

環境刺激による
マウスの情動・不安・学習行動への影響

徳毛孝至、平居貴生、西尾廣昭

**Effects of environmental stimulation on emotional,
anxiety and learning behavior in mice**

Kohji Tokumo, Takao Hirai and Hiroaki Nishio

ABSTRACT

Environmental stimulation affects human. We studied the effect of environmental noise to prenatal or early postnatal period on the development of mice emotional and anxiety-related behavior and the spatial learning in mice. Present results indicated that environmental noise to early postnatal period might cause learning impairment accompanied by the emotional and anxiety disorder afterwards. In the other study, the effect of (Z)-3-hexenol, one of the main constituent of green odor, on the anxiety-related behavior of mouse in an elevated plus-maze and the content of 5-hydroxytryptamine (5-HT) and its metabolite in the brain were investigated. Changes in serotonergic activity in the cortex and hippocampus were suggested to be involved in the anxiolytic effect of (Z)-3-hexenol observed in the elevated plus-maze test.

はじめに

日常生活の中には光、音、におい、精神的、身体的ストレスなど生体に何らかの影響を与える様々な刺激が存在している。これらの刺激を「環境刺激」と考えると、環境刺激はヒトを快にもさせ不快にもさせる。例えば音についてみると、美しい音楽はヒトの心を豊かにし、騒音はヒトの気分とともに健康をも害する可能性が示唆されている¹⁾。また、同一のにおいに対してヒトによっては、あるいは体調によっては快と感ずることがあり、不快と感ずることもある。このように環境刺激は、刺激の種類や強度だけではなく、刺激を受ける側の要因により生体に有益な影響や、あるいは有害な影響をもたらすことがある。本研究では、環境刺激として、ヒトに有害な影響をもたらす「ストレス刺激」と、有益な効果をもたらす「におい」が生体に及ぼす影響について明らかにするため、マウスの行動解析を中心に検討を行い、さらに神経化学的検討も加えた。

1. 胎生期・幼若期ストレスのマウス情動・不安関連行動及び学習能力への影響

ストレス刺激は生体に生物学的影響にとどまらず、きわめて大きな心理的・精神的影響を及ぼす。過度のストレス負荷は不安や抑うつの原因となり、さらには心的外傷後ストレス障害 (PTSD: Post traumatic stress disorder) のような重篤な障害をもたらす場合もある。妊婦を取り巻く環境には、職場での人間関係、夫婦喧嘩、外部からの騒音、離婚問題など多種多様のストレスが存在しているのが現状である。以前から、妊娠中とくに妊娠後期に離婚問題、夫との死別などによって激しい精神的なストレスを受けた母親から生まれた子供は、そうしたストレスを受けなかった親から生まれた子供に比べ、行動異常や精神遅滞の発生率が約2倍であることが知られていた²⁾。また、胎児期にはすでに音を区別する能力が認められていることから、周産期における過剰な騒音環境は、子供の性格や行動に悪影響を及ぼし、現在問題となっている学級崩壊、学力低下の一因となることが推測される。一方、動物実験においてラットやマウスの脳発達過程には、脳機能への影響を受けやすい時期 (臨界期) があると考えられている。我々は、妊娠中の音環境が出生児に及ぼす影響について注目し、ラット胎生期に音刺激と、一般的に繁用される強制水泳ストレスを同時に負荷することにより雄ラットに情動性の亢進及び学習障害が認められることをすでに明らかにしている³⁾。また、ラット授乳期におけるストレス負荷により、不安関連行動の増加⁴⁾あるいは低下^{5,6)}、学習障害^{7,8)}やHPA系への影響⁹⁾が報告されていることなどを考え合わせると、生体におけるストレス刺激に対する応答性に関する見解は様々である。

マウス行動実験の場合、成体マウスを用いた解析が多い。しかしながら、現代社会における自殺や凶悪犯罪の若齢化、心的外傷後ストレス障害、いじめ、登校拒否、学級崩壊など『こころの疾患』に起因する事件や事故の急増といった深刻な社会問題を考えると、思春期を想定した4-6週齢の若齢マウスを用いた解析の必要性も高いといえる。なお、本研究ではマウスの発達過程において、生後2週齢を授乳期、生後3週齢を離乳期、授乳期と離乳期を含めた期間を幼

