

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：14603

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24653213

研究課題名(和文) リラックスモデルの確立と持ち出し

研究課題名(英文) Direct handling of "Relaxing" for experiments.

研究代表者

駒井 章治 (Komai, Shoji)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・准教授

研究者番号：50420469

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円、(間接経費) 720,000円

研究成果の概要(和文)：「リラックス」とは一体何なのだろうか。臨床場面において漸近的筋弛緩法などのリラクゼーション法は広く活用されているにも関わらず、リラックスを実験的に取り扱うのは非常に困難である。多くの場合はリラックス研究の対局にあるストレス研究に方向を転じ、得られた研究結果を逆に読むことでリラックスについて論じられてきた。そこで当研究課題ではストレスからの緩和過程を光や音などの条件刺激と連合学習させ、全くストレスと関係のない状況もしくは別のストレス状況下で任意にリラックス状態を誘導する試みた。結果のばらつきが大きいため、今後のより厳密な統制が必要ではあるものの、一定の成果を得た。

研究成果の概要(英文)：We modern human beings have been suffered from severe mental stress these days. Then people have tried to take care of it by using of various methods called "relaxation". The relaxation itself, however, seems to be mysterious to handle in experimental conditions. This is simply because we have no subjective marker of relaxation rather than stress condition. Animal clearly raises the concentration of glucocorticoids and drops the body temperature accompanied with stress stimulus. We here tried to arrange the schedule to mobilize the relaxation condition in a particular stressful situation according to classical conditioning paradigm. We found that the physical stimuli could work as unconditioned stimuli to bring out the relaxation condition rather than chemical stimuli, because of precise reaching time to their sensors, which helps the stimuli to be strongly conditioned.

研究分野：動物生理・行動

科研費の分科・細目：実験心理学

キーワード：リラックス 条件づけ

1. 研究開始当初の背景

近年うつ病患者数の増加は甚だしく、自殺者数も増加の一途をたどっている。このような患者に対する薬物の開発はいうまでもなく重要であるが、一方で心身の健康を保つことにより未然にこういった疾患から自らを守るための方略の開発も極めて重要である。本研究課題では、系統的脱感作法、特に今回は弛緩法によるリラックス誘導を実験動物であるマウスに施術し、「リラックス」を実験的に取り扱うことを目的とする。これまでにストレス研究は多くなされてきたが、リラックスそのものを実験対象とした研究は殆ど行われていない。

2. 研究の目的

本研究課題ではリラックスのモデル化とリラックス状態の「持ち出し」を目的とした。これにより、緊張場面でのリラックス誘導の科学的根拠が明らかとなり、精神予防医療への一助となるものと考えらる。

3. 研究の方法

(1)ジアゼパム投与による情動性の変化量の測定

実験動物

Sprague-Dawley 系 (SD) 雄ラット (日本 SLC) を 7 週齢で購入し、0.5 mg/kg に希釈したジアゼパム注射液 (大洋薬品) と、コントロールとして saline (大塚製薬) をラットに投与した群に分け、投与後 30 分の回復期間をおいた。その後、ホールボード試験及び高架式十字迷路試験による情動性の変化量測定を行った。全ての動物は、8 時から 20 時を明期とする 12 時間の明暗サイクル下で飼育し、食餌と水は自由に摂取できるようにした。

ホールボード試験

新奇環境における探索行動から検出される情動性への影響を測定するため、ホールボード試験装置を作成し、行動実験を行った。試験装置は、幅 48 cm × 奥行 48 cm × 高さ 53 cm の白色角形ケージで、地面から床面までの距離を 30 cm とし、床面には中央から等距離に直径 38 mm の穴を 4 カ所設けたものを使用した。情動性評価試験の実験系を確立するため、抗不安剤であるジアゼパム (大洋薬品) を投与したラットを用いて試験を行った。それぞれのラットを迷路の中心に置き、迷路内での探索行動を 5 分間観察した。装置の上方からデジタルカメラを用いて行動を撮影し、EthoVision XT version7 (Noldus Information Technology, Leesburg, VA) で解析を行った。EthoVision を用いてラットの鼻先、重心、尾の付け根の 3 点を標識した。進入を、鼻先と重心が指定した範囲に動物が入った時と定義した。測定項目として、床面の中央から穴を囲む 28 cm 四方の範囲を "center zone" と定義し、center zone への進入回数と滞在時間の平均値を算出した。

