

平成22年 3月31日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2006～2009
 課題番号：18591322
 研究課題名（和文） ストレスによる過覚醒の神経メカニズムの解明
 ：ラットを用いた精神生理学的研究
 研究課題名（英文） Neuronal mechanisms of stress-induced hyperarousal
 ：A psychophysiological study in rats
 研究代表者
 榛葉 俊一（SHINBA TOSHIKAZU）
 財団法人東京都医学研究機構・精神医学総合研究所・副参事研究員
 研究者番号：80175398

研究成果の概要（和文）：

ラット前頭葉のDC電位は日内変動し、陰性方向への変化は筋活動の増加とデルタ波の減少を伴い覚醒レベルと関係した。ストレスの予期に伴うDC電位変化も前頭葉で出現することを確認した。また脳内ノルアドレナリン濃度は、皮質、海馬、視床下部で、急性ストレス後7日目まで上昇が持続することが認められた。ストレスによる前頭葉のDC電位変化や脳内ノルアドレナリンの過剰生産が過覚醒の出現に関与すると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

The DC potential at the rat frontal cortex showed a significant diurnal variation, and its negative shifts were accompanied by muscular activation and delta wave suppression, indicating its relationship with arousal level. DC potential shifts were also observed at the frontal cortex on expecting the footshock stress. Acute stress application induced a significant NA increase at the cerebral cortex, hypothalamus and hippocampus 7 days after the footshock stress. These results suggest that stress induces changes in frontal DC potential and noradrenaline activity, leading to generation of hyperarousal state.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	2,000,000	0	2,000,000
2007年度	500,000	150,000	650,000
2008年度	500,000	150,000	650,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
年度			
総計	3,500,000	450,000	3,950,000

研究分野：精神生理学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・精神神経科学

キーワード：ストレス、脳波、事象関連電位、DC電位、ノルアドレナリン、ラット、過覚醒

1. 研究開始当初の背景

ストレスが引き起こす「過覚醒」が種々のストレス性精神疾患の病態を理解する上で重要であることは、精神医学的に認識はされ

ているが、その神経メカニズムの解明はまだ十分にはなされていない。また、臨床的にも適切に利用できる検査は開発されていない。コルチゾールなどの内分泌検査は検査条件の設定が難しい。血圧や発汗などの自律神経

系の指標は個人差が大きく解析に注意が必要である。現在は、主として質問紙法を用いた患者の主観的なストレス評価が行われている。

これまでの研究では、ストレスによる「過覚醒」を、行動変化を指標としてとらえてきた。神経伝達物質であるノルアドレナリンの関与も指摘されている。また、末梢型のベンゾジアゼピン受容体の変化も研究されてきている。本研究課題では、これらの行動学のおよび生化学的指標に加え、精神生理学的指標を開発することである。

精神生理学的指標は、脳や神経の活動を直接的に検討することができるという特色を持つ。ストレスによる「過覚醒」という状況に関連する病態を的確に捉える為には精神生理学的指標が必要であり、本研究の結果は有用な知見がもたらすと考えられた。

2. 研究の目的

ストレス性の精神障害の主要な症状の一つである「過覚醒」の脳内メカニズムを電気生理学的に分析し、臨床の場で利用できる「過覚醒の指標」を開発することである。本研究課題では、ラットの脳波、事象関連電位、脳内フィールド電位、および脳内神経発火などの生理指標を用い、ストレス負荷（フットショック）が「覚醒機能」に与える影響を明らかにする。

「覚醒機能」は（1）外的要因に対する脳の電氣的反応や（2）神経活動の日内リズム、（3）ストレス後に長期間持続する神経活動の変化として評価する。

脳の部位としては覚醒注意機能に関連すると考えられる前頭葉に焦点を当て、感覚刺激に対する脳波や神経発火などの反応を記録する。日内リズムは脳の電気活動の周期的変化により分析する。長期間持続する神経活動の変化は脳内ノルアドレナリン濃度や心拍変動解析を用いた自律神経活動指標により評価する。これらの覚醒関連指標がストレスによりどのように影響を受けるのかを知ることにより、ストレスによる「覚醒機能障害」の神経メカニズムの解明につなげる。

ストレスは、心的外傷後ストレス障害やパニック障害などの不安障害のみならず、うつ病や統合失調症など種々の精神疾患の発現に関連することは臨床的に広く認められている。そして、ストレスが引き起こす覚醒の過剰な上昇である「過覚醒」は、精神機能に大きな影響を与え、不安障害における「焦燥、過敏、自律神経症状」、うつ病における「睡眠障害」、統合失調症における「注意障害」など、多くの病態発現の基盤となると考えられる。ストレスによる「覚醒機能障害」の神

経メカニズムの解明は、これら精神疾患の病態の理解につながる。

本研究において見いだされた知見をもとに、ストレスによる「過覚醒」を評価する臨床検査指標を開発し、ストレス性の精神疾患の治療において、脳機能や自律神経機能の検査所見を、診断や治療法の選択にむすびつけていくことを目指す。