若期、胎生後期と幼若期を含めた期間を周産期とした。

現在まで、マウス周産期における胎生期ストレスと授乳期ストレスの影響を同一の評価系で比較した行動解析は報告されていない。また、マウス周産期における騒音環境の影響に関する解析は報告されてない。さらに、行動変化に関する報告は殆どが雄の個体についての解析結果であり、周産期ストレスの影響には性差が存在する可能性が考えられる。また、成熟期のラットにおいて単一ストレスと複合ストレスとでは影響が異なることが報告されている^{10,11)}が、マウス周産期における複合ストレスの影響に関する解析は報告されていない。そこで本研究では、妊娠中、授乳中、または離乳後のマウスに音刺激と、鬱の動物モデルとして知られる強制水泳ストレス¹²⁾を負荷し、マウスの脳機能への影響を受けやすい時期すなわち臨界期及びマウス周産期における過剰な騒音環境の若齢マウスにおける影響について行動解析するとともに、その性差について検討を行った。また、単一ストレスと複合ストレスの影響の相違についても検討を行った。

本実験では胎生期及び幼若期ストレスの情動、不安、学習行動への影響を検討するため、妊娠10-18日目の妊娠マウス、生後2週目あるいは生後3週目の雌性マウスあるいは雄性マウスにストレスを負荷し、その2-3週間後の生後4-10週齢の雌性マウスあるいは雄性マウスにおける授乳期ストレス刺激の影響を行動解析した。離乳は生後21日目に行った (Fig. 1)。ストレス負荷は、妊娠10-18日目の母体に対して9日間、生後2週目の雌性マウスあるいは雄性マウスに対して1日に1回15分間のストレス負荷を5日間 (生後14-18日目)、あるいは生後3週目の雌性マウスあるいは雄性マウスに対して1日に1回15分間のストレス負荷を5日間 (生後21-25日目) 行った。音刺激群 (Sound: SO) には、断続的で不規則なブザー音を90デシベル (dB) で1日15分間曝露した。強制水泳ストレス負荷群 (Swim: SW) にはマウスの後肢及び尾が底に届かない程度の、水温 20 ± 1 °C の水を入れたの容器の中で、1日15分間水泳させた。音刺激+強制水泳ストレス群 (Sound + Swim: SS) には、SO群とSW群が経験するストレス刺激を同時に負荷した。対照群 (Normal: NO) はストレス負荷を行う実験室へ移動し1日15分間放置した。ストレス負荷中には餌と水は与えなかった。

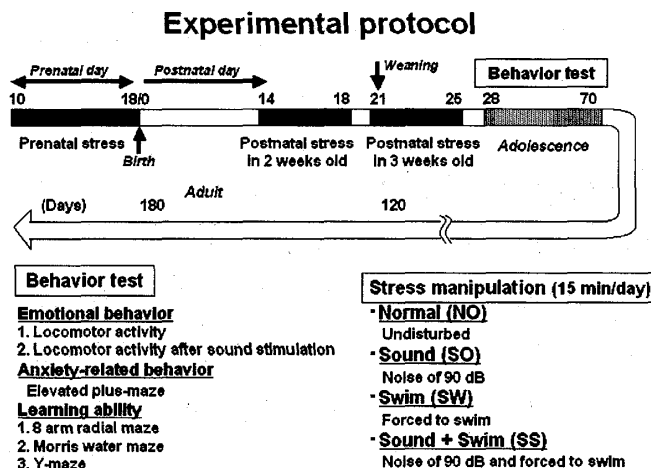


Fig. 1 Experimental protocol.

