

13. ト라우マ発症機構の解明研究

前田 紗弥香 (薬学部総合薬学科 3年)

指導教員

米田 幸雄 (自然科学研究科生命科学専攻 教授)

1. 背景と研究目的

トラウマ体験により誘引される精神疾患として、心的外傷後ストレス障害(posttraumatic stress disorder: PTSD)が知られている。PTSDは圧倒的な環境ストレスに曝露されたのち、長期に渡りその精神的な外傷事件を反復的に擬似再体験(フラッシュバック)することから、患者はしばしば強烈な不安や恐怖、無力感に起因する麻痺徴候、および過度の警戒心と不眠を基盤とする過覚醒症状のような、相反する2方向性の症状を呈する。このような障害は、以前から実在していたと考えられるが、それらの症状は疾患としての観点からは捉えられていなかったと思われる。しかしながら、わが国でも阪神淡路大震災以降にそれらの症状がクローズアップされるようになり、近年では多方面からさまざまな調査や研究が行われている。しかしながら、その発症機構などは未だ十分には解明されておらず、その原因としては有用なPTSDモデルが存在しないことが考えられる。そこで本研究では、PTSDモデルとなりうるモデル動物の作成を目指すとともに、このトラウマは圧倒的環境ストレスへの一過性曝露の影響が、脳内で長期間固定されることに起因するとの仮説を打ちたてて、トラウマ発症機構の解明を行うことを目的とした。

2. 研究方法

2.1. ト라우マ体験モデル

6週齢のStd-ddY系雄性マウスを金属製のストレスケージに拘束し、水温 $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ にセットした水浴中に鎖骨下まで3時間浸すことによって水浸拘束ストレスを負荷した。

2.2. 薬物投与

PTSDに治療効果を示す三環系抗うつ薬のイミプラミンおよびPTSDの第一選択薬である選択的セロトニン再取り込み阻害薬のフルボキサミンを、それぞれ30 mg/kgの用量で腹腔内投与した。対照群には生理食塩水を腹腔内投与した。

また、細胞増殖能の指標となる5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)は、動物に灌流固定を行う24および12時間前に、それぞれ50 mg/kgの用量で腹腔内投与した。

2.3. 音恐怖条件付け課題

動物にメトロノーム音を条件刺激として与えながら、水浸拘束ストレスを負荷した。負荷後、実験当日まで飼育ケージ内で飼育したのち、テストケージ内で音恐怖条件付け課題を行った。すなわち、無条件刺激下で5分間の行動観察後、条件刺激を15分間与えて、そのとき観察されるすくみ行動を定量化した。動物は行動観察後、再び飼育ケージに移し、最終的に28日経過後まで観察した(図1)。すくみ行動は、10秒間呼吸以外の行動が欠如した状態と定義し、10秒間を1 periodとして観察した総 periods 中のすくみ行動を起こした periods の割合を% Freezingとして定量化した。また、対照群には条件刺激のみを与えた。

