

平成30年6月16日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K04180

研究課題名(和文)ニオイ刺激が生み出すトラウマ記憶：恐怖条件づけと母子分離を用いた検討

研究課題名(英文)Traumatic memory provoked by odor in rats' fear conditioning and maternal separation

研究代表者

山田 一夫 (YAMADA, Kazuo)

筑波大学・人間系・准教授

研究者番号：30282312

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：心的外傷後ストレス障害(PTSD)の動物モデルである恐怖条件づけと母子分離を用いて、ニオイ刺激がトラウマ記憶の形成やその消去過程に及ぼす影響について検討した。その結果、1. 文脈に対する恐怖条件づけを消去したとしても、ニオイに対する恐怖反応は維持される、2. グルタミン酸NMDA受容体作動薬はニオイに対する恐怖反応の消去を促進しない、3. 母子分離中に経験したニオイに対して雄のみが選好性を示す、4. それは母子分離期間中の母親の養育行動が主に雄に向けられることが原因である等が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：We examined effects of odors on the acquisition and the extinction of traumatic memories using two PTSD animal models: fear conditioning and maternal separation paradigms. Our data showed that 1. the extinction of fear responses associated with contextual stimulus could not generalize those associated with odor stimulus, 2. only male rats preferred the odor stimulus that they experiences during maternal separation. 3. the fact that mothers took care of male pups more than females' could cause the sex differences in their preference to odor stimulus related to traumatic memories.

研究分野：実験心理学

キーワード：ラット ニオイ刺激 ト라우マ記憶 恐怖条件づけ 母子分離 養育行動

1. 研究開始当初の背景

恐怖やストレスと関連した疾患は、1995年の阪神淡路大震災や地下鉄サリン事件、2001年の池田小児童殺傷事件をきっかけとして我が国では注目されるようになった。なかでも特に注目されている疾患は、心的外傷後ストレス障害 (Posttraumatic Stress Disorder: PTSD) であり、たった一度の強度の恐怖体験によって、その後の生活に多大な影響がみられる。PTSD はアメリカでは1980年に初めて DSM-III に掲載された。そのきっかけとなったのは、ベトナム戦争帰還兵の中に、金縛りや叫喚、無口、無反応など戦地に赴く前には見られなかった症状を訴える者がおり、精神的に何らかの障害がみられると考えられたことである。その後2001年9月11日のテロ事件後に PTSD はさらに注目を集めるようになった。我が国においても、2011年の東日本大震災では PTSD に悩まされる被災者が数多く存在し、経済的な復興だけでなく、被災者の心のケアが重要視されてきたところである。

PTSD の症状には、悪夢、フラッシュバック (再燃現象)、事件の回想に伴う悪寒などが含まれるが、代表的な心理療法として脱感作療法が知られている。脱感作療法は、古典的条件づけの消去に基づく心理療法であり、一般的には、患者にトラウマ事象を再体験させやすい視・聴覚刺激を用いられることが多い。しかしながら、脱感作療法において問題となっているのは治療後にみられる再燃現象であり、たとえ一時的にトラウマ記憶が消去されたとしても、その後恐怖反応が再燃する場合がある。とりわけ臨床現場で問題視されているのが、嗅覚刺激による再燃である。火事被災者にとっての焦げ臭いニオイ、レイプ被害者にとっての湿った草むらのニオイ、津波被災者にとっての潮のニオイなどが、恐怖記憶を再燃させる嗅覚刺激の典型例である。

プルースト効果に代表されるように、嗅覚刺激は記憶想起の重要な手がかりとなりうる。特に、情動記憶と嗅覚刺激の結びつきは強固であり、情動記憶の中核と考えられている扁桃核は、視覚刺激提示時よりも嗅覚刺激提示時により強く活動する (Vermetten et al., 2007)。さらに恐怖や不安などのネガティブな情動を伴う嫌悪性情動記憶は、聴覚刺激よりも嗅覚刺激によって想起が促進されることも示されており (Herz et al., 2004)、PTSD 患者は、トラウマ体験から数十年経過後でも、トラウマ体験時のニオイに曝露されることでトラウマ記憶が想起されることが報告されている (Vermetten & Bremner, 2003)。

我々はこれまでに、恐怖条件づけパラダイムを用いて、ラットの PTSD モデルを確立してきた (Ryoke et al., 2014)。比較的強いストレス (複数回のフットショックなど) を受けたラットでは、その後、通常であれば恐怖反応を示さない程度の弱いフットショックを用いた恐怖条件づけにおいても十分に