Locomotor activity — Changed by sound stimulation —

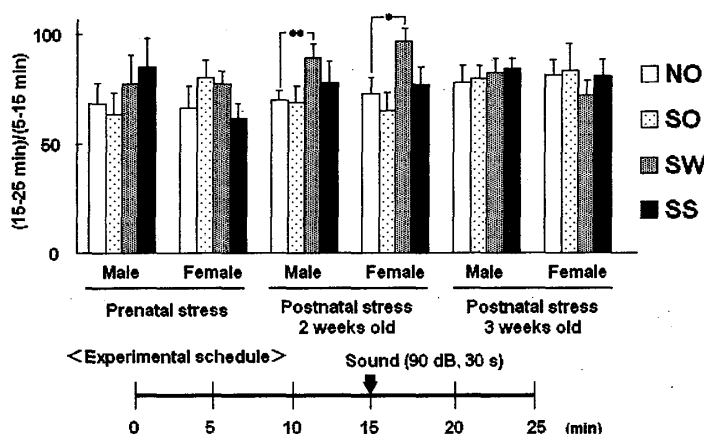


Fig. 2 Effects of locomotor activity by sound stimulation. 4 weeks old male and female mice subjected to noise, forced swim stress and a combination of noise and swim stress in prenatal period, 2 weeks old or 3 weeks old and non-stressed mice. The mean locomotor activity was expressed as a percentage of that prior to stimulation, calculating the percentage activity in the 10 min following stimulation, taking the activity in the 10 min prior to stimulation as 100 %. Data were presented as mean values \pm S.E.M. in 16 mice. Asterisks indicate values that differ significantly from NO, according to Student t-test ($*P < 0.05$, $**P < 0.01$).

1-1. 胎生期・幼若期ストレスのマウス情動関連行動への影響

胎生期ストレスまたは幼若期ストレスの情動関連行動への影響を検討するため、胎生期ストレスまたは幼若期ストレス負荷を受けた4週齢の雌性マウスあるいは雄性マウスについて、音刺激提示前後10分間の自発運動量比（測定開始から5-15分の自発運動量）／（測定開始から15-25分の自発運動量）、すなわち音刺激に対する自発運動量変化を情動関連行動の指標として評価した。その結果、胎生期あるいは生後3週目にストレス負荷を受けた4週齢のマウスにおいて、雌雄ともに、NO群と比較してSO群、SW群、SS群の音刺激に対する自発運動量に著明な変化は認められなかった。一方、生後2週目にストレス負荷を受けた4週齢のマウスにおいて、SO群、SS群においては雌雄ともに、NO群と比較して有意な変化は認められなかったが、SW群の音刺激に対する自発運動量がNO群と比較して雌雄ともに増加した（Fig. 2）。胎生期、授乳期、離乳期における反復刺激がマウスの情動関連行動に及ぼす影響について音刺激に対する自発運動量変化を指標に検討した結果、これら情動関連行動に関してストレスの影響を最も受けやすい時期は、雌雄ともに授乳期であることが明らかとなった。

1-2. 胎生期・幼若期ストレスのマウス不安関連行動への影響

胎生期ストレスまたは幼若期ストレスの不安関連行動への影響を検討するため、胎生期ストレスまたは幼若期ストレス負荷を受けた5週齢の雌性マウスあるいは雄性マウスに対して、高架式十字迷路試験を行った。試験には、床から40 cmの高さで、高さ12 cmの側壁で囲まれた幅10 cm、長さ39.5 cmのクローズドアームと側壁のない幅10 cm、長さ39.5 cmのオープンアームが十字に直交し、中央に10 × 10 cmのプラットフォームで構成される木製装置を用いた

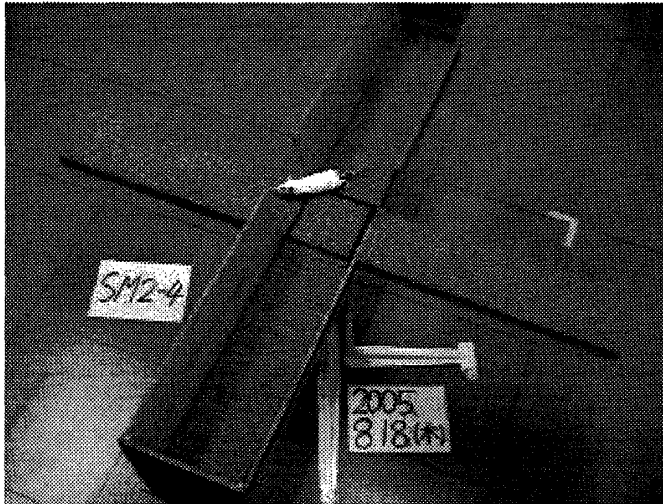


Fig. 3 Elevated plus-maze apparatus.