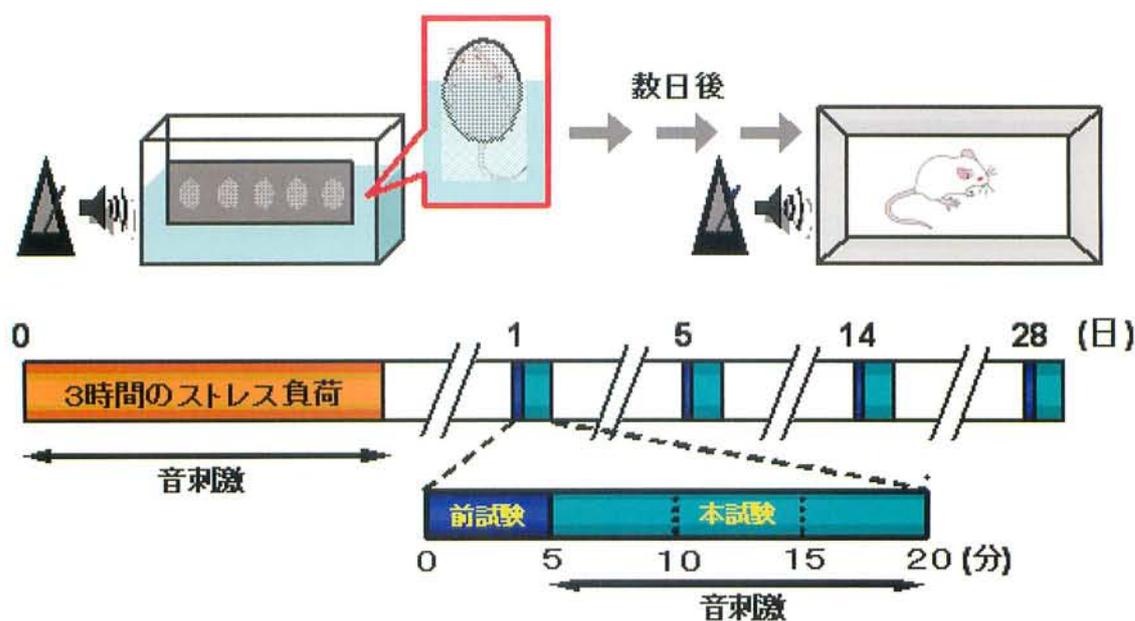


図1 音恐怖条件付け課題のプロトコル

2.4. 強制水泳試験

ストレス負荷後14日目のモデル動物を、水温 $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ に保った水を満たした2Lビーカー内で10分間強制水泳させた。強制水泳試験はストレスを負荷する前日に行う前試験とストレス負荷後14日目に行う本試験の2つの試験から成り、前試験において群間に水泳能力の差がないことを確認したのち、本試験で観察される無動時間を定量化した。無動とは、動物が水面に浮くために必要最低限の行動を除いた無動状態と定義した。

2.5. 新奇環境における自発的活動量の解析

ストレス負荷後14日目のモデル動物を測定ケージに移し、赤外線センサーにより5分間毎に30分間、自発的活動量をカウントした。

2.6. BrdU に対する免疫組織化学法

ストレス負荷後、各日数経過した動物を灌流固定法により犠死させたのち、全脳を摘出した。作成した標本から凍結海馬冠状切片を作成し、50%ホルムアミドにより 65°C、2 時間インキュベートした。続いて、2N HCl により 37°C、30 分間インキュベートしたのち 0.1 M ホウ酸により 25°C、10 分間処理した。この切片を 3% H₂O₂ により室温で 30 分間処理したのち、正常ウマ血清を用いてブロッッキングした。次いで BrdU に対する一次抗体と反応させた。洗浄後、ビオチン化二次抗体で処理したのち、ストレプトアビジンを付加させ、発色気質で可視化した。作成した切片を光学顕微鏡を用いて海馬歯状回における BrdU 陽性細胞数を計測した。陽性細胞はクラスターを形成しているものに注目し、歯状回門および顆粒細胞層を含む範囲の数を測定し、単位面積当たりの個数として定量化した。

2.7. TUNEL 染色法

ストレス負荷直後ないし 5 日目の新鮮凍結脳切片を、4%パラホルムアルデヒド液により浸漬固定した。洗浄後、0.1%トリトンにより氷上 2 分間インキュベートしたのち、In Situ Cell Death Detection Kit (Roche Diagnostics) により 37°C、1 時間遮光下で反応させて発色させた。

3. 結果

3.1. 音恐怖条件付け課題

水浸拘束ストレスを用いたトラウマ体験モデルに音恐怖条件付けしたところ、ストレスを負荷した翌日より動物は条件刺激であるメトロノーム音を聞くだけで著名なすくみ行動を示し、この行動抑制症状はストレス負荷後 28 日を経過しても観察された。ヒトの場合では、PTSD による障害が一ヶ月以上持続することや、ヒトとマウスの平均寿命等を考慮して、以降の行動解析では、ストレス負荷後 14 日目に注目して検討を行った。

ストレス負荷翌日ないし 14 日目のモデル動物でみられたトラウマ誘起性の麻痺症状に対して、PTSD に治療効果を有するイミプラミンおよびフルボキサミンを投与したところ、単回投与では著変を与えなかったが、1 日 1 回 14 日間慢性的に投与することによって、有意な改善がみられた。

3.2. 強制水泳試験

ストレス負荷後 14 日目のモデル動物に強制水泳試験を行ったところ、対照群と比べて著しい無動時間の延長が認められた。このトラウマ誘起性の麻痺症状に対して、イミプラミンあるいはフルボキサミンを慢性投与することにより、有意な改善がみられた。

3.3 新奇環境における自発的活動量

ストレス負荷後 14 日目のモデル動物を用いて、新奇環境における自発的活動量を測定したところ、対照群と比べて著しい自発的活動量の増加が認められた。この覚醒亢進症状に対してもイミプラミンあるいはフルボキサミンの慢性投与により有意な改善がみられた。