高架式十字迷路試験

高さによる恐怖から検出される情動性への影響を測定するため、高架式十字迷路を作成し、行動試験を行った。試験装置は、幅 110 cm × 奥行 110 cm × 高さ 45 cm アームの幅 10 cm の十字に交差した迷路で、地面から迷路までの距離は 50 cm とし、壁の付いたアーム (closed arm) と壁のないアーム (open arm) を設けたものを使用した。それぞれのラットを迷路の中心に置き、迷路内での探索行動を 5 分間観察した。撮影、点の標識、進入の定義はホールボード試験と同様である。EthoVision の解析は open arm と closed arm における滞在時間と進入回数を計測した。open arm での滞在時間の割合は、open arm での滞在時間をすべての arm での滞在時間で割った値を%で示した。この解析では、十字の交差部分であるセンター領域は考慮しないものとする。open arm への進入回数の割合も同様に、open arm への進入回数をすべての arm への進入回数で割った値を%で示した。

統計学的処理

データはすべて平均値 ± SEM として示し、Student's t-test により検定を行った。

(2) 匂い条件づけ試験

実験動物

SD 雄ラットを 5 週齢で購入し、2 週間の匂い条件づけを行った後、7 週齢でホールボード試験及び高架式十字迷路試験による情動性の変化量測定を行った。全ての動物は、8 時から 20 時を明期とする 12 時間の明暗サイクル下で飼育し、食餌と水は自由に摂取できるようにした。

匂い条件づけ

ラットをランダムに三群に分け、アロマオイルを長時間提示し、飼育環境の匂いとして条件づけを行った。アロマオイルは分別学習が可能であるシナモンリーフ (Herbal Life) とジュニパー (Herbal Life)、コントロールとしてミネラルオイル (SIGMA ALDRICH) を用いた。

異なる匂いの条件づけとして、ラットを二群に分け、飼育環境の匂いとして条件づけを行った。当研究室の先行研究で血圧降下を示した匂い (40 - 2) (シトラール, 40%、リナロール, 2%) とミネラルオイルを用いた。

ミネラルオイルにて 100 倍希釈したアロマオイルを、三つ折りにしたキムワイブに 500 µL 塗布し、ティーボールに入れ、飼育用ケージにつり下げた環境で 14 日間の飼育を行った。匂いの交換は 1 日に 1 回の頻度で行った。ただし、2 日以上交換を行なわない場合には、塗布したキムワイブを増やして飼育した。また、各種アロマオイルを提示した飼育ケージは、24 時間換気され、外部の匂いを遮断した飼育装置 (Safety Rack Model

2200S, NY system) にて飼育された。

ホールボード試験

条件づけられた環境由来の嗅覚刺激による情動性への影響を測定するため、嗅覚刺激装置付属のホールボード試験装置を作成し、行動実験を行った。

測定中は常に、10 倍希釈したアロマオイル 2 mL を入れたシャーレを設置したアクリルボックスに活性炭とシリカゲルを通して脱臭、脱水した Air を通し、揮発した気体を流量 2 L / min にて装置内に充満させ、飼育時の環境と同じ匂いの濃度を保った。ホールボード試験は 1 日 1 種類のアロマオイルを使用し、ジュニパー、シナモンリーフ、ミネラルオイルの 3 種類のアロマオイルについて 2 日間の測定を行った。ミネラルオイルは溶媒であるため、コントロールとした。当研究室の先行研究で血圧降下を示した匂い (40 - 2) とミネラルオイルを用いた試験ではコントロールであるミネラルオイルを用いて測定後、十分換気し、(40 - 2) で測定を行った。解析については、1-2. と同様である。

高架式十字迷路試験

ホールボード試験と同様、条件づけられた環境由来の嗅覚刺激による情動性への影響を測定するため、嗅覚刺激装置付属の高架式十字迷路を作成し、行動試験を行った。

測定中は常に、10 倍希釈したアロマオイル 6 mL を入れたシャーレを設置したアクリルボックスに活性炭とシリカゲルを通して脱臭、脱水した Air を通し、揮発した気体を流量 2 L/min にて装置内に充満させ、飼育時の環境と同じ匂いの濃度を保った。ホールボード試験は 1 日 1 種類のアロマオイルを使用し、ジュニパー、シナモンリーフ、ミネラルオイルの 3 種類のアロマオイルについて 2 日間の測定を行った。ミネラルオイルは溶媒であるため、コントロールとする。当研究室の先行研究で血圧降下を示した匂い (40 - 2) とミネラルオイルを用いた試験ではコントロールであるミネラルオイルを用いて測定後、十分換気し、(40 - 2) で測定を行った。解析については、1-3. と同様である。

統計学的処理

データはすべて平均値 \pm SEM として示し、One-way ANOVA により検定を行った。前者で有意差が認められた場合、多重比較 (Tukey's HSD test) を行った。

(3) Air ストレスによる生理応答の変化量の測定

実験動物

SD 雄ラットを 5 週齢で購入し、7 日間飼育ケージに順応させた後、血圧測定のためのヘッドプレート及び、カテーテル手術を行った。また、カテーテル手術、ヘッドプレート手術を施したラット群を術後 3 - 4 日の回復期間

