

情動ストレス応答における海馬シナプス可塑性と
セロトニン作動性神経系の性差に関する研究

平成 25 年度

北海道医療大学大学院薬学研究科

井上 純孝

Abstract

Gender differences in prevalence of psychiatric disorders such as depression has been known in clinical populations, however its detailed mechanisms remain unsolved. The present study elucidated the possible involvement of the median raphe nucleus (MRN)-hippocampus 5-HTergic system via 5-HT_{1A} receptors in gender difference underlying emotional regulation, focusing on the synaptic plasticity in rats. Behavioral study using elevated plus maze (EPM) and contextual fear conditioning (CFC) paradigm showed that 5-HTergic lesion in males and intact females produced low-anxiety like behavior. The extracellular 5-HT and GABA levels in the hippocampus were increased by CFC in males, but not in females. The long-term potentiation (LTP) in the hippocampal CA1 field was suppressed following CFC in males, which was mimicked by the synaptic response to electrical stimulation of the MRN. 5-HT positive cells in the MRN significantly increased in female compared with males. In addition, 5-HT contents in the hippocampus and MRN significantly increased in female compared with males. Pretreatment of 5-HT_{1A} receptor agonists, tandospirone (10 mg/kg, i.p.) and 8-OH-DPAT (3 mg/kg, i.p.) significantly suppressed LTP induction in males. Tandospirone-induced LTP suppression was reversed by pretreatment with WAY-100135. The synaptic responses to CFC and 5-HT_{1A} receptor interventions were not observed in females. Ovariectomy at 3 postnatal weeks, but not at 8 weeks old, produced an inclination to anxiety during CFC in adulthood. These results suggest that the metaplastic 5-HTergic mechanism via 5-HT_{1A} receptors in the MRN-hippocampus pathway is a key component for gender-specific emotional regulation. In addition, gonadal hormones may have critical roles for the gender difference in behavioral and synaptic responses to emotional stress. These facts may be causable for psychiatric disorders based on vulnerability or resistance to fear stress. To further clarify the 5-HTergic mechanisms underlying gender-specific emotional regulation may provide insights into better understanding the pathogenesis of psychiatric disorders and the development of novel therapeutic strategies.

略 語 集

aCSF: artificial cerebrospinal fluid

ACTH: adrenocorticotrophic hormone

ANOVA: analysis of variance

AUC: area under the curve

BDNF: brain-derived neurotrophic factor

BLA: basolateral nucleus of the amygdala

CA: cornu ammonis

CeA: central nucleus of the amygdala

CFC: contextual fear conditioning

CRH: corticotropin-releasing hormone

CS: conditioned stimulus

DA: dopamine

DRD: dorsal raphe nucleus dorsal parts

DRL: dorsal raphe nucleus lateral wings

DRN: dorsal raphe nucleus

DRV: dorsal raphe nucleus ventral parts

DSM: diagnostic and statistical manual of mental disorders

EPM: elevated plus maze

FS: footshock

FS-box: footshock-box

GABA: γ -aminobutyric acid

HPA axis: hypothalamic-pituitary-adrenal axis

HPLC-ECD: high-performance liquid chromatography with electrochemical detection

HPLC-FLD: high-performance liquid chromatography with fluorescent detection

LTP: long-term potentiation

mPFC: medial prefrontal cortex

MRN: median raphe nucleus

NA: noradrenaline

NMDA: N-methyl-D-aspartate

OVX: ovariectomy

PAG: periaqueductal gray matter

PB: phosphate buffer

PBS: phosphate buffer saline

PBST: phosphate buffer saline triton-X

PET: positron emission tomography

PSA: population spike amplitudes

PTSD: posttraumatic stress disorder

SNRI: serotonin-noradrenaline reuptake inhibitor

SSRI: selective serotonin reuptake inhibitor

Tetanus: high-frequency stimulation

US: unconditioned stimulus

5-HT: 5-hydroxytryptamine (serotonin)

5,7-DHT: 5,7-dihydroxytryptamine

8-OH-DPAT: 8-hydroxy-2-(di-*n*-propylamino)tetralin

目次

序論	1
本論	
第1章 情動ストレス応答の性差におけるセロトニン作動性神経系の関与	7
第1節 実験方法	9
第2節 実験結果	
1 行動学的検討	
1-1 高架式十字迷路 (elevated plus maze: EPM) 試験	
1-1-(1) EPM 試験における情動ストレス応答の性差	18
1-1-(2) EPM 試験における情動ストレス応答へのセロトニン作動性神経 擾乱の影響	19
1-2 文脈的恐怖条件付け (contextual fear conditioning: CFC) 試験	
1-2-(1) CFC 試験における情動ストレス応答の性差	20
1-2-(2) CFC 試験における情動ストレス応答へのセロトニン作動性神経 擾乱の影響	21
2 神経化学的検討 (脳内微小透析法)	
2-1 細胞外セロトニン濃度に対する CFC の影響と性差	22
2-2 細胞外グルタミン酸/GABA 濃度に対する CFC の影響と性差	23
3 組織学的検討	
3-1 縫線核のセロトニン陽性細胞数	25
3-2 海馬ならびに縫線核のモノアミン組織量	26
第3節 考察	27

第2章 情動ストレス応答の性差と海馬シナプス可塑性の関連性	31
第1節 実験方法	32
第2節 実験結果	35
1 電気生理学的検討	
1-1 文脈的恐怖条件付け (CFC) によるシナプス可塑性の変化と性差	35
1-2 正中縫線核刺激によるシナプス可塑性の変化と性差	36
2 薬理的検討	
2-1 タンドスピロンによるシナプス可塑性の変化と性差	37
2-2 8-OH-DPAT によるシナプス可塑性の変化と性差	39
第3節 考察	40
第3章 情動ストレス応答の性差におけるエストロゲンの関与	44
第1節 実験方法	46
第2節 実験結果	
1 文脈的恐怖条件付け試験における情動ストレス応答への卵巣摘出の影響	47
第3節 考察	48
総括	51
謝辞	56
引用文献	57

学位論文の基礎となる報文

Kimura S., Saito Y., Ohashi A., Inoue S., Matsumoto M., Togashi H., Minami M., Saito H., Parvez H., Shimamura K., Attenuation of 5-HT_{1A} regulation in medial prefrontal cortex GABA system of early postnatal-stressed rats. *Biogenic Amines*, **25**, 231-241 (2011).

Inoue S., Shikanai H., Matsumoto M., Hiraide S., Saito Y., Yanagawa Y., Yoshioka M., Shimamura K., Togashi H., Metaplastic regulation of median raphe nucleus via serotonin 5-HT_{1A} receptor on hippocampal synaptic plasticity is associated with gender-specific emotional expression in rats. *J. Pharmacol. Sci.*, in press (2014).

参考論文

Hiraide S., Saito Y., Matsumoto M., Yanagawa Y., Ishikawa S., Kubo Y., Inoue S., Yoshioka M., Togashi H., Possible modulation of the amygdala on metaplasticity deficits in the hippocampal CA1 field in early postnatally stressed rats. *J. Pharmacol. Sci.*, **119**, 64-72 (2012).

Saito Y., Matsumoto M., Yanagawa Y., Hiraide S., Inoue S., Kubo Y., Shimamura K., Togashi H., Facilitation of fear extinction by the 5-HT_{1A} receptor agonist tandospirone: possible involvement of dopaminergic modulation. *Synapse*, **67**, 161-170 (2013).

Inoue S., Kamiyama H., Matsumoto M., Yanagawa Y., Hiraide S., Saito Y., Shimamura K., Togashi H., Synaptic modulation via basolateral amygdala on the rat hippocampus-medial prefrontal cortex pathway in fear extinction. *J. Pharmacol. Sci.*, **123**, 267-278 (2013).

序 論

ストレスはうつ病や不安障害など、ある種の精神疾患に対する脆弱性の要因と考えられている。^{1,2)} その罹患率には性差が存在することが知られている。³⁻⁵⁾ 例えば、男性では外在化障害（注意欠如/多動性障害，行為障害，間欠性爆発性障害）や物質障害が多いのに対して，⁶⁻⁸⁾ 女性では不安障害や気分障害が多く，^{9,10)} 心的外傷後ストレス障害（posttraumatic stress disorder: PTSD）も男性に比べて罹患率が高いことが知られている。¹¹⁻¹³⁾ さらに，女性のうつ病の罹患率は男性の約2倍という報告がある。^{3,4)} 精神疾患の原因は身体的な背景による「身体因」と社会・心理的な要因による「心因」の2つに大別することができる。身体因はさらに，遺伝・体質的な背景による「内因」と，感染や薬物乱用，外傷などにより脳や身体に器質的な障害が生じることによる「外因」に分けられる。主な心因による障害としては不安障害が挙げられる。不安障害はアメリカ精神医学会が定めている「精神障害の診断と統計の手引き（diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM）」第5版によれば，7種類に分類されている。PTSDは第4版までは不安障害のカテゴリーに分類されていたが，第5版から独立した疾患として記載されている。また，うつ病は主に内因が関与している「内因性うつ病」とストレスなど心因が主な原因とされる「心因性うつ病」に分類されていた。しかし，多くのうつ病において原因が特定されていないことから，現在では上述したような分類の他に重症度による分類など，その分類法は多様化している。

精神疾患の病因・病態には様々な神経伝達物質が関与していると考えられているが，PTSDやうつ病などのストレス関連性精神疾患についてはセロトニン（serotonin, 5-hydroxytryptamine: 5-HT）が重要な役割を担っている。^{14,15)} 例えば，選択的5-HT再取込み阻害薬（selective serotonin reuptake inhibitor: SSRI）や5-HT-ノルアドレナリン再取込み阻害薬（serotonin-noradrenaline reuptake inhibitor: SNRI）など，5-HT再取込み機能を標的とした治療薬が多

く開発されている。また、不安・恐怖を含む情動調節には少なくとも14種存在する5-HT受容体サブタイプのうち、5-HT_{1A}受容体が関与していることが知られている。^{16,17)} 実際、タンドスピロン (セディール[®]) などの5-HT_{1A}受容体部分作動薬が抗不安薬として臨床の場で広く用いられている。しかしながら、その詳細なメカニズムは解明されていない。

ストレス起因性の精神疾患に關与する5-HT作動性神経系には性差が存在することが報告されている。例えば、ポジトロン断層法 (positron emission tomography: PET) を用いた臨床研究では、脳全体における5-HT合成能を比較すると男性の方が女性よりも52%高いという報告がある。¹⁸⁾ また、5-HTトランスポーターへの結合能は男性の方が高いのに対して、5-HT_{1A}受容体の発現は女性の方が高い。¹⁹⁾

脳の形態学的な性差も報告されており、大脳は身長の違いと関係なく、男性の方が女性より重い、表面の脳回数は女性の方が多い。また、右利きの男性では左の大脳半球がより重い、女性では左右差がない。さらに、脳梁、前交連、視床中間質など左右の大脳半球を結ぶ複数の構造は女性でより発達しており、海馬は男性の方が大きいとの報告がある。²⁰⁾

げっ歯類を用いた行動実験では、ストレスに対する応答性や5-HT_{1A}受容体の発現に性差があることが報告されている。例えば、海馬依存的な運動学習である瞬目反射条件付けを用いた実験では、回避不能な急性ストレスを受けると、条件反射である瞬目の回数が雄性ラットでは高値を示したのに対して雌性ラットでは低値を示した。²¹⁾ また、強制水泳試験を行った雄性ラットでは海馬での5-HT_{1A}受容体mRNA発現が増加したのに対して、雌性ラットでは視床下部での5-HT_{1A}受容体mRNA発現が低下した。^{22,23)} このようにストレス感受性の性差に関しては多くの報告がされているが、その結果は実験系によって異なり、性差に基づくメカニズムに関しても不明な点が多い。²⁴⁾

PTSD やうつ病などのストレス関連性精神疾患の原因となる不安や恐怖という情動ストレスは、高所に対する恐怖などの生得的なもの、恐怖体験などの記憶に基づいた後天的なものに分類できる。記憶に基づいた恐怖には

連合学習としての側面がある。動物を用いた条件付け行動試験では、音や光などの条件刺激により恐怖記憶が想起される。しかし、不安障害患者が恐怖に関連した音よりも環境に過敏であることから、周囲の環境，“文脈”が恐怖の想起に重要であると考えられている (Fig.1).

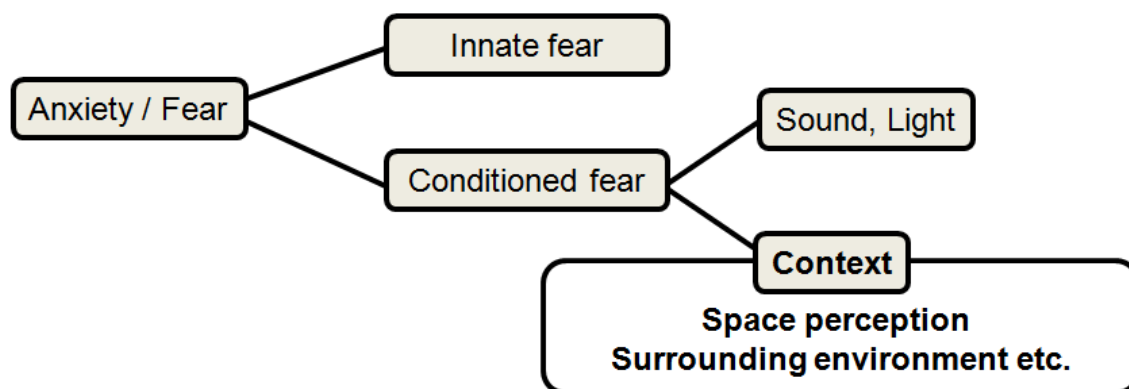


Fig.1. Anxiety and Fear

乳頭体と視床前核，帯状回，海馬体から構成されるパペッツ回路はエピソードの形成（記憶事象の順序立て）や想起に関与していると考えられている。²⁵⁾ 乳頭体は視床下部に含まれており，視床から歯状回に入る主要経路は乳頭体より投射を受ける。²⁶⁻²⁸⁾ 両側乳頭体の障害は前向き健忘症を生じるコルサコフ症候群の原因とされていることから，記憶の形成に関わっていると考えられている。視床は間脳の一部を占める部位で，感覚入力的大脑新皮質へ中継する重要な役割を担い，視床前核は乳頭体と海馬からの投射を受けている。帯状回は大脳内側面において，脳梁の辺縁を前後方向に延びる脳回であり，大脳辺縁系の各部位に連絡している。また，情動や記憶・学習に関与する。海馬体は海馬と歯状回，海馬台から構成される。このうち，海馬は空間認知や周辺環境などの文脈に依存する記憶に関わる重要な脳部位である。^{29,30)} ストレスに対する海馬のシナプス応答は，情動に関与するヤコブレフ回路を構成する扁桃体の調節を受けていることが示唆されており，³¹⁾ 情動ストレス応答の表出にとって，海馬は重要な脳部位と考えられる。

海馬はアンモン角 (cornu ammonis) と呼ばれ、大小錐体細胞からなる領域がある。小錐体細胞領域は CA1, 大錐体細胞領域は CA2~CA4 に区分される。ラットの海馬大錐体細胞領域は CA1 側から歯状回側に向けて CA2, CA3a,b,c に区分される。CA4 は霊長類やネコで顕著だが、げっ歯類ではみられない。海馬のシナプス伝達効率には海馬の機能を表す指標の一つであり、特に海馬 CA1 領域のシナプス可塑性である長期増強 (long-term potentiation: LTP) は、記憶・学習の電気生理学的基盤と考えられている。^{32,33)} 情動神経回路の一部である海馬においては、不安・恐怖などの情動ストレスにより、LTP の形成が抑制される。³⁴⁾ さらに、PTSD の病態メカニズムについては、恐怖条件付けに関連する扁桃体、内側前頭前野 (medial prefrontal cortex: mPFC) および海馬を含む皮質-辺縁系神経回路の関与が考えられている。PTSD には海馬シナプス可塑性を基盤とする恐怖記憶制御機構の変容が関わっている可能性が指摘されている。³⁵⁾ げっ歯類が文脈に基づく恐怖記憶を獲得してから、情動ストレス応答を示すまでの概要を Fig.2 に示す。

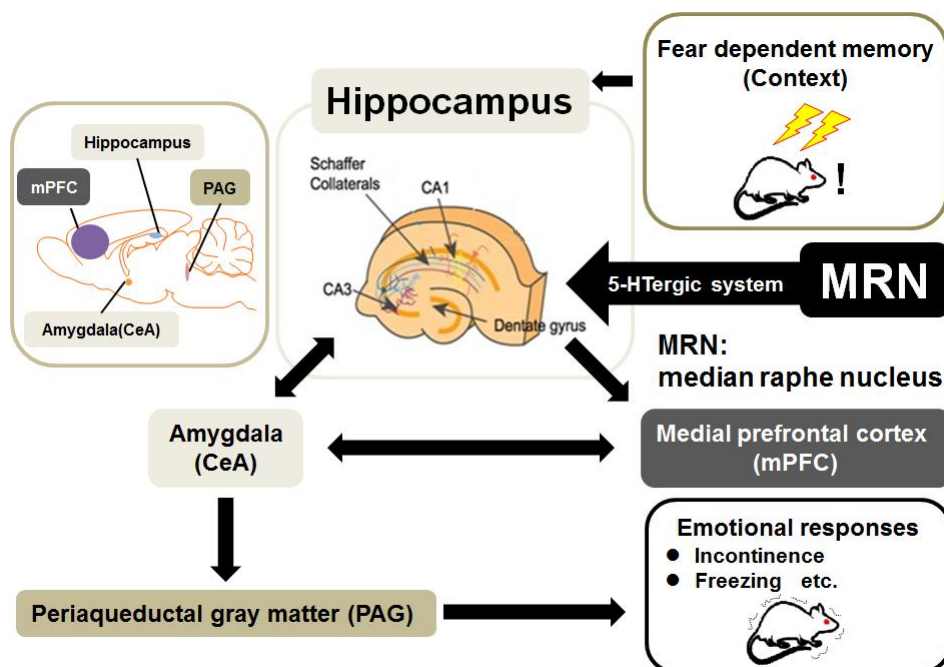


Fig.2. Emotional Responses Based on Context-dependent Fear Memory in Rodents

文脈に基づく恐怖記憶は海馬に対する入出力ゲートとして機能する嗅内皮質を通じて海馬に至る。さらに、海馬から内側前頭前野や扁桃体に伝わり、扁桃体中心角 (central nucleus of the amygdala: CeA) を経て、中脳水道周囲灰白質 (periaqueductal gray matter: PAG) に至る。そして、心拍数の上昇や失禁などの自律神経応答や、げっ歯類特有の不安や恐怖に対する情動ストレス応答であるすくみ行動 “freezing” などを引き起こす。このように文脈に依存した恐怖記憶に対する情動ストレス応答には海馬が大きな役割を果たす。

ストレスによる海馬シナプス応答は、扁桃体など他の脳部位からの入力を受けることも知られている。³⁶⁾ また、グルタミン酸作動性神経系や γ -アミノ酪酸 (γ -aminobutyric acid: GABA) 作動性神経系など、5-HT 以外の神経系の関与も知られている。³⁷⁾ しかし、上述したように、ストレスに関連する精神疾患の治療には、主に 5-HT 作動性神経系を標的とした薬物が用いられており、情動ストレス応答について明らかにするためには 5-HT 作動性神経系への着目が重要であると考えられる。

5-HT 作動性神経系の起始核である、縫線核は脳幹内に存在する諸核の総称で、吻側と尾側に大別される。吻側縫線核はさらに、皮質や扁桃体に 5-HT 作動性神経を投射している背側縫線核 (dorsal raphe nucleus: DRN) と海馬に投射している正中縫線核 (median raphe nucleus: MRN) に分けられる。正中縫線核には 5-HT_{1A} 受容体が最も高密度に存在しており、自己受容体として 5-HT の遊離・合成を抑制的に調節している。したがって、正中縫線核-海馬 5-HT 作動性神経系は、恐怖記憶に基づく情動応答やシナプス可塑性を制御していると推測される。しかし、性差という観点から正中縫線核-海馬 5-HT 作動性神経系と情動応答またはシナプス可塑性との関連性を明らかにした報告はほとんどない。

本研究では情動ストレス応答ならびに海馬シナプス可塑性の性差について正中縫線核-海馬 5-HT 作動性神経系の機能的役割に着目して実験を行った。すなわち、雌雄ラットを用いて、恐怖ストレスに対する情動行動を解析し、5-HT 作動性神経擾乱ラットの行動応答と比較検討した。また、神経化

学的ならびに組織学的に正中縫線核-海馬 5-HT 作動性神経系の性差を追究した。さらに 5-HT_{1A} 受容体に焦点を当て、海馬シナプス可塑性の性差について電気生理学および薬理的に検討した。加えて、5-HT_{1A} 受容体の機能および発現はエストロゲンの調節下にあることから、情動ストレス応答に対する卵巣摘出の影響について行動学的に検討した。

本 論

第 1 章 情動ストレス応答の性差におけるセロトニン作動性 神経系の関与

情動ストレス応答とは、生体がストレスに曝露されたときに示す生理的反応や行動などの一連の現象のことを言う。生体は恒常性維持のために、様々なストレスに対する応答機構を普遍的に有しており、ヒトとげっ歯類の間にも共通の機構が存在すると考えられている。情動ストレス応答のなかでも、不安・恐怖に対する応答機構は生命維持のために備わった重要な生得的能力(本能)であり、生体は様々な応答を示す。

