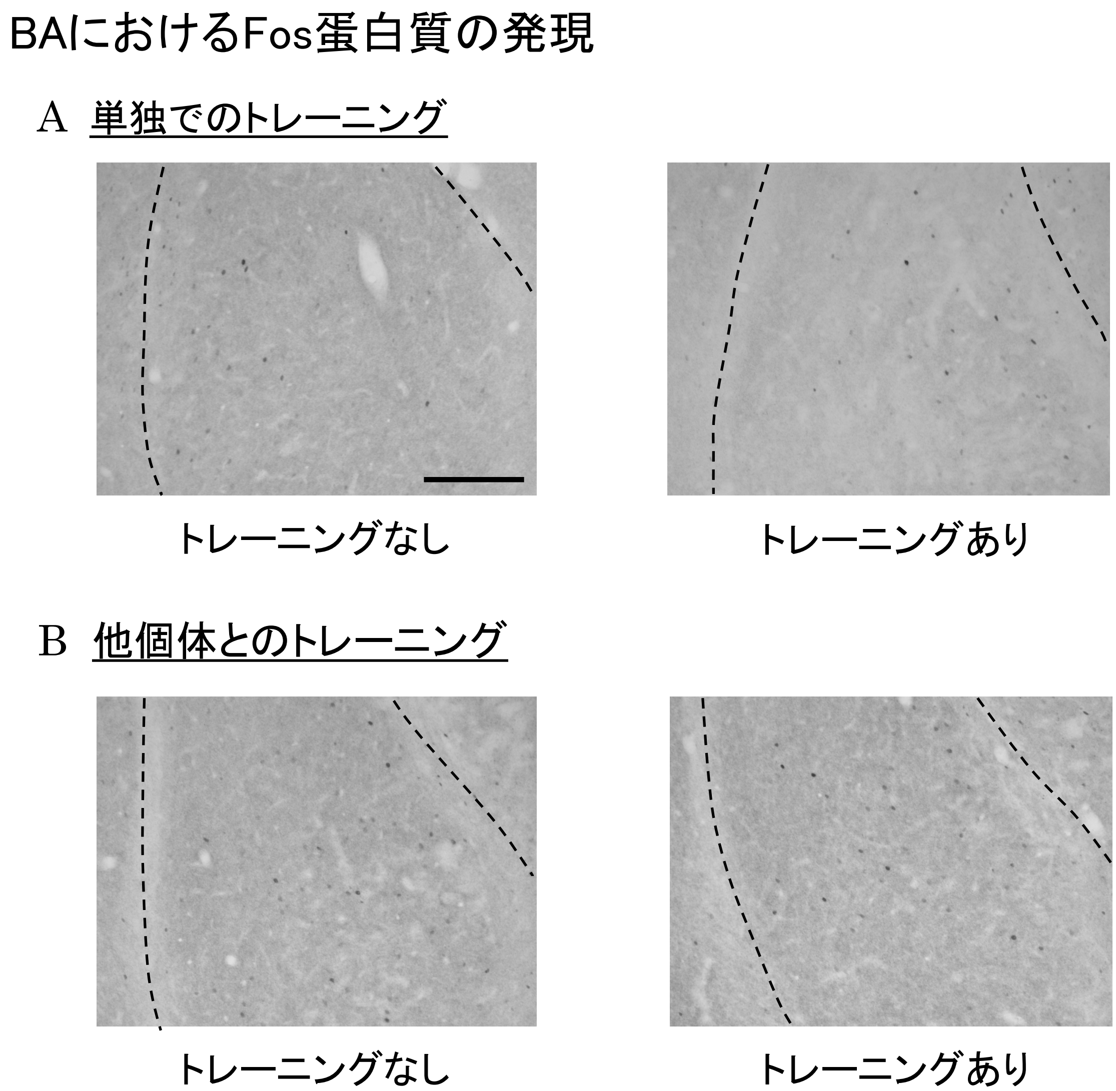
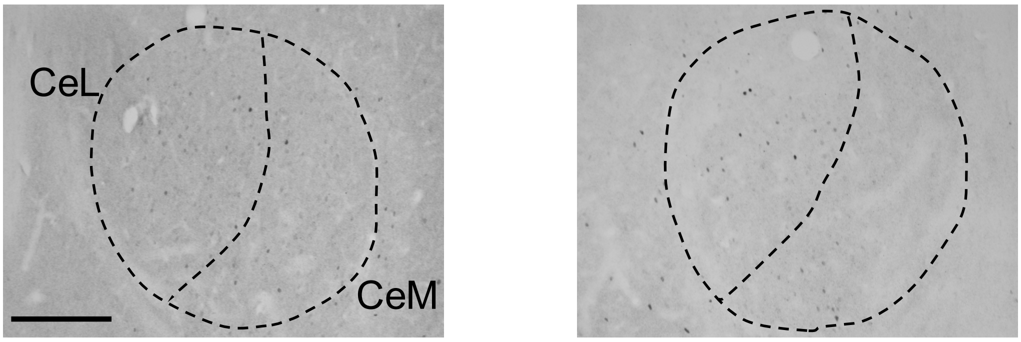


図 3-8、単独でのトレーニング(A)または他個体とのトレーニング(B)条件における想起テスト後の BA における Fos 蛋白質の発現
点線は領域を示した。Scale bar = 200 µm