をおいた後、7 週齢で血圧測定を行った。全ての動物は、8 時から 20 時を明期とする 12 時間の明暗サイクル下で飼育し、食餌と水は自由に摂取できるようにした。

ヘッドプレート手術

術中は、小動物用麻酔器 (Model MK-A100, 室町機械) を用いて揮発性麻酔薬セボフルラン (丸石製薬) 5% を流量 4 - 5 L/min でキャリアーガスに通し、ラットの鼻近傍に提示して吸引麻酔を施した。麻酔下において、脳定位固定装置 (Narishige) を用いてラットを固定した。頭部を剃毛した後、切開し、ヘッドプレートと頭蓋骨を歯科用セメント (Unifast Trad, GC Corporation) で接合した。

カテーテル手術

Air 停止時の血圧を測定するため、カテーテル手術を行った。術中の麻酔処理は、ヘッドプレート手術と同様の手順で行い、ラットの鼠径部の皮膚を切開し、大腿動脈と静脈を剥離してからカテーテル (PUFC-C30-10, INSTECH SOLOMON, プライムテック) を大腿動脈に 2 cm 程度挿入した。カテーテル内の血液が凝固するのを防ぐため、2500 U に調整したヘパリン (Wako) を入れた生理食塩水 (大塚製薬) で流路を満たしたハミルトンシリンジ (アズワン) とカテーテルを接続した。ハミルトンシリンジ内へはシリンジポンプ (MAPE-1, アズワン) で生理食塩水を 0.1 μ L/min で流した。術後の当日、翌日のラットは咀嚼が困難なため、カロリーメイト (チョコレート味、大塚製薬) を与えた。回復後、血圧測定用アニマルホルダに順応するためのトレーニングを行った。

トレーニング

ヘッドプレート及びカテーテル手術を行ったラットを血圧測定用アニマルホルダに順応させるため、ラットをアニマルホルダに入れ、ヘッドプレートで固定するトレーニングを 2 回行った。アニマルホルダに入れる時間は 1 回目が 5 分、2 回目が 60 分としてトレーニングを行った。

生理応答の変化量の測定

ストレスによる生理応答を多角的に評価するため、実験小動物用パルスオキシメータ (STSRR Life sciences) を用いて飽和酸素濃度、心拍、呼吸数を測定した。

血圧測定時は、アニマルホルダにラットを入れ、ラットの心臓と尾部が同じ高さに、また、頭部から尾部までが一直線になるように固定した。

カテーテルと血圧トランスデューサー (日本光電工業) を結合し、BPCABLE2 コネクター (World Precision Instrument) を経由して Pressure Monitor BP-1 (World Precision Instrument) で血圧を測定した。

測定プログラムは LabVIEW (日本ナショナルインスツルメンツ) で作成したプログラムによって制御し、自動的にコンピュータにデータを取り込めるようにした。Air をラットの顔に当てるのと同時に血圧測定を開始し、Air が停止してから 180 秒後に血圧の計測を終了した。Air は 60 - 180 秒の間でランダムに停止するようにした。

測定した血圧の値は、30 秒間隔で平均し、0 秒を Air が停止した時間とした。各時間の値は前後 15 秒を平均しており、例として 0 秒における平均値は、-14 秒から 15 秒までの 30 秒間を平均した値である。

Air 刺激

Air は、常に活性炭とシリカゲルを通し脱臭、脱水した Air を提示した。Air 刺激は、すべて LabVIEW で作成したプログラムにより制御し、電磁バルブを自動的に切り替えることで Air を停止した。Air 刺激は、内径 1.0 mm のパンチバルブチューブ (TB040X085S11P, ASCO Scientific) を通して流量 4.0 L/min で提示した。

統計学的処理

データはすべて平均値 \pm SEM として示し、血圧、心拍の顕著な低下が観察された -30 - 90 秒の間の 1 秒毎の変化量を One-way ANOVA より検定を行った。前者で有意差が認められた場合、多重比較 (Tukey's HSD test) を行った。

(4) 音条件づけ試験

実験動物

SD 雄ラットを 5 週齢で購入し、7 日間飼育ケージに順応させた後、血圧測定のためのヘッドプレート及び、テレメトリー手術を行った。また、テレメトリー手術、ヘッドプレート手術を施したラット群を術後 3 - 4 日の回復期間をおいた後、7 週齢で条件づけを行った。

全ての動物は、8 時から 20 時を明期とする 12 時間の明暗サイクル下で飼育し、食餌と水は自由に摂取できるようにした。

テレメトリー手術

行動試験中及び遠隔に血圧測定を行うため、全身麻酔を施した後、ラットの腹部を切開し、腹大動脈を剥離し TR53P 送信機、TR46SP 送信機 (TELEMETRY RESEARCH) を挿入した。術後、体力回復のため、カロリーメイトを与えた。