(Fig. 3)。試験時間は5分間で、マウスをプラットフォーム上にオープンアーム側に頭を向けて置き、オープンアーム及びクローズドアームにおける滞在時間、進入回数、クローズドアームリターンを記録した。マウスの四肢が全てアームに入った際にアームの進入とみなした。試験では、オープンアーム滞在時間の割合、オープンアーム進入回数の割合及びクローズドアームリターンを不安関連行動の指標として評価し、クローズドアーム進入回数を行動量の指標として評価した。

胎生期、授乳期、離乳期における反復刺激がマウスの不安関連行動に及ぼす影響について高架式十字迷路試験を用いて検討した結果、雄マウスでは、授乳期に強制水泳ストレスあるいは複合ストレス（音刺激＋強制水泳ストレス）を負荷した群においてのみオープンアーム進入回数の割合の増加、すなわち不安水準の低下がみられた（Fig. 4）。授乳期にストレスを負荷したラット、マウスにおいて不安水準が低下することが報告され^{5, 13)}、授乳期ストレスにより5-HT神経系機能異常とラットの不安水準低下の関連を示唆する報告もある¹⁴⁾ことから、本実験において周産期に行った音刺激は、マウス不安関連行動へ影響を与えるストレス刺激ではない可能性が考えられる。一方、雌マウスでは、胎生期に複合ストレス群においてのみ不安水準の低下がみられた。胎生期ストレスによる不安関連行動への影響では、雌雄ともに不安水準の上昇がみられることが成体マウスあるいはラットについて多数報告されている^{9, 15)}が、本結果においては、雌性若齢マウスにおいてのみ不安水準の低下がみられることが明らかとなった。我々は既に、胎生期に複合ストレス負荷を受けた雌性マウスにおいて、生後16、18日目の大脳皮質におけるDA代謝の低下を示唆する実験結果を得ている（本稿ではデータを示していない）。さらに、ストレスに対するDA神経系の反応性増大と不安水準の低下の関連を示唆する報告があるが¹⁶⁾、雄性マウスにおいても同様の変化がみられることから、胎生期ストレスを受けた雌性マウスにおいてみられた不安水準の低下をDA代謝の低下のみで説明することは困難である。また、胎生期ストレスが性ホルモン系に影響を及ぼすことが報告されており^{17, 18)}、エストロゲンと不安関連行動との関係を示唆する報告もある¹⁹⁾ことから、胎生期にストレスを受けた雌性

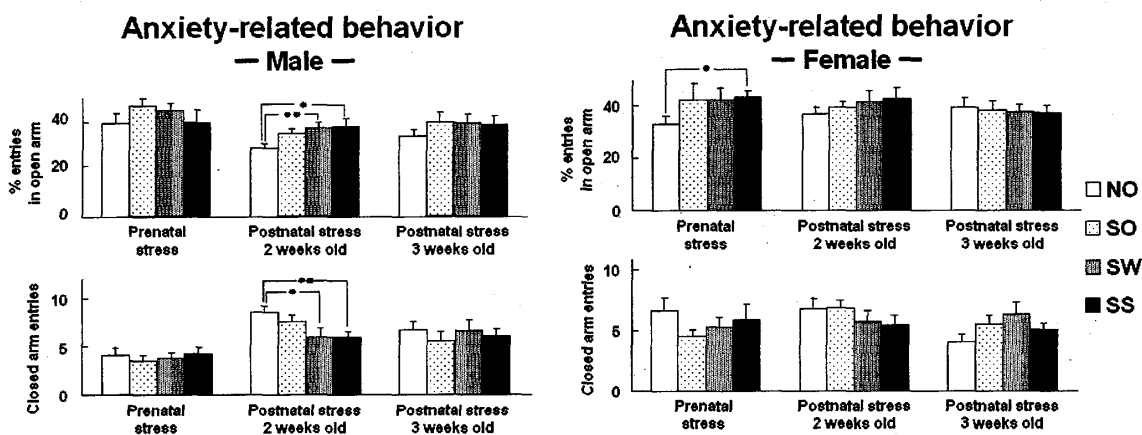


Fig. 4 Behavior of 5 weeks old male and female mice subjected to noise, forced swim stress and a combination of noise and swim stress in prenatal period, 2 weeks old or 3 weeks old and non-stressed mice in the elevated plus-maze. Percent entries in open arm/total arm and closed arm entries were shown. Data were presented as mean values \pm S.E.M. in 8-20 mice. Asterisks indicate values that differ significantly from NO, according to Student t-test ($*P < 0.05$, $**P < 0.01$).