3. 研究の方法

ウィスター系雄ラットを用い、麻酔下で電極植え込み手術を行う。表面脳波計測用のステンレスネジ電極を前頭葉、後頭葉、側頭葉直上の頭蓋骨に設置する。皮質内のフィールド電位を記録する電極は、0.5mm 間隔のステンレスまたは銀塩化銀製多段電極を用いる。神経発火記録用には慢性ミニマニピュレーター付きステンレス電極を前頭葉に挿入する。心電図記録には前胸部皮下に挿入し固定した銀塩化銀電極を用いた。

全ての電極からのリード線はコネクタに連結し、レジセメントにより頭蓋骨に固定する。手術後1週間の回復期の後に記録を開始する。脳波、フィールド電位、神経発火、及び心電図は、生体信号増幅器（ER-1, Sygnus社）にて同時記録する（Power1401, CED社）。データはパソコンのハードディスクに記録し、以下のように off-line 解析をする。

（1）外的要因に対する脳の活動は、音刺激に対する前頭葉における事象関連電位と神経発火の反応を用い解析した。事象関連電位では P1 N1 それに引き続く緩電位成分の潜時や振幅を計測した。神経発火は Spike2 ソフトウェア（CED）により単一発火を分離した後に、音刺激前後でヒストグラム表示し、発火頻度を求めた。

ストレス負荷としては、2つの音刺激の一方（5KHz 音または、10KHz 音）が呈示された後1秒後にケージの床面のグリッドに電流を1秒程度流すフットショックストレスを用いた。

（2）神経活動の日内リズムの変化の解析においては、脳波のDC成分の変動、デルタ、シータ、アルファ、シグマ、ベータ波の分析、筋電図記録および心拍変動解析による副交感神経および交感神経活動指標の日内変動も計測する（Sleep Sign, KisseiComtec社）。

心拍変動解析は心電図記録を用いて行った。心電図から心拍間隔を求め、その揺らぎを周波数分析したパワー値を用いた。心拍変動の揺らぎには速い成分（high frequency : HF）と遅い成分（low frequency : LF）があり、交感神経性の変動指標（LF/HF）

と副交感神経性の変動指標（HF）を求め、覚醒状態の指標とした。

ストレス負荷としては、ラットのケージの床グリッドに1秒程度の電流を12回、ランダムに1時間の間に与える急性フットショックストレスを用いた。

（3）ストレス後に長期間持続する神経活動の指標として、脳内ノルアドレナリンおよび代謝産物であるMHPGをHPLC法により測定した。測定は大脳皮質、視床下部、海馬の3部位とし、ストレスをかけていない状態、ストレス直後、4時間後、1日後、そして7日後のラットにおいて測定し、長期間持続する変化があるかどうかを検討した。

ストレス負荷には（2）と同様の急性フットショックストレスを用いた。

4. 研究成果

ラットにおいてストレスや覚醒レベルの変動がDC脳電位、slow potential、心拍変動指標、脳内ノルアドレナリン濃度に及ぼす影響を分析した。

（1）ラット脳の前頭部におけるDC電位を小脳に基準電極を置き24時間記録した。暗期は20時から8時に設定した。前頭部では小脳に比べ活動時にあたる暗期にはマイナスになり、休息時にあたる明期にはプラスなる日内変動が認められた。また、数十分のphasicな変動も見出され、変動はミリボルトレベルに達した。前頭部DC電位のマイナス方向への変化は筋活動の増加と脳波デルタ波の減少を伴った。

これらの知見は覚醒レベルと脳のDC電位とは密接に関連することが示すものである。これまで、DC電位は様々な行動との関連により変動することが知られているが、本研究において覚醒レベルとの直接的な関係を明らかにすることができた。

（2）フットショックストレスの予期に伴いDC脳電位の変動を伴うCNV様のslow potentialが前頭部に出現することを確認した。二種類の音を平均12秒間隔でランダムに提示し、一方の音の後1秒後にフットショックを負荷する。脳波を音刺激ごとに約100回加算平均すると、フットショックが負荷される音刺激の後のみCNVが、訓練開始3日頃から出現した。フットショックが負荷されない音刺激に対しては、CNVは発生しない。ストレスによる不安の分析において、このCNVラットモデルの有用性が考えられている。

ストレスに関連した過覚醒状態が前頭部

のDC電位発現と関連すると考えられ、DC脳電位の測定が臨床の場での過覚醒状態評価に利用できる可能性が示唆された。

（3）外傷後ストレス障害（PTSD）などのストレス性疾患における過覚醒にノルアドレナリン系の関与が示唆されている。慢性ストレスではノルアドレナリンの濃度上昇を引き起こすことが知られている。しかし、一回の急性ストレス後には脳内のノルアドレナリン濃度は減少し、慢性ストレスとの違いについては明らかになっていない。