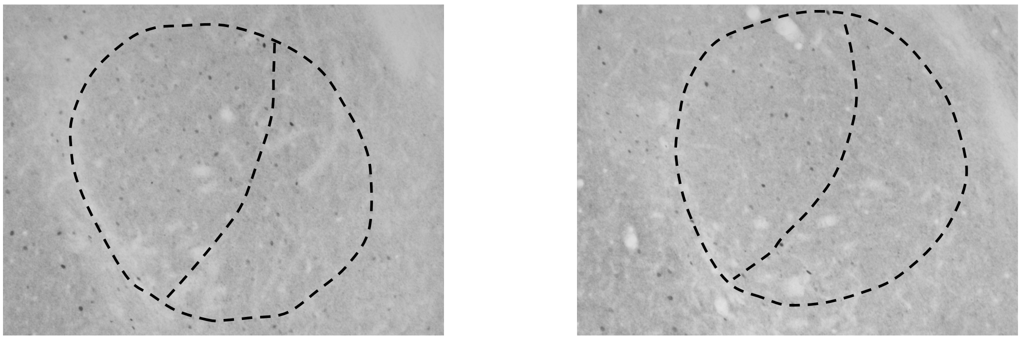
CeLおよびCeMにおけるFos蛋白質の発現

A 単独でのトレーニング



トレーニングなし　　トレーニングあり

B 他個体とのトレーニング



トレーニングなし　　トレーニングあり

図 3-9、単独でのトレーニング(A)または他個体とのトレーニング(B)条件における想起テスト後の CeL、CeM における Fos 蛋白質の発現
点線は領域を示した。Scale bar = 200 μm

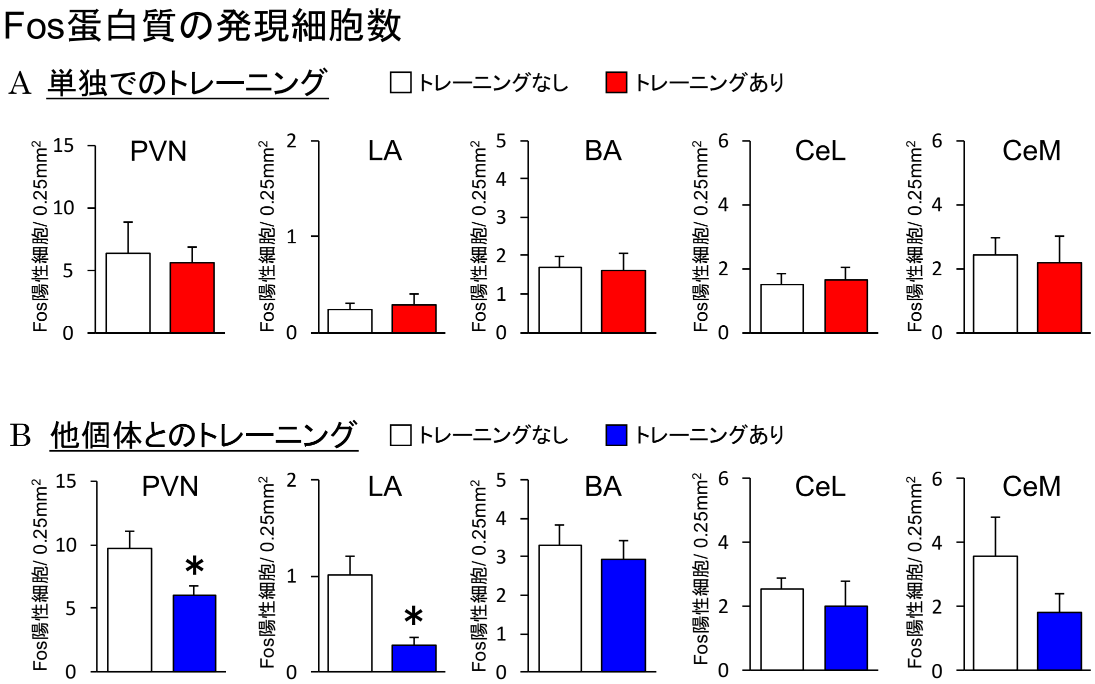
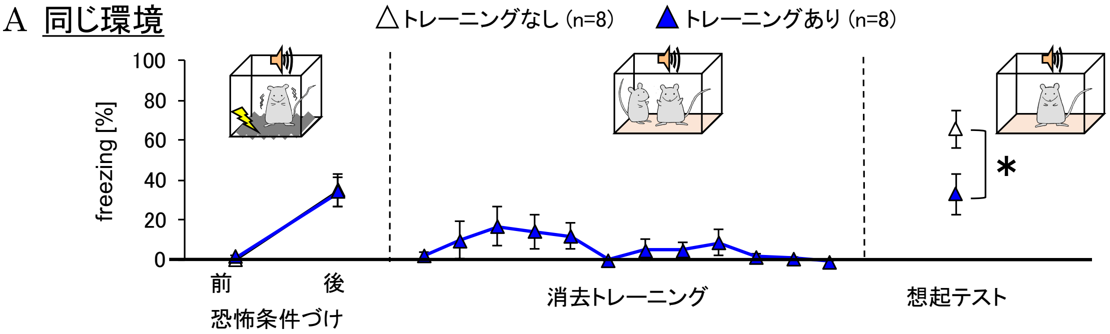


図 3-10、単独でのトレーニング(A)または他個体とのトレーニング(B)条件の想起テスト後の PVN、LA、BA、CeL、CeM における Fos 蛋白質の発現細胞数（Mean ± SEM, ＊: $P < 0.05$）

freezing



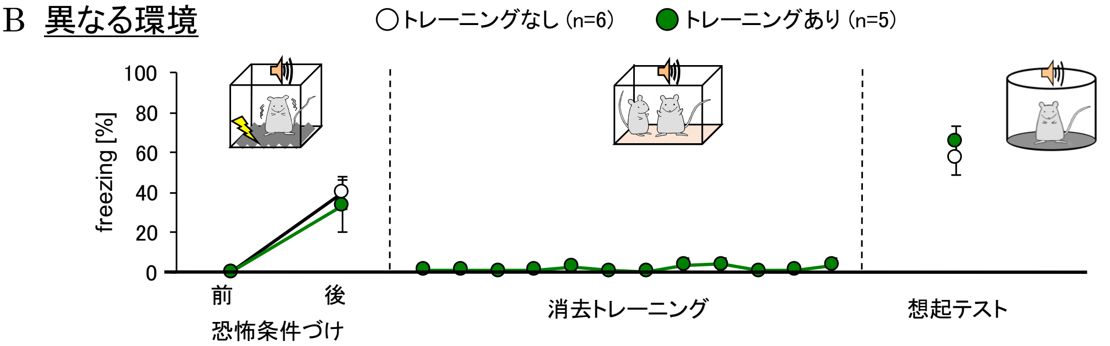
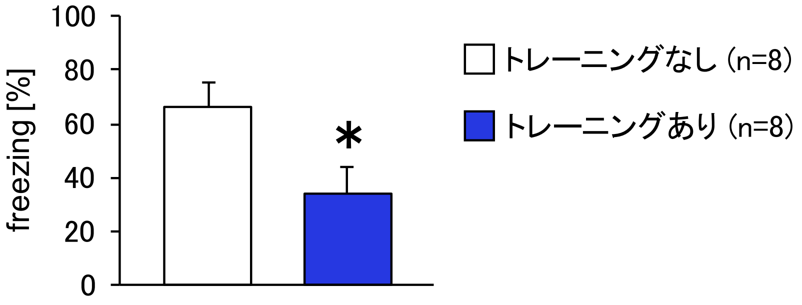


図 3-11、他個体とのトレーニング条件において、消去トレーニングと
同じ環境(A)または異なる環境(B)で想起テストを行った時の
恐怖条件づけ、消去トレーニング、想起テストにおける freezing の割合
1 点は 2 回の条件刺激に対する freezing の割合の平均値を示す。
(Mean ± SEM, ＊: $P < 0.05$)

想起テストにおけるfreezing

A 同じ環境



B 異なる環境

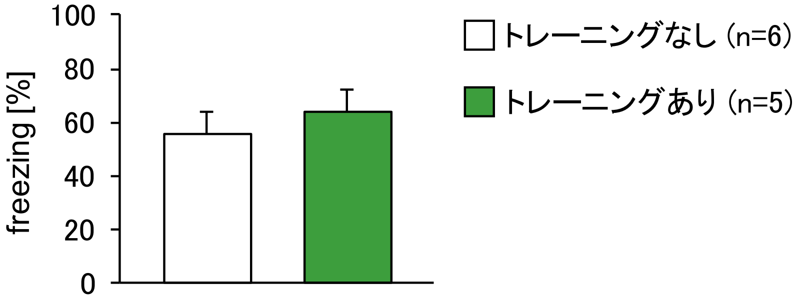


図 3-12、他個体とのトレーニング条件において、消去トレーニングと同じ環境(A)または異なる環境(B)での想起テストにおける freezing の割合想起テストの結果(図 3-11)を棒グラフにて示した。(Mean ± SEM, ＊: $P < 0.05$)

第 4 章

社会的緩衝作用の消去促進機構におけるコルチコステロンの役割

本章の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。
5 年以内に出版予定。

第 5 章

総合考察

本章の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。
5 年以内に出版予定。

要　旨

生物は環境変化や外敵などから身を守り生き残るために、ストレスに対する適応機構を発達させてきた。個体間でのコミュニケーションも重要な戦略の一つであると考えられる。例えば、ヒツジやモルモットなどの群れを形成するような動物種では、同種他個体が近傍に存在することでストレス反応が緩和される社会的緩衝作用という現象が存在する。社会的緩衝作用は新奇環境や捕食者臭といった刺激に対するストレス反応だけでなく、学習の結果として引き起こされるストレス反応、例えば恐怖条件づけモデルにおける条件刺激に対するストレス反応も緩和することが明らかとなっている。獣医動物行動学研究室におけるラットを用いた研究により、同種他個体の存在が被験動物における様々な脳領域に影響を与え、扁桃体の活性化を阻害することで、条件刺激に対するすくみ行動 (freezing)を始めとしたストレス反応を緩和することが明らかにされてきた。しかし社会的緩衝作用が脳内に与える影響は、同種他個体が近傍に存在する時にだけ観察される一時的なものなのか、同種他個体が存在しなくなった後も持続するものなのかは検討されてこなかった。そこで、条件刺激の提示回数を多くして、より神経核を活性化させることで持続的な影響を観察することが可能になるのではないかと考えた。このように条件刺激の提示回数を増加させ、その後に効果を確認する実験系は一般的に「消去」と呼ばれる。そこで本研究では、雄のラットを用いて、まず持続的な影響を検討するための基盤となる「消去」の研究で用いられる実験系を確立し、社会的緩衝作用が脳内に持続的な影響をもたらすことを明らかにした上で、この影響に関与する要因を解明することを目的とした。

本論文は5章から構成され、第1章の総合緒言で本研究の背景と目的を論じた後、第 2 章から第 4 章において本研究で実施した実験について記述し、第 5 章において本研究で得られた成果をもとに総合的な考察を行った。

第2章では、本研究の基盤となる実験系の確立を目指した。当研究室における社会的緩衝作用の研究では 3 秒の聴覚性条件刺激が用いられてきた一方で、過去の文献における消去の研究には 20 秒の聴覚性条件刺激が用いられていた。そこで、本研究を遂行するにあたってどちらの条件刺激を用いることが適切であるかについて検討した。まず、被験動物に20秒または3秒の条件刺激と電気ショックを同時に提示することで恐怖条件づけを行い、その翌日に条件刺激のみを繰り返し提示する消去トレーニングを実施した。続いて翌々日に再度条件刺激を提示する想起テストを行い、その間に被験動物が示す freezing の割合を観察することで、恐怖反応の消去を評価した。対照群としては消去トレーニングを行わない群を作製した。20秒の条件刺激を用いた場合に、消去トレーニングを経験した群では対照群と比較して freezing の割合が減少していたことから、本実験で行った消去トレーニングによって freezing が抑制されることが明らかとなった。一方で 3 秒の条件刺激を用いた場合には、消去トレーニングを経験した被験動物が示す freezing の割合は対照群と同程度であったことから、本実験で行った消去トレーニングでは freezing は抑制されないことが明らかとなった。本章の結果より、社会的緩衝作用の影響を評価するには消去トレーニングによって恐怖反応が十分に消去されない 3 秒の条件刺激を用いた実験系が適すると考えられた。