強い条件性恐怖反応、すなわちストレス誘発性恐怖反応増強を1ヶ月以上にわたって示し、この現象は PTSD 患者にみられる、その後の弱いストレッサーやトラウマ的事象に関連した些細なきっかけに対する過度の反応と類似している。

また近年、ラットやマウスにおける母仔分離が、心理的虐待やネグレクトの動物モデルとして考えられるようになってきた。幼少期における虐待もまたトラウマ体験であり、幼少期の虐待によって成体期における不安やうつ傾向が増加する。仔の神経発達に重要であると考えられている新生仔期における母仔間のアタッチメントは、視覚や聴覚、触覚のみならず嗅覚によっても形成される (Bolles & Woods, 1964)。また、ラットにおいて、新生仔期における嗅覚刺激とフットショックの連合は、成体期での恐怖学習に影響を及ぼすことが報告されている (Sevelinges et al., 2008)。したがって、新生仔期のニオイ体験は、その後の神経発達や成体期での行動に影響を及ぼすことが示唆され、幼少期のトラウマ体験である母仔分離時に提示されたニオイが、成体期でのトラウマ記憶の形成や想起に影響を与える可能性が考えられる。

2. 研究の目的

嗅覚刺激は記憶想起の重要な手がかりとなりうるが、特に、恐怖や不安などのネガティブな情動を伴う嫌悪性情動記憶は、視・聴覚刺激よりも嗅覚刺激によってその想起が促進されることが知られている。心的外傷後ストレス障害 (PTSD) の心理的治療において、視・聴覚刺激に対する脱感作療法はある程度の効果は得られてきた一方で、嗅覚刺激によるフラッシュバックが臨床場面で問題視されている。嗅覚刺激によるトラウマ記憶喚起の神経メカニズムを明らかにすることは、PTSD の病態の解明や治療法の開発に有益である。そこで本研究では、PTSD モデル動物を用いて、嗅覚刺激がトラウマ記憶の形成やその消去過程に及ぼす影響について明らかにすることを目的とした。

(1) 恐怖条件づけパラダイムにおいて、ニオイ刺激と文脈刺激に対して同時に恐怖条件づけを行った後、文脈に対する恐怖反応を消去した場合に、ニオイ刺激に対する反応がどの程度みられるのかどうかを検討した。同時に条件づけられた刺激間においては、消去の般化が生じることが知られているが、ニオイ刺激と情動記憶の関係は強固であることから、消去の般化がみられない可能性が予想された。

(2) 母仔分離法を用いて、新生仔期のトラウマ記憶と連合したニオイが、成体期の情動行動に及ぼす影響を検討した。

(3) 上記の研究において、新生仔期母仔分離期間中に経験した匂い刺激に対する反応に性差がみられることが明らかにされた。そこでその性差が生じる原因の一つとして、母親の養育行動に焦点を当て、母仔分離直後の母親の養育行動が仔の性別によって異なるかどうかを検討した。

3. 研究の方法

(1) 被験体として Wistar-Imamichi 系雄ラットを用いた。まずニオイ刺激がない状態の装置に被験体を入れ、120 秒後にニオイ発生装置を用いてニオイ刺激（コーヒー、条件刺激：CS）を提示し、フットショック（無条件刺激：US）を提示した後に空気排出装置を用いて装置内の空気を排出した。その後再び CS-US の対提示と空気排出を行い、被験体を装置から取り出した。翌日の条件づけテストにおいて、ニオイ刺激の提示によって有意に恐怖反応（フリージング）レベルが上昇することを確認した後、被験体を、文脈 CS に対する消去を行わない（NE）群、消去後に生理食塩水（SAL）またはグルタミン酸 NMDA 受容体作動薬 s-cycloserine（DCS）を投与する 3 群に振り分け、恐怖条件づけの翌日から 3 日間にわたって文脈 CS に対する恐怖反応の消去および DCS（30 mg/kg）腹腔内投与を行った。