音条件づけ

ラットの顔に Air を当て、Air を停止後に表れるストレスから解放された状態時に聴覚刺激を行うことで、緩和状態と音を連合学習させるために条件づけを行った。評価試行の際に、Air 刺激に置き換わる異なるストレスを提示するため、Air 提示時と同時に LED (電球サイズ 1 cm, 強度 20 mcd, RS) を提示す

ることで連合学習させた。評価試験では、平常時の血圧として Air 提示までの 60 秒間測定し、60 秒から評価試行の間終始 LED を当て、121 - 181 秒の間でランダムに条件づけされた音を提示した時の血圧の変化を測定した。条件づけのためのトレーニング 1 試行は、まず平常時の血圧として Air 提示までの 60 秒間測定し、60 秒から Air と LED が同時に提示され Air と LED が同時に停止する時間を 120 - 180 秒の間でランダムに設定し、Air 停止後 120 秒間の血圧の変化を観察してから、次のトレーニングまたは評価試行に移行するよう LabVIEW でプログラムを制御した。Air の停止から音の提示までの時間を delay と称し、音は 10 秒間提示した。1 セットを 1 評価試行と 5 回のトレーニングで構成し、1 日 3 セット行った。ただし、LED と Air 提示の連合学習の評価として平常時の血圧として Air 提示までの 60 秒間測定し、60 秒から LED のみ提示したときの血圧と心拍を確認した。また、条件刺激である音の提示は行わなかった (図 12)。

LED と Air の提示の連合学習の評価方法として、トレーニング 2 日目と 10 日目の 2 セット目と 3 セット目の評価試行における LED 提示直前 30 秒、提示直後 30 秒、音提示直前 30 秒間の血圧及び心拍の平均値を求めた。

-1. イヤホンの装着

Air 音による血圧への影響を排除するため、外部からの音が聞こえないようにラットの耳にパンチバルブチューブ (TB040X085S11P, ASCO Scientific) を入れ、シリコンシーラント (World Precision Instruments) で隙間を塞いだ。この処理はテレメトリー手術の時にを行った。パンチバルブチューブを耳の中で固定した後、パンチバルブチューブにイヤホンを入れ、イヤホンとチューブが外れないようシリコンシーラントで固定した。

-2. 音条件づけ試験の条件検討

イヤホンの装着させたラットに、音のタイミング delay 1 秒、音圧 37 db、音域 10 kHz の音で条件づけを行った。音圧はラットの生理応答に影響を及ぼさない音圧に設定した。強い Air 刺激をラットに提示することで、Air 停止時に表れる緩和状態を引き起こすことが容易になると考え、Air の流量を 5.0 L/min に設定し、Air 刺激はパンチバルブチューブを用いてラットの鼻に当たるように提示した。Air を提示している間は LED ライトを提示した。条件づけのためのトレーニングとして、図 12 のスケジュールを 10 日間連続で行った。

評価方法として、Air が停止した時間を 0 秒とし、0 - 30 秒で血圧及び心拍が有意に減少したことから -30 - 0、0 - 30 秒の間の 1 秒毎の変化量の平均値を求めた。

-4. 統計学的処理

データはすべて平均値 \pm SEM として示し、Two-way ANOVA より検定を行った。前者で有意差が認められた場合、多重比較 (Tukey's HSD test) を行った。また有意性検定と並行して、effect size も算出した。有意性検定における p 値はサンプル数に左右されるが、effect size はサンプル数に左右されず、実験操作や条件間の関係の強さを表す指標として用いられる。effect size が大きい [(Large), $2 > 0.14$] 場合、各条件間の母集団の分布の間に大きな隔たりがあると予想される。今回算出した effect size の指標は Medium > 0.06 , Small > 0.01 である。

4. 研究成果

シナモンリーフ、ジュニパー等、比較的ラットが好む匂いを用いたものの、ホームケージへの臭付けによる条件づけではホールボード試験、高架式十字迷路試験ともに明確な効果は見られなかった。しかし当方で吸引による血圧降下を確認した (特許取得済) リナロールとシトラールの混合臭「40:2」ではホームページにおける条件づけにより高架式十字迷路におけるオープンアームでの滞在時間に差がある傾向を示し、オープンアームへの進入回数が有意に増加した。

音によるストレスからの緩和過程の条件づけでは、条件づけ3日目までに比べ、8日目以降のほうが音による血圧現象が顕著に見られた。このことは、条件づける無条件刺激の種類が匂いのような拡散性化学刺激よりも音や光といった物理刺激の方が今回のような研究には適していることを示している。これは、無条件刺激と条件刺激の随伴性 (時間的な連続性) が明確であり、連合学習が成立しやすい条件であることが原因であると推測される。

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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

駒井章治 (KOMAI, Shoji)

奈良先端科学技術大学院大学バイオサイ