雌雄のつがい形成によるストレス抵抗性増強効果の解明

廣田 湧

群馬大学大学院保健学研究科

(ストレス科学研究 2020, 35, 64-67)

目 的

有事の際に、異性との関係性（つがい）が変化することがある。例えば、2011年東日本大震災の時には、「絆婚」といった結婚する人が増えたことや、2020年COVID19の流行下では、家にいる時間が増加することによるストレスで、離婚を考える人が増えたという報道が実際にあった。安定したつがいの維持は、死亡率を低下させるが、つがいの不和は、心疾患や精神疾患の発症リスクを増加することがヒトの疫学研究で報告されており（Walum and Young, *Nat. Rev. Neurosci.*, 2018）、健康な生活を維持する上で、良好なつがいの形成・維持は重要である。そのため、ストレスが、つがいの形成やその維持にどのような影響を及ぼすのかを科学的に示すことと、その影響を軽減する方法を探索することが必要である。

つがいの形成やその維持には、オキシトシン、バソプレッシン、ドーパミンが関与することが、一夫一婦制をとる齧歯類のプレーリーハタネズミを用いた研究で報告されている（Walum and Young, *Nat. Rev. Neurosci.*, 2018）。この動物は、性経験がない異性同士を同じ飼育ケージに入れると24時間でつがい形成する（Arai et al., *KMJ*, 2018）。先行研究で、ストレス処置された性経験のないオスは、メスと同居させた際に、つがいが形成されないこと（Arai et al., *Behav Brain Res.*, 2016）（Figure 1 左）から、つがい形成後にストレス処置を行った所、つがいは維持されることが分かった（Figure 1 右）。また、ストレス処置を受けると、恐怖記憶の増強が起きることが知られているが、メスとのつがいを形成した群では、それが軽減されるという知見を得た（Figure 2）。本研究では、つがい形成によりストレスや恐怖反応が軽減されるという現象に着目し、①恐怖記憶減弱効果が記憶の獲得と想起のい

Figure 1 ストレス（SPS）処置によるつがいへの影響

Figure 2 文脈的恐怖条件付けの結果
オスと同居させた群では、SPS 処置後の恐怖反応の増悪が確認された。一方、メスとつがい形成させた群では、オスと同居させた群と比較して、恐怖反応時間が有意に減少していた。

ずれへの作用かを同定, ②恐怖記憶減弱効果の介在物質, ③非つがい形成群での恐怖記憶減弱効果に介在が示唆された物質の効果を検証することを目的とした。

方 法

実験① Passive avoidance test を用いたつがい形成による恐怖記憶の減弱効果の作用点の同定

オスのプレーリーハタネズミ (13 ± 1.7 週齢) を性経験がないメスとつがい形成させた群 (パートナー群) とオス同士同居させた群 (対照群) に分けて, 5 日間飼育した。5 日目にメスとのつがい形成されているかを確認するために, partner preference test を実施した。Partner preference test は, 3 つのチャンバーと 2 つのトンネルからなる装置で行う (Figure 3 上)。本実験では, メス個体を 2 つのチャンバーに鎖で繋いでおき, 被験オス個体とその装置の中を自由に動くことができ, 3 時間の試験時間の中で, パートナーのメスと新規のメス個体と寄り添い合って過ごす時間を測定した。つがい形成しているプレーリーハタネズミは, 新規のメスと比較して, パートナーとより多くの時間を過ごすことから, つがい形成されているかを確認するのに用いた。

6 日目から passive avoidance test を実施した。Pas-

sive avoidance test の装置は, 白い明箱と黒い暗箱からなり, それぞれの箱の間にはギロチンドアがある作りになっている (Figure 3 下)。6 日目に, 装置に慣らすための馴化 (habituation) を 5 分間行った。明箱に入れてからの最初の 30 秒間はギロチンドアを閉めておき, 30 秒経過すると, ドアが開くことで, 被験個体は自由に 2 つの箱を出入り出来る。7 日目に条件付けを行った。条件付けの方法は以下である。馴化と同様, 明箱に入れてからの最初の 30 秒間はギロチンドアを閉めておき, 30 秒後にドアを開ける。被験個体が暗箱に入ると同時に, ドアを閉め, 電気ショック (0.4 mA, 2 秒間) を与える。1 分後に再度電気ショックを与え, 10 秒後に被験個体をホームケージに戻す。条件付けから 24 時間後に恐怖記憶試験を実施した。また, 9-11 日目に恐怖消去試験を行った。方法は, 馴化の方法と同様 5 分間行い, 電気ショックの付与は行わない。7 日目の条件付け時の暗箱までに入るまでの潜時と, 8 日目の恐怖記憶試験, 9-11 日目の恐怖消去試験の暗箱までに入る潜時を測定した。

実験② つがい形成によって恐怖反応を減弱させる作用物質の解明

つがい形成によって, 恐怖反応が減弱することが示唆されたため, つがい形成に関わるオキシトシンの関与を検証した。つがい形成したオス個体の脳室内にカニューレを設置し (Figure 4), 脳室内に直接オキシトシンレセプター阻害剤 (OTA) を投与することにした。つがい形成後に実験 1 と同様に partner preference test を行った。その翌日に, 被験オス個体の脳室内にカニューレを設置し, 以降は単独で飼育した。術後の回復期間を 5 日間設け, 11 日目から実験 1 と同様の方法で passive avoidance test を行った。脳室内への薬剤の投与は, 条件付けの 30 分前に 2 μ l 投与し

Figure 3 Partner preference test 装置 (上)
Passive avoidance test 装置 (下)

Figure 4 右側脳室にカニューレを設置されたプレーリーハタネズミ

た。つがい形成させた対照群には、溶媒とした人工脳脊髄液を同量投与した。13日目の恐怖記憶試験の90分後に被験個体を麻酔し、脳を摘出した。

実験③ 非つがい形成群での恐怖反応を減弱させる作用物質の効果検証

実験②より、つがい形成したオス個体にオキシトシンレセプター阻害剤を投与することで、つがい形成による恐怖反応の減弱効果が打ち消されることが明らかになった。次に、オス同士同居群に対し、恐怖条件付けの直前にオキシトシンを脳室内に直接投与することで、恐怖反応を減弱することが出来るかを検証した。実験③では、オス同士同居群のみを用いるため、オス同士をペアで4日間飼育し、5日目に脳室内にカニュレを設置した。10日目から passive avoidance test を実施した。脳室内への薬剤の投与は、薬剤の薬効を考慮し、条件付けの20分前に2 μ l 投与した。対照群には人工脳脊髄液を投与した。12日目の恐怖記憶試験の90分後に被験個体を麻酔し、脳を摘出した。

結果・考察

実験① Passive avoidance test を用いたつがい形成による恐怖記憶減弱効果が作用するタイミングの同定

つがい形成群のオスとオス同士同居群のオスに対し、passive avoidance test を行った結果、両群とも条件付け前と比較して、条件付け後の暗箱に入るまでの潜時が有意に増加した。しかし、条件付け後で両群を比較すると、つがい形成群はオス同士同居群よりもその潜時が有意に短縮した (Figure 5)。また、消去試験を行ったが、両群ともに暗箱に入るまでの潜時の減少過程に違いは見られず、つがい形成依存的な恐怖反応の減弱効果は、恐怖記憶の獲得時に作用していることが示唆された。同様の効果はメス同士の同居群と比較してつがい形成したメスにも認められ、性差のない現象であることも確認した。

実験② つがい形成によって恐怖記憶の減弱に介在する物質の解明

つがい形成にはオキシトシンが関わっていること、先行研究でつがい形成群では視床下部室傍核でのオキシトシン染色性が増加したこと、実験①で恐怖記憶獲得時に減弱効果が作用していることが示唆されたことから、OTA をつがい形成群のオス個体に対し、恐怖条件付けの前に脳室内に投与した。

その結果、OTA 群は、条件付け前と比較して条件付け後の暗箱までに入る潜時が有意に遅延した。また、

Figure 5 Passive avoidance test の結果
条件付け前と比較して、両群とも、暗箱に入るまでの潜時が遅延する。メスとつがい形成させた群では、オスと同居させた群と比較して、潜時が有意に短縮。

Figure 6 オキシトシンレセプター阻害剤は、つがい形成による恐怖反応減弱効果を打ち消す
阻害剤投与群は、条件付け前と比較して、暗箱に入るまでの潜時が大幅に遅延した。対照群と比較し、条件付け後の潜時が有意に増加。

条件付け後で両群を比較しても、OTA 群は対照群よりも潜時が有意に遅延した (Figure 6)。この結果より、つがい形成による恐怖記憶の減弱効果は、恐怖記憶獲得 (学習) 時に、オキシトシンが作用していることが示唆された。

実験③ 非つがい形成群での恐怖記憶を減弱への介在が示唆される物質の効果検証

実験②で恐怖反応の獲得時に、オキシトシンが恐怖記憶の獲得を減弱させることが示されたので、オス同士同居群に対して、条件付けの直前にオキシトシンを投与することで、恐怖反応を減弱することが出来るか

Figure 7 非つがい形成群へのオキシトシン投与
非つがい形成群へのオキシトシンの単回投与では、恐怖記憶の減弱効果は得られなかった。

を検証した。

その結果、人工脳脊髄液を投与した対照群、オキシトシン投与群共に、条件付け前と比較して、条件付け後の暗箱に入るまでの潜時が有意に遅延した。条件付け後で両群を比較したが、両群との間で有意な差はなかった (Figure 7)。この結果より、条件付けの直前にオキシトシンをオス同士同居群の脳室内に投与したが、つがい形成群で見られた恐怖反応の減弱効果を引き出すことは出来なかった。これにはメスと5日間同居するような長期的な関わりや、メスとの交尾行動・身体的接触による脳内神経回路の変化が必要であると考えられる。オス同士同居群には、オキシトシンの単回投与を行ったが、同様の効果を引き起こすには、長期的な投与によるオキシトシンニューロンの神経回路変化の必要性が示唆される。

視床下部室傍核から扁桃体中心核に投射するオキシトシンニューロンの活性が、扁桃体中心核内のGABA作動性ニューロンを活性化することによって、恐怖記憶を抑制するという先行研究がある (Knobloch et al., *Neuron.*, 2012)。今回得られた知見では、つがい形成によって視床下部室傍核から投射するオキシトシンニューロンが変化することで恐怖学習の減弱効果が起きたと仮定している (Figure 8)。

また、扁桃体中心核のアストロサイトに発現するオキシトシンレセプターを介して、扁桃体から出力される行動反応が調節されることが報告されている (Wahis et al., *Nature Neurosci.*, 2021)。現在、実験①-③で得られた被験個体の脳を用いて、神経活動のマー

Figure 8 オキシトシンニューロンによる恐怖記憶獲得の減弱効果
視床下部室傍核から投射するオキシトシンニューロンは、扁桃体中心核のGABA作動性ニューロンを活性化し、恐怖学習を減弱する。

カーである cFos と GABA の前駆体である GAD67, GAD67 とオキシトシンの蛍光2重染色を行っている。

得られた結果の社会貢献性・新規性・独創性

本研究は、メスとのつがいを形成することで、オス個体の恐怖記憶を減弱することを示した。これは、他の先行研究と異なり、ストレス付与時に同種他個体の動物を提示せずとも得られる点や、つがいの形成という雌雄の社会的・性的な関係性によって得られる点で独創的である。

つがい形成をする動物は哺乳類のおよそ3%とされている。プレーリーハタネズミは、こうした性状を示す貴重な実験動物であり、つがい形成の神経機構の解明に用いられているが、本研究は、そのつがいの形成がストレスや恐怖に対する反応性を変化させることを世界で初めて示した。同性同士をペアにした場合は、ストレス反応の減弱は起きず、異性とつがい形成した時にのみ、この減弱効果が起きることから、これは雌雄のつがいを形成することにより、神経可塑的な変化が生じていると考えている。これは、夫婦が父母になるための準備として、このような行動変容を生じている可能性も示唆する。この行動変容を引き起こす神経機構が解明されることで、関与が示唆されたオキシトシンを用いた、ストレスを軽減させる治療薬の開発や関連疾患の予防に貢献すると考える。