マウスにみられた不安水準の低下は、ストレス負荷による性ホルモン系への異常が関与しているかもしれない。

1-3. 胎生期・幼若期ストレスのマウス学習能力への影響

胎生期ストレスの空間学習獲得能力への影響を検討するため、胎生期ストレス負荷を受けた7-10週齢の雌性マウスあるいは雄性マウスに対して8方向放射状迷路試験を行った。装置には、高さ35cmの支柱の上に一辺が6.3cmの正八角形のプラットフォームがあり、各辺の中央には幅4.5cm長さ38.7cmのアームがついている8方向放射状迷路を用いた (Fig. 5)。装置は木製であり、中央のプラットフォームと各アームの間はプラットフォームを取り囲むプラスチック製の透明な囲いで仕切れるようにした。学習獲得課題に入る10日前から食餌量を7割に制限し、7日前から2日前までの6日間、装置の上に報酬用ペレット (45 mg Bio-Serv A Holton Industries) をばらまき、生後6週齢の雌性マウスあるいは雄性マウスに対して1日15分間のシェイピングを行った。学習獲得課題では、装置の8本あるアームのうち一定の4本のアーム先端部に報酬用ペレットを1個ずつ置き、マウスを測定装置の透明な囲い (高さ12 cm) を置いたプラットフォーム上に置き、1分間経過後、透明な囲いを外した。マウスが4個のペレットを全て摂食するか、迷路上で10分間経過した時点を試行の終了とした。マウスが未選択のアームに入りペレットを摂る反応を正反応、それ以外を誤反応とし、さらに誤反応は、ペレットを置いていないアームを選択した場合を参照記憶障害 (RME: Reference Memory Error)、ペレットを取り終えたアームを再び選択した場合を作業記憶障害 (WME: Working Memory Error) とした。学習獲得課題は1日1試行で6日間連続行いこれを1セットとし、4セット行った。その結果、雌雄ともに

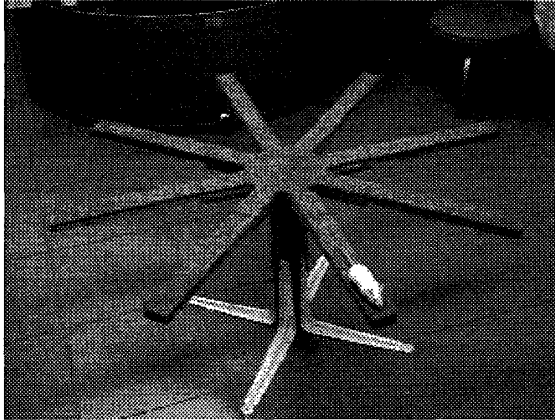


Fig. 5 8 arm radial maze apparatus.

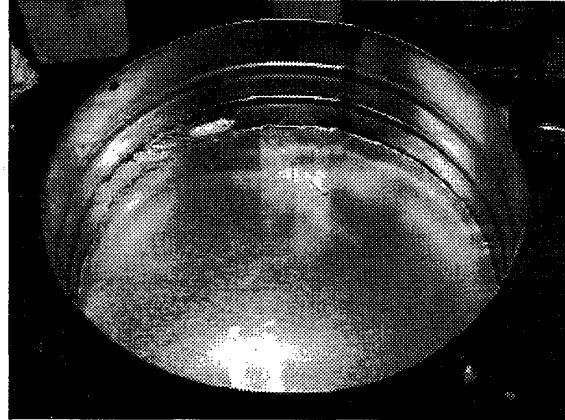


Fig. 7 Morris water maze apparatus.

NO群と比較して有意な参照記憶障害は認められなかった。また、雄性マウスのSO群、SW群では、NO群と比較して有意な作業記憶障害が認められなかったが、SS群では、第7ブロックにおいて有意な作業記憶障害がみられ、全試行中においてNO群と比較して有意な作業記憶障害がみられた。一方、雌性マウスのSO群、SW群、SS群では、NO群と比較して有意な作業記憶障害は認められなかった (Fig. 6)。また、幼若期ストレスの空間学習獲得能力への影響を検討するため、生後2週目または生後3週目にストレス負荷を受けた5週齢の雌性マウスあるいは雄性マウスに対してモーリス水迷路試験を行った。装置には直径85 cm × 高さ40cmの金属製円筒形容器を用い、25 cmの深さになるよう水を入れた (Fig. 7)。水温は $20 \pm 1^\circ\text{C}$ となるようにした。また、11 cm × 11 cm × 高さ24.5 cmの透明アクリル製の逃避用プラットフォームを、円筒形容器の一定の場所に設置した (プラットフォームは水面から5 mmだけ低い位置にあるようにした)。実験には、5週齢の雄性マウスを使用した。試験はDringenbergらの方法²⁰⁾にしたがって行った。試験ではプラットフォームを一定の場所に設置し、5日間連続で行い学習獲得能力について評価した。4試行を1ブロックとし、ブロック間は5分間隔を置いた。学習獲得課題は1日2ブロックを5日間連続で行った。各試行のスタート地点は装置壁面に沿って等間隔に4箇所設定し、1ブロックごとに異なった順序で試行を行った。試行は装置壁面にマウスの顔を向けて放したときを開始時点とした。マウスがプラットフォームへ到達するまでの時間を逃避潜時 (Escape latency) とし、ストップウォッチを用いて測定した。マウスがプラットフォームに到達した後、15秒間プラットフォーム上に滞在させ次の試行を開始した。マウスが45秒以内にプラットフォームへ到達しなかった場合は、実験者がマウスをプラットフォームへ載せ、15秒間滞在させ次の試行を開始した。このときの逃避潜時は45秒とした。データは、各個体について1日に行った8試行の逃避潜時を平均し、各試行日の1日分のデータとして示した。また、各試行日の逃避潜時のデータ5日間分を合計し、全逃避潜時 (Total escape latency) として示した。生後2週目にストレス負荷をした5週齢の雌性マウスあるいは雄性マウスにおいてモーリス水迷路試験にて空間学習獲得能力の評価を行った。その結果、雄性マウスにおいて、SO群では試験3日目にNO群と比較して逃避潜時の延長が認められ、さらにNO群と比較して試験5日間の全

逃避潜時の延長が認められた。また、SW群において、試験2日目にNO群と比較して逃避潜時の延長が認められ、さらにNO群と比較して試験5日間の全逃避潜時の延長が認められた。一方、SS群ではNO群と比較して有意な逃避潜時の変化は認められなかった。雌性マウスにおいては、SS群では試験4日目及び5日目にNO群と比較して逃避潜時の延長が認められ、さらにNO群と比較して試験5日間の全逃避潜時の延長が認められた。SO群、SW群ではNO群と比較して有意な逃避潜時及び試験5日間の全逃避潜時の変化は認められなかった (Fig. 8)。

同様に生後3週齢にストレス負荷をした5週齢の雌性マウスあるいは雄性マウスにおいて空間学習獲得能力の評価を行った。その結果、雄性マウスにおいて、SW群では試験1日目にNO群と比較して逃避潜時の延長が認められ、さらにNO群と比較して試験5日間の全逃避潜時の延長が認められた。また、SS群では試験1日目にNO群と比較して逃避潜時の延長がみられた。SO群ではNO群と比較して有意な逃避潜時及び試験5日間の全逃避潜時の変化は認められなかった。雌性マウスにおいて、SS群では試験1日目にNO群と比較して逃避潜時の延長が認められた。SO群、SW群ではNO群と比較して試験1、2、3、4、5日目における逃避潜時及び試験5日間の全逃避潜時の有意な変化は認められなかった (Fig. 8)。

胎生期、授乳期、離乳期における反復刺激がマウスの空間学習能力に及ぼす影響について検討した結果、胎生期、授乳期、離乳期のいずれの時期における反復ストレス刺激によっても、マウス空間学習障害が生じることが明らかとなった。授乳期のストレスには、母子分離ストレスによりマウス、ラットの空間学習障害を生じることが報告されており、これらの報告は、本結果を支持している^{7,8)}。一方、複合ストレスを負荷した雄性マウスにおいては空間学習障害が認められなかったことから、空間学習能力に関しては、授乳期における音刺激及び強制水泳の複合ストレス負荷により単一ストレスの影響が減弱される可能性が示唆された。拘束ストレスのみの単回ストレスを成体ラットに21日間反復処置すると、HPA系の抑制と脳海馬CA3細胞の萎縮の両方が認められるが¹¹⁾、拘束ストレス・振動ストレス・強制水泳ストレスという複数のタイプのストレスを21日間反復処置すると、HPA系への影響は認められず脳海馬CA3細胞の萎縮のみが認められることが報告されている¹⁰⁾。また、ラット脳の発達過程において、胎生期におけるストレス負荷は母体内におけるコルチコステロンの増加により胎仔脳の発達に様々な変化が生じることが示唆されている。さらに、胎生期にストレス負荷を受けたラットの脳内において、5-HT濃度が変化することが報告されている^{21,22)}。5-HTはシナプスの形成維持に重要であることが知られており²³⁾、胎生期ストレス負荷によりラット海馬における5-HT含量の減少とともにシナプス密度の低下することが報告されている²⁴⁾。このことから、胎生期ストレスを受けたラット脳内のシナプス数減少は、胎生期ストレスによりラット海馬の神経新生の抑制を伴う空間学習障害がみられること²⁵⁾と関係している可能性が示唆されている。5-HTはシナプスの形成維持に重要であることが知られている²³⁾。すなわち、雄性マウスのみ空間学習障害を生じた背景には、胎生期ストレスによる5-HT神経系の異常が関与しているのかもしれない。

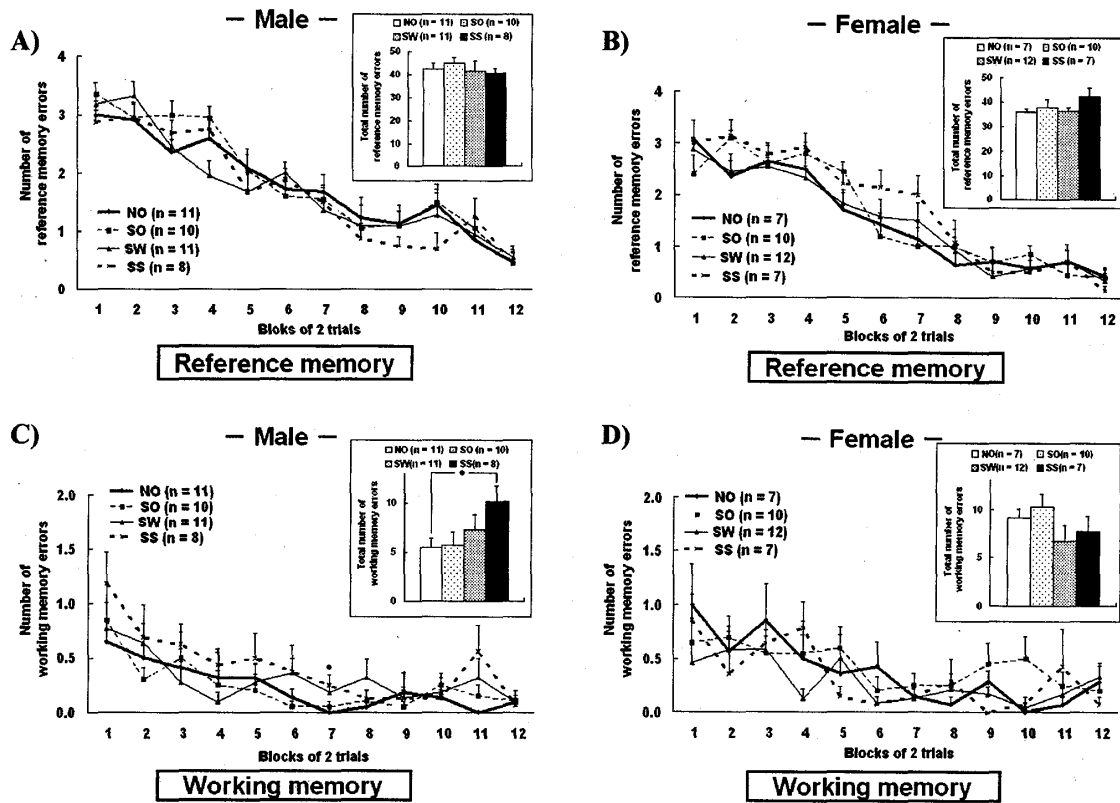


Fig. 6 The number of reference memory errors (A, B) and working memory errors (C, D) of 7-10 weeks old male and female offspring delivered from NO, SO, SW and SS dams, i.e. NO, SO, SW and SS offspring in the 8-arm radial maze task (four arms baited). Each value represents the number of working memory errors made until the mouse acquired all the rewards. The total number of working memory errors of 7-10 weeks old male offspring (Inset). Data were presented as mean values \pm S.E.M. in each block of 2 trials. Asterisks indicate values that differ significantly from NO, according to Student t-test ($*P < 0.05$).