第 3 章では、社会的緩衝作用がもたらす影響が持続するかどうかについて検討した。3 秒の条件刺激を用いて恐怖条件づけを施した被験動物を準備し、翌日に行う消去トレーニングを単独で経験する群と、同種他個体と一緒にトレーニングを経験することでトレーニング中に社会的緩衝作用を受ける群を作製した。対照群としては消去トレーニングを行わない群を作製した。これらの被験動物に対し消去トレーニングの翌日に想起テストを行ったところ、被験動物単独で消去トレーニングを経験した群では、消去トレーニングは freezing の割合や、視床下部室傍核（PVN)や扁桃体外側核（LA)における Fos 蛋白質の発現に影響を与えなかった。一方で、消去トレーニング中に社会的緩衝作用を受けた群では、消去トレーニングにより freezing の割合が減少するとともに、PVN および LA における Fos 蛋白質の発現が減少することが明らかとなった。またこの効果は、消去トレーニングが行われた環境特異的に引き起こされることも確認された。これらことから、社会的緩衝作用はストレス反応の消去を促進することが示唆された。すなわち、条件刺激に対する LA 活性化の抑制といった、消去トレーニングによって生じる脳内変化が社会的緩衝作用により促進され、それが想起テストまで残存していることが推察された。本章の結果より、社会的緩衝作用が脳に持続的な影響をもたらすことが示された。

第 4 章では、社会的緩衝作用による消去の促進機構へのコルチコステロンの関与について検討した。社会的緩衝作用では視床下部–下垂体–副腎皮質（HPA）軸が抑制されることから、消去の促進には消去トレーニング時の HPA 軸の抑制、すなわちコルチコステロンの低下が関与していることが疑われた。一方で、先

行研究より HPA 軸の活性化が消去を阻害することが示唆されているものの、消去におけるコルチコステロンの役割は未だ不明瞭であった。そこで本章では消去トレーニング時のコルチコステロン濃度の影響を検証することとした。消去トレーニング後の血液中コルチコステロン濃度の推移を検討するために、消去トレーニング終了から 0、10、15 分後に被験動物の尾静脈から採血を行った。その結果、消去トレーニング終了直後において被験動物単独で消去トレーニングを実施した群よりも他個体と消去トレーニングを実施した群の方が、血液中コルチコステロン濃度が低いことが明らかとなった。社会的緩衝作用を受けている最中のコルチコステロン濃度が抑制されているという先行研究結果を考え合わせると、消去トレーニング時の持続的なコルチコステロンの低下が消去の促進に関与していることが示唆された。

第 5 章では、総合考察を行った。本研究より、3 秒の条件刺激を用いた実験系が本研究に適していること、社会的緩衝作用が脳に与える影響は他個体が存在しなくなっても持続し、消去を促進すること、この消去の促進にはコルチコステロンの関与が示唆されることが明らかとなった。

本研究結果より、社会的緩衝作用は脳に持続的な影響をもたらすことで、条件刺激に対するストレス反応の消去を促進することが示唆された。このような効果は学習に依らない刺激に対するストレス反応に対しても現れ、馴化を促進することが考えられる。また本研究でモデルとして用いた社会的緩衝作用のみならず、例えば母性行動や性行動、攻撃行動といった他の社会的な刺激も脳に持続的な影響をもたらすことが、多くの動物種において知られている。本研究

結果と考え合わせると、同種他個体による社会的な刺激は脳に影響を与えやすいものであることが推察された。

危険に対して素早くストレス反応を生じることは生存戦略として重要なことであるものの、もはや危険ではなくなった刺激に対して余分なストレス反応を長期に生じることは逆に不利益となるであろうと考えられる。仲間が存在することで過剰な長期的ストレス反応から解放されることは、ストレスに対する重要な適応機構であると考えられる。今後、本研究成果を発展させ、仲間という社会的な刺激が脳に影響を与えるメカニズムをより詳細に解析していくことで、例えば心的外傷ストレス障害やうつ病といった過剰なストレス反応に起因する人間の疾患に対して、社会的な刺激を取り入れるような新たな予防法や治療法の開発への応用が期待される。

参考文献

Akirav, I. & Maroun, M. (2007) The role of the medial prefrontal cortex-amygdala circuit in stress effects on the extinction of fear. *Neural Plast*, **2007**, 30873.

Amano, T., Duvarci, S., Popa, D. & Paré, D. (2011) The fear circuit revisited: contributions of the basal amygdala nuclei to conditioned fear. *J Neurosci*, **31**, 15481-15489.

Amano, T., Unal, C.T. & Paré, D. (2010) Synaptic correlates of fear extinction in the amygdala. *Nat Neurosci*, **13**, 489-494.

Atsak, P., Guenzel, F.M., Kantar-Gok, D., Zalachoras, I., Yargicoglu, P., Meijer, O.C., Quirarte, G.L., Wolf, O.T., Schwabe, L. & Roozendaal, B. (2016) Glucocorticoids mediate stress-induced impairment of retrieval of stimulus-response memory. *Psychoneuroendocrinology*, **67**, 207-215.

Axelrod, J. & Reisine, T.D. (1984) Stress hormones: their interaction and regulation. *Science*, **224**, 452-459.

Barrett, D. & Gonzalez-Lima, F. (2004) Behavioral effects of metyrapone on Pavlovian extinction. *Neurosci Lett*, **371**, 91-96.

Baum, M. (1969) Extinction of an avoidance response motivated by intense fear: social facilitation of the action of response prevention (flooding) in rats. *Behav Res Ther*, **7**, 57-62.

Boissy, A. & Le Neindre, P. (1997) Behavioral, cardiac and cortisol responses to brief peer separation and reunion in cattle. *Physiol Behav*, **61**, 693-699.

Bouton, M.E. (2004) Context and behavioral processes in extinction. *Learn Mem*, **11**, 485-494.

Bowen, M.T., Keats, K., Kendig, M.D., Cakic, V., Callaghan, P.D. & McGregor, I.S. (2012) Aggregation in quads but not pairs of rats exposed to cat odor or bright light. *Behav Processes*, **90**, 331-336.

Bowen, M.T., Kevin, R.C., May, M., Staples, L.G., Hunt, G.E. & McGregor, I.S. (2013) Defensive aggregation (huddling) in Rattus norvegicus toward predator odor: individual differences, social buffering effects and neural correlates. *PLoS One*, **8**, e68483.

Brooks, D.C. & Bouton, M.E. (1993) A retrieval cue for extinction attenuates spontaneous recovery. *J Exp Psychol Anim Behav Process*, **19**, 77-89.

Brudzynski, S.M., Bihari, F., Ociepa, D. & Fu, X.W. (1993) Analysis of 22 kHz ultrasonic vocalization in laboratory rats: long and short calls. *Physiol Behav*, **54**, 215-221.

Bryan Jones, R. & Merry, B.J. (1988) Individual or paired exposure of domestic chicks to an open field: Some behavioural and adrenocortical consequences. *Behav Processes*, **16**, 75-86.

Buwalda, B., Felszeghy, K., Horváth, K.M., Nyakas, C., de Boer, S.F., Bohus, B. & Koolhaas, J.M. (2001) Temporal and spatial dynamics of corticosteroid receptor down-regulation in rat brain following social defeat. *Physiol Behav*, **72**, 349-354.

Cannon, W. (1914) The interrelations of emotions as suggested by recent physiological researches. *Am J Psychol*, **25**, 256-282.

Coover, G.D., Sutton, B.R., Welle, S.L. & Hart, R.P. (1978) Corticosterone responses, hurdle-jump acquisition, and the effects of dexamethasone using classical conditioning of fear. *Horm Behav*, **11**, 279-294.

Corcoran, K.A., Desmond, T.J., Frey, K.A. & Maren, S. (2005) Hippocampal inactivation disrupts the acquisition and contextual encoding of fear extinction. *J Neurosci*, **25**, 8978-8987.

Corcoran, K.A. & Maren, S. (2001) Hippocampal inactivation disrupts contextual retrieval of fear memory after extinction. *J Neurosci*, **21**, 1720-1726.

de Quervain, D.J., Roozendaal, B. & McGaugh, J.L. (1998) Stress and glucocorticoids impair retrieval of long-term spatial memory. *Nature*, **394**, 787-790.

Do-Monte, F.H., Manzano-Nieves, G., Quiñones-Laracuente, K., Ramos-Medina, L. & Quirk, G.J. (2015) Revisiting the role of infralimbic cortex in fear extinction with optogenetics. *J Neurosci*, **35**, 3607-3615.

Droste, S.K., de Groote, L., Atkinson, H.C., Lightman, S.L., Reul, J.M. & Linthorst, A.C. (2008) Corticosterone levels in the brain show a distinct ultradian rhythm but a delayed response to forced swim stress. *Endocrinology*, **149**, 3244-3253.

Duvarci, S., Popa, D. & Paré, D. (2011) Central amygdala activity during fear conditioning. *J Neurosci*, **31**, 289-294.

Ehrlich, I., Humeau, Y., Grenier, F., Ciocchi, S., Herry, C. & Lüthi, A. (2009) Amygdala inhibitory circuits and the control of fear memory. *Neuron*, **62**, 757-771.

Emmelkamp, P.M., Krijn, M., Hulsbosch, A.M., de Vries, S., Schuemie, M.J. & van der Mast, C.A. (2002) Virtual reality treatment versus exposure in vivo: a comparative evaluation in acrophobia. *Behav Res Ther*, **40**, 509-516.

Endres, T., Widmann, K. & Fendt, M. (2007) Are rats predisposed to learn 22 kHz calls as danger-predicting signals? *Behav Brain Res*, **185**, 69-75.

Feng, X., Wang, L., Yang, S., Qin, D., Wang, J., Li, C., Lv, L., Ma, Y. & Hu, X. (2011) Maternal separation produces lasting changes in cortisol and behavior in rhesus monkeys. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **108**, 14312-14317.

Ferland, C.L. & Schrader, L.A. (2011) Cage mate separation in pair-housed male rats evokes an acute stress corticosterone response. *Neurosci Lett*, **489**, 154-158.

File, S.E. & Peet, L.A. (1980) The sensitivity of the rat corticosterone response to environmental manipulations and to chronic chlordiazepoxide treatment. *Physiol Behav*, **25**, 753-758.

Fitzgerald, P.J., Giustino, T.F., Seemann, J.R. & Maren, S. (2015) Noradrenergic blockade stabilizes prefrontal activity and enables fear extinction under stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **112**, E3729-3737.

Foa, E.B. (2006) Psychosocial therapy for posttraumatic stress disorder. *J Clin Psychiatry*, **67 Suppl 2**, 40-45.

Francis, D., Diorio, J., Liu, D. & Meaney, M.J. (1999) Nongenomic transmission across generations of maternal behavior and stress responses in the rat. *Science*, **286**, 1155-1158.

Furlong, T.M., Richardson, R. & McNally, G.P. (2016) Habituation and extinction of fear recruit overlapping forebrain structures. *Neurobiol Learn Mem*, **128**, 7-16.

Fuxe, K., Wikström, A.C., Okret, S., Agnati, L.F., Härfstrand, A., Yu, Z.Y., Granholm, L., Zoli, M., Vale, W. & Gustafsson, J.A. (1985) Mapping of glucocorticoid receptor immunoreactive neurons in the rat tel- and diencephalon using a monoclonal antibody against rat liver glucocorticoid receptor. *Endocrinology*, **117**, 1803-1812.

Fuzzo, F., Matsumoto, J., Kiyokawa, Y., Takeuchi, Y., Ono, T. & Nishijo, H. (2015) Social buffering suppresses fear-associated activation of the lateral amygdala in male rats: behavioral and neurophysiological evidence. *Front Neurosci*, **9**, 99.

Galvão-Coelho, N.L., Silva, H.P. & De Sousa, M.B. (2012) The influence of sex and relatedness on stress response in common marmosets (Callithrix jacchus). *Am J Primatol*, **74**, 819-827.

Gómez, F., De Kloet, E.R. & Armario, A. (1998) Glucocorticoid negative feedback on the HPA axis in five inbred rat strains. *Am J Physiol*, **274**, R420-427.

Hall, J.C. (1955) Some conditions of anxiety extinction. *J Abnorm Psychol*, **51**, 126-132.

Hennessy, M.B., Zate, R. & Maken, D.S. (2008) Social buffering of the cortisol response of adult female guinea pigs. *Physiol Behav*, **93**, 883-888.

Herry, C., Ciocchi, S., Senn, V., Demmou, L., Müller, C. & Lüthi, A. (2008) Switching on and off fear by distinct neuronal circuits. *Nature*, **454**, 600-606.

Hobin, J.A., Goosens, K.A. & Maren, S. (2003) Context-dependent neuronal activity in the lateral amygdala represents fear memories after extinction. *J Neurosci*, **23**, 8410-8416.

Hofer, M.A. & Shair, H. (1978) Ultrasonic vocalization during social interaction and isolation in 2-weeek-old rats. *Dev Psychobiol*, **11**, 495-504.

Holt, W. & Maren, S. (1999) Muscimol inactivation of the dorsal hippocampus impairs contextual retrieval of fear memory. *J Neurosci*, **19**, 9054-9062.

Ishii, A., Kiyokawa, Y., Takeuchi, Y. & Mori, Y. (2016) Social buffering ameliorates conditioned fear responses in female rats. *Horm Behav*, **81**, 53-58.

Kanitz, E., Hameister, T., Tuchscherer, M., Tuchscherer, A. & Puppe, B. (2014) Social support attenuates the adverse consequences of social deprivation stress in domestic piglets. *Horm Behav*, **65**, 203-210.

Kendig, M.D., Bowen, M.T., Kemp, A.H. & McGregor, I.S. (2011) Predatory threat induces huddling in adolescent rats and residual changes in early adulthood suggestive of increased resilience. *Behav Brain Res*, **225**, 405-414.

Kiyokawa, Y., Hiroshima, S., Takeuchi, Y. & Mori, Y. (2014a) Social buffering reduces male rats' behavioral and corticosterone responses to a conditioned stimulus. *Horm Behav*, **65**, 114-118.

Kiyokawa, Y., Honda, A., Takeuchi, Y. & Mori, Y. (2014b) A familiar conspecific is more effective than an unfamiliar conspecific for social buffering of conditioned fear responses in male rats. *Behav Brain Res*, **267**, 189-193.

Kiyokawa, Y., Takeuchi, Y. & Mori, Y. (2007) Two types of social buffering differentially mitigate conditioned fear responses. *Eur J Neurosci*, **26**, 3606-3613.

Kiyokawa, Y., Takeuchi, Y., Nishihara, M. & Mori, Y. (2009) Main olfactory system mediates social buffering of conditioned fear responses in male rats. *Eur J Neurosci*, **29**, 777-785.

Kiyokawa, Y., Wakabayashi, Y., Takeuchi, Y. & Mori, Y. (2012) The neural pathway underlying social buffering of conditioned fear responses in male rats. *Eur J Neurosci*, **36**, 3429-3437.

Klein, B., Bautze, V., Maier, A.M., Deussing, J., Breer, H. & Strotmann, J. (2015) Activation of the mouse odorant receptor 37 subsystem coincides with a reduction of novel environment-induced activity within the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Eur J Neurosci*, **41**, 793-801.

Knapska, E. & Maren, S. (2009) Reciprocal patterns of c-Fos expression in the medial prefrontal cortex and amygdala after extinction and renewal of conditioned fear. *Learn Mem*, **16**, 486-493.

Kovács, K.J. (1998) c-Fos as a transcription factor: a stressful (re)view from a functional map. *Neurochem Int*, **33**, 287-297.

Lamprecht, R., Dracheva, S., Assoun, S. & LeDoux, J.E. (2009) Fear conditioning induces distinct patterns of gene expression in lateral amygdala. *Genes Brain Behav*, **8**, 735-743.

Landgraf, R., Wigger, A., Holsboer, F. & Neumann, I.D. (1999) Hyper-reactive hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis in rats bred for high anxiety-related behaviour. *J Neuroendocrinol*, **11**, 405-407.

LeDoux, J.E. (2000) Emotion circuits in the brain. *Annu Rev Neurosci*, **23**, 155-184.

LeDoux, J.E., Sakaguchi, A. & Reis, D.J. (1984) Subcortical efferent projections of the medial geniculate nucleus mediate emotional responses conditioned to acoustic stimuli. *J Neurosci*, **4**, 683-698.

Lee, S., Kim, S.J., Kwon, O.B., Lee, J.H. & Kim, J.H. (2013) Inhibitory networks of the amygdala for emotional memory. *Front Neural Circuits*, **7**, 129.

Likhtik, E., Popa, D., Apergis-Schoute, J., Fidacaro, G.A. & Paré, D. (2008) Amygdala intercalated neurons are required for expression of fear extinction. *Nature*, **454**, 642-645.

Liu, D., Diorio, J., Tannenbaum, B., Caldji, C., Francis, D., Freedman, A., Sharma, S., Pearson, D., Plotsky, P.M. & Meaney, M.J. (1997) Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science*, **277**, 1659-1662.

Lyons, D.M., Price, E.O. & Moberg, G.P. (1988) Social modulation of pituitary-adrenal responsiveness and individual differences in behavior of young domestic goats. *Physiol Behav*, **43**, 451-458.

Lyons, D.M., Price, E.O. & Moberg, G.P. (1993) Social grouping tendencies and separation-induced distress in juvenile sheep and goats. *Dev Psychobiol*, **26**, 251-259.

Manser, M.B. (2001) The acoustic structure of suricates' alarm calls varies with predator type and the level of response urgency. *Proc Biol Sci*, **268**, 2315-2324.

Maren, S. & Chang, C.H. (2006) Recent fear is resistant to extinction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 18020-18025.

Maren, S., Phan, K.L. & Liberzon, I. (2013) The contextual brain: implications for fear conditioning, extinction and psychopathology. *Nat Rev Neurosci*, **14**, 417-428.

Meerlo, P., De Boer, S.F., Koolhaas, J.M., Daan, S. & Van den Hoofdakker, R.H. (1996a) Changes in daily rhythms of body temperature and activity after a single social defeat in rats. *Physiol Behav*, **59**, 735-739.

Meerlo, P., Overkamp, G.J., Daan, S., Van Den Hoofdakker RH & Koolhaas, J.M. (1996b) Changes in Behaviour and Body Weight Following a Single or Double Social Defeat in Rats. *Stress*, **1**, 21-32.

Meltzer, D. & Brahlek, J.A. (1970) Conditioned suppression and conditioned enhancement with the same positive UCS: an effect of CS duration. *J Exp Anal Behav*, **13**, 67-73.

Milad, M.R. & Quirk, G.J. (2012) Fear extinction as a model for translational neuroscience: ten years of progress. *Annu Rev Psychol*, **63**, 129-151.

Milad, M.R., Rauch, S.L., Pitman, R.K. & Quirk, G.J. (2006) Fear extinction in rats: implications for human brain imaging and anxiety disorders. *Biol Psychol*, **73**, 61-71.

Milad, M.R., Vidal-Gonzalez, I. & Quirk, G.J. (2004) Electrical stimulation of medial prefrontal cortex reduces conditioned fear in a temporally specific manner. *Behav Neurosci*, **118**, 389-394.

Mohammadi, M., Bergado-Acosta, J.R. & Fendt, M. (2014) Relief learning is distinguished from safety learning by the requirement of the nucleus accumbens. *Behav Brain Res*, **272**, 40-45.

Monfils, M.H., Cowansage, K.K., Klann, E. & LeDoux, J.E. (2009) Extinction-reconsolidation boundaries: key to persistent attenuation of fear memories. *Science*, **324**, 951-955.

Mueller, D., Bravo-Rivera, C. & Quirk, G.J. (2010) Infralimbic D2 receptors are necessary for fear extinction and extinction-related tone responses. *Biol Psychiatry*, **68**, 1055-1060.

Muigg, P., Hetzenauer, A., Hauer, G., Hauschild, M., Gaburro, S., Frank, E., Landgraf, R. & Singewald, N. (2008) Impaired extinction of learned fear in rats selectively bred for high anxiety--evidence of altered neuronal processing in prefrontal-amygdala pathways. *Eur J Neurosci*, **28**, 2299-2309.

Myers, K.M., Ressler, K.J. & Davis, M. (2006) Different mechanisms of fear extinction dependent on length of time since fear acquisition. *Learn Mem*, **13**, 216-223.

Nader, K., Schafe, G.E. & Le Doux, J.E. (2000) Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature*, **406**, 722-726.

Nakamura, K., Ishii, A., Kiyokawa, Y., Takeuchi, Y. & Mori, Y. (2016) The strain of an accompanying conspecific affects the efficacy of social buffering in male rats. *Horm Behav*, **82**, 72-77.

Norcross, J.L. & Newman, J.D. (1999) Effects of separation and novelty on distress vocalizations and cortisol in the common marmoset (Callithrix jacchus). *Am J Primatol*, **47**, 209-222.

Papadimitriou, A. & Priftis, K.N. (2009) Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Neuroimmunomodulation*, **16**, 265-271.

Pare, D. & Duvarci, S. (2012) Amygdala microcircuits mediating fear expression and extinction. *Curr Opin Neurobiol*, **22**, 717-723.

Paré, D., Quirk, G.J. & Ledoux, J.E. (2004) New vistas on amygdala networks in conditioned fear. *J Neurophysiol*, **92**, 1-9.

Peters, J., Kalivas, P.W. & Quirk, G.J. (2009) Extinction circuits for fear and addiction overlap in prefrontal cortex. *Learn Mem*, **16**, 279-288.

Pilz, P.K., Arnold, S.W., Rischawy, A.T. & Plappert, C.F. (2014) Longterm-habituation of the startle response in mice is stimulus modality, but not context specific. *Front Integr Neurosci*, **7**, 103.

Quirk, G.J. (2002) Memory for extinction of conditioned fear is long-lasting and persists following spontaneous recovery. *Learn Mem*, **9**, 402-407.

Quirk, G.J., Paré, D., Richardson, R., Herry, C., Monfils, M.H., Schiller, D. & Vicentic, A. (2010) Erasing fear memories with extinction training. *J Neurosci*, **30**, 14993-14997.

Rankin, C.H., Abrams, T., Barry, R.J., Bhatnagar, S., Clayton, D.F., Colombo, J., Coppola, G., Geyer, M.A., Glanzman, D.L., Marsland, S., McSweeney, F.K., Wilson, D.A., Wu, C.F. & Thompson, R.F. (2009) Habituation revisited: an updated and revised description of the behavioral characteristics of habituation. *Neurobiol Learn Mem*, **92**, 135-138.

Rescorla, R.A. & Heth, C.D. (1975) Reinstatement of fear to an extinguished conditioned stimulus. *J Exp Psychol Anim Behav Process*, **1**, 88-96.

Rogan, M.T., Leon, K.S., Perez, D.L. & Kandel, E.R. (2005) Distinct neural signatures for safety and danger in the amygdala and striatum of the mouse. *Neuron*, **46**, 309-320.

Roozendaal, B., McEwen, B.S. & Chattarji, S. (2009) Stress, memory and the amygdala. *Nat Rev Neurosci*, **10**, 423-433.

Selye, H. (1936) A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature*, **138**, 32-32.

Selye, H. (1970) The evolution of the stress concept. Stress and cardiovascular disease. *Am J Cardiol*, **26**, 289-299.

Shair, H.N., Muller, J.M. & Moore, H. (2009) Dopamine's role in social modulation of infant isolation-induced vocalization: I. Reunion responses to the dam, but not littermates, are dopamine dependent. *Dev Psychobiol*, **51**, 131-146.

Shipley, R.H. (1974) Extinction of conditioned fear in rats as a function of several parameters of CS exposure. *J Comp Physiol Psychol*, **87**, 699-707.

Sierra-Mercado, D., Padilla-Coreano, N. & Quirk, G.J. (2011) Dissociable roles of prelimbic and infralimbic cortices, ventral hippocampus, and basolateral amygdala in the expression and extinction of conditioned fear. *Neuropsychopharmacology*, **36**, 529-538.

Sotres-Bayon, F., Cain, C.K. & LeDoux, J.E. (2006) Brain mechanisms of fear extinction: historical perspectives on the contribution of prefrontal cortex. *Biol Psychiatry*, **60**, 329-336.

Sullivan, G.M., Apergis, J., Bush, D.E., Johnson, L.R., Hou, M. & Ledoux, J.E. (2004) Lesions in the bed nucleus of the stria terminalis disrupt corticosterone and freezing responses elicited by a contextual but not by a specific cue-conditioned fear stimulus. *Neuroscience*, **128**, 7-14.

Takahashi, L.K., Nakashima, B.R., Hong, H. & Watanabe, K. (2005) The smell of danger: a behavioral and neural analysis of predator odor-induced fear. *Neurosci Biobehav Rev*, **29**, 1157-1167.

Takahashi, Y., Kiyokawa, Y., Kodama, Y., Arata, S., Takeuchi, Y. & Mori, Y. (2013) Olfactory signals mediate social buffering of conditioned fear responses in male rats. *Behav Brain Res*, **240**, 46-51.

Terranova, M.L., Cirulli, F. & Laviola, G. (1999) Behavioral and hormonal effects of partner familiarity in periadolescent rat pairs upon novelty exposure. *Psychoneuroendocrinology*, **24**, 639-656.

Tornatzky, W. & Miczek, K.A. (1993) Long-term impairment of autonomic circadian rhythms after brief intermittent social stress. *Physiol Behav*, **53**, 983-993.

van Kerkhof, L.W., Trezza, V., Mulder, T., Gao, P., Voorn, P. & Vanderschuren, L.J. (2014) Cellular activation in limbic brain systems during social play behaviour in rats. *Brain Struct Funct*, **219**, 1181-1211.

Vanderschuren, L.J., Achterberg, E.J. & Trezza, V. (2016) The neurobiology of social play and its rewarding value in rats. *Neurosci Biobehav Rev*, **70**, 86-105.

VanElzakker, M.B., Dahlgren, M.K., Davis, F.C., Dubois, S. & Shin, L.M. (2014) From Pavlov to PTSD: the extinction of conditioned fear in rodents, humans, and anxiety disorders. *Neurobiol Learn Mem*, **113**, 3-18.

Vogt, J.L., Coe, C.L. & Levine, S. (1981) Behavioral and adrenocorticoid responsiveness of squirrel monkeys to a live snake: is flight necessarily stressful? *Behav Neural Biol*, **32**, 391-405.

Waddell, J., Morris, R.W. & Bouton, M.E. (2006) Effects of bed nucleus of the stria terminalis lesions on conditioned anxiety: aversive conditioning with long-duration conditional stimuli and reinstatement of extinguished fear. *Behav Neurosci*, **120**, 324-336.

Wilber, A.A., Southwood, C.J. & Wellman, C.L. (2009) Brief neonatal maternal separation alters extinction of conditioned fear and corticolimbic glucocorticoid and NMDA receptor expression in adult rats. *Dev Neurobiol*, **69**, 73-87.

Wilson, D.R. & Hare, J.F. (2004) Animal communication: ground squirrel uses ultrasonic alarms. *Nature*, **430**, 523.

Winslow, J.T., Noble, P.L., Lyons, C.K., Sterk, S.M. & Insel, T.R. (2003) Rearing effects on cerebrospinal fluid oxytocin concentration and social buffering in rhesus monkeys. *Neuropsychopharmacology*, **28**, 910-918.

Wolf, O.T. (2008) The influence of stress hormones on emotional memory: relevance for psychopathology. *Acta Psychol (Amst)*, **127**, 513-531.

Yang, Y.L., Chao, P.K. & Lu, K.T. (2006) Systemic and intra-amygdala administration of glucocorticoid agonist and antagonist modulate extinction of conditioned fear. *Neuropsychopharmacology*, **31**, 912-924.

Yang, Y.L., Chao, P.K., Ro, L.S., Wo, Y.Y. & Lu, K.T. (2007) Glutamate NMDA receptors within the amygdala participate in the modulatory effect of glucocorticoids on extinction of conditioned fear in rats. *Neuropsychopharmacology*, **32**, 1042-1051.

厚生労働省（2015）平成 26 年度版厚生労働省白書. [Online]
http://www.mhlw.go.jp/wp/hakusyo/kousei/14/dl/1-02-1.pdf
[Accessed 16 1 2017]

世界保健機関（1946）世界保健機関憲章（外務省訳）
[Online] http://www.mofa.go.jp/mofaj/files/000026609.pdf
[Accessed 16 1 2017]

謝辞

本研究の遂行および本論文の執筆にあたり、多くの方々にご指導、ご協力をいただきました。厚く御礼申し上げます。

本学獣医動物行動学研究室の森裕司教授には、本研究の遂行および学術論文の執筆にあたり、多くのご支援をいただき、暖かく見守っていただきました。深く御礼申し上げます。

同研究室の武内ゆかり准教授には、本研究の遂行、学術論文および本論文の執筆にあたり、終始ご指導をいただきました。常に励ましの言葉をかけてくださり、研究を遂行することができました。厚く御礼申し上げます。

同研究室の清川泰志助教には、本研究の計画から学術論文および本論文の執筆に至るまで様々な場面で多くのご助言をいただき、研究の姿勢を丁寧にご指導いただきました。深く御礼申し上げます。

本学獣医生理学研究室の松脇貴志助教にはホルモン投与法についてご助言いただきました。厚く御礼申し上げます。

獣医動物行動学研究室の皆様には日々多くのご助言や暖かいお言葉をいただきました。深く感謝いたします。

特に同研究室の石井晶子氏には、ホルモン濃度の測定にご協力いただくと共に、研究のみならず常に相談しあえたことで研究生活を乗りきることができました。感謝申し上げます。

また六山寛美氏や南翔太氏をはじめ、ネズミチームの皆様には研究の様々な場面でご助言や励ましの言葉をいただきました。ありがとうございました。

本研究の遂行にあたり、身を捧げてくれた多くの動物たちに深く感謝するとともに、ご冥福をお祈りいたします。

最後に研究を続けることを応援し支えてくれた父、母、弟に感謝いたします。