動物実験において、不安や恐怖に対する情動ストレス応答を行動学的に評価する手法としてはいくつかの行動バッテリーが用いられている。例えば、生得的な不安の評価法として、オープンフィールド試験や高架式十字迷路(elevated plus maze: EPM) 試験がある。また、記憶に基づく不安の評価法として、文脈的恐怖条件付け(contextual fear conditioning: CFC) 試験が広く用いられている。

そこで、はじめに情動ストレス応答の性差について、EPM 試験および CFC 試験を用いて行動学的検討を行った。EPM 試験とは、高所に設置した壁のあるエンクローズドアームと壁のないオープンアームからなる十字迷路にラットを置き、その行動を評価する方法である。通常、ラットは高所の解放空間に対して恐怖を感じるとされていることからエンクローズドアームの滞在時間が長く、オープンアームの滞在時間や進入頻度は低いと考えられている。また、各アームへの総進入回数(total arm entries)を計測することによって、行動量評価に用いる。一方、CFC 試験とは、情動ストレス応答を引き起こす条件刺激(conditioned stimulus: CS)と無条件刺激(unconditioned stimulus: US)を組み合わせることでCS-US関連行動を評価するもの

である。^{38,39)} 動物実験では、条件刺激としては音、光、匂いなどの手がかり (cue) が用いられることが多いが、^{40,41)} 恐怖の想起には文脈が重要であるとの臨床的視点から、足蹠電撃ショック箱 (footshock-box: FS-box) および FS-box が置かれている環境を条件刺激として、げっ歯類特有の不安関連行動とされているすくみ行動を評価した。さらに、情動ストレス応答の性差における 5-HT 作動性神経系の関与について、正中縫線核-海馬 5-HT 作動性神経系に着目して、5-HT 作動性神経擾乱ラットを用い、行動学的検討を行った。また、海馬には 5-HT 作動性神経のみならずグルタミン酸や GABA 作動性神経も高密度に分布しており、これらの神経アミノ酸も情動応答に関わっている可能性がある。さらに 5-HT 作動性神経は 5-HT 受容体を介してグルタミン酸ならびに GABA 遊離量を促進的あるいは抑制的に調節していることが知られている。⁴²⁻⁴⁶⁾ そこで本章では、情動ストレス曝露中の海馬 CA1 領域における 5-HT ならびにグルタミン酸/GABA 作動性神経活動の挙動について、神経化学的あるいは組織学的に検討した結果について述べる。

第1節 実験方法

1 実験動物および飼育条件

三共ラボサービス（東京）から購入した雌雄ウィスターST ラットを自家繁殖し、成熟後（11～14週齢）実験に用いた。母子分離の影響をさけるために、生後28日目に離乳した。離乳後、雌雄に分け、1ケージに3～4匹ずつ、室温 22 ± 2 °C、12時間毎の明暗サイクル（明期: 8:00～20:00、暗期: 20:00～8:00）、相対湿度 $50 \pm 10\%$ 、換気回数12回/時の条件下で飼育した。水および固形飼料（MF、オリエンタル酵母工業、東京）は自由摂取させた。実験はすべて動物実験委員会の承認を受け「北海道医療大学動物実験の指針」に準拠して行った。

2 セロトニン作動性神経擾乱ラットの作成

2-1 化学的破壊

雄性ラットをデシプラミン（25 mg/kg, i.p.）（Sigma, MO, USA）で30分処置後、ペントバルビタール（60 mg/kg, i.p.）（共立製薬、東京）麻酔下にて5-HT神経毒である5,7-ジヒドロキシトリプタミン（5,7-dihydroxytryptamine: 5,7-DHT, 150 μ g/rat, 10 μ l）（Sigma, MO, USA）を側脳室内（ブレグマより尾側: 0.8 mm, 正中より側方: 1.4 mm, 深さ: 3.3 mm）に投与し、2週間後に実験に用いた。偽処置群には、デシプラミン投与後、人工脳脊髄液（artificial cerebrospinal fluid: aCSF, KCl 27 mM, NaCl 140 mM, NaH_2PO_4 0.3 mM, Na_2HPO_4 1.7 mM, CaCl_2 1.2 mM, MgCl_2 1 mM, pH 7.2）10 μ l を側脳室内投与した（Fig.3A）。

2-2 電氣的破壊

雄性ラットをペントバルビタール（60 mg/kg, i.p.）（共立製薬、東京）で麻酔し、正中縫線核（ブレグマより尾側: 10.3 mm, 正中より側方: 0.1 mm, 深さ: 8.3 mm, 後方角度: 18°）に双極電極を挿入した。直流電流（刺激強度: 300 μ A）を10秒間与えた後、2分間静置した。その後、電極

を取り除き、挿入部位にビスを封入した。また、背側縫線核（ブレグマより尾側: 10.3 mm, 正中より側方: 0.1 mm, 深さ: 6.4 mm, 後方角度: 22°) も正中縫線核と同様に電氣的に破壊した (Fig.3B)。偽手術群は縫線核破壊群と同様に双極電極を挿入後、直流電流の負荷はせずに 2 分間静置した。その後、電極を取り除き、挿入部位にビスを封入した。術後 4 日以上の回復期間をおいて実験に用いた。

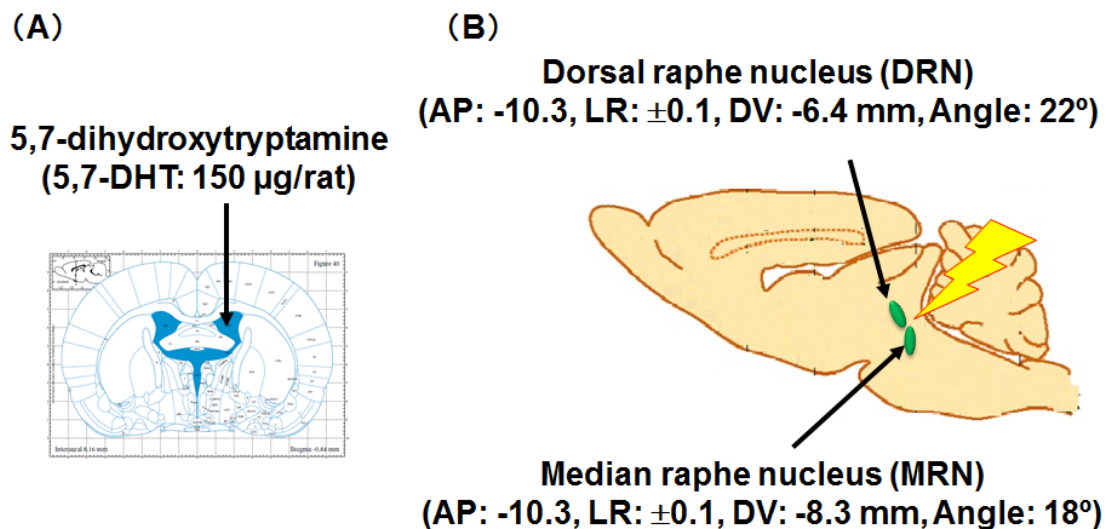


Fig.3. Chemical or Electric Lesions of the 5-HTergic Neuron in Male Rats

(A) Chemical lesion: 5-HT neurotoxin 5,7-DHT (150 µg/rat) was intracerebro-ventricularly (i.c.v.) injected under anesthesia. (B) Electrolytic lesion of the raphe nuclei: A stimulating electrode was inserted into the median raphe nucleus (MRN) or the dorsal raphe nucleus (DRN) through a hole drilled in the skull under anesthesia. Electric lesions were made by application of a direct current of 300 µA for 10 sec.

3 行動学的検討

3-1 高架式十字迷路 (elevated plus maze: EPM) 試験

実験に用いた装置は高さ 40 cm の壁に囲まれたエンクローズドアームと壁のないオープンアームからなり、各アームは幅 10 cm, 長さ 50 cm で、床面から 50 cm の高さに設置されている (Fig. 4)。エンクローズドアームとオープンアームが交差する中心はプラットフォーム (10 cm × 10 cm) となっている。試験はラットの鼻先をオープンアーム方向に向

けてプラットフォーム上に置き 200 lux の照明強度の下、10 分間ビデオ録画した。画像は行動解析システム (Limelight2, Actimetrics, IL, USA) を用いて解析した。ラット体部の中央部分が各アームに入ったことを以て進入とみなした。

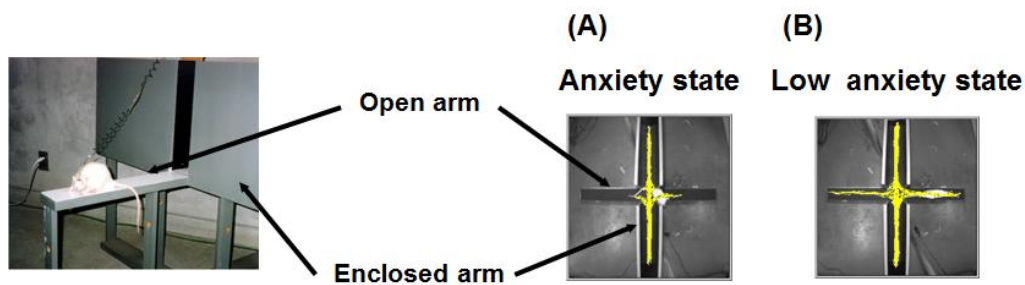


Fig.4. Elevated Plus Maze (EPM) Test

The equipment of EPM consisted of two open arms (width: 10 cm, length: 50 cm) and two enclosed arms (width: 10 cm, length: 50 cm, wall height: 40 cm) with a central platform (10 cm × 10 cm). The maze was elevated 50 cm from the floor. A rat under anxiety state does not generally enter the open arm (A), whereas a rat under low anxiety state frequently stays on the open arm (B), as indicated by behavioural trace.

3-2 文脈的恐怖条件付け (contextual fear conditioning: CFC) 試験

ラットに足蹠電気刺激 (footshock: FS) を負荷するため FS-box (アクリル製, 幅:50 cm, 奥行き:16 cm, 高さ:25 cm) に入れ, 5 分間環境に馴化させた後, FS (刺激強度: 1 mA, 刺激時間: 2 秒, 刺激間隔: 30 秒, 刺激回数: 5 回) を与えた. FS は電撃式ストレス実験装置 (SS-1, 日本光電, 東京) を用いて, 床面に組み込まれたスチール製グリッド (幅: 3 mm, 間隔: 1 cm) を介して行った (Fig. 5). げっ歯類特有の不安・恐怖関連行動と考えられている「すくみ行動 (freezing)」を指標として行動解析を行った. すくみ行動の有無は, 呼吸に関する骨格筋とひげの動き以外の行動が認められない状態が 5 秒間持続した場合にすくみ行動 (+) とし, すくみ行動発現率は 5 秒毎に計測した値を百分率換算して求めた. FS 負荷直後から 5 分間を Post FS (acquisition period), FS 負荷 24 時間後に FS を与えずに同一の FS-box へ 15 分間再曝露した際を CFC (retention period) としてすくみ行動を測定した.

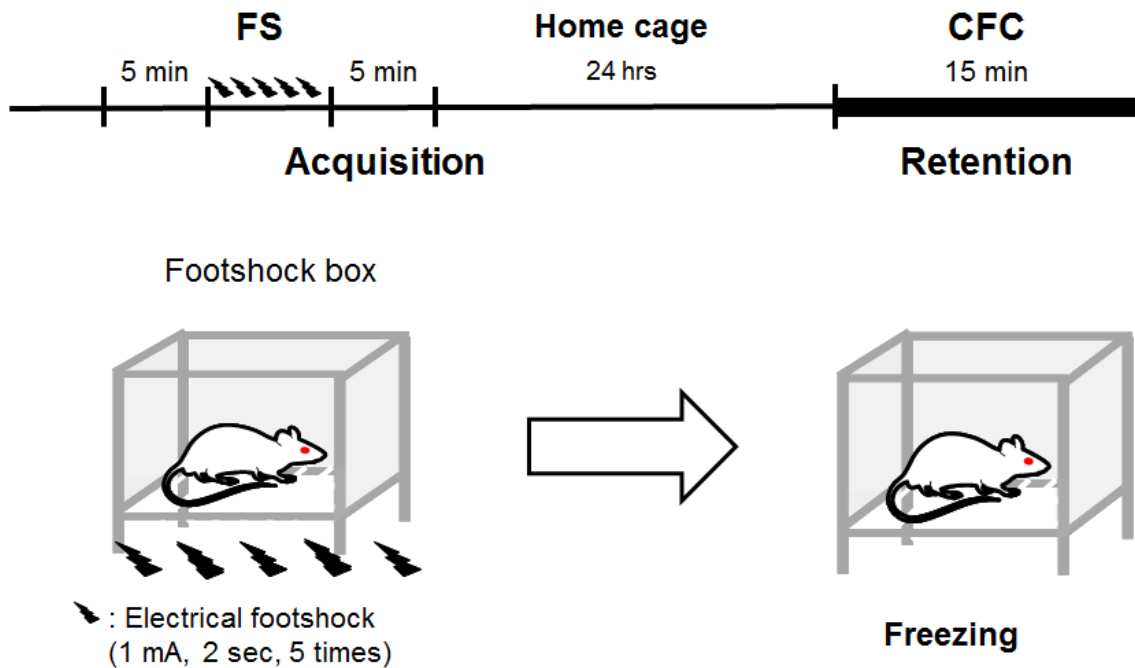


Fig.5. Experimental Protocol of Contextual Fear Conditioning (CFC) Paradigm

A rat was acclimatized in the footshock (FS)-box for 5 min, and received FS stimuli (shock intensity 1 mA, 2 sec, 5 times). After FS stimuli, a rat remained FS-box for 5 min and measured freezing behavior (acquisition). Twenty-four hours after FS stimuli, a rat was re-exposed in the FS-box without FS stimuli for 15 min and freezing behavior was measured (CFC: retention).

4 神経化学的検討 (脳内微小透析法)

ペントバルビタール (60 mg/kg, i.p.) (共立製薬, 東京) 麻酔下で, ブレグマとラムダが水平になるように脳定位固定装置 (SR-6R, 成茂科学器械研究所, 東京) に固定し, マイクロダイアリシス用ガイドカニューレ (AG-4, エイコム, 京都) を右方海馬 CA1 領域 (ブレグマより尾側: 5.0 mm, 正中より側方: 3.5 mm, 深さ: 2.0 mm) に挿入した. ビスを頭蓋骨にアンカーとして埋め込み, 超速硬常温重合レジン (ジーシーユニファスト II, ジーシー, 東京) にて固定した. 約 1 週間の術後回復期間の後, Fig.5 に示した CFC 試験のプロトコールにしたがい FS を負荷した. FS 負荷の翌日, ガイドカニューレを介して海馬 CA1 領域にマイク

ロダイアリス用プローブ (A-I-4-02, エイコム, 京都) を挿入した. ガスタイトシリンジ (#1002, Hamilton Co., NV, USA) に充填した人工脳脊髄液をシリンジポンプ (ESP-64, エイコム, 京都) を用いて流速 2.0 $\mu\text{l}/\text{min}$ で灌流し, 基礎値が安定した後, 20 分間隔でサンプリングを行った. サンプリング開始 60 分後にラットを FS box に 30 分間再曝露した (CFC). その後, ホームケージに戻し 90 分間サンプリングを継続した. 得られた透析液は 5-HT 測定用とグルタミン酸/GABA 測定用に分け, 5-HT 測定用透析液は直ちに電気化学検出器付き高速液体クロマトグラフィー (HPLC-ECD) を用いて定量した. 分析のための機器および分析条件を Table 1 に示す.

Table 1. Analytical Conditions for Determination of Extracellular 5-HT Levels

HPLC	EP-300 (Eicom, Kyoto, Japan)
ECD	ECD-300 (Eicom, Kyoto, Japan)
Column	Eicompact PP-ODS (Eicom, Kyoto, Japan)
Mobile phase	0.1 M sodium dihydrogenphosphate/ 0.1 M disodium hydrogenphosphate buffer (pH 6.0) 1% (v/v) methanol 50 mg/l EDTA·2Na 500 mg/l sodium 1-decanesulfonate
Flow rate	0.5 ml/min
Column temperature	25 °C
Applied voltage	+400 mV vs Ag/AgCl

グルタミン酸およびGABA濃度は透析液を50%メタノールで希釈し、プレラベル誘導化法により *o*-フタルアルデヒドと反応させた後、蛍光検出器付き高速液体クロマトグラフィー (HPLC-FLD) を用いて測定した。分析のための機器および分析条件を Table 2 に示す。

Table 2. Analytical Conditions for Determination of Extracellular Glutamate and GABA levels

HPLC	EP-300 (Eicom, Kyoto, Japan)
FLD	FLD-370 (Eicom, Kyoto, Japan)
Column	Eicompac MA-5ODS (Eicom, Kyoto, Japan)
Pre-column	CA-ODS ϕ 3.0 \times 4.0 mm (Eicom, Kyoto, Japan)
Mobile phase	0.1 M sodium dihydrogenphosphate/ 0.1 M disodium hydrogenphosphate buffer (pH 6.0) 30% (v/v) methanol 5 mg/l EDTA-2Na
Derivatization reagent	20 mM <i>o</i> -phthaldialdehyde-2-mercaptoethanol
Reaction temperature	10 °C
Reaction time	2.5 min
Flow rate	0.65 ml/min
Column temperature	30 °C
Emission wavelength	445 nm
Excitation wavelength	340 nm

5 組織学的検討

5-1 セロトニン陽性細胞の計測

5-1-(1) 灌流固定および冠状切片作製

ペントバルビタール (60 mg/kg, i.p.) (共立製薬, 東京) で深麻酔後に開胸し、生理食塩水を左心室から灌流して脱血した。次に 4% パラホルムアルデヒド含有 0.1 M リン酸緩衝液 (PB) (pH 7.2) を灌流して脱脳した。脳を一晚、同液で固定後、冷暗所にて 30% スクロース含有 PB

に置換し、ティシュー・テック OCT コンパウンド (サクラファインテックジャパン, 東京) に包埋して-80 °Cで保存した. クライオスタット (HM 300, Leica, Nussloch, Germany) を用いて厚さ 30 μm の冠状断切片を作製し, 0.01% アジ化ナトリウム含有 0.1M リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) にて, 4 °Cで保存した.

5-1-(2) 酵素抗体法 (DAB 染色法)

酵素抗体法により, 縫線核群に存在する5-HT陽性細胞を可視化した. 反応はすべて室温で行った. 縫線核群を含む冠状断切片を, 0.3% トリトン-X含有PBS (PBST) に60分間浸透させた. その後, 内因性ペルオキシダーゼを除去するために, 3% 過酸化水素含有50% メタノールと30分間反応させた. PBSTによる洗浄後, 非特異的反応を防止するために10% ヤギ正常血清 (Histofine, ニチレイバイオサイエンス, 東京) 含有PBでブロッキング処理を60分間行なった. 1次抗体としてウサギ抗5-HT抗体 (1:500, Zymed Laboratories Inc., CA, USA) を一晩反応させた. PBSTにて洗浄後, 2次抗体としてビオチン標識ヤギ抗ウサギ抗体 (Vector Laboratories, CA, USA) を60分間反応させた. さらにPBSTによる洗浄後, ABCペルオキシダーゼ試薬 (Vectastain Elite ABC Kit, Vector Laboratories, CA, USA) を60分間反応させた. 次に, DAB基質キット (Vector Laboratories, CA, USA) を用いて0.05% 3,3'-ジアミノベンチジン (DAB), 0.6% 硫酸ニッケル溶液, および0.01% 過酸化水素含有50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.6) を加え, 5-HT陽性細胞を可視化した. PBSTで洗浄後, 切片をスライドガラスに貼り付けて風乾させた. 最後にエンテランニュー (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) を用いて封入した.

5-1-(3) セロトニン陽性細胞の計測

免疫ペルオキシダーゼ染色法⁴⁷⁾を用いて計測を行った. 免疫染色後, Shikanaiら⁴⁸⁾の方法にて5-HT陽性細胞数を計測した. 測定画像は光学顕微鏡 (BX50, オリンパス, 東京) および撮影装置 (MCID system: InterFocus Imaging Ltd., Cambridgeshire, UK) に接続した CCD カメラ

(CCD-IRIS, ソニー, 東京) でデジタル方式にて記録した. ブレグマから尾側: 7.8 mm の冠状断切片を中心に前後 30 μm ごとに, 正中縫線核と背側縫線核の背側部 (dorsal raphe nucleus dorsal parts: DRD), 腹側部 (dorsal raphe nucleus ventral parts: DRV) ならびに lateral wing 部 (dorsal raphe nucleus lateral wings: DRL) に分け, 各部位において 5-HT 陽性細胞数の測定を 3 回ずつ行い, その平均値を求めた.

5-2 組織内神経伝達物質の定量

ペントバルビタール (60 mg/kg, i.p.) (共立製薬, 東京) で麻酔後, 断頭および脱脳して, 正中縫線核, 背側縫線核および海馬に分画し, 分析まで $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ で凍結保存した. サンプルに人工脳脊髄液を加えて超音波破碎した後, 0.2 M 過塩素酸を加えて除タンパクし遠心分離 (10,000 rpm, 10 分, $-2\text{ }^{\circ}\text{C}$) した. 上清を採取し 1 M 酢酸ナトリウム 20 μl を加えて pH 3 に調整し, 再び遠心分離して得られた上清を HPLC-ECD にて分析した. 分析のための機器および分析条件を Table 3 に示す.

