



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	幼若期ストレスによって生じる成熟期ラットのうつ様行動に対するケタミンの効果とその神経基盤研究 [全文の要約]
Author(s)	相川, 勝洋
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 配架番号：2435 他
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第13421号
Issue Date	2019-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/74302
Type	doctoral thesis
File Information	Katsuhiro_Aikawa_summary.pdf



学位論文（要約）

幼若期ストレスによって生じる
成熟期ラットのうつ様行動に対するケタミンの効果と
その神経基盤研究

(Studies about the effect of ketamine on the juvenile stress-induced depression-like behavior and
alteration of neural activity in adult rats)

2019 年 3 月

北 海 道 大 学

相 川 勝 洋

学位論文（要約）

幼若期ストレスによって生じる
成熟期ラットのうつ様行動に対するケタミンの効果と
その神経基盤研究

(Studies about the effect of ketamine on the juvenile stress-induced depression-like
behavior and alteration of neural activity in adult rats)

2019 年 3 月

北 海 道 大 学

相 川 勝 洋

学位論文内容の要約

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 相 川 勝 洋

学 位 論 文 題 名

幼若期ストレスによって生じる成熟期ラットのうつ様行動に対するケタミンの効果と
その神経基盤研究

(Studies about the effect of ketamine on the juvenile stress-induced depression-like behavior
and alteration of neural activity in adult rats)

【背景と目的】

うつ病は現在世界で約 3 億人が罹患する深刻な疾患である。うつ病の誘引は強いストレスであるが、虐待などの幼少期の強いストレスも、その後の人生におけるうつ病の発症率を上げることが分かっている。これは、虐待が脳の正常な成熟を障害し、成長後のストレス感受性および脆弱性を高めることに起因すると考えられており、さらに虐待経験を持つうつ病患者は治療抵抗性や自殺企図を伴う重症化を示す傾向があることが報告されている。うつ病の薬物治療は約半世紀の間大きな進歩が得られずにいたが、近年有望な抗うつ薬として従来麻酔薬として用いられてきたケタミンが注目を集めており、ヒト・動物を対象にした多くの研究が行われてきた。その結果、ケタミンは投与からわずか数時間で気分改善効果を発揮するという既存の抗うつ薬に無い即効性があること、さらに治療抵抗性のうつ病にも有効で、自殺企図を減少させるなど画期的な効果が報告されている。一方で、幼若期ストレスとうつ病の関連性が明らかであるにも関わらず、小児期の虐待経験をもつ患者、もしくは幼若期のストレスを負荷された動物へのケタミンの効果について検証した研究はない。虐待を模した幼若期ストレスを負荷した動物を用いて、惹起されたうつ様行動に対するケタミンの効果、およびその神経基盤を検証することは、うつ病治療の進歩にとって有益な知見となり得る。本研究では、「幼若期ストレスに起因する成熟期のうつ様行動および神経学的変化をケタミンが回復させる」という仮説を設定し、気分のコントロールに重要な役割を担う内側前頭前野の変化を多角的に検証した。

【材料と方法】

実験には、Wister/ST 系雄性ラットを用いた。生後 21 日齢で母子分離し、25 日齢まで 5 日間連続した足蹠電気刺激ストレス（3wFS）に曝露した。その後は追加でストレスを負荷することなく飼育し、成熟期とされる 10 週齢に達した後ケタミン 10 mg/kg もしくは生理食塩水を腹腔内投与した上で、以下の実験を行った。

1. 強制水泳試験：15 分間の強制水泳試験を行い、うつ様行動である無動時間を比較し

た。

2. Whole-cell patch-clamp 法による記録：ラット脳の急性冠状スライスを作製し、内側前頭前野 prelimbic 領域第 V 層錐体細胞の膜電位と、興奮性および抑制性シナプス後電位 (EPSC/IPSC) を記録し比較した。本研究ではさらに、自発性 EPSC の変化がシナプス前後どちらによるものであるかを検討するため、テトロドトキシンを還流液に加えた状態で微小 EPSC/IPSC も記録、分析した。電極内液には細胞染色のため、0.1%ピオサイチンを添加した。