(2) 被験体として Wistar-Imamichi 系雌雄ラットを用いた。まず実験 1 では、生後 1 日目から 14 日目までの 14 日間に毎日 3 時間、母ラットと仔ラットを分離し、母仔分離期間中にニオイ刺激（2-phenylethanol）を提示した。その後成体期において、新生仔期母仔分離時に提示したニオイ刺激に対する接近行動と、そのニオイ提示下での条件性恐怖反応を測定した。また実験 2 では、実験 1 の結果をふまえて、母ラットのニオイ経験の統制や文脈恐怖条件づけで用いるフットショック強度を強める等の手続きの一部を変更してさらなる検討を行った。特に文脈恐怖条件づけについては、新生仔期母仔分離期間中に提示したニオイ刺激提示下とニオイ刺激非提示下での条件性恐怖反応を比較した。

(3) 被験体として、Wistar-Imamichi 系妊娠ラット 7 匹を用いた。生まれた仔ラットは、各リターでオス 4 匹、メス 4 匹に調整した。各仔ラットの背中には、赤色と青色のアニマルマーカで着色し、雌雄が判別できるようにした。母親ラットを統制群（n=3）と母仔分離群（n=4）に振り分けた。出産日を Postnatal Day（PND）0 とし、母仔分離群は、PND 1 から PND 14 までの 14 日間、明期開始の 3 時間後から 3 時間、母親と仔を別々のケージに分離した。母仔分離を実施した 14 日間、母仔分離の直後に母親が仔ラットを巣に連れ戻す行動を観察する Retrieve テストを行った。統制群については母親を別のケージ

に移し、巣と反対側の角にオスとメスを 4 匹ずつひとかたまりにして置いた。その後母親を巣の位置に戻し、母親がどの順番で仔ラットをくわえ巣に戻したか観察し、仔の性別毎に順位を記録した。Retrieve テストの終了直後から 60 分間、母親の養育行動を 2 台のビデオカメラで記録した。録画された養育行動は、タイムサンプリング法を用いて、(1)nursing（背中を丸め、横向きに寝て授乳している状態や、頭を下げ、仔ラットの上に覆い被さっている状態、仰向けに寝て授乳している状態を含む）(2) licking（肛門性器付近をなめる、または体をなめること含む）(3) nest building（仔ラットのまわりにおがくずを押したり運んだりすること）を 2 分毎に 10 秒間ずつ観察・記録した。なお、nursing と nest building については、各 10 秒間の観察時間内での有無を記録し、licking については対象となった仔ラットの数を性別毎には記録した。

4. 研究成果

(1) たとえ文脈 CS に対する恐怖反応が消去されたとしても、ニオイ CS に対する恐怖反応は残っていた。したがって、文脈への恐怖反応の消去はニオイ刺激に般化しないことが実証された。また、DCS は文脈 CS からニオイ CS への消去の般化を促進する効果も認められなかった。

(2) 母仔分離中に経験したニオイ刺激に対する接近行動には性差がみられ、雄のみでニオイ刺激に対する探索行動の一時的な増加が認められた。また条件性恐怖反応についても性差がみられ、雌では、新生仔期母仔分離時と恐怖条件づけ時の両方でニオイを提示された群の条件性恐怖反応は、他の群よりも高かった。以上の結果から、新生仔期母仔分離時に経験したニオイは、成体期での恐怖反応を増強すること、そしてその効果には性差がみられることが示唆された。本研究の結果は、トラウマ記憶とニオイの連合メカニズムの解明や、幼少期の虐待による精神疾患への心理的介入や新たな治療法の開発に非常に有益であると考えられる。

(3) 仔が自由に動ける日齢になると母親の連れ戻し行動は見られなくなったため、Retrieve テストについては、すべての母親が連れ戻し行動を示した PND 3、PND 6 および PND 9 のデータのみを分析の対象とした。その結果、PND 3 では統制群および母仔分離群のいずれにおいても、雄のほうを雌よりも早く連れ戻すことが示された。養育行動のうちの nursing については、統制群では日を追って有意に減少していったのに対して、母仔分離群ではそのような減少はみられず、PND 14 においても高い水準で維持されていた。また licking については、母仔分離群の母親は雌よりも雄の仔に対してより多くの licking を

示したことから、母仔分離された母親の養育行動は出産2週間後まで高レベルで維持され、それは主に雄の仔に対して向けられることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計7件)