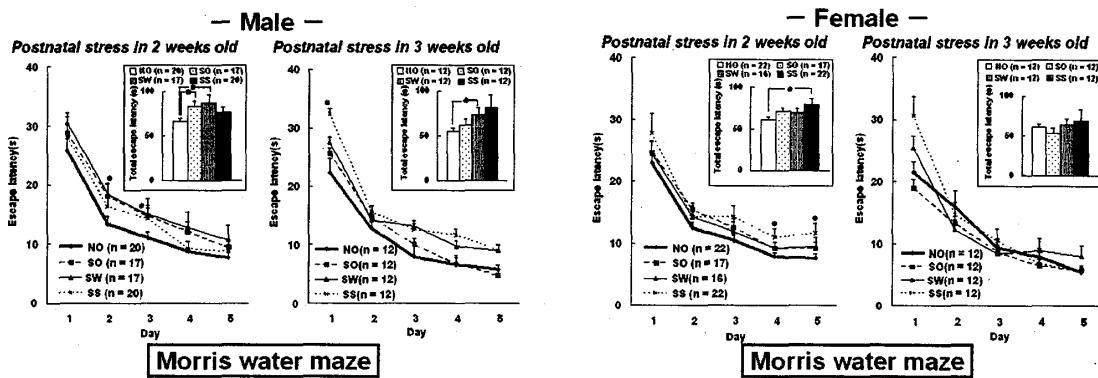


Fig. 8 Spatial learning in a water maze of 6 weeks old male and female mice subjected to noise, forced swim stress and a combination of noise and swim stress in 2 or 3 weeks old. Escape latency was equal to the latency to find the platform. The total escape latency of 6 weeks old male mice subjected to noise, forced swim stress and a combination of noise and swim stress in 2 or 3 weeks old (Inset). Data were presented as mean values \pm S.E.M. in 12-20 mice in each day of 8 trials. Asterisks indicate values that differ significantly from NO, according to Student t-test ($*P < 0.05$).

1-4. 小括

本実験成績では、マウスの発達過程において授乳期ストレス負荷が最も情動、不安、空間学習能力への影響を受けやすい可能性が示唆された。さらに、これらのストレスの影響は、雌よりもむしろ雄マウスにおいて顕著であり、発達期におけるストレスには性依存性の影響がある可能性が示唆された。また、授乳期における音刺激と強制水泳ストレスの複合ストレス負荷は雄性マウスに対して、情動行動及び不安関連行動には明らかな影響を及ぼしたが、空間学習能力には授乳期に単一ストレス負荷した場合とは異なり影響を及ぼさなかったことから、複合ストレス負荷により単一ストレスの影響が増強あるいは減弱される可能性が示唆された。本研究結果におけるマウスのストレス応答性の相違や性依存性に関する詳細なメカニズムについては今後更なる検討が必要であるが、胎生期、授乳期におけるストレス負荷による行動変化には、脳内モノアミン神経系の発達障害が少なくとも一部関連しているかもしれない。我々の日常生活の中には様々なストレスが混在しており、高度化、複雑化された現代社会において、妊婦や発達期の子供が複合的なストレスに曝される可能性は高い。ゆえに、妊娠中あるいは出生後の生育環境により、現在問題となっている子供の学力低下や学級崩壊、凶悪犯罪をも引き起こすことが考えられる。しかし逆に、ストレスのように生体に悪影響を及ぼす環境刺激ではなく、豊かな生育環境のような環境刺激は、ヒトに優れた能力を開花させるかもしれない。動物実験の結果をヒトに外挿することは慎重に行うべきであるが、マウス脳発達期におけるストレスの影響についての科学的な解明が、ストレス性精神神経疾患の予防あるいは治療の貢献につながることを期待する。

2. みどりの香りの抗不安作用 —マウス不安関連行動及び脳内モノアミンに関する神経化学的検討—

古くからにおいをもつ植物が、香りのみならず、宗教儀式、防腐剤、食品などに幅広く利用されていたことが知られており、このことはヒトとにおいの長い歴史を物語っている。ヒトに対する植物のにおいの効果については、心身のリラックス作用²⁶⁾などが報告されている。また、においをストレスや不安の軽減に利用することを目的としたアロマセラピーの有効性に関する臨床報告もされている²⁷⁾。においは、その穏やかな作用であるという特徴を生かし、今後さらに