3. 蛍光染色による形態評価：Whole-cell patch-clamp 法で用いた細胞を Alexa 488 conjugated streptavidin を用いて染色し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて先端および基底樹状突起の 3D イメージを取得し、興奮性入力強度を反映する樹状棘突起の形態を観察・比較した。

統計は主に two-way analysis of variance (ANOVA) を用い、交互作用が有意だった場合は one-way ANOVA による単純主効果の比較を行った。ラットは 3wFS およびケタミンの有無で 4 群に分類した。

【結果】

強制水泳試験：two-way ANOVA で、3wFS とケタミンの交互作用を認めた ($F(1,24) = 16.61, p < 0.001$)。one-way ANOVA により単純主効果の検定を行ったところ、3wFS により immobility が増加し ($F(1,12) = 20.225, p = 0.001$)、この変化がケタミンにより回復する ($F(1,12) = 7.235, p = 0.02$) ことが示された。

Whole-cell patch-clamp 記録：振幅に関して、two-way ANOVA で 3wFS とケタミンの間に交互作用を認めた ($F(1,6128) = 75.684, p < 0.001$)。one-way ANOVA で単純主効果の検定を行ったところ、3wFS により振幅が低下し ($F(1,2355) = 51.096, p < 0.001$)、ケタミンにより振幅が回復する ($F(1,3403) = 72.351, p < 0.001$) 結果となった。頻度に関して、two-way ANOVA で 3wFS とケタミン間に交互作用を認めた ($F(1,6062) = 44.139, p < 0.001$)。one-way ANOVA で単純主効果の検定を行ったところ、3wFS で頻度が減少し ($F(1,2319) = 52.975, p < 0.001$)、ケタミンにより頻度が回復する ($F(1,3364) = 181.193, p < 0.001$) 結果となった。また、微小 EPSC も、3wFS により振幅・強度とも減少し、ケタミンにより回復する事が示された。膜電位の変化、自発性/微小 IPSC に関しては群間に有意差は認めなかったものの、うつ様行動の変化とは一致しなかった。

蛍光染色による形態評価：先端樹状突起の密度は 3wFS によって減少し ($F(1,21) = 23.508, p < 0.001$)、ケタミンにより回復傾向を示した ($F(1,20) = 3.032, p = 0.097$)。成熟 spine の比率に関してはケタミンの主効果を認め ($F(1,39) = 10.044, p = 0.003$)、ケタミンによって成熟 spine の比率が増加することが示された。一方、基底樹状突起に関しては変化を認めなかった。

【考察】

3wFS により成熟期における無動時間の増加、内側前頭前野第 V 層錐体細胞における EPSC の減弱、spine 密度の減少が生じたことは、幼若期ストレスにより成熟後うつ様変化が惹起されることを示唆している。さらにこの変化がケタミンにより回復したことは、幼若期ストレスに起因するうつ様変化に対してケタミンが有効であることを示している。spine の変化は先端樹状突起にのみ生じたことから、観察された電気生理学的変化は先端樹状突起からの興奮性入力に起因すると考えられた。先行研究ではケタミン投与から 24 時間後の変化を調べたものがほとんどであり、その時点では先端樹状突起の密度および成熟 spine の比率の両方の改善が認められている。一方ケタミン投与後 16 時間後の変化を調べた本研究では、成熟 spine の比率は改善したものの、密度は回復傾向にとどまった。このことから、行動学および電気生理学的なうつ様変化の回復は、密度の回復に先行して既存の spine の成熟化によって達成されるという時間的経過が示唆された。

【結 論】3wFS を負荷したラットを用いて、ケタミンの効果を行動学的、電気生理学的、形態学的に検証した。その結果、ケタミンは先端樹状突起からの興奮性入力を増加させることで、うつ様変化を回復させることが示された。このことは、幼若期ストレスに起因するうつ様変化に対するケタミンの有効性を示唆している。ケタミンは虐待に起因するうつ病に対しても有効であることが期待される。

【今後の展望】

本研究は相関研究であるため、今後ケタミンの抗うつ効果をブロックするラパマイシンを用いて、因果関係を明らかにする必要がある。

ケタミン投与後早期の電気生理学的および形態学的変化を検討し、ケタミン投与からの時間経過を明らかにしていく予定である。

IPSC が変化した機序およびそれがもたらした結果に関して、さらなる検討が必要である。