3.4. ト라우マ体験モデルの BrdU 取り込み能

当該モデル動物を用いて、成熟脳海馬歯状回に発現している神経系前駆細胞の増殖能を検討した。近年、海馬歯状回の特に関与する顆粒細胞層下では胎児脳や発達脳の場合のみならず成熟脳においても、神経幹細胞等神経系前駆細胞が発現しており、成体においても神経細胞新生が行われていることが明らかとなっている。

当該モデル動物の海馬歯状回顆粒細胞層下において、ストレス負荷後 3 日目より BrdU 陽性細胞数の減少が認められ、この減少は 7 日目においても持続していたが、14 日目には回復した。特に 5 日目においては最も顕著な減少が観察された。

次いでストレス負荷後 5 日目のモデル動物を用いて、イミプラミンあるいはフルボキサミンが BrdU 取り込み能に与える影響を検討したところ、負荷直後から 4 日目まで 1 日 1 回 5 日間連続的に投与することによって、有意な回復がみられた。

3.5. TUNEL 染色法

ストレス直後および 5 日目のモデル動物を用いて、TUNEL 染色法により細胞のアポトーシス（細胞死）を可視化したところ、対照群とモデル動物群で著変は認められなかった。

3.6. ト라우マ再体験モデルの BrdU 取り込み能

PTSD に特徴的な障害であるトラウマの想起によっても BrdU 取り込み能の低下が再び惹起されるかどうかを調べる目的で、ストレス負荷後 9 日目のモデル動物に対して、水に対するトラウマの再体験刺激として 10 分間の強制水泳を行った。その結果、トラウマの再体験により再度、BrdU 陽性細胞数の減少が惹起されることが明らかとなった。また、このトラウマ再体験による細胞増殖能の低下に対しても、イミプラミンないしフルボキサミンの慢性投与により有意な回復がみられた。

4. 考察

精神疾患動物モデルの確立には、ヒトと動物で観察される症状の類似性、成因そして治療薬による改善効果を満たす必要があると考えられる。アメリカ精神医学会が作製した精神疾患の診断・統計マニュアル第 4 版によると、PTSD の成因として、「(1)実際にまたは危うく死ぬまたは重傷を負うような出来事を、1 度または数度、または自分、または他人の身体の保全に迫る危険を、その人が体験し、目撃し、または直面した。(2)その人の反応は

強い恐怖、無力感または戦慄に関するものである、という 2 つが共に認められる外傷的な出来事に曝露されたことあること」が記されており、またその症状は、「外傷的な出来事の再体験障害」、「トラウマ関連刺激に対する持続的な回避・麻痺徴候」、および「覚醒亢進症状」がみられ、これら障害が「一ヶ月以上持続すること」が記されている。今回、水浸拘束ストレスを用いた当該モデル動物は、PTSD に特徴的な障害である長期間持続する麻痺症状と過覚醒症状の相反する 2 方向性の行動異常を示し、一部に心理的再体験類似症状を示すことが明らかとなった。また、水浸拘束ストレスは強力なストレスモデルであり、フットショックモデルなどの他のストレスモデルと比較しても十分に成因を満たしているといえる。さらに、当該モデルでみられた PTSD 類似症状は、PTSD 治療薬によって改善された。したがって、当該モデルは症状の類似性、成因、治療薬による改善効果を十分に満たす、有用な PTSD モデルとなる可能性が示唆される (図 2)。

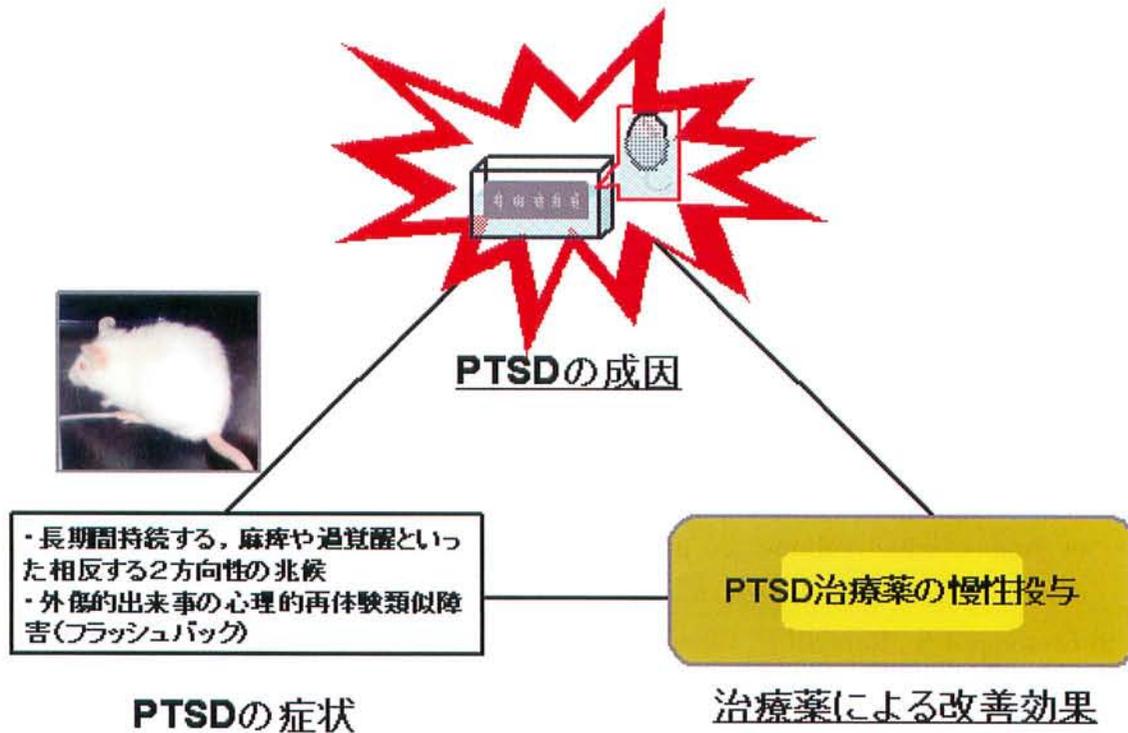


図 2 PTSD モデルとしての妥当性

また当該モデル動物において、海馬歯状回での神経細胞新生の抑制が観察され、条件刺激によるトラウマの再体験によっても再度、この抑制作用が誘引されることが明らかとなった。PTSD 患者の海馬では著明な萎縮が観察されるとの臨床報告(Bremner et al., 1995, 1997; Gurvits et al., 1996)があることを鑑みると、PTSD 患者では、トラウマ体験とそれに引き続くトラウマ誘起性の持続的フラッシュバックが、海馬歯状回の神経細胞新生を繰

り返し抑制する結果、海馬の萎縮が招来されている可能性は否定できない。このような抑制作用が、トラウマ神経症の発症機構に関与する可能性が考えられる。さらには、この抑制作用に対して、PTSD 治療薬が回復効果をもつことは、PTSD のような難治性の精神疾患に対して、注目すべき新しい視点の治療戦略になりうると考えられる。

5. 結論

水浸拘束ストレスを用いたトラウマ体験モデルは

- ・ トラウマ関連刺激により、持続的な麻痺症状がみられた。
- ・ 新奇環境下において、持続的な過覚醒症状がみられた。
- ・ PTSD 治療薬の慢性投与によって、上記の症状は改善された。

一方、当該モデルの海馬歯状回における BrdU 取り込み能の解析より

- ・ トラウマにより、神経細胞死に起因しない BrdU 陽性細胞数の低下が認められた。
- ・ トラウマの再体験により再び、BrdU 陽性細胞数の低下が惹起された。
- ・ PTSD 治療薬の慢性投与によって、上記の低下は回復した。

6. 謝辞

本研究を遂行するに当たり終始懇切なるご指導とご助言を頂いた、金沢大学大学院自然科学研究科博士後期課程在籍の玉置啓祐氏に深甚なる謝意を表します。

7. 参考文献

- 1) Bremner J.D., Randall P., Scott T.M., Bronen R.A., Seibyl J.P., Southwick S.M., Delaney R.C., McCarthy G., Charney D.S. and Innis R.B. : MRI-based measurement of hippocampal volume in patients with combat-related posttraumatic stress disorder. *Am. J. Psychiatry* 152, 973-981, 1995.
- 2) Bremner J.D., Randall P., Vermetten E., Staib L., Bronen R.A., Mazure C., Capelli S., McCarthy G., Innis R.B. and Charney D.S. : Magnetic resonance imaging-based measurement of hippocampal volume in posttraumatic stress disorder related to childhood physical and sexual abuse--a preliminary report. *Biol. Psychiatry* 41, 23-32, 1997.
- 3) Gurvits T.V., Shenton M.E., Hokama H., Ohta H., Lasko N.B., Gilbertson M.W., Orr S.P., Kikinis R., Jolesz F.A., McCarley R.W. and Pitman R.K. : Magnetic resonance imaging study of hippocampal volume in chronic, combat-related posttraumatic stress disorder. *Biol. Psychiatry* 40, 1091-1099, 1996.
- 4) Kuroki N. : Problems in diagnosing and deciding on compensation for PTSD in Japan. *Seishin Shinkeigaku Zasshi* 104, 1198-1206, 2002.