Table 3. Analytical Conditions for Determination of Monoamine Contents

HPLC	EP-300 (Eicom, Kyoto, Japan)
ECD	ECD-300 (Eicom, Kyoto, Japan)
Column	Eicompact SC-5ODS (Eicom, Kyoto, Japan)
Pre-column	PREPAK \varnothing 4.0 \times 5.0 mm (Eicom, Kyoto, Japan)
Mobile phase	0.1 M sodium acetate/0.1 M citric acid buffer (pH 3.5) 17% (v/v) methanol 190 mg/l sodium 1-octanesulfonate 5 mg/l EDTA-2Na
Flow rate	0.5 ml/min
Column temperature	25 $^{\circ}\text{C}$
Applied voltage	+750 mV vs Ag/AgCl

6 統計処理

結果は全て平均値 \pm 標準誤差 (mean \pm SEM) で表した。脳内微小透析法を用いた透析液中 5-HT およびグルタミン酸/GABA の経時的変化は, CFC 直前の基礎値を 100%として百分率で表した。また CFC 開始直後からの 60 分間の変化を曲線下面積 (area under the curve: AUC: % \cdot min/1000) で算出し, 統計学的に評価した。

2 群間の比較については Student's t-test あるいは Mann-Whitney U-test により, 多群間については一元配置分散分析 (one-way ANOVA) または二元配置分散分析 (two-way ANOVA) を行った。多重比較には, Bonferroni *post hoc* tests あるいは Dunnett *post hoc* tests を用いて検定した。いずれの場合も危険率 5%未満を以って統計学的に有意とした。

第2節 実験結果

1 行動学的検討

1-1 高架式十字迷路 (elevated plus maze: EPM) 試験

1-1-1 EPM 試験における情動ストレス応答の性差

EPM 試験を用いて生得的な恐怖に対する情動ストレス応答の性差について検討した。総進入回数 (total arm entries) に雌雄差はみられなかったことより、行動量には性差が認められなかった (Fig.6A)。一方、オープンアームへの進入頻度は、雄性ラットよりも雌性ラットの方が有意に高値を示した (Fig.6B)。以上の結果から、雌性ラットは雄性ラットに比べて低不安様状態を示すことが明らかになった。

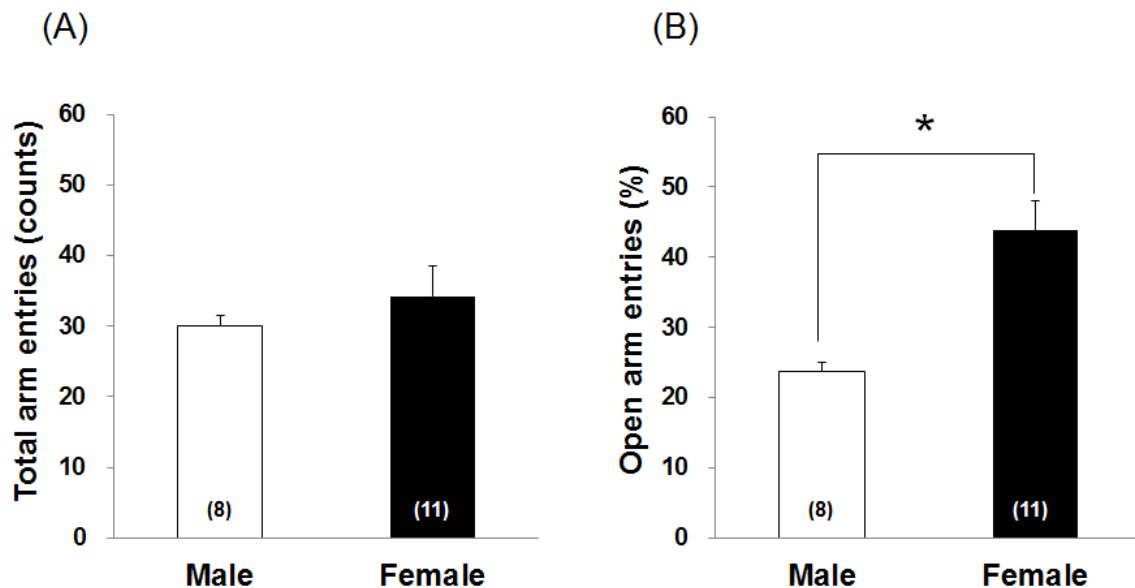


Fig.6. Behavioral Responses to Fear Stress using EPM Test in Male and Female Rats

(A) Each column shows the count of total arm entries consisting of enclosed and open arm entries. (B) Each column shows the % of open arm entries. Fear-related behavior was assessed by measurement of open arm entries. Data are expressed the mean \pm SEM. The numbers of rats tested are shown within each column. * $p < 0.05$.

1 - 1 - (2) EPM 試験における情動ストレス応答へのセロトニン作動性神経擾乱の影響

生得的な恐怖に対する情動応答における 5-HT 作動性神経の調節的役割を検討するため、5-HT 作動性神経擾乱ラット (雄性) を用いて実験を行った。5-HT 神経毒である 5,7-DHT の前処置群ではオープンアームへの進入頻度が偽処置群に比べ有意に増加した (Fig.7A)。また正中縫線核を電氣的に破壊した群においても、偽手術群に比べオープンアームへの進入頻度が約 2 倍に増加していた。しかしながら、背側縫線核破壊群ではオープンアームへの進入頻度は偽手術群とほぼ変化はみられなかった (Fig.7B)。なお各群間の総進入回数 (total arm entries) に差は認められなかった (データ未掲載)。以上の結果から、EPM 試験における情動応答調節には正中縫線核-5-HT 作動性神経系が関与していることが示唆された。

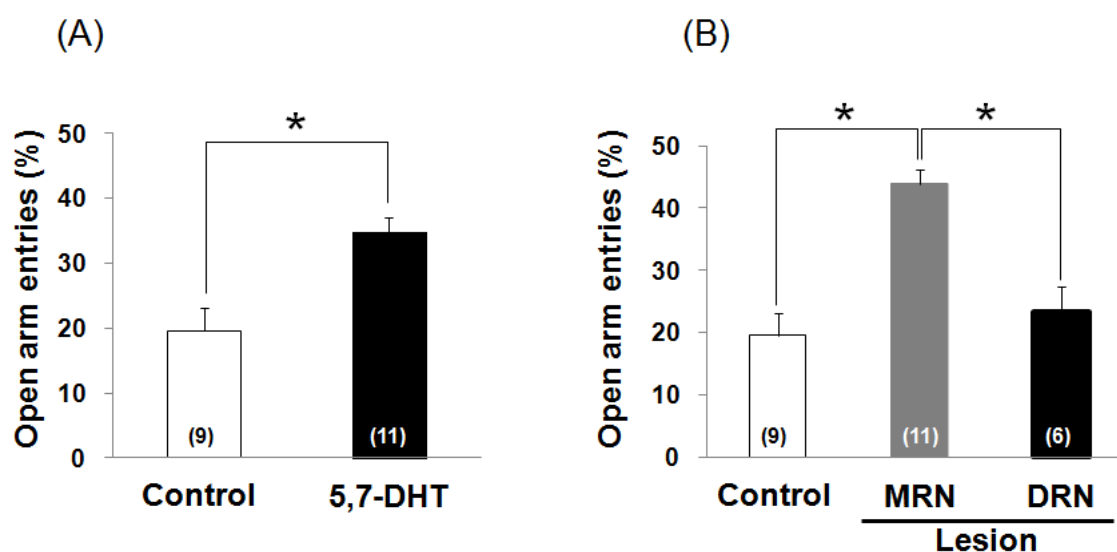


Fig.7. Behavioral Responses to Fear Stress using EPM Test in 5-HTergic Lesioned Male Rats

(A) Chemical lesion of pretreatment with 5-HT neurotoxin 5,7-DHT (150 μ g/rat, i.c.v.). Control: pretreatment with artificial cerebrospinal fluid (10 μ l/rat, i.c.v.). (B) Electric lesion of the median raphe nucleus (MRN) or dorsal raphe nucleus (DRN). Control: sham operation group. Fear-related behavior was assessed by measurement of open arm entries. Each column shows the % of open arm entries. Data are expressed the mean \pm SEM. The numbers of rats tested are shown within each column. * p <0.05.

1-2 文脈的恐怖条件付け (contextual fear conditioning: CFC) 試験

1-2-(1) CFC 試験における情動ストレス応答の性差

CFC 試験を用い、恐怖記憶に基づいた情動行動の性差について検討した。Fig.5 に示した実験プロトコールに従い、FS 負荷直後ならびに負荷 24 時間後にラットを FS-box へ再曝露 (CFC, retention period) した際のすくみ行動を測定した。FS 負荷直後の Post FS (acquisition period) ではすくみ行動発現率に性差は見られなかった。一方、CFC (retention period) では雌性ラットのすくみ行動発現率は雄性ラットに比べ有意に低値を示した (Fig.8)。以上の結果から CFC 試験において、雌性ラットは雄性ラットに比べて不安水準が低いことが示唆された。すなわち雌性ラットは、生得的な恐怖のみならず、記憶に基づいた恐怖に対しても低不安様状態を示すことが明らかとなった。

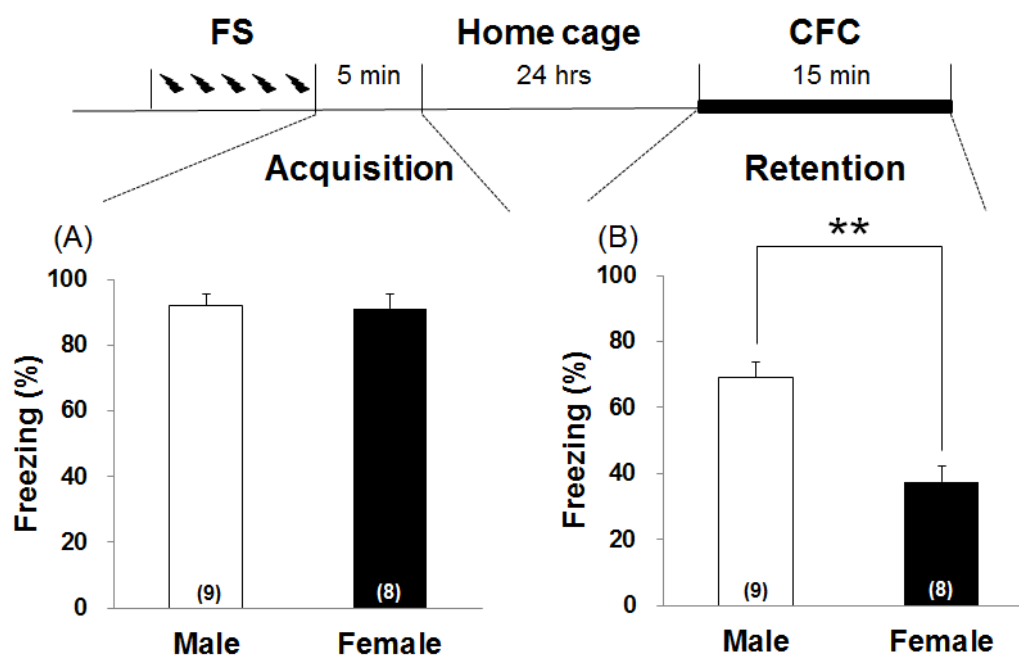


Fig.8. Behavioral Responses to Fear Stress Based on Contextual Fear Conditioning (CFC) Paradigm in Male and Female Rats

Fear-related behavior was assessed by measurement of freezing which was determined immediately after footshock (FS) conditioning (acquisition period) (A) and during exposure to CFC (retention period) (B). Each value represents the mean \pm SEM. The numbers of rats tested are shown within each column. ** $p < 0.01$.

1 - 2 - (2) CFC 試験における情動ストレス応答へのセロトニン作動性神経擾乱の影響

恐怖記憶に基づいた情動応答における 5-HT 作動性神経系の関与を明らかにするため、5-HT 作動性神経擾乱ラット (雄性) を用いて実験を行った。結果 1-1-(2)で示したように、EPM 試験において背側縫線核破壊群ではなく正中縫線核破壊群が低不安様状態を示したことから、本項では正中縫線核破壊群についてのみ検討した。FS 負荷 24 時間後の FS-box への再曝露 (CFC, retention period) では 5,7-DHT 処置群のすくみ行動発現率は偽処置群に比べ著しく減少した (Fig.9A)。また正中縫線核破壊群も偽手術群より有意に低いすくみ行動発現率を示した (Fig.9B)。なお、FS 負荷直後の Post FS (acquisition period) ではすくみ行動発現率に各群間で有意差は認められなかった (データ未掲載)。

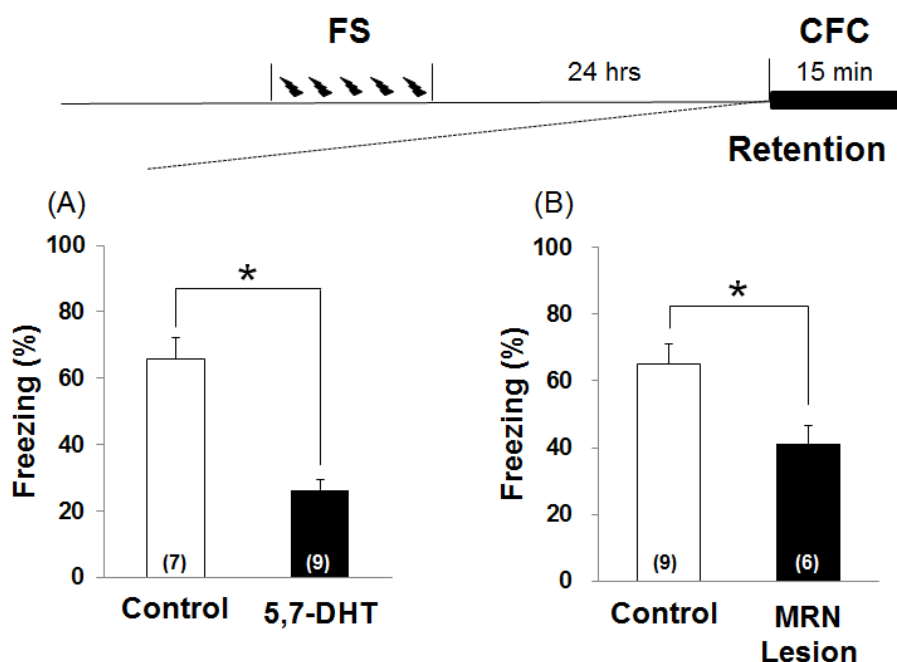


Fig.9. Behavioral Responses to Fear Stress Based on Contextual Fear Conditioning (CFC) Paradigm in 5-HTergic Lesioned Male Rats

(A) Chemical lesion of pretreatment with 5-HT neurotoxin 5,7-DHT (150 $\mu\text{g}/\text{rat}$, i.c.v.). Control: pretreatment with artificial cerebrospinal fluid (10 $\mu\text{l}/\text{rat}$, i.c.v.). (B) Electric lesion of the median raphe nucleus (MRN). Control: sham operation group. Fear-related behavior was assessed by measurement of freezing during CFC (retention period). Data are expressed as mean \pm SEM. The numbers of rats tested are shown within each column. * $p < 0.05$.

2 神経化学的検討 (脳内微小透析法)

2-1 細胞外セロトニン濃度に対する CFC の影響と性差

CFCによる海馬5-HT遊離量の変動における性差について脳内微小透析法を用いて検討した。雄性ラットではFS負荷24時間後の再曝露(CFC)により、細胞外5-HT濃度は対照群に比べて約1.5倍上昇し、その後徐々に基礎値まで低下した。CFC開始直後60分間をAUCで表すと、細胞外5-HT濃度は対照群に比べ有意な上昇を示した (Fig.10A)。これに対して、雌性ラットではCFCにより細胞外5-HT濃度は上昇せず、対照群と差がみられなかった (Fig.10B)。

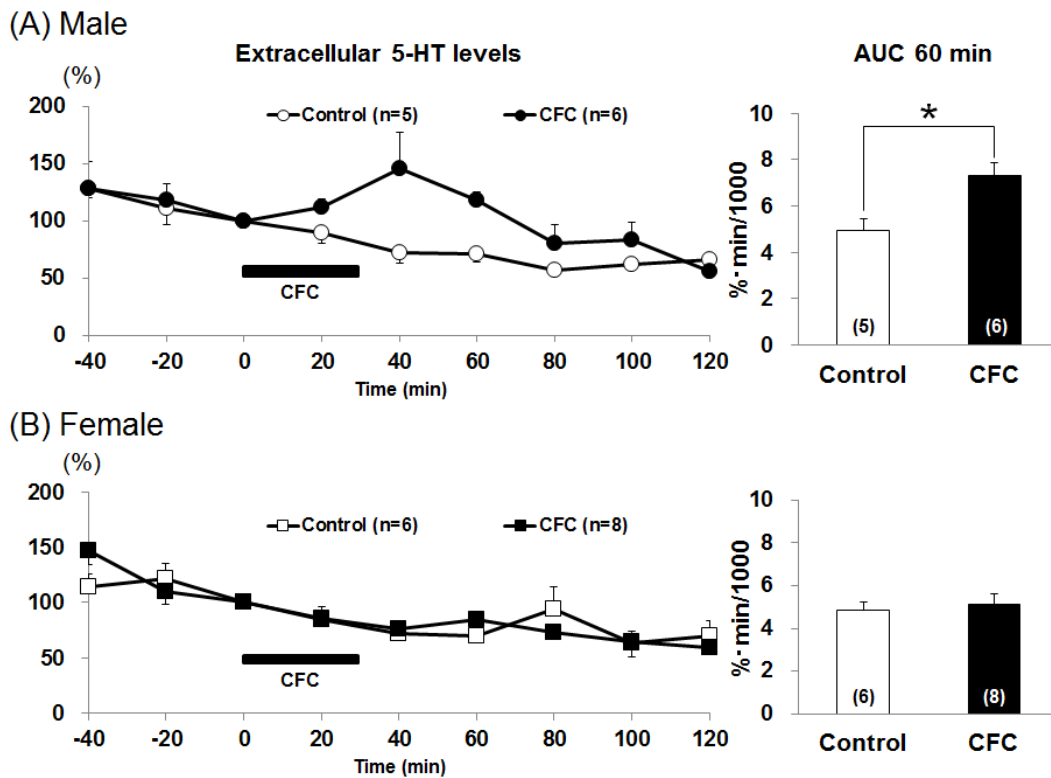


Fig.10. Dynamic Changes in Hippocampal 5-HT Levels following Contextual Fear Conditioning (CFC) in Male (A) and Female (B) Rats

Time-course responses (left) and the area under the curve (AUC) (right) of extracellular 5-HT levels. Data are expressed as mean \pm SEM. The numbers of rats tested are shown in parentheses or within each column. * $p < 0.05$.

2-2 細胞外グルタミン酸/GABA 濃度に対する CFC の影響と性差

5-HT 作動性神経は 5-HT 受容体を介して海馬グルタミン酸ならびに GABA 遊離量を促進的あるいは抑制的に調節していることが知られている。⁴²⁻⁴⁶⁾ そこで内因性グルタミン酸および GABA 遊離に対する CFC の影響と性差について、脳内微小透析法を用いて検討した。その結果、雄性ならびに雌性ラットの細胞外グルタミン酸濃度は CFC により変化しなかった (Fig.11)。

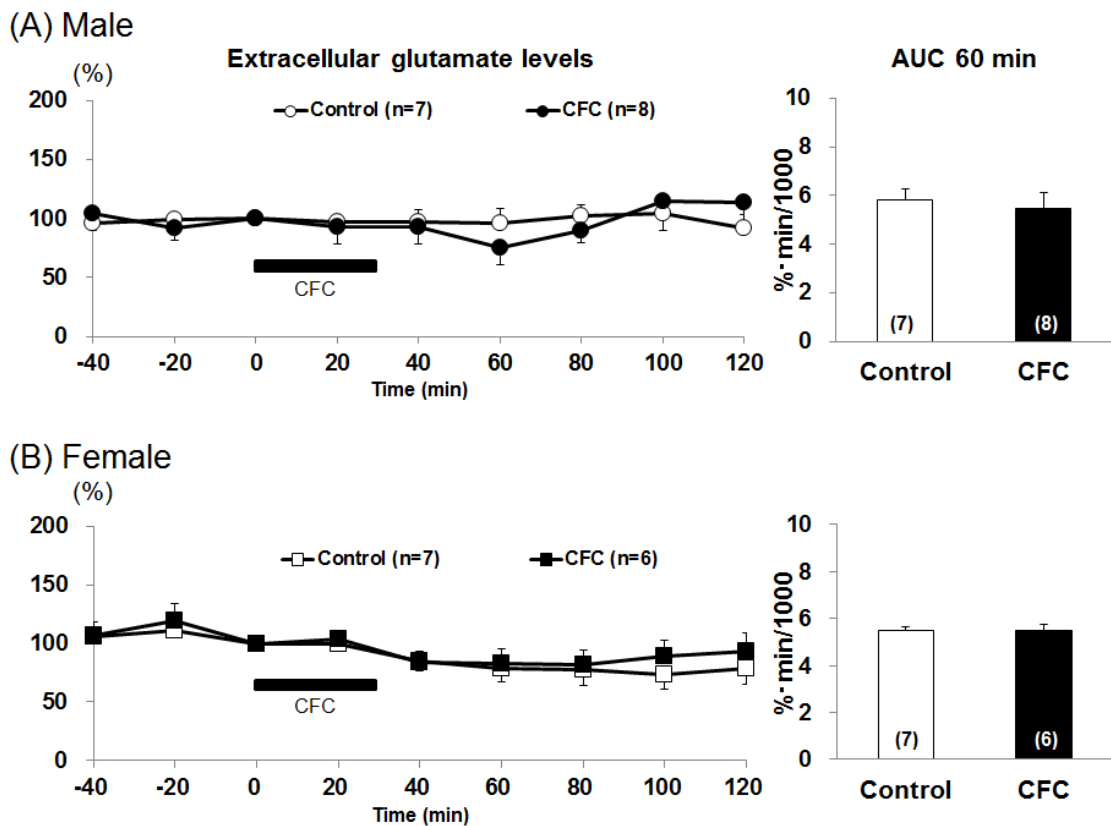


Fig.11. Dynamic Changes in Hippocampal Glutamate Levels following Contextual Fear Conditioning (CFC) in Male (A) and Female (B) Rats

Time-course responses (left) and the area under the curve (AUC) (right) of extracellular glutamate levels. Data are expressed as mean \pm SEM. The numbers of rats tested are shown in parentheses or within each column.

一方、細胞外 GABA 濃度は、雄性ラットでは CFC により対照群に比べ有意に上昇した。しかし雌性ラットでは CFC による GABA 濃度の変化はみられなかった (Fig.12).

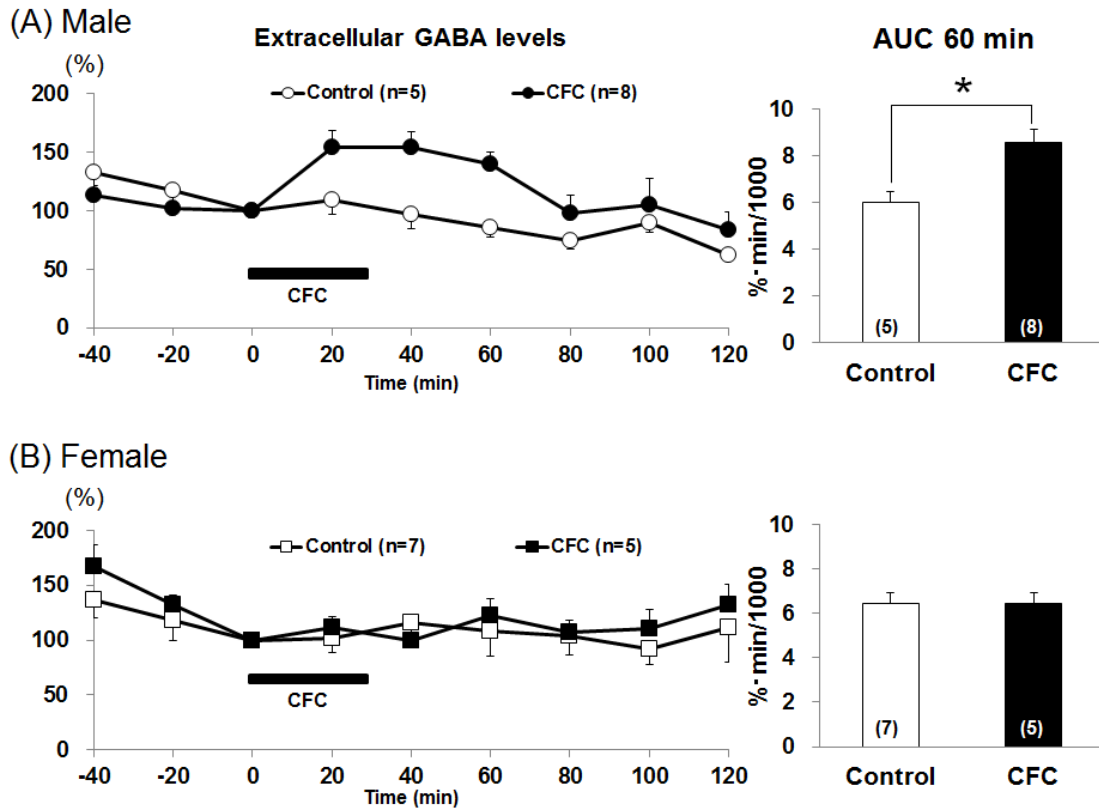


Fig.12. Dynamic Changes in Hippocampal GABA Levels following Contextual Fear Conditioning (CFC) in Male (A) and Female (B) Rats

Time-course responses (left) and the area under the curve (AUC) (right) of extracellular GABA levels. Data are expressed as mean \pm SEM. The numbers of rats tested are shown in parentheses or within each column. * $p < 0.05$.

3 組織学的検討

3-1 縫線核のセロトニン陽性細胞数

皮質-辺縁系に投射する 5-HT 作動性神経の起始核である正中縫線核 (MRN) および背側縫線核 (DRN) の 5-HT 陽性細胞数を DAB 染色法を用いて計測した。正中縫線核の 5-HT 陽性細胞数は雌性ラットの方が雄性ラットに比べて有意に高値を示した。一方、背側縫線核に関しては背側部 (DRD)、腹側部 (DRV)、lateral wing 部 (DRL) のいずれの部位においても 5-HT 陽性細胞数に性差は認められなかった (Fig.13)。

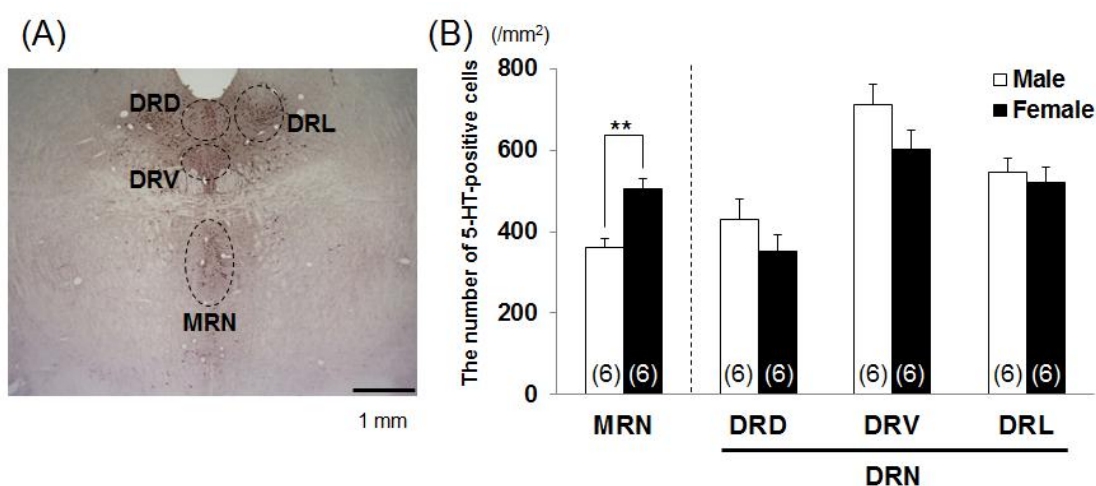


Fig.13. 5-HT Positive Cells in the Raphe Nuclei of Male and Female Rats

The number of 5-HT positive cells was determined by immunohistochemical staining. (A) A low-power photograph of 5-HT immunolabeling in the median raphe nucleus (MRN) and dorsal raphe nucleus (DRN), including ventral parts (DRV), dorsal parts (DRD) and lateral wings (DRL). (B) Column graphs show the number of 5-HT positive cells in the MRN and each area of the DRN. Each value represents the mean \pm SEM. The numbers of rats tested are shown within each column. ** $p < 0.01$.

3-2 海馬ならびに縫線核のモノアミン組織量

海馬と正中縫線核 (MRN) および背側縫線核 (DRN) のノルアドレナリン (NA), ドパミン (DA) および 5-HT 組織量について定量した。海馬ノルアドレナリンおよびドパミン組織量は, 雌性ラットの方が高い傾向がみられたが統計学的には雄性ラットとの間に有意差はみられなかった。縫線核においてはいずれの部位においてもノルアドレナリンおよびドパミン組織量に性差は認められなかった。海馬と正中縫線核の 5-HT 組織量は雌性ラットが雄性ラットに比べ有意に高値を示した。一方, 背側縫線核の 5-HT 組織量で性差はみられなかった (Table 4)。

Table 4. Monoamine Contents in the Hippocampus and the Raphe Nuclei

		NA	DA	5-HT
(ng/g wet weight)				
Hippocampus	M (5)	69.08±4.48	6.86±1.17	5.70±2.02
	F (5)	92.14±10.08	8.62±1.64	14.18±2.36*
MRN	M (5)	136.15±13.70	21.43±3.56	47.90±3.97
	F (5)	139.84±9.86	23.86±3.14	70.53±7.34*
DRN	M (4)	241.28±52.41	2.41±0.63	95.48±16.37
	F (4)	258.94±41.40	3.45±0.25	87.89±1.81

Tissue contents of noradrenaline (NA), dopamine (DA) and serotonin (5-HT) were determined in male (M) and female (F) rats. Each value represents the mean ± SEM. The number of rats used was indicated in the parentheses. MRN: median raphe nucleus, DRN: dorsal raphe nucleus. *p<0.05 vs. male.

第3節 考察

高架式十時迷路 (EPM) 試験におけるオープンアームへの進入率は、雌性ラットが雄性ラットよりも有意に高値を示した。この結果はWeintraubら⁴⁹⁾が報告した結果と一致する。EPM試験とは、ラットが高所や明るい場所などを回避する本能的性質を利用して、生得的な不安水準の評価に広く用いられている行動試験法である。また、新奇環境に対する不安水準を評価するオープンフィールド試験においても雌性ラットは低不安様状態を示すことが報告されている。⁵⁰⁾ また、5-HT作動性神経を破壊した雄性ラットは、対照群に比べてオープンアームへの進入率が有意に高値を示した。すなわち、雌性ラットでみられた低不安様状態は、雄性ラットの5-HT神経系破壊によっても生じることが明らかとなった。これらの結果は、雌性ラットが示す情動ストレス応答には、5-HT作動性神経による調節機構が関与している可能性を示唆している。

興味深いことに、中枢5-HT作動性神経の起始核である縫線核のうち、正中縫線核を電氣的に破壊した群では低不安様状態を示したのに対して、背側縫線核破壊群では偽手術群と変わらなかった。すなわち、背側縫線核と正中縫線核は情動ストレスに対する調節的役割が異なる可能性がある。実際、サルを用いた実験で、視覚刺激と報酬または嫌悪刺激を関連づける古典的条件付け課題により、背側縫線核ニューロンは持続的な報酬・嫌悪情報よりは「状態や環境」(文脈)をコードしていることが明らかにされた。⁵¹⁾ 持続的な報酬・嫌悪刺激とは、EPM試験においてはオープンアームへの進入状態を指すと考えられる。EPM試験では文脈とは関連がなく、「持続的な嫌悪情報」が示されるだけなので、文脈に関わる背側縫線核が破壊されても影響されず、オープンアームへの進入頻度が対照群と差がなかったと思われる。

一方、文脈的恐怖条件付け (CFC) 試験におけるすくみ行動発現率は、雌性ラットは雄性ラットに比べ低値を示した。この結果はMitsushimaら⁵²⁾の報告と一致する。CFC試験は恐怖記憶に基づく不安の行動評価法であり、あ

る特定の環境下でFSなどの嫌悪刺激を負荷し、一定時間後に同じ環境に再曝露すると、嫌悪刺激を与えないにもかかわらず、ラットはすくみ行動や脱糞、排尿などの情動応答を示す。これは環境と嫌悪刺激が条件付けられた、文脈的記憶を背景とする不安に基づく行動応答であり、すくみ行動発現率が高いほど不安・恐怖の程度は強いと考えられている。⁵³⁾ したがって本章の実験結果は、雌性ラットは雄性ラットよりも不安水準が低い、すなわち低不安様状態にあることを示していると考えられる。また、5-HT作動性神経系を破壊した雄性ラットは著しくすくみ行動発現率が低下したことから、EPM試験と同様に、CFC試験でみられた雌性ラットの低不安様状態は、5-HT神経破壊によっても生じることが明らかとなった。以上の結果から、正中縫線核は恐怖記憶に基づく情動行動応答と生得的な恐怖に対する情動応答の双方に関与しており、恐怖記憶に基づく情動行動応答には、正中縫線核-海馬5-HT作動性神経系による調節機構が関与していることが強く示唆された。

海馬 CA1 領域における細胞外 5-HT 濃度は、雄性ラットでは CFC により上昇し、雌性ラットでは変化がみられなかった。この結果から、海馬における内因性 5-HT 作動性神経活動の変動は情動ストレス応答でみられた性差と関連していることが推測された。言い換えると、正中縫線核-海馬 5-HT 作動性神経系による情動調節機構の相違が、雌雄ラットにおける情動応答あるいはストレスに対する感受性の違いを反映しているのかもしれない。Shors and Miesegaes は急性ストレスにより、雄性ラットでは記憶・学習が強化されるのに対して、雌性ラットでは逆に減弱すると報告している。⁵⁴⁾ この報告からは、雌性ラットでみられた低不安様行動は、記憶・学習過程における神経基盤に対する性差を反映していると考えられる。しかし、本章における CFC 試験では、Post FS (acquisition period) におけるすくみ行動発現率に性差は認められなかったことや、短期記憶の評価に用いられる Y 字迷路試験^{55,56)} において性差がみられなかったという当研究室の報告⁵⁷⁾ から、記憶・学習過程における神経基盤の変化は生じていないことが考えられた。

雄性ラットと比較して雌性ラットでは、正中縫線核の 5-HT 陽性細胞数は

有意に高値を示した。海馬および正中縫線核の 5-HT 組織量も雌性ラットの方が高値を示した。これらの結果は、中枢 5-HT 合成能や 5-HT 受容体の感受性は雌性ラットの方が高いというこれまでの報告と一致する。⁵⁸⁻⁶¹⁾ また、雌性ラットは、雄性ラットに比べ海馬と正中縫線核の 5-HT 組織量のみ有意に高値を示したことから、正中縫線核-海馬 5-HT 作動性神経系が性差に関連していることが示唆される。しかしながら、5-HT 組織量が高値を示したにもかかわらず、雌性ラットでは CFC による細胞外 5-HT 濃度の上昇は認められなかった。この現象について、本章の実験結果からは十分に説明することは出来ない。しかしながら臨床研究では、女性は男性に比べ脳内 5-HT 組織量が多く、5-HT_{1A} 受容体を介してストレス等における縫線核-海馬 5-HT 作動性神経系の神経伝達を抑制するため、女性のうつ病に対する脆弱性が生じていると推測されている。⁶²⁾ 同様に本章の結果は、雌性ラットでは正中縫線核に豊富に存在する 5-HT が自己受容体である 5-HT_{1A} 受容体を刺激し、結果的に海馬での 5-HT 放出を抑制することを示していると考えられる。一方、Dilts らはラットに音によるストレスを与えると、正中縫線核の 5-HT 作動性神経細胞が活性化されると報告している。⁶³⁾ 雄性ラットの場合、CFC によっても同様に正中縫線核の 5-HT 作動性神経細胞が活性化している可能性がある、そして、この活性化には性差が存在することが考えられる。すなわち、CFC に対する正中縫線核の感受性の性差が、海馬における 5-HT 放出に影響を与えている可能性が考えられる。

海馬 CA1 領域の細胞外グルタミン酸濃度は、CFC により雌雄ラット共に変化しなかった。一方、細胞外 GABA 濃度は 5-HT と同様に雄性ラットにおいてのみ CFC による上昇が認められた。海馬のグルタミン酸ならびに GABA 作動性神経は 5-HT 受容体を介して促進的あるいは抑制的に調節されている。⁴²⁻⁴⁸⁾ したがって、今回みられた CFC によるグルタミン酸遊離および GABA 遊離量の変動には 5-HT 受容体サブタイプによる制御機構の関与が考えられる。例えば 5-HT_{1A} 受容体はグルタミン酸作動性神経の前シナプスに存在しグルタミン酸遊離を抑制している。⁴²⁾ また介在ニューロンからの

GABA 遊離は 5-HT_{1A} 受容体により抑制される。^{43,44)} 一方, 5-HT₂⁴⁵⁾ および 5-HT₃ 受容体^{43,46)} は GABA 遊離を促進的に調節している (Fig.14). このことから雄性ラットにおいては, CFC により遊離した内因性 5-HT が 5-HT_{1A} 受容体を介してグルタミン酸遊離に対して抑制的に作用した結果, グルタミン酸濃度に変動がみられなかった可能性が考えられる. GABA 遊離については, 5-HT₂ または 5-HT₃ 受容体が 5-HT_{1A} 受容体よりも優位に働き, GABA 遊離に対して促進的に作用したのかもしれない. 一方, 雌性ラットでは CFC により 5-HT のみならず細胞外グルタミン酸および GABA 濃度変化は見られなかった. したがって内因性 5-HT による 5-HT 受容体を介した調節機構が作動せず, 結果的にグルタミン酸あるいは GABA 濃度の変化が生じなかったのかもしれない. あるいは GABA 遊離については, 5-HT_{1A} 受容体の数的または機能的相違により, 5-HT₂ および 5-HT₃ 受容体の促進的作用を凌駕し, 抑制的に作用した可能性も考えられる (Fig.14). しかしながら, この仮説を立証するためには 5-HT_{1A} 受容体と 5-HT₂ および 5-HT₃ 受容体の作用効率のバランスについて明確にする必要がある. そのためには 5-HT 受容体サブタイプの数や 5-HT 結合能などを含む機能的特徴について今後さらに検討する必要がある.

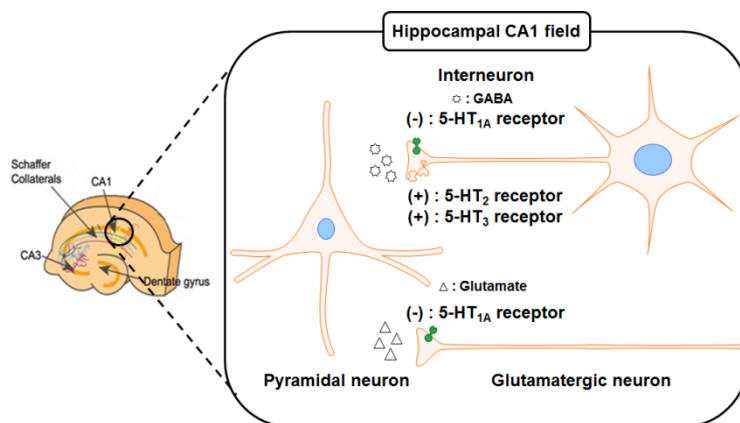


Fig.14. Modulation of Glutamate and GABA Neurotransmission Mediated via 5-HT Receptors in the Hippocampal CA1 Field

GABA release from inhibitory interneurons is facilitated by 5-HT₂ or 5-HT₃ receptors, whereas the release is inhibited by 5-HT_{1A} receptors. Glutamate release is negatively regulated via presynaptic 5-HT_{1A} heteroreceptors located on glutamatergic nerve terminals.
modified figure based on reference [42-46].

第2章 情動ストレス応答の性差と海馬シナプス可塑性の関連性

シナプス可塑性の一つである長期増強 (LTP) 現象とは化学シナプスを高頻度刺激 (high-frequency stimulation: tetanus) した後に起きるシナプス結合強度の持続的増加のことであり, この現象は 1973 年にウサギ海馬において初めて見出された. その後, LTP 現象は大脳皮質や扁桃体, 線条体など他の脳部位でも報告され, その生理学的意義が注目されている. 特に海馬 CA1 領域の LTP は, 記憶・学習の電気生理学的基盤と考えられている.^{32,33)} LTP 形成は脳由来神経栄養因子 (brain-derived neurotrophic factor: BDNF) により誘導されることが知られているが, 海馬の BDNF 発現量はストレス負荷により減少する.⁶⁴⁾ またストレス応答機構の主軸をなす視床下部 - 下垂体 - 副腎軸 (hypothalamic-pituitary-adrenal axis: HPA axis) の賦活化によって分泌される副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン (corticotropin-releasing hormone: CRH), 副腎皮質刺激ホルモン (adrenocorticotrophic hormone: ACTH) およびコルチコステロンは海馬における LTP 形成に影響をおよぼすことも知られている.⁶⁵⁻⁶⁷⁾ 海馬 CA1 領域の LTP 形成は, 生理的ストレスや不安・恐怖などの情動ストレスによって影響を受ける. 例えば, 高所ストレス負荷後では海馬 CA1 領域の LTP 形成は抑制されるが^{68,69)}, 新奇環境ストレス負荷後では LTP 形成は抑制されない.⁶⁹⁾ このことから, 海馬におけるシナプス可塑性の変化はストレス強度に依存したものであると推測される. すなわち, 海馬シナプス可塑性に関わるシナプス伝達効率の変化は情動ストレス応答に深く関与していると考えられる. しかしながら, 情動ストレス応答でみられた性差と海馬シナプス可塑性との関連性については明らかではない.

本章では, 第 1 章の結果をふまえて, 情動調節機構における正中縫線核-海馬 5-HT 神経系の機能的役割についてシナプス可塑的变化に焦点を当て追究した. また 5-HT 受容体サブタイプの中でも不安・恐怖などの情動機能調節に重要な役割を担っている 5-HT_{1A} 受容体^{16,17)} の海馬シナプス可塑的变化への関与について, 電気生理学的ならびに薬理学的手法を用いて検討した.

第 1 節 実験方法

1 実験動物および飼育条件

第 1 章第 1 節 1 に準じた。

2 電気生理学的検討

2-1 慢性電極埋め込み方法

ペントバルビタール (60 mg/kg, i.p.) (共立製薬, 東京) 麻酔下, ブレグマとラムダが水平になるようにラットを脳定位固定装置 (SR-6R, 成茂科学器械研究所, 東京) に固定し頭部皮膚を正中切開後, 頭蓋骨を露出させた。記録電極を右方海馬 CA1 領域 (ブレグマより尾側: 5.0 mm, 正中より側方: 3.0 mm, 深さ: 1.5~3.0 mm), 刺激電極を右方シャーファー側枝 (ブレグマより尾側: 3.0 mm, 正中より側方: 1.5 mm, 深さ: 2.8 mm) に挿入した。

覚醒下用記録電極はエナメル被覆ステンレス製単極電極 (先端径 100 μm), 覚醒下用刺激電極はエナメル被覆ステンレス製双極張り合わせ電極 (先端径 200 μm , 先端間距離 500 μm) を用いた。ビスを頭蓋骨 2 カ所に埋め込み, 記録電極に付随させた銅線を巻き付けて不関電極およびアースとした。刺激電極を電気刺激装置 (SEN-3401, 日本光電, 東京) およびアイソレータ (SS-203, 日本光電, 東京) に接続し, 油圧式マイクロマニピュレータ (MMO-220A, 成茂科学器械研究所, 東京) にて目的の深度まで挿入した。記録電極は高感度増幅器 (S-0476, 日本光電, 東京) に接続した後, シャーファー側枝刺激による海馬 CA1 領域の誘発集合電位 (population spike amplitudes: PSA) を観察しながら, 誘発波形が観察される深度まで挿入した。刺激強度依存性があることを確認した後, 超速硬常温重合レジン (ジーシーユニファスト II, ジーシー, 東京) にて固定し, 約 1 週間の術後回復期間をおいて, 実験に用いた。

2-2 誘発集合電位の測定

覚醒下で実験する場合、ホームケージ内で刺激電極と記録電極にコードを装着して、海馬 CA1 領域の誘発集合電位 (PSA) を測定した。最大反応が得られる刺激強度を 100% として、20% 間隔で PSA を測定し input-output curve を作製することにより強度依存性を確認した。テスト刺激として PSA が最大反応の 50% になる刺激強度で 30 秒毎に 250 μsec の電気刺激を与え、データ解析装置 (Power Lab System, ADInstruments Pty. Ltd., NSW, Australia) を用いてアナログ・デジタル変換を行い 7 回のテスト刺激による加算平均を 5 分毎に記録した。高頻度刺激としてテスト刺激と同電流、同持続時間の短形波を高頻度、短時間 (100 Hz: パルス間隔 10 msec で 10 pulses を 10 秒間隔で 10 回) の条件で与えた。高頻度刺激後、テスト刺激による PSA を 60 分間測定した。実験終了後、深麻酔し記録電極および刺激電極に直流電流 (900 μA , 30 秒) を流して脳を摘出し、電極位置の確認を行った (Fig.15)。

麻酔下での電気生理学的実験は、ウレタン (1 g/kg, i.p.) (Sigma, MO, USA) 麻酔を使用し、覚醒下と同様の方法 (2-1) で電極を挿入し、レジンによる固定はせずに実験を行った。PSA の測定方法ならびに高頻度刺激条件は覚醒下での測定方法に準じた。

3 正中縫線核電気刺激条件

正中縫線核 (ブレグマより尾側: 10.3 mm, 正中より側方: 0.1 mm, 深さ: 8.3 mm, 後方角度: 18°) に双極電極を挿入し、高頻度刺激の 20 分前から実験終了までの 80 分間、刺激強度 100 または 300 μA で 30 秒毎に 250 μsec の電気刺激を与えた。実験終了後、(2-2) と同様の方法で電極位置の確認を行った (Fig.15)。

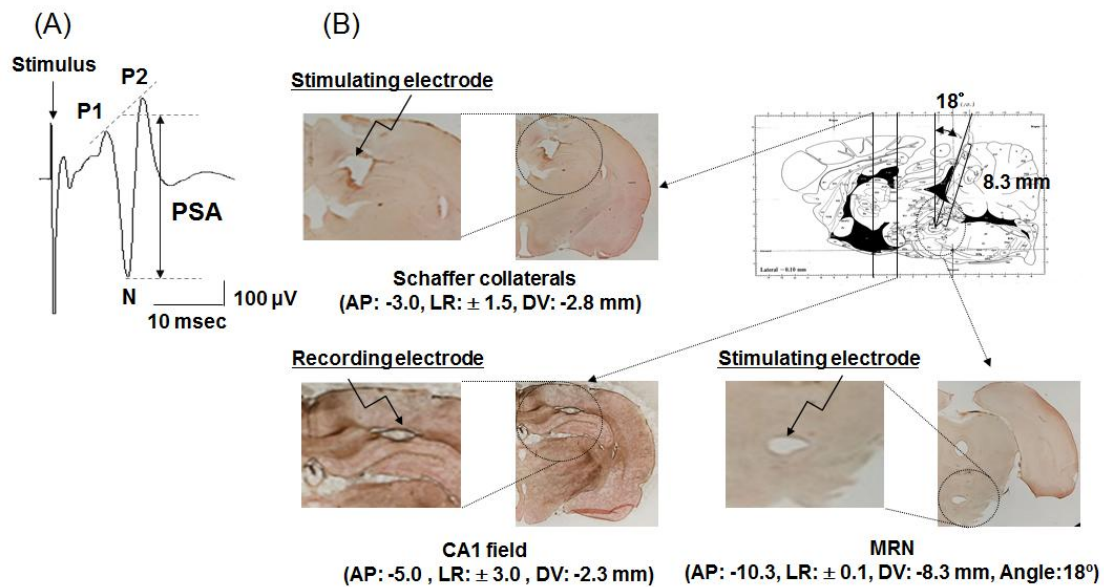


Fig.15. A Typical Wave-form of an Evoked Potential in the CA1 Field (A) and Diagrams Showing Electrode Placements (B)

(A) The population spike amplitudes (PSA) in the CA1 field was defined as the absolute amplitude between the two dotted lines separating the positive line (between the P1 and P2 components) and the negative (N) peak. PSA is defined as the absolute voltage with a latency of 7-10 ms. (B) Diagrams depicting stimulating electrodes in the Schaffer collaterals and the median raphe nucleus (MRN), and a recording electrode in the CA1 field.

4 使用薬物

5-HT_{1A} 受容体部分作動薬タンドスピロン (tandospirone; 大日本住友製薬, 東京), 5-HT_{1A} 受容体選択的作動薬 8-hydroxy-2-(di-*n*-propylamino) tetralin (8-OH-DPAT; Sigma, MO, USA) ならびに 5-HT_{1A} 受容体選択的遮断薬 WAY-100135 (Tocris, Bristol, UK) を使用した. タンドスピロン (10 mg/kg, i.p.) および 8-OH-DPAT (0.3 あるいは 3 mg/kg, i.p.) は高頻度刺激 20 分前に投与した. WAY-100135 (3 mg/kg, i.p.) はタンドスピロン投与 20 分前に投与した. 薬物は全て生理食塩水に溶解した.

5 統計処理

PSA の経時的变化は高頻度刺激直前の値を 100% とし, 百分率で表した. また高頻度刺激後 60 分間の PSA について AUC を算出した. その他については第 1 章第 1 節 6 に準じた.

第2節 実験結果

1 電気生理学的検討

1-1 文脈的恐怖条件付けによるシナプス可塑性の変化と性差

不安・恐怖ストレスに対するシナプス応答に性差が存在するか否かを追究するため、海馬 CA1 領域のシナプス可塑性-長期増強 (LTP) 形成におよぼす文脈的恐怖条件付け (CFC) の影響について検討した。対照群では雌雄ラットとも高頻度刺激により LTP が形成された。雄性ラットでは CFC 後に高頻度刺激を与えると LTP 形成は抑制された (Fig.16A)。一方、雌性ラットでは CFC による LTP 形成の抑制はみられず LTP が形成された (Fig.16B)。

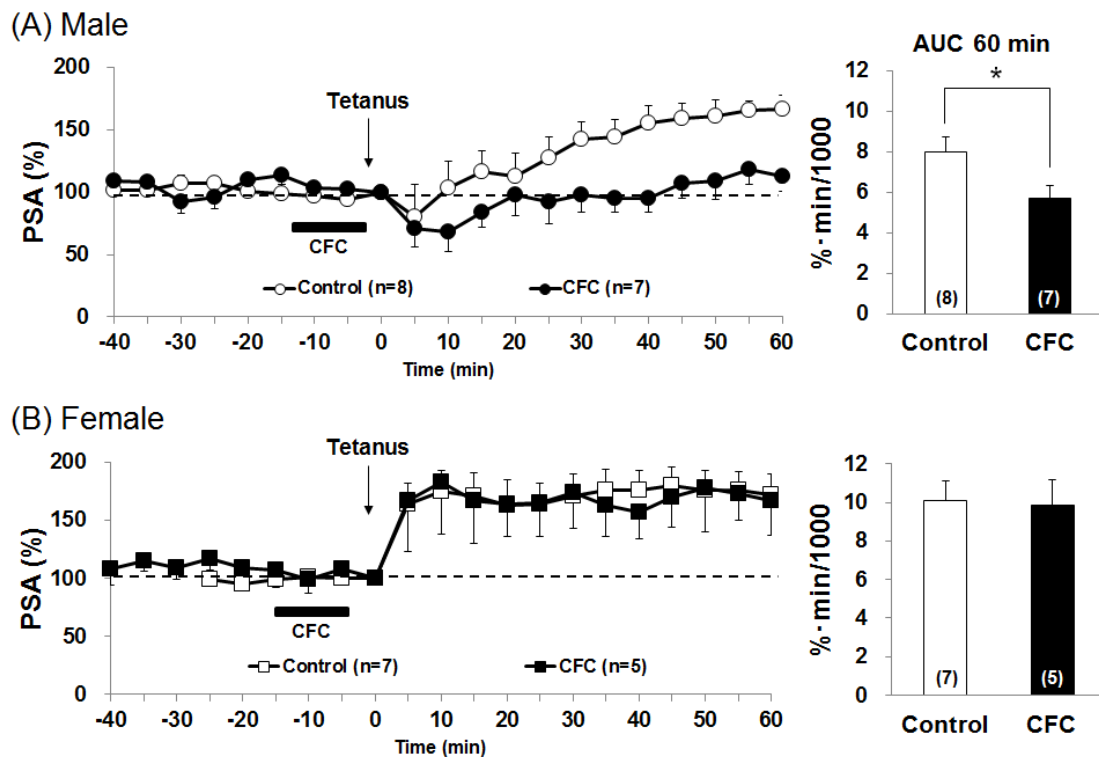


Fig.16. Effects of CFC on LTP Induction in Male (A) and Female (B) Rats under Freely Moving Conditions

Time-course response (left) and the area under the curve (AUC) (right) of the population spike amplitudes (PSA) in the CA1 field following exposure to CFC. Control: FS conditioned group without exposure to CFC. Each value represents the mean \pm SEM. The numbers of rats tested are shown in parentheses or within each column. * $p < 0.05$.

1-2 正中縫線核刺激によるシナプス可塑性の変化と性差

海馬へ投射する 5-HT 作動性神経の起始核である正中縫線核 (MRN) に対する持続的な電気刺激による、海馬 CA1 領域の LTP 形成におよぼす影響を麻酔下で検討した。雄性ラットでは正中縫線核刺激 (100 または 300 μ A) により、LTP 形成は刺激強度依存的に抑制された (Fig.17A)。雌性ラットでは、刺激強度 300 μ A で正中縫線核を刺激しても LTP 形成の有意な抑制はみられなかった (Fig.17B)。

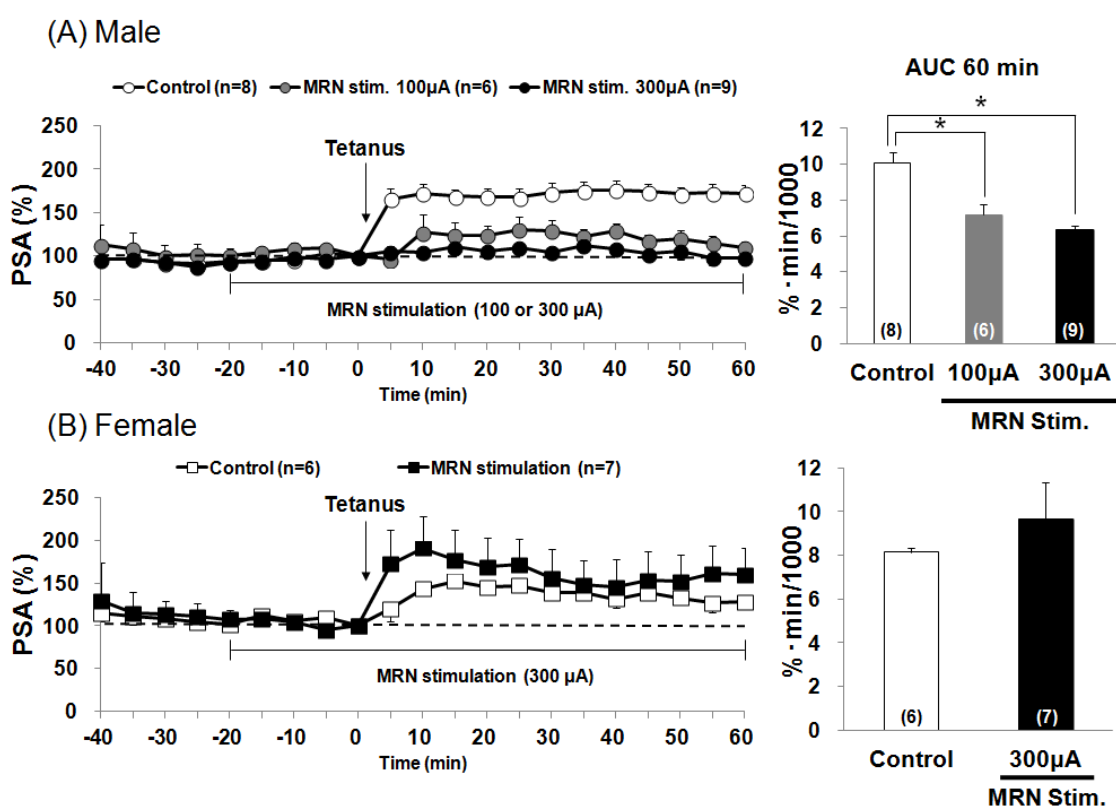


Fig.17. Effects of the Median Raphe Nucleus (MRN) Stimulation on LTP Induction in the CA1 Field in Male (A) and Female (B) Rats under Anesthesia

Time-course responses (left) and the area under the curve (AUC) of the population spike amplitudes (PSA) (right). Electrical stimulation of the MRN (100 or 300 μ A) was performed 20 min before tetanus and continued until the end of the experiment. Control: group without MRN stimulation. Data are expressed as mean \pm SEM. The numbers of rats tested are shown in parentheses or within each column. * p <0.05.

2 薬理的検討

2-1 タンドスピロンによるシナプス可塑性の変化と性差

5-HT受容体の中でも5-HT_{1A}受容体は不安や恐怖などの情動調節に重要な役割を果たしている。^{16,17)}そこで、5-HT_{1A}受容体部分作動薬であるタンドスピロンを用いてLTP形成におよぼす影響を検討した。雄性ラットではタンドスピロン(10 mg/kg, i.p.)投与により、高頻度刺激後のLTP形成が有意に抑制された。しかしながら、雌性ラットではタンドスピロンによるLTP形成抑制はみられなかった(Fig.18)。

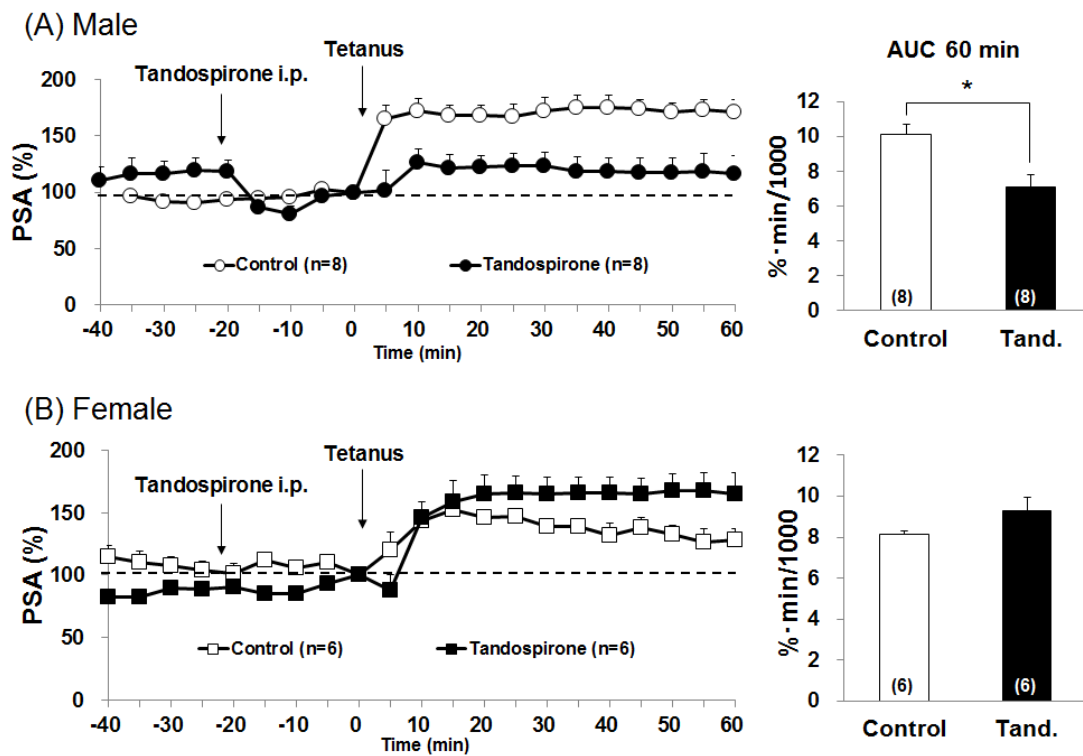


Fig.18. Effects of Tansospiron (Tand.: 10 mg/kg, i.p.) on LTP Induction in the CA1 Field in Male (A) and Female (B) Rats under Anesthesia

Time-course responses (left) and the area under the curve (AUC) of the population spike amplitude (PSA) (right). Tansospiron was administered 20 min before tetanus. Control: group without tansospiron administration. Data are expressed as mean \pm SEM. The numbers of rats tested are shown in parentheses or within each column. * $p<0.05$.

雄性ラットでみられたタンドスピロンによる LTP 形成の抑制が 5-HT_{1A} 受容体を介しているかを追究するために、5-HT_{1A} 受容体選択的拮抗薬である WAY-100135 を用いて検討した。WAY-100135 (3 mg/kg, i.p.) はタンドスピロン (10 mg/kg, i.p.) 投与 20 分前に投与した。その結果、WAY-100135 前投与によってタンドスピロンによる LTP 形成の抑制が解除され、LTP が形成された (Fig.19)。なお LTP 形成は WAY-100135 (3 mg/kg, i.p.) 単独投与による影響を受けなかった (データ未掲載)。以上の結果から、雄性ラットでは 5-HT_{1A} 受容体を介し LTP 形成が抑制されるが、雌性ラットでは 5-HT_{1A} 受容体によるシナプス抑制がみられないことが明らかとなった。

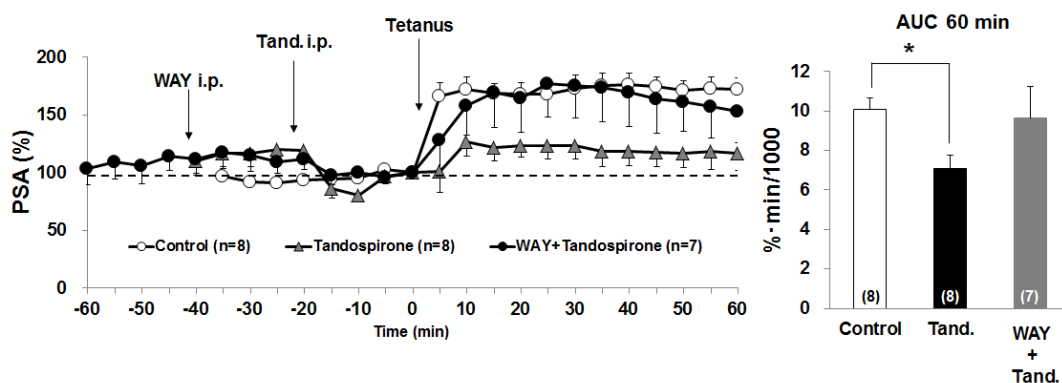


Fig.19. Effects of Pretreatment with WAY-100135 (WAY: 3 mg/kg, i.p.) on Tansospirone (Tand.: 10 mg/kg, i.p.)-induced LTP Suppression in the CA1 Field in Male Rats under Anesthesia

Time-course responses of tetanus-induced LTP in the absence or presence of WAY-100135. (left) The area under the curve (AUC) of the population spike amplitudes (PSA) (right). WAY-100135 was administered 20 min before tansospirone treatment. Control: group without tansospirone and WAY-100135 administration. Data are expressed as mean \pm SEM. The numbers of rats tested are shown in parentheses or within each column. * $p < 0.05$

2-2 8-OH-DPAT によるシナプス可塑性の変化と性差

5-HT_{1A} 受容体選択的作動薬である 8-OH-DPAT を用い、5-HT_{1A} 受容体を介したシナプス可塑性の変化に性差が存在する可能性をさらに追究した。その結果、雄性ラットでは 8-OH-DPAT (0.3 および 3 mg/kg, i.p.) 投与により用量依存的に LTP 形成は抑制された。一方、雌性ラットでは 8-OH-DPAT を高用量 (3 mg/kg, i.p.) 投与したにもかかわらず、LTP 形成の抑制はみられなかった (Fig.20)。

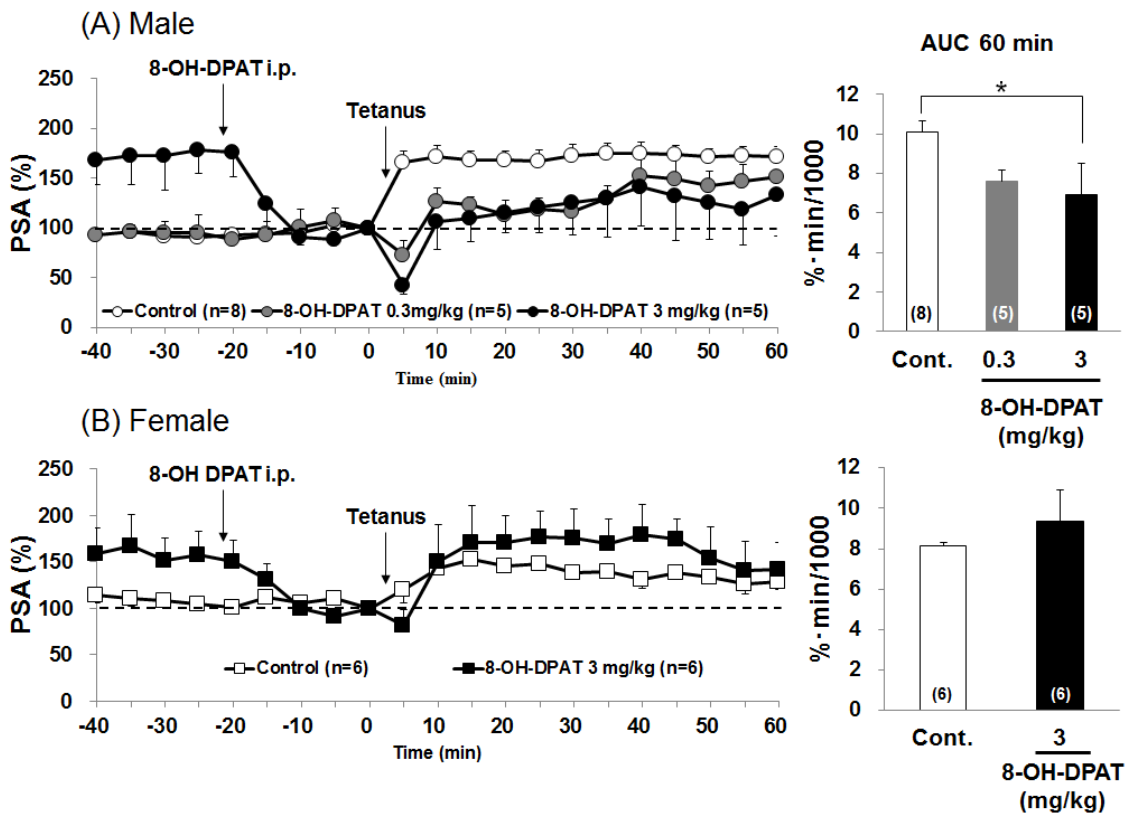


Fig.20. Effects of 8-OH-DPAT on LTP Induction in the CA1 Field in Male (A) and Female (B) Rats under Anesthesia

Time-course responses (left) and the area under the curve (AUC) of the population spike amplitudes (PSA) (right). 8-OH-DPAT was administered 20 min before tetanus. Control: group without 8-OH-DPAT administration. Data are expressed as mean \pm SEM. The numbers of rats tested are shown in parentheses or within each column. * $p < 0.05$.

第3節 考察

雄性ラットの海馬 CA1 領域における長期増強 (LTP) 形成は、文脈的恐怖条件付け (CFC) および正中縫線核刺激によって抑制された。このようなシナプス可塑性の抑制は、雌性ラットではみられなかった。雌雄ラットでみられた CFC によるシナプス応答と正中縫線核刺激によるシナプス可塑的变化が一致した事実は、正中縫線核-海馬 5-HT 作動性神経系が情動ストレス応答の性差に関与していることを裏付けるものである。このことは、正中縫線核を破壊された雄性ラットでは雌性ラットと同様に CFC によるすくみ行動発現率が低下し、低不安様状態を示した結果 (第1章) によっても支持される。言い換えると、本章の結果は、正中縫線核-海馬 5-HT 作動性神経系が雌性ラットにおける低不安様状態に関与していることを強く示唆する。したがって、正中縫線核-海馬 5-HT 作動性神経系は、情動ストレスに対する行動ならびにシナプス応答の性差に重要な調節的役割を果たしていると考えられる。

Tada らは⁷⁰⁾ 雄性ラットの海馬 CA1 領域の錐体ニューロンの自発発火が CFC により減弱することを報告している。実際、本実験でも CFC により雄性ラットの誘発集合電位 (PSA) は若干低下する傾向がみられた。しかしながら、雌性ラットでは CFC による PSA の変化は認められなかった (Fig.16)。したがって、雄性ラットでは CFC によって LTP を誘導するシナプス伝達効率の閾値が変化し、結果として LTP 形成の抑制を引き起こしていると考えられる。さらに第1章で明らかにしたように、雄性ラットでみられた CFC による海馬 CA1 領域の 5-HT 遊離量の上昇は、雌性ラットでは認められなかった。すなわち、情動ストレスに応答する 5-HT 作動性神経活動の変化には性差が存在する。第1章および本章での結果から、シナプス可塑的变化の性差が恐怖ストレスに対する適応機構として機能するためには、5-HT 作動性神経系による調節機構が関与している可能性が考えられる。

本章の実験結果から、5-HT_{1A}受容体を介した海馬CA1領域のシナプス可塑的变化には性差が存在することが明らかとなった。雄性ラットでは、5-HT_{1A}

受容体部分作動薬であるタンドスピロンによってLTP形成が抑制され、5-HT_{1A}受容体選択的拮抗薬であるWAY-100135によりシナプス可塑性の抑制が解除された。また、5-HT_{1A}受容体選択的作動薬の8-OH-DPATによってもLTP形成が抑制された。これら結果は、5-HT_{1A}受容体刺激により海馬CA1領域のLTP形成が抑制されることを強く示すものである。したがって、雄性ラットにおける正中縫線核-海馬5-HT作動性神経系は、5-HT_{1A}受容体を介した情動ストレスに対するシナプス応答機構に重要な役割を有している可能性がある。一方、雌性ラットでは、5-HT_{1A}受容体によるシナプス可塑性の抑制は認められなかった。すなわち、5-HT_{1A}受容体を介したシナプス応答には性差が存在する。その詳細なメカニズムについては不明であるが、一つの可能性として、正中縫線核に存在する5-HT_{1A}受容体の感受性の相違が考えられる。海馬における5-HTの合成・遊離は、縫線核の5-HT細胞体あるいは樹状突起に存在する5-HT_{1A}自己受容体により抑制的に制御されている。⁶⁰⁾ Dominguezらは正中縫線核の5-HT作動性神経活性は生得的恐怖ストレスであるEPMにより抑制されることを明らかにした。⁷¹⁾ Rozeskeらはラットの尾部に電気刺激を与えることにより、背側縫線核の5-HT_{1A}受容体機能が抑制されることを報告している。⁷²⁾ したがって、恐怖ストレスに対する5-HT_{1A}自己受容体の感受性が雌雄ラットでは異なっており、その相違が5-HT作動性神経による情動調節機構に影響を与えているのかもしれない。また、第1章において正中縫線核の5-HT陽性細胞数および5-HT組織量は雌性ラットの方が雄性ラットよりも高値を示すことを明らかにした。これらの組織学的検討結果により、雌性ラットでは5-HT_{1A}受容体による抑制的な制御機構がより強く生じている可能性が考えられる。すなわち、情動ストレス応答の性差は、5-HT_{1A}受容体を介した正中縫線核-海馬5-HT作動性神経系調節機構の相違によることが示唆された。

一方、恐怖ストレスにより海馬の後シナプス5-HT_{1A}受容体の機能的変化が生じている可能性も考えられる。Schillerらは、雌性ラットでは雄性ラットに比べて後シナプス5-HT_{1A}受容体への5-HT結合能が低いことを報告してい

る。彼らはこの結果に基づき、後シナプス5-HT_{1A}受容体の結合能の差が海馬依存性の行動応答の性差に関連があるのではないかと推論している。⁷³⁾ また、ストレス曝露により雄性ラットでは海馬5-HT_{1A}受容体mRNAの発現が増加するが、雌性ラットでは逆に減少するという報告もある。^{22,23)} これらの知見から雌性ラットでは、恐怖ストレスにより後シナプス5-HT_{1A}受容体のダウンレギュレーションが誘導され、5-HT_{1A}受容体を介したシナプス可塑性の抑制機能が減弱していることが考えられる。5-HT_{1A}受容体はLTP形成に重要な役割を果たすN-メチル-D-アスパラギン酸 (N-methyl-D-aspartate: NMDA) 受容体との相互作用により、情動応答に関わる5-HT作動性神経による調節機構に関与していることが知られている。^{74,75)} 例えば5-HT_{1A}受容体刺激により、後シナプスのK⁺透過性が増加し過分極を生じる。5-HT_{1A}受容体刺激により生じた過分極はNMDA受容体に結合したMg²⁺の離脱を抑制しNMDA依存性のLTP形成を抑制する。⁷⁶⁻⁷⁹⁾ したがって、後シナプス5-HT_{1A}受容体の感受性の相違が、5-HT_{1A}受容体-NMDA受容体の相互作用に影響を与え、結果的に異なったシナプス応答を引き起こしているのかもしれない。言い換えると、雌性ラットでみられた情動行動あるいはシナプス応答の変容は、正中縫線核の5-HT_{1A}受容体の感受性が雄性よりも高い、あるいは後シナプス5-HT_{1A}受容体の感受性が雄性よりも低いことに起因している可能性が示唆された (Fig. 21).

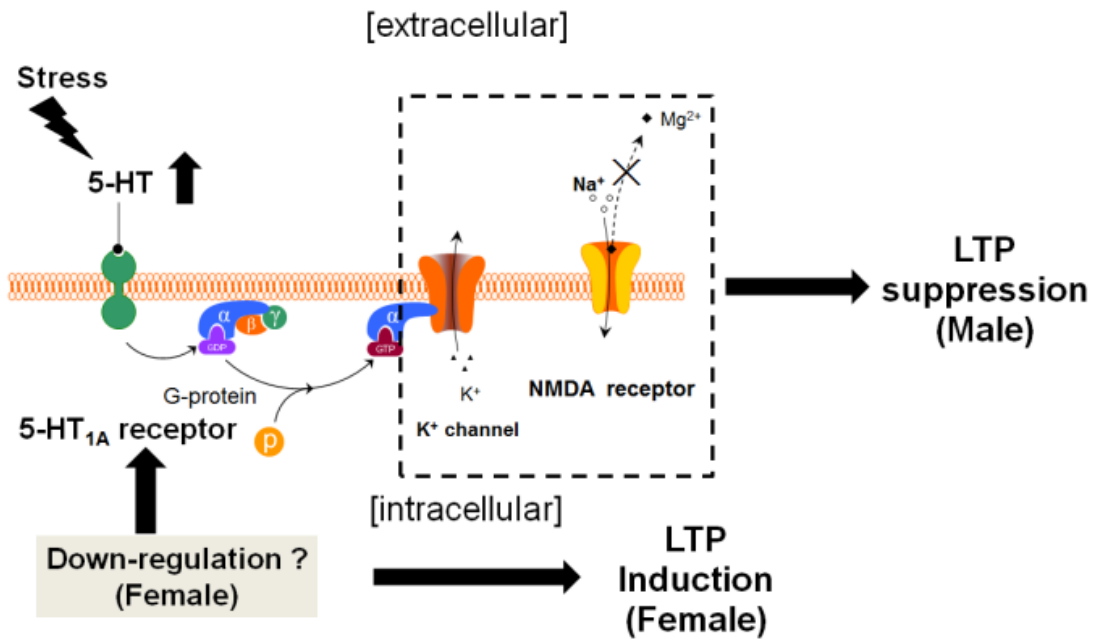


Fig.21. Hypothesis of the Mechanism of Gender Differences underlying Hippocampal Synaptic Plasticity Mediated via 5-HT_{1A} Receptors in Response to Fear Stress

In male rats, stress-induced increases in endogenous 5-HT reduce excitatory postsynaptic potentials by eliciting a 5-HT_{1A} receptor-mediated increase in potassium conductance. Thus, activation of postsynaptic 5-HT_{1A} receptors could impair LTP induction at the NMDA dependent synapse. In female rats, due to lack of increases in 5-HT release, and probably due to down-regulation of postsynaptic 5-HT_{1A} receptors, LTP suppression did not occur after stress exposure.

第3章 情動ストレス応答の性差におけるエストロゲンの関与

女性では下垂体から分泌される卵胞刺激ホルモンと黄体形成ホルモンの量および比率の周期的な変化によって月経周期が形成され、身体的な周期変動が形成されている。この周期的変動は情動にも大きく影響していることが指摘されている。例えば、女性が不安・うつなどの精神症状を訴えるのは閉経期周辺、いわゆる更年期に多いとされている。また、排卵から月経開始までの間に不安・うつなどの精神症状や睡眠障害などを示す「月経前症候群」が知られている。さらに、周産期に気分障害の発症率が増加する「マタニティ・ブルー」と呼ばれる現象が存在する。このような女性特有の周期性を伴う情動に関する問題はエストロゲンやプロゲステロンなどの卵巣ホルモンの関与が考えられる。これに対して、男性では情動に関する問題に周期性はみられない。それは、男性の脳では精巣から大量のテストステロンが分泌される「アンドロゲン・シャワー」と呼ばれる現象が胎生期にみられ、これによって女性のような周期性を失うためと考えられている。このような脳内における性ホルモン、特に女性ホルモンによる影響が、精神神経疾患に対する脆弱性や罹患率における性差などと関連している可能性が推測される。

ラットの皮質-辺縁系神経回路は離乳期前後に相当する生後 2~3 週齢時に急速に発達し、ニューロン分化やシナプス形成がみられる。しかし、情動調節に関わる脳部位の発達は各部位によって異なる。例えば、感覚入力部位である扁桃体は生後 2 週齢時に成熟するのに対して、海馬および皮質は 2 週齢時以降に成熟する。⁸⁰⁾ また、シナプス形成に対して調節的役割を担っている 5-HT 作動性神経の受容体には、この時期に細胞内情報伝達系を介した機能的変化が生じることが知られている。^{81,82)} 例えば、皮質錐体細胞において、2 週齢時では 5-HT によって脱分極が生じるが 3 週齢時では過分極に転じる。⁸³⁾ 3 週齢時に嫌悪ストレスを与えた群 (3W-FS) の成熟期における腹側海馬では 5-HT_{1A} 受容体数が減少しており、⁸⁴⁾ 内側前頭前野では 5-HT_{1A} 受容体の機能が低下することも報告されている。⁸⁵⁾ 当研究室の先行

研究において 3W-FS 群では成熟後、正中縫線核での 5-HT 陽性細胞が減少していることを報告した。^{47,57)} また、雄性ラットでは正中縫線核の 5-HT 陽性細胞が 2 週齢時から 3 週齢時にかけて一過性で顕著な成熟を示すのに対して、雌性ラットでも 3 週齢時に発現のピークを迎えるが、その成熟勾配は雄性ラットに比べて緩やかである。⁵⁷⁾ このように正中縫線核における 5-HT 陽性細胞を指標とした 5-HT 作動性神経系の発達・成熟に関しても性差が存在する。さらに、文脈的恐怖条件付け (CFC) 試験におけるすくみ行動発現率は、雄性ラットでは 2 週齢時に嫌悪ストレスを与えた群 (2W-FS) で低下するが雌性ラットでは 3W-FS 群で上昇する。^{37,57)} このように 5-HT 作動性神経系の発達臨界期である 2~3 週齢時にストレスを与えると成熟期の情動応答が変容するという我々の実験結果を基にすると、雌性ラットでは 3 週齢時が 5-HT 作動性神経系の発達にとって、重要な時期であることが考えられる。

このように、5-HT 作動性神経系の発達には臨界期が存在する。さらに、5-HT_{1A} 受容体の機能および発現はエストロゲンの調節下にあることが報告されている。以上のことから、情動ストレス応答の性差におけるエストロゲンの関与を検討することは重要であると考えられる。そこで本章では、情動ストレス応答に対するエストロゲンの影響を追究するために、卵巣摘出術 (OVX: ovariectomy) を施したラットを用いて行動学的検討を行った。

第 1 節 実験方法

1 実験動物および飼育条件

第 1 章第 1 節 1 に準じた。

1-1 卵巢摘出ラットの作成

生後 3 週齢 (3W-OVX) または 8 週齢 (8W-OVX) のラットに対し、ペントバルビタール (60 mg/kg, i.p.) (共立製薬, 東京) 麻酔下にて卵巢摘出術 (OVX) を行った。下腹部をポピドンヨード (Meiji Seika ファルマ, 東京) で消毒後, 正中切開し膀胱および卵管を露出させた。卵管の先端にある卵巢を結紮・切除後, 閉腹した。偽手術群は卵巢の結紮・切除以外, 卵巢摘出ラットと同様の処置を行った。ラットは成熟後 (11~14 週齢) 実験に用いた。実験終了後, 開腹して卵巢摘出の確認を目視にて行った (Fig.22)。

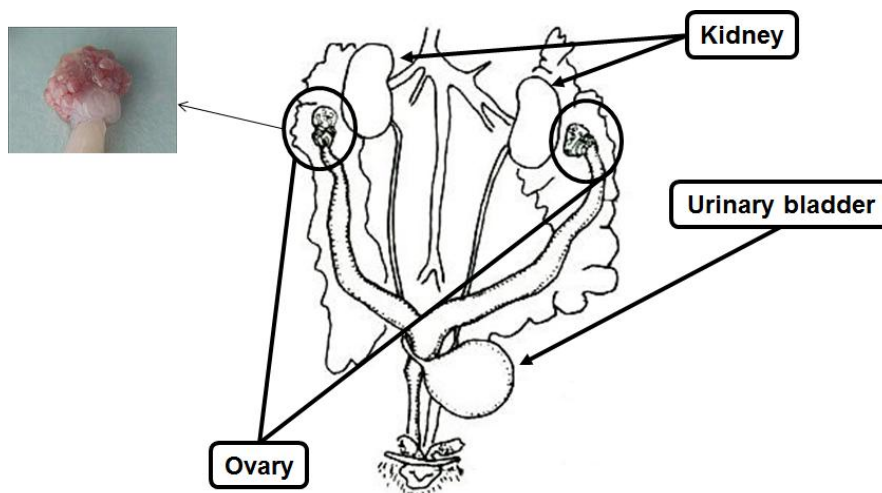


Fig.22. The Genitals in Female Rats

2 行動学的検討

第 1 章第 1 節 3-2 にしたがって文脈的恐怖条件付け試験を行った。

3 統計処理

第 1 章第 1 節 6 に準じた。

第2節 実験結果

1 文脈的恐怖条件付け試験における情動ストレス応答への卵巣摘出の影響

3W-OVX 群は偽手術群 (sham) に比べてすくみ行動発現率の上昇傾向, すなわち不安様状態にある傾向がみられた. これに対し 8W-OVX 群では偽手術群と比べて, 変化が認められなかった (Fig.23).

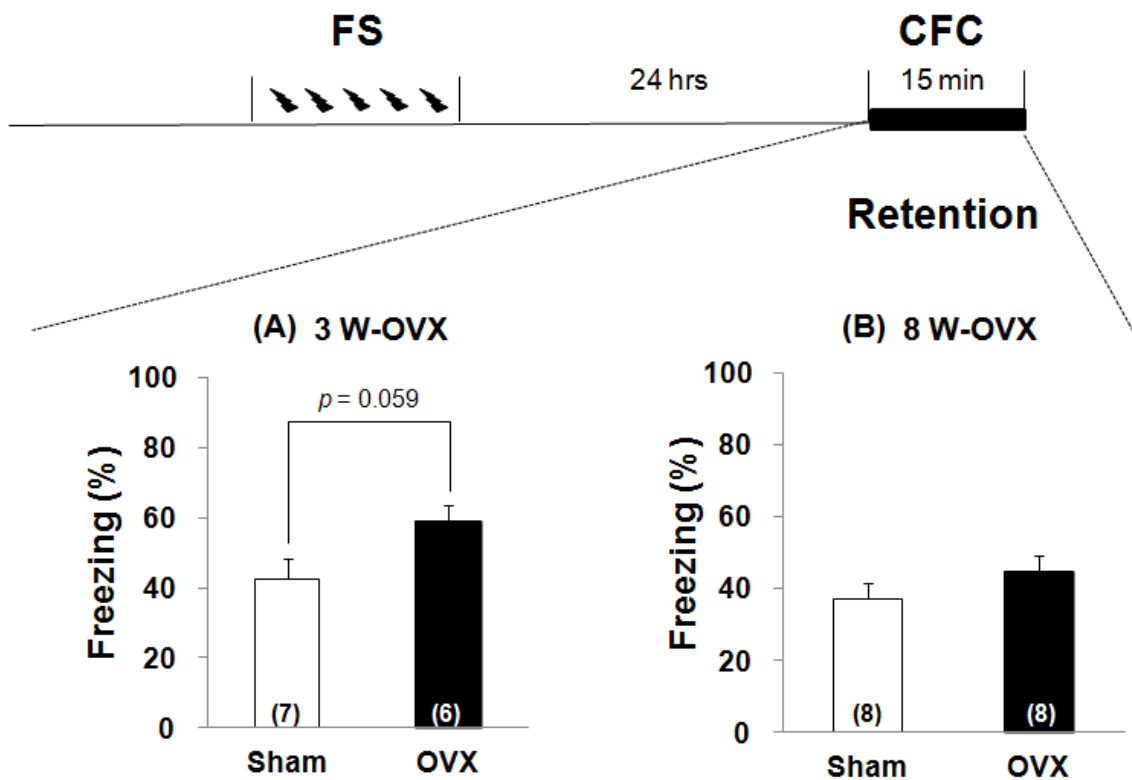


Fig.23. Effects of Ovariectomy (OVX) on CFC-induced Freezing Behaviors

Freezing behavior during exposure to CFC (retention period) in OVX rats. (A): % of freezing during CFC in OVX at post-natal 3 weeks group. (B): % of freezing during CFC in OVX at post-natal 8 weeks group. Data are expressed as mean \pm SEM. The numbers of rats tested are shown in parentheses or within each column.

第3節 考察

本章ではエストロゲンの情動ストレス応答に対する影響について、卵巢摘出 (OVX) ラットを用いて検討を行った。文脈的恐怖条件付け試験において 3W-OVX 群では、すくみ行動の発現率に上昇傾向がみられたのに対して、8W-OVX 群では偽手術群との間に、有意差が認められなかった。この 8W-OVX 群において、不安様行動が認められなかったという結果は先行研究⁸⁶⁾と一致する。この結果から、エストロゲンの不安様行動に対する影響は、主に神経系の発達時期である幼若期に限定される可能性が考えられた。

エストロゲンと情動との関連については、いくつかの臨床研究に基づく報告がある。例えば、乳がん治療に使用されるタモキシフェン (ノルバデックス[®], タスオミン[®]) は抗エストロゲン作用を有するが、副作用としてうつ症状が挙げられている。また、がんの手術・治療によるエストロゲン値の急激な低下によってもうつ症状が生じることが知られている。動物実験においては、情動ストレス応答における性差にエストロゲンやグルココルチコイドが関与している可能性が指摘されている。実際、雄性ラットにおける恐怖条件付けはグルココルチコイドに依存しているが、雌性ラットではエストロゲンによって恐怖記憶の獲得能が減弱するという報告がある。^{87,88)} また、卵巢ホルモンは高架式十時迷路試験^{89,90)} またはオープンフィールド試験⁹¹⁾ における不安様行動に影響を与える可能性が報告されている。さらに、Toufexis らはエストロゲン受容体作動薬が雌性ラットにおける恐怖条件付けを阻害すると報告している。⁹²⁾ Gupta らは卵巢摘出ラットにエストロゲンを補充すると雌性偽手術ラットと同様のすくみ行動発現率を示したと報告している。⁸⁶⁾ これらの報告は、雌性ラットにおけるエストロゲンの存在が情動ストレス応答に関与している可能性を示している。

しかしながら、エストロゲンを補充した際の抗不安・抗うつ効果の評価は必ずしも一致していない。例えば、更年期障害に起因する精神症状に対してホルモン補充療法は有効とされているが、無効または不安を増大させるとの

報告もある。⁹³⁾ 動物実験においても、上述のGuptaらの報告のようにエストロゲンにより不安・うつ状態を減少させると多くの報告がなされているが、相反する報告もある。^{94,95)} Tomiharaらはエストロゲンが抗不安作用と不安惹起作用の両方を有するのではないかと考察している。⁹⁶⁾ このように、エストロゲンの不安やうつに対する効果に関しては不明な点も多く、さらなる追究が必要である。

当研究室では、情動ストレス応答における「神経系の発達」の重要性に着目して研究を進めてきた。例えば、雄性ラットの3W-FS群では、対照群と同様にタンドスピロンによる海馬における長期増強 (LTP) 形成の抑制が認められたが、2W-FS群では認められなかった。すなわち、成熟期における正常な情動ストレス応答の確立には、雄性ラットにおいては2週齢時が重要な発達臨界期であり、それには5-HT_{1A}受容体応答性の変化が関与していることを明らかにした。⁹⁷⁾ 同様の現象について、内側前頭前野においても報告している。例えば、8-OH-DPAT による内側前頭前野におけるシナプス伝達の抑制は2W-FS群では認められない。⁹⁸⁾ また、成熟期ラットの内側前頭前野におけるGABA作動性神経への5-HT_{1A}受容体の反応性に関する研究では、成熟期の内側前頭前野での5-HT_{1A}受容体によるGABA作動性神経の抑制が、幼若期ストレスによって減弱することを明らかにした。¹⁰⁰⁾ 5-HT作動性神経系の発達臨界期のラットにストレスを与えると成熟期の情動応答が変容するという当研究室における先行研究、および8週齢時の卵巣摘出による影響は認められなかったという本章の結果を考え合わせると、情動応答の性差には5-HT作動性神経系の発達を含めた情動調節機構に対するエストロゲンの関与が考えられる。すなわち、エストロゲンは主に5-HT_{1A}受容体を含む5-HT作動性神経系が発達する時期に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

本章では、縫線核の5-HT陽性細胞の発達に関する先行研究⁵⁷⁾ から雌性ラットの5-HT作動性神経系の発達に重要であると考えられる3週齢時に卵巣摘出術を施して検討を行った。しかし、卵巣摘出处置によってすくみ行動発現率の上昇傾向は認められたが有意差はなかった。この結果は雌性ラット

において縫線核 5-HT 作動性神経の発達においては 3 週齢時が重要な時期であるが、情動表出に関わる扁桃体、海馬など他の脳部位の発達とは必ずしも一致していない可能性を示している。すなわち、各脳部位に存在する 5-HT 作動性神経系は、ある週齢で同時に発達するのではなく、部位ごとに段階的に発達すること、その発達臨界期には性差が存在することが考えられた。エストロゲンはこのような時間的・空間的な 5-HT 作動性神経系の発達に何らかの役割を果たしているのかもしれない。

総 括

ストレスは不安障害やうつ病などの精神疾患の原因となる。また、ストレスに起因する精神疾患には性差が存在することが知られている。ストレス関連性精神疾患の治療薬として 5-HT 作動性神経系を標的とした薬物が多く開発されており、特に 5-HT_{1A} 受容体部分作動薬であるタンドスピロンは抗不安薬として臨床で用いられている。ヒトおよびげっ歯類における 5-HT_{1A} 受容体の機能・発現等についての報告は多く存在し、性差に関する報告もある。一方、情動ストレス応答には海馬や扁桃体を含む、皮質-辺縁系の関与が知られており、特に海馬は記憶に基づく情動ストレス応答において重要な役割を果たしている。情動ストレス応答における海馬の役割については多くの研究がなされているが、海馬に 5-HT 作動性神経系を投射している起始核である正中縫線核との関連についての報告は少なく、特に性差という視点からの解明はなされていない。

本研究では情動ストレスに対する行動および海馬シナプス応答における性差について、正中縫線核-海馬 5-HT 作動性神経系の 5-HT_{1A} 受容体による調節的役割に着目して実験を行った。

第 1 章では、情動ストレス応答の性差における 5-HT 作動性神経系の関与について検討し、以下の結果を得た。

- ① 行動学的検討において、雄性ラットよりも、雌性ラットの方が低不安様状態を示した。また、5-HT 作動性神経系を擾乱した雄性ラットは雌性ラットと同様に低不安様状態を示した。
- ② 神経化学的検討において雄性ラットは文脈的恐怖条件付け (CFC) により海馬 CA1 領域における細胞外 5-HT および GABA 濃度の上昇が認められたが、雌性ラットではこの様な変化は認められなかつ

た。また、細胞外グルタミン酸濃度は雌雄ラット共に上昇は認められなかった。

- ③ 組織学的検討において海馬および正中縫線核における 5-HT 組織量は雄性ラットよりも雌性ラットの方が有意に高値を示した。さらに正中縫線核における 5-HT 陽性細胞数についても雄性ラットよりも雌性ラットの方が有意に高値を示した。

第 2 章では、情動ストレス応答の性差と海馬シナプスの可塑性の関係について覚醒下あるいは麻酔下で検討し、以下の結果を得た。

- ① 雄性ラットでは CFC により海馬 CA1 領域の長期増強 (LTP) 形成が抑制されたのに対して、雌性ラットでは LTP 形成の抑制は認められなかった。
- ② 雄性ラットでは正中縫線核刺激により海馬 CA1 領域の LTP 形成が刺激強度依存的に抑制されたのに対して、雌性ラットでは LTP 形成の抑制は認められなかった。
- ③ 雄性ラットでは 5-HT_{1A} 受容体作動薬であるタンドスピロンまたは 8-OH-DPAT 投与により海馬 CA1 領域の LTP 形成が抑制されたが、雌性ラットでは LTP 形成の抑制は認められなかった。雄性ラットにおいてみられたタンドスピロン投与による LTP 形成抑制は 5-HT_{1A} 受容体選択的拮抗薬である WAY-100135 により解除された。

第 3 章では情動ストレス応答の性差におけるエストロゲンの関与について検討し、以下の結果を得た。

- ① CFC 試験において 3 週齢時に卵巣摘出处置をした群は偽手術群と比較してすくみ行動発現率が増加する傾向が認められた。
- ② 8 週齢時に卵巣摘出处置をした群と偽手術群との間にはすくみ行動発現率の有意差は認められなかった。

本研究によりラットにおける情動ストレス応答には性差が存在することが明らかとなった。また、雄性ラットにおいて、5-HT 作動性神経系の化学的破壊や正中縫線核の電氣的破壊によって生じた行動応答が、雌性ラットでみられた低不安様行動と一致した結果から、情動ストレス応答でみられた性差には正中縫線核-5-HT 作動性神経系が関与していると考えられた。CFC 中の海馬 CA1 領域における細胞外 5-HT および GABA 濃度の変化に性差が認められた要因は、正中縫線核-海馬 5-HT 作動性神経系に存在する 5-HT_{1A} 受容体の機能的相違であると推測された。さらに、本実験では海馬および正中縫線核の 5-HT 組織量ならびに正中縫線核の 5-HT 陽性細胞数は、雌性ラットは雄性ラットより高値を示していた。その明確な機能的意味は不明であるが、ストレス負荷時の情動調節における正中縫線核や海馬 5-HT_{1A} 受容体機能変化あるいは扁桃体や大脳皮質の GABA 作動性神経系を含めた情動神経回路の性差を反映している可能性が考えられた。本研究から得られた結果から考えられる仮説を Fig.24 に示す。

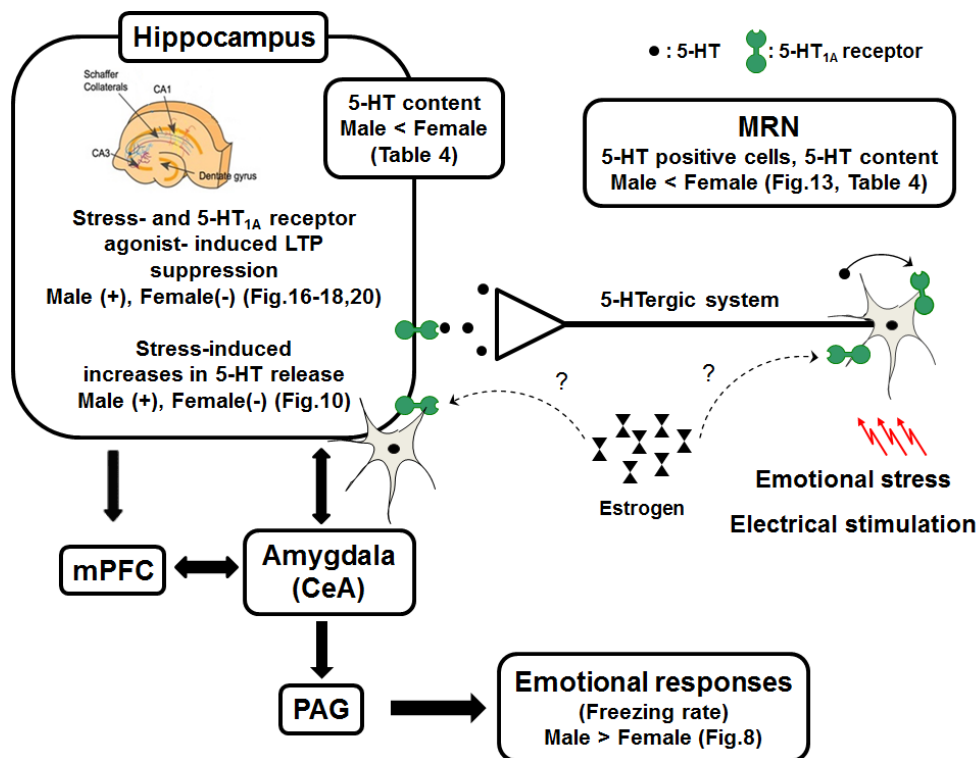


Fig.24. The Hypothesis of the Gender Differences in Expression of Emotional Stress Responses

本研究では、雄性ラットにおいて、CFC に対する行動応答であるすくみ行動が、海馬における 5-HT 放出と LTP 形成の抑制というシナプス応答の変化を伴っていることを明らかにした。また、正中縫線核刺激および 5-HT_{1A} 受容体刺激によって LTP 形成が抑制されたのに対して、雌性ラットではこのような変化は認められなかった。このことから、情動ストレス応答でみられた性差には正中縫線核-海馬における 5-HT_{1A} 受容体を含む 5-HT 作動性神経系が関与することが明らかとなった。言い換えれば、正中縫線核に存在する 5-HT_{1A} 受容体の機能的相違が情動ストレスに対する脆弱性や抵抗性に関与しており、精神疾患における罹患率の性差に影響を及ぼしている可能性が考えられた。

本研究では海馬に焦点を当てて、実験を行った。しかし、皮質-辺縁系を構成する扁桃体も恐怖条件付けに重要な役割を果たす脳部位であり、海馬との関連も深い。特に、扁桃体基底外側核 (basolateral nucleus of the amygdala: BLA) は恐怖記憶の想起の際に活性化する。¹⁰⁰⁾ BLA の性差について Mitsushima らは BLA の細胞外 5-HT 濃度の基礎値およびストレス応答には性差があり、ラットにおける性特有の情動ストレス応答に関与している可能性を指摘している。⁵²⁾ 本研究では、海馬シナプス可塑性における BLA の関与については検討していない。当研究室は、雄性ラットにおける海馬 CA1 領域でのメタ可塑性 (シナプス可塑性の制御) に対する扁桃体の関与について報告しているが、³⁶⁾ 情動ストレス応答における性差について評価するためには扁桃体を含めた神経系からのさらなる追究が必要である。

これまで当研究室は、情動ストレス応答に関わる要因について海馬-内側前頭前野回路や海馬-扁桃体回路などの様々な神経回路やその発達臨界期という視点から研究を重ねてきた。本研究では新たに、情動ストレス応答でみられた性差は正中縫線核-海馬 5-HT 作動性神経系のシナプス可塑性の変化と関連していること、正中縫線核-5-HT 作動性神経系の調節機構の性差には 5-HT_{1A} 受容体に関与していることを明らかにした。また、第 3 章の実験結果より 5-HT 作動性神経の発達を含めた情動調節機構にエストロゲンが関

与している可能性が示唆されたことから、エストロゲンは雌性ラットにおけるストレス起因性の恐怖の記憶や学習に障害的に働く可能性が考えられた。すなわち、神経回路および発達臨界期という2つの視点に加えて、性差という要因も情動ストレス応答について追究する上で重要な役割を果たすことを明らかにした (Fig.25)。

精神疾患の罹患率に性差が存在することは知られている。近年では同じ疾患でもリスクファクターや医薬品の効果に性差が存在することが報告されている。しかしながら、これまでの医学・薬学の分野では成人男性を標準として、動物実験では雄性動物が主に使用されてきた。

情動制御機構における性差を、5-HT 作動性神経系から明らかにした本研究は、精神疾患の病態解明の一助となると考える。本研究を基に様々な疾患を「性差」という視点から追究することにより、さらに、個体差も視野に入れたテーラーメイド医療などの、多様で新しい治療戦略の構築につながることで期待される。

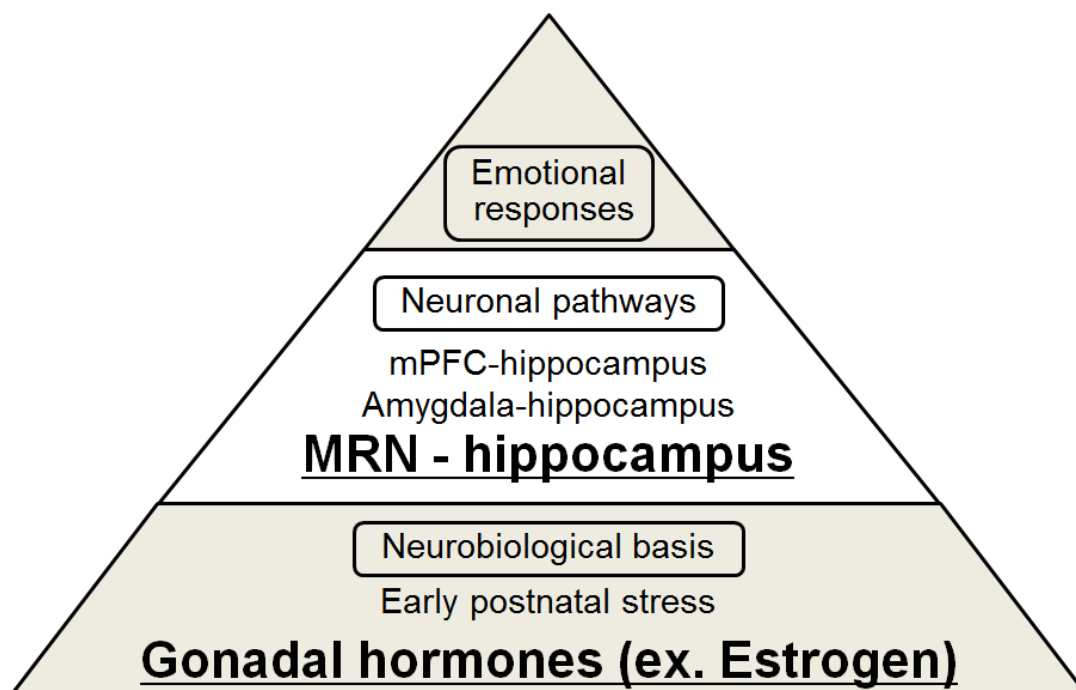


Fig.25. Hypothetical Basis of Gender-specific Emotional Regulation

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究に終始懇切丁寧なる御指導、御鞭撻を賜りました北海道医療大学大学院薬学研究科薬理学分野 富樫廣子教授に深く御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、終始細部にわたる丁寧な御指導と有益な御教授を賜りました北海道医療大学大学院薬学研究科薬理学分野 松本眞知子元准教授に心より感謝致します。

本研究に際し、御助言、御支援を頂きました北海道医療大学大学院薬学研究科薬理学分野 柳川芳毅講師ならびに北海道医療大学薬学部薬理学講座(病態生理学) 平出幸子助教をはじめ、御協力頂きました教室員の皆様に謝意を表します。

本研究を遂行するにあたり、多大なる御助言、御協力を賜りました北海道医療大学大学院薬学研究科薬理学分野 島村佳一教授ならびに北海道医療大学薬学部薬理学講座(臨床薬理毒理学) 鹿内浩樹助教および北海道医療大学薬学部薬学教育支援室 木村真一准教授に厚く御礼申し上げます。

最後に、本研究に際し、御親切な御指導を賜りました北海道医療大学大学院薬学研究科薬理学分野 平藤雅彦教授ならびに北海道医療大学大学院薬学研究科生化学分野 青木隆教授、北海道医療大学大学院薬学研究科衛生化学分野 増田園子教授をはじめ、御協力いただきました北海道医療大学の教職員の皆様に深く感謝致します。

平成 26 年 3 月

北海道医療大学大学院薬学研究科

井上 純孝

引用文献

- 1) Kendler K.S., Thornton L.M., Gardner C.O., Genetic risk, number of previous depressive episodes, and stressful life events in predicting onset of major depression. *Am. J. Psychiatry.*, **158**, 582-586 (2001).
- 2) Stroud C.B., Davila J., Moyer A., The relationship between stress and depression in first onsets versus recurrences: a meta-analytic review. *J. Abnorm. Psychol.*, **117**, 206-213 (2008).
- 3) Kessler R.C., Epidemiology of women and depression. *J. Affect Disord.*, **74**, 5-13 (2003).
- 4) Marcus S.M., Young E.A., Kerber K.B., Kornstein S., Farabaugh A.H., Mitchell J., Wisniewski S.R., Balasubramani G.K., Trivedi M.H., Rush A.J., Gender differences in depression: findings from the STAR*D study. *J. Affect Disord.*, **87**, 141-150 (2005).
- 5) Piccinelli M., Wilkinson G., Gender differences in depression. Critical review. *Br. J. Psychiatry*, **177**, 486-492 (2000).
- 6) Arnold L.E., Sex differences in ADHD: conference summary. *J. Abnorm. Child Psychol.*, **24**, 555-569 (1996).
- 7) Brady K.T., Randall C.L., Gender differences in substance use disorders. *Psychiatr. Clin. North Am.*, **22**, 241-252 (1999).
- 8) Keenan K., Loeber R., Green S., Conduct disorder in girls: a review of the literature. *Clin. Child Fam. Psychol. Rev.*, **2**, 3-19 (1999).
- 9) Kuehner C., Gender differences in unipolar depression: an update of epidemiological findings and possible explanations. *Acta Psychiatr. Scand.*, **108**, 163-174 (2003).
- 10) Pigott T.A., Gender differences in the epidemiology and treatment of anxiety disorders. *J. Clin. Psychiatry*, **60**, 4-15 (1999).

- 11) Breslau N., Davis G.C., Andreski P, Peterson EL, Schultz LR. Sex differences in posttraumatic stress disorder. *Arch. Gen. Psychiatry*, **54**, 1044-1048 (1997).
- 12) Frans O., Rimmö P.A., Aberg L., Fredrikson M., Trauma exposure and post-traumatic stress disorder in the general population. *Acta Psychiatr. Scand.*, **111**, 291-299 (2005).
- 13) Kessler R.C., Sonnega A., Bromet E., Hughes M., Nelson C.B., Posttraumatic stress disorder in the National Comorbidity Survey. *Arch. Gen. Psychiatry*, **52**, 1048-1060 (1995).
- 14) Jans L.A., Riedel W.J., Markus C.R., Blokland A., Serotonergic vulnerability and depression: assumptions, experimental evidence and implications. *Mol. Psychiatry.*, **12**, 522-543 (2007).
- 15) Heninger G.R., Charney D.S., Sternberg D.E., Serotonergic function in depression. Prolactin response to intravenous tryptophan in depressed patients and healthy subjects. *Arch. Gen. Psychiatry*, **41**, 398-402 (1984).
- 16) Pytliak M., Vargová V., Mechírová V., Felšöci M., Serotonin receptors - from molecular biology to clinical applications. *Physiol. Res.*, **60**, 15-25 (2011).
- 17) Nichols D.E., Nichols C.D., Serotonin receptors. *Chem. Rev.*, **108**, 1614-1641 (2008).
- 18) Nishizawa S., Benkelfat C., Young S.N., Leyton M., Mzengeza S., de Montigny C., Blier P., Diksic M., Differences between males and females in rates of serotonin synthesis in human brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 5308-5313 (1997).
- 19) Jovanovic H., Lundberg J., Karlsson P., Cerin A., Saijo T., Varrone A., Halldin C., Nordström A.L., Sex differences in the serotonin 1A receptor and serotonin transporter binding in the human brain measured by PET. *Neuroimage*, **39**, 1408-1419 (2008).

- 20) 佐久間康夫, 脳の性分化 *日本生理学雑誌*, **68**, 355-367 (2006).
- 21) Waddell J., Bangasser D.A., Shors T.J., The basolateral nucleus of the amygdala is necessary to induce the opposing effects of stressful experience on learning in males and females. *J. Neurosci.*, **28**, 5290-5294 (2008).
- 22) Bellido I., Gomez-Luque A., Garcia-Carrera P., Rius F., de la Cuesta F.S., Female rats show an increased sensibility to the forced swim test depressive-like stimulus in the hippocampus and frontal cortex 5-HT_{1A} receptors. *Neurosci. Lett.*, **350**, 145-148 (2003).
- 23) Drossopoulou G., Antoniou K., Kitraki E., Papathanasiou G., Papalexi E., Dalla C., Papadopoulou-Daifoti Z., Sex differences in behavioral, neurochemical and neuroendocrine effects induced by the forced swim test in rats. *Neuroscience*, **126**, 849-857 (2004).
- 24) McCarthy M.M., Konkle A.T., When is a sex difference not a sex difference? *Front. Neuroendocrinol.*, **26**, 85-102 (2005).
- 25) 森寿, 真鍋俊也, 渡辺雅彦, 岡野栄之, 宮川剛, 脳神経化学イラストレイテッド 改訂第2版, 羊土社, 東京 (2008).
- 26) Wyss JM, Swanson LW, Cowan WM. Evidence for an input to the molecular layer and the stratum granulosum of the dentate gyrus from the supramammillary region of the hypothalamus. *Anat. Embryol.*, **156**, 165-176 (1979).
- 27) Dent J.A., Galvin N.J., Stanfield B.B., Cowan W.M., The mode of termination of the hypothalamic projection to the dentate gyrus: an EM autoradiographic study. *Brain Res.*, **258**, 1-10 (1983).
- 28) Haglund L., Swanson L.W., Köhler C., The projection of the supramammillary nucleus to the hippocampal formation: an immunohistochemical and anterograde transport study with the lectin PHA-L in the rat. *J. Comp. Neurol.*, **229**, 171-185 (1984).

- 29) Barot S.K., Chung A., Kim J.J., Bernstein I.L.. Functional imaging of stimulus convergence in amygdalar neurons during Pavlovian fear conditioning. *PLOS One*, **4**, e6156 (2009).
- 30) Maren S., Pavlovian fear conditioning as a behavioral assay for hippocampus and amygdala function: cautions and caveats. *Eur. J. Neurosci.*, **28**, 1661-1666 (2008).
- 31) Kim J.J., Koo J.W., Lee H.J., Han J.S., Amygdalar inactivation blocks stress-induced impairments in hippocampal long-term potentiation and spatial memory. *J. Neurosci.*, **25**, 1532-1539 (2005).
- 32) Bliss T.V., Lomo T., Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J. Physiol.*, **232**, 331-356 (1973).
- 33) Bliss T.V., Gardner-Medwin A.R., Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the unanaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J. Physiol.*, **232**, 357-374 (1973).
- 34) Hirata R, Matsumoto M, Judo C, Yamaguchi T, Izumi T, Yoshioka M, Togashi H., Possible relationship between the stress-induced synaptic response and metaplasticity in the hippocampal CA1 field of freely moving rats. *Synapse*, **63**, 549-556 (2009).
- 35) Li Z, Zhou Q, Li L, Mao R, Wang M, Peng W, Dong Z, Xu L, Cao J. Effects of unconditioned and conditioned aversive stimuli in an intense fear conditioning paradigm on synaptic plasticity in the hippocampal CA1 area in vivo. *Hippocampus*, **15**, 815-24 (2005).
- 36) Hiraide S., Saito Y., Matsumoto M., Yanagawa Y., Ishikawa S., Kubo Y., Inoue S., Yoshioka M., Togashi H., Possible modulation of the amygdala on metaplasticity deficits in the hippocampal CA1 field in early postnatally stressed rats. *J. Pharmacol. Sci.*, **119**, 64-72 (2012).

- 37) 重堂智加, 恐怖記憶制御機構と発達臨界期ストレスに関する研究, 博士論文, (2011).
- 38) Rescorla R. A., Wagner A.R., A Theory of Pavlovian Conditioning: Variations in the Effectiveness of Reinforcement and Non-reinforcement. Classical Conditioning II. *Current Research and Theory*, Appleton-Century-Crofts, New York (1972).
- 39) Kida S., Fukushima H., Mamiya N., Mechanisms of reconsolidation and extinction of fear memory. *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi*, **29**, 125-133 (2009).
- 40) Sullivan G.M., Apergis J., Bush D.E., Johnson L.R., Hou M., Ledoux J.E., 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 (2004).
- 41) Sacchetti B., Lorenzini C.A., Baldi E., Tassoni G., Bucherelli C., Auditory thalamus, dorsal hippocampus, basolateral amygdala, and perirhinal cortex role in the consolidation of conditioned freezing to context and to acoustic conditioned stimulus in the rat. *J. Neurosci.*, **19**, 9570-9578 (1999).
- 42) Schmitz D., Empson R.M., Heinemann U., Serotonin and 8-OH-DPAT reduce excitatory transmission in rat hippocampal area CA1 via reduction in presumed presynaptic Ca²⁺ entry. *Brain Res.*, **701**, 249-254 (1995).
- 43) Katsurabayashi S., Kubota H., Tokutomi N., Akaike N., A distinct distribution of functional presynaptic 5-HT receptor subtypes on GABAergic nerve terminals projecting to single hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Neuropharmacology*, **44**, 1022-1030 (2003).
- 44) Schmitz D., Empson R.M., Heinemann U., Serotonin reduces inhibition via 5-HT_{1A} receptors in area CA1 of rat hippocampal slices *in vitro*. *J. Neurosci.*, **15**, 7217-7225 (1995).

- 45) Shen R.Y., Andrade R., 5-Hydroxytryptamine₂ receptor facilitates GABAergic neurotransmission in rat hippocampus. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **285**, 805-812 (1998).
- 46) McMahon L.L., Kauer J.A., Hippocampal interneurons are excited via serotonin-gated ion channels. *J. Neurophysiol.*, **78**, 2493-2502 (1997).
- 47) Konno K., Matsumoto M., Togashi H., Yamaguchi T., Izumi T., Watanabe M., Iwanaga T., Yoshioka M., Early postnatal stress affects the serotonergic function in the median raphe nuclei of adult rats. *Brain Res.*, **1172**, 60-66 (2007).
- 48) Shikanai H., Yoshida T., Konno K., Yamasaki M., Izumi T., Ohmura Y., Watanabe M., Yoshioka M., Distinct neurochemical and functional properties of GAD67-containing 5-HT neurons in the rat dorsal raphe nucleus. *J. Neurosci.*, **32**, 14415-14426 (2012).
- 49) Weintraub A., Singaravelu J., Bhatnagar S., Enduring and sex-specific effects of adolescent social isolation in rats on adult stress reactivity. *Brain Res.*, **1343**, 83-92 (2010).
- 50) Elliott B.M., Grunberg N.E., Effects of social and physical enrichment on open field activity differ in male and female Sprague-Dawley rats. *Behav. Brain Res.*, **165**, 187-196 (2005).
- 51) Nakamura K., Matsumoto M., Hikosaka O., Reward-dependent modulation of neuronal activity in the primate dorsal raphe nucleus. *J. Neurosci.*, **28**, 5331-5343 (2008).
- 52) Mitsushima D., Yamada K., Takase K., Funabashi T., Kimura F., Sex differences in the basolateral amygdala: the extracellular levels of serotonin and dopamine, and their responses to restraint stress in rats. *Eur. J. Neurosci.*, **24**, 3245-3254 (2006).

- 53) Phillips R.G., LeDoux J.E., Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behav. Neurosci.*, **106**, 274-285 (1992).
- 54) Shors J., Miesegaes G., Testosterone in utero and at birth dictates how stressful experience will affect learning in adulthood. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **99**, 13955-13960 (2002).
- 55) Sarter M., Bodewitz G., Stephens D.N., Attenuation of scopolamine-induced impairment of spontaneous alteration behaviour by antagonist but not inverse agonist and agonist beta-carbolines. *Psychopharmacology (Berl)*, **94**, 491-495 (1988).
- 56) Parada-Turska J., Turski W.A., Excitatory amino acid antagonists and memory: effect of drugs acting at N-methyl-D-aspartate receptors in learning and memory tasks. *Neuropharmacology*, **29**, 1111-1116 (1990).
- 57) 松崎広和, ラット情動応答に対する幼若期ストレスの影響における性差に関する研究, 修士論文, (2006).
- 58) Carlsson M., Svensson K., Eriksson E., Carlsson A., Rat brain serotonin: biochemical and functional evidence for a sex difference. *J. Neural Transm.*, **63**, 297-313 (1985).
- 59) Rosecrans J.A., Differences in brain area 5-hydroxytryptamine turnover and rearing behavior in rats and mice of both sexes. *Eur. J. Pharmacol.*, **9**, 379-382 (1970).
- 60) Simon N., Volicer L., Neonatal asphyxia in the rat: greater vulnerability of males and persistent effects on brain monoamine synthesis. *J. Neurochem.*, **26**, 893-900 (1976).
- 61) Haleem D.J., Kennett G.A., Curzon G., Hippocampal 5-hydroxytryptamine synthesis is greater in female rats than in males and more decreased by the 5-HT_{1A} agonist 8-OH-DPAT. *J. Neural Transm Gen. Sect.*, **79**, 93-101 (1990).

- 62) Haleem D.J., Raphe-Hippocampal Serotonin Neurotransmission In The Sex Related Differences of Adaptation to Stress: Focus on Serotonin-1A Receptor. *Curr. Neuropharmacol.*, **9**, 512-521 (2011).
- 63) Dilts R.P., Boadle-Biber M.C., Differential activation of the 5-hydroxytryptamine-containing neurons of the midbrain raphe of the rat in response to randomly presented inescapable sound. *Neurosci. Lett.*, **199**, 78-80 (1995).
- 64) Smith M.A., Makino S., Kvetnansky R., Post R.M., Stress and glucocorticoids affect the expression of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNAs in the hippocampus. *J. Neurosci.*, **15**, 1768-1777 (1995).
- 65) Thomas B., Ingrid N., Klaus E., Joachim S., Priming of long-term potentiation in mouse hippocampus by corticotropin-releasing factor and acute stress: Implications for hippocampus-dependent learning. *J. Neurosci.*, **22**, 3788-3794 (2002).
- 66) Seidenbecher T., Balschun D., Vogel D., Reymann K.G., Neuronal transmission of hippocampal CA1 neurones is modulated by corticotropin-like intermediate lobe peptide [CLIP; ACTH(18-39)]. *Peptides*, **14**, 1221-1224 (1993).
- 67) Diamond D.M., Bennett M.C., Fleshner M., Rose G.M., Inverted-U relationship between the level of peripheral corticosterone and the magnitude of hippocampal primed burst potentiation. *Hippocampus*, **2**, 421-430 (1992).
- 68) Shakesby A.C., Anwy I. R., Rowan M.J., Overcoming the effects of stress on synaptic plasticity in the intact hippocampus: rapid actions of serotonergic and antidepressant agents. *J. Neurosci.*, **22**, 3638-3644 (2002).

- 69) Hirata R., Togashi H., Matsumoto M., Yamaguchi T., Izumi T., Yoshioka M., Characterization of stress-induced suppression of long-term potentiation in the hippocampal CA1 field of freely moving rats. *Brain Res.*, **1226**, 27–32 (2008).
- 70) Tada K., Kasamo K., Suzuki T., Matsuzaki Y., Kojima T., Endogenous 5-HT inhibits firing activity of hippocampal CA1 pyramidal neurons during conditioned fear stress-induced freezing behavior through stimulating 5-HT_{1A} receptors. *Hippocampus*, **14**, 143-147 (2004).
- 71) Domínguez R., Cruz-Morales S.E., Carvalho M.C., Xavier M., Brandao M.L., Sex differences in serotonergic activity in dorsal and median raphe nucleus. *Physiol. Behav.*, **80**, 203-210 (2003).
- 72) Rozeske R.R., Evans A.K., Frank M.G., Watkins L.R., Lowry C.A., Maier S.F., Uncontrollable, but not controllable, stress desensitizes 5-HT_{1A} receptors in the dorsal raphe nucleus. *J. Neurosci.*, **31**, 14107-14115 (2011).
- 73) Schiller L., Jähkel M., Oehler J., The influence of sex and social isolation housing on pre- and postsynaptic 5-HT_{1A} receptors. *Brain Res.*, **1103**, 76-87 (2006).
- 74) Buwalda B., Kole M.H., Veenema A.H., Huininga M., de Boer S.F., Korte S.M., Koolhaas J.M.. Long-term effects of social stress on brain and behavior: a focus on hippocampal functioning. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **29**, 83-97 (2005).
- 75) Zhong P., Yuen E.Y., Yan Z., Modulation of neuronal excitability by serotonin-NMDA interactions in prefrontal cortex. *Mol. Cell Neurosci.*, **38**, 290-299 (2008).
- 76) Anwyl R., Neurophysiological actions of 5-hydroxytryptamine in the vertebrate nervous system. *Prog. Neurobiol.*, **35**, 451-468 (1990).

- 77) Colino A., Halliwell J.V., Differential modulation of three separate K-conductances in hippocampal CA1 neurons by serotonin. *Nature*, **328**, 73-77 (1987).
- 78) Corradetti R., Ballerini L., Pugliese A.M., Pepeu G., Serotonin blocks the long-term potentiation induced by primed burst stimulation in the CA1 region of rat hippocampal slices. *Neuroscience*, **46**, 511-518 (1992).
- 79) Eby G.A., Eby K.L., Rapid recovery from major depression using magnesium treatment. *Med. Hypotheses*, **67**, 362-370 (2006).
- 80) Kim J.H., Richardson R., The effect of temporary amygdala inactivation on extinction and reextinction of fear in the developing rat: unlearning as a potential mechanism for extinction early in development. *J. Neurosci.*, **28**, 1282-1290 (2008).
- 81) Zhang Z.W., Serotonin induces tonic firing in layer V pyramidal neurons of rat prefrontal cortex during postnatal development. *J. Neurosci.*, **23**, 3373-3384 (2003).
- 82) Béïque J.C., Chapin-Penick E.M., Mladenovic L., Andrade R., Serotonergic facilitation of synaptic activity in the developing rat prefrontal cortex. *J. Physiol.*, **556**, 739-754 (2004)
- 83) Béïque J.C., Campbell B., Perring P., Hamblin M.W., Walker P., Mladenovic L., Andrade R., Serotonergic regulation of membrane potential in developing rat prefrontal cortex: coordinated expression of 5-hydroxytryptamine (5-HT)_{1A}, 5-HT_{2A}, and 5-HT₇ receptors. *J. Neurosci.*, **24**, 4807-4817 (2004).
- 84) Matsuzaki H., Izumi T., Horinouchi T., Boku S., Inoue T., Yamaguchi T., Yoshida T., Matsumoto M., Togashi H., Miwa S., Koyama T., Yoshioka M., Juvenile stress attenuates the dorsal hippocampal postsynaptic 5-HT_{1A} receptor function in adult rats. *Psychopharmacology (Berl)*, **214**, 329-337 (2011).

- 85) Matsuzaki H., Izumi T., Matsumoto M., Togashi H., Yamaguchi T., Yoshida T., Watanabe M., Yoshioka M., Early postnatal stress affects 5-HT_{1A} receptor function in the medial prefrontal cortex in adult rats. *Eur. J. Pharmacol.*, **615**, 76-82 (2009).
- 86) Gupta R.R., Sen S., Diepenhorst L.L., Rudick C.N., Maren S., Estrogen modulates sexually dimorphic contextual fear conditioning and hippocampal long-term potentiation (LTP) in rats¹. *Brain Res.*, **888**, 356-365 (2001).
- 87) Wood G.E., Beylin A.V., Shors T.J., The contribution of adrenal and reproductive hormones to the opposing effects of stress on trace conditioning in males versus females. *Behav. Neurosci.*, **115**, 175-187 (2001).
- 88) Wood G.E., Shors T.J., Stress facilitates classical conditioning in males, but impairs classical conditioning in females through activational effects of ovarian hormones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 4066-4071 (1998).
- 89) Marcondes F.K., Miguel K.J., Melo L.L., Spadari-Bratfisch R.C., Estrous cycle influences the response of female rats in the elevated plus-maze test. *Physiol. Behav.*, **74**, 435-440 (2001).
- 90) Mora S., Dussaubat N., Díaz-Véliz G., Effects of the estrous cycle and ovarian hormones on behavioral indices of anxiety in female rats. *Psychoneuroendocrinology*, **21**, 609-620 (1996).
- 91) Frye C.A., Walf A.A., Changes in progesterone metabolites in the hippocampus can modulate open field and forced swim test behavior of proestrous rats. *Horm. Behav.*, **41**, 306-315 (2002).
- 92) Toufexis D.J., Myers K.M., Bowser M.E., Davis M., Estrogen disrupts the inhibition of fear in female rats, possibly through the antagonistic effects of estrogen receptor alpha (ERalpha) and ERbeta. *J. Neurosci.*, **27**, 9729-9735 (2007).

- 93) Girdler S.S., O'Briant C., Steege J., Grewen K., Light K.C., A comparison of the effect of estrogen with or without progesterone on mood and physical symptoms in postmenopausal women. *J. Womens Health Gen. Based. Med.*, **8**, 637-646 (1999).
- 94) Morgan M.A., Pfaff D.W., Effects of estrogen on activity and fear-related behaviors in mice. *Horm. Behav.*, **40**, 472-482 (2001).
- 95) Morgan M.A., Pfaff D.W., Estrogen's effects on activity, anxiety, and fear in two mouse strains. *Behav. Brain Res.*, **132**, 85-93 (2002).
- 96) Tomihara K., Soga T., Nomura M., Korach K.S., Gustafsson J.A., Pfaff D.W., Ogawa S., Effect of ER-beta gene disruption on estrogenic regulation of anxiety in female mice. *Physiol. Behav.*, **96**, 300-306 (2009).
- 97) Matsumoto M., Higuchi K., Togashi H., Koseki H., Yamaguchi T., Kanno M., Yoshioka M., Early postnatal stress alters the 5-HTergic modulation to emotional stress at postadolescent periods of rats. *Hippocampus*, **15**, 775-781 (2005).
- 98) Kimura S., Togashi H., Matsumoto M., Shiozawa T., Ishida J., Kano S., Ohashi A., Ishikawa S., Yamaguchi T., Yoshioka M., Shimamura K., Serotonin(1A) receptor-mediated synaptic response in the rat medial prefrontal cortex is altered by early life stress: in vivo and in vitro electrophysiological studies. *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi*, **31**, 9-15 (2011).
- 99) Kimura S., Saito Y., Ohashi A., Inoue S., Matsumoto M., Togashi H., Minami M., Saito H., Parvez H., Shimamura K., Attenuation of 5-HT_{1A} regulation in medial prefrontal cortex GABA system of early postnatal-stressed rats. *Biogenic Amines*, **25**, 231-241 (2011).

- 100) Izumi T., Boku S., Shinmin W., Inoue T., Konno K., Yamaguchi T., Yoshida T., Matsumoto M., Watanabe M., Koyama T., Yoshioka M., Retrieval of conditioned fear activates the basolateral and intercalated nucleus of amygdala. *J. Neurosci Res.*, **89**, 773-790 (2011).