- ① Okabe, S., Fukuda, K., Mochizuki-Kawai, H. & Yamada, K. (2018) Favorite odor induces negative dream emotion during REM sleep. *Sleep Medicine*, 47, 72-76. doi.org/10.1016/j.sleep.2018.03.026 (査読有)
- ② Toyoshima, M., Yamada, K., Sugita, M. & Ichitani, Y. (2018) Social enrichment improves social recognition memory in male rats. *Animal Cognition*, 231, 345-351. doi.org/10.1016/j.bbr.2006.07.007 (査読有)
- ③ Yamada, K., Arai, M., Suenaga, T. & Ichitani, Y. (2017) Involvement of hippocampal NMDA receptors in encoding and consolidation, but not retrieval, processes of spontaneous object location memory in rats. *Behavioural Brain Research*, 331, 14-19. doi.org/10.1016/j.bbr.2017.05.006 (査読有)
- ④ Ueno, M., Yamada, K. & Ichitani, Y. (2017) The relationship between fear extinction and resilience to drug-dependence in rats. *Neuroscience Research*, 121, 37-42. doi.org/10.1016/j.neures.2017.03.006 (査読有)
- ⑤ Ozawa, T., Yamada, K. & Ichitani, Y. (2017) Differential requirements of hippocampal de novo protein and mRNA synthesis in two long term spatial memory tests: spontaneous place recognition and delay-interposed radial maze performance in rats. *PLOS ONE*, 12(2), e0171629. doi.org/10.1371/journal.pone.0171629 (査読有)
- ⑥ Iwamura, E., Yamada, K. & Ichitani, Y. (2016) Involvement of hippocampal NMDA receptors in retrieval of spontaneous object recognition memory in rats. *Behavioural Brain Research*, 307, 92-99. doi.org/10.1016/j.bbr.2016.03.048 (査読有)
- ⑦ Furuie, H., Yamada, K. & Ichitani, Y. (2016) Chronic NMDA receptor blockade in early postnatal period, but not in adulthood, impairs methamphetamine-induced conditioned place preference in rats. *Behavioural Brain Research*, 301, 253-257. doi.org/10.1016/j.bbr.2015.12.044 (査読有)

[学会発表] (計8件)

- ① Hatakeyama, T., Furuie, H., Yamada, K. & Ichitani, Y. (2017) Spontaneous novel object recognition, object location recognition, and temporal order discrimination in rats neonatally treated chronically with MK-801. Society for Neuroscience, 47th Annual Meeting (Washington, DC).
- ② Toyoshima, M., Yamada, K., Sugita, M. & Ichitani, Y. (2017) Social enrichment enhances rats' memory span of social, but not object, recognition. Society for Neuroscience, 47th Annual Meeting (Washington, DC).
- ③ Sugita, M., Yamada, K. & Ichitani, Y. (2017) Involvement of the rat hippocampal NMDA and AMPA receptors in temporal order memory in radial maze. International Behavioral Neuroscience Society, Annual Meeting (Hiroshima, Japan)
- ④ Mochizuki-Kawai, H., Ayabe-Kanamura, S., Ichitani, Y. & Yamada, K. (2017) The odor associated with maternal memories reduces anxiety in adult rats. Association for Chemoreception Sciences, 39th Annual meeting (Fort Myers, FL)
- ⑤ Ueno, M., Yamada, K. & Ichitani, Y. (2016) Individual ability of fear extinction predicts their resilience to drug addiction in rats. International Congress of Psychology (Yokohama, Japan)
- ⑥ Yamada, K., Ishikawa, H., Osato, Y., Ayabe-Kanamura, S. & Ichitani, Y. (2016) Sex differences in maternal care determine effects of infant odor memory on anxiety-related behavior in adult rats. Association for Chemoreception Sciences, 38th Annual meeting (Fort Myers, FL)
- ⑦ Yamada, K., Sugita, M. & Ichitani, Y. (2015) Hippocampal NMDA receptors are involved in rats' spontaneous object recognition only under high memory load condition. Society for Neuroscience, 45th Annual Meeting (Chicago, IL).
- ⑧ Ishikawa, H., Nakano, S., Ayabe-Kanamura, S., Ichitani, Y. & Yamada, K. (2015) Sex differences in effects of infant odor memory on fear conditioning in adult rats. Association for Chemoreception Sciences, 37th Annual meeting (Fort Myers, FL)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kansei.tsukuba.ac.jp/~ichitanilab/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 一夫 (YAMADA, Kazuo)

筑波大学・人間系・准教授

研究者番号：30282312

(2) 研究分担者

一谷 幸男 (ICHITANI, Yukio)

筑波大学・人間系・教授

研究者番号：80176289

(3) 連携研究者

綾部 早穂 (AYABE, Saho)

筑波大学・人間系・教授

研究者番号：40323232

(4) 研究協力者

()