本研究では、一回の急性ストレスがノルアドレナリン系にどのような長期的影響を及ぼすのかを明らかにした。脳内ノルアドレナリン濃度をストレス負荷直後と4時間後、1日後、7日後に測定した。ストレス負荷直後には視床下部では減少するが、1日後からは上昇し、皮質、海馬、視床下部でストレス負荷後7日目まで上昇が持続することが認められた。ストレス後の過覚醒の神経メカニズムに脳内ノルアドレナリンの過剰生産が関連することが示唆された。

（4）心拍変動指標を用いた自律神経指標は、日内変動を示した。交感神経指標であるLF/HFは活動時に上昇し、副交感神経指標であるHFは睡眠時に上昇し、心拍変動指標がラットにおいて覚醒レベルを評価するための有用な指標となることが示された。

急性フットショックストレス後には、LF/HF指標の上昇が数日間持続する傾向が観察された。

ストレス負荷後には、slow potentialに反映されるDC脳電位の変化、自律神経活動、脳内ノルアドレナリンの過剰生産が引き起こされることが過覚醒の出現に関与すると考えられた。

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6件）

(1) Shinba T, Ozawa N, Yoshii M, Yamamoto K. (2010) Delayed increase of brain noradrenaline after acute footshock stress in rats. *Neurochemical Research* 35:412-417. (査読有)

(2) Shinba T (2009) 24-h profiles of direct current brain potential fluctuation in rats. *Neuroscience Letter* 465:104-107. (査読有)

(3) Kitamura K, Ito Y, Yanazawa M,

Ohsawa M, Suzuki-Migishima R, Umeki Y, Hohjoh H, Yanagawa Y, Shinba T, Itoh M, Nakamura K, Goto Y (2009) Three human ARX mutations cause the lissencephaly-like and mental retardation with epilepsy-like pleiotropic phenotypes in mice. *Human Molecular Genetics* 18:3708-3724. (査読有)

(4) 山本健一, 榛葉俊一 (2009) 中枢ノルアドレナリン系の精神医学的意義. *精神神経学雑誌* 111: 741-761. (査読有)

(5) Shinba T, Kariya N, Matsui Y, Ozawa N, Matsuda Y, Yamamoto K (2008) Decrease in heart rate variability response to task is related to anxiety and depressiveness in normal subjects. *Psychiatry and Clinical Neurosciences* 62:603-609. (査読有)

(6) Ishizaki R, Shinba T, Mugishima G, Haraguchi H, Inoue M (2008) Time-series analysis of sleep-wake stage of rat EEG using time-dependent pattern entropy. *Physica A* 387:3145-3154. (査読有)

[学会発表] (計8件)

(1) 山口雅章, 山口徹太郎, 小澤信行, 榛葉俊一, 榎宏太郎 (2008) 食物性状が睡眠に与える影響. 第67回日本矯正歯科学会, 幕張 [2008/09/18]

(2) 松崎なぎさ, 榛葉俊一, 小田香奈絵, 塩月太一郎, 麦島剛 (2008) Paired stimulationの間隔とラットの聴覚誘発電位との関係. 第68回日本動物心理学会, 水戸 [2008/09/13]

(3) 木村舞子, 榛葉俊一, 木村裕, 中本百合江, 吉井光信, 麦島剛 (2008) 睡眠剥奪ストレスがマウスのガラス玉覆い隠し行動に及ぼす影響と clonidine 投与の効果. 第68回日本動物心理学会, 水戸 [2008/09/13]

(4) Suzuki J, Ozawa N, Murashima YL, Shinba T, Yoshii M (2007) Neuronal activities in the parietal cortex of an EL and DDY mouse. 第30回日本神経科学大会, 横浜 [2007/09/12]

(5) Shinba T (2007) Arousal and frontal cortex: An experimental study analyzing contingent negative variation (CNV) and related neuronal firing in rats and mice. *Toward a Science of Consciousness 2007*, Budapest [2007/07/25]

(6) 石崎龍二, 榛葉俊一, 麦島剛, 原口光, 井上政義 (2006) ラットの脳波のエントロピー時系列解析. 第112回日本物理学会九州支部例会, 鹿児島 [2006/12/09]

(7) 麦島剛, 榛葉俊一 (2006) ラットの paired stimulation への聴覚誘発電位に対する methamphetamine 投与の影響. 日本心理学会第70回大会, 福岡 [06/11/05]

(8) 石崎龍二, 榛葉俊一, 麦島剛, 原口光, 井上政義 (2006) ラットの脳波のエントロピー時系列による解析. 日本物理学会 2006 年秋期大会, 千葉 [06/09/26]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

榛葉俊一 (財団法人東京都医学研究機構・東京都精神医学総合研究所・副参事研究員)

研究者番号: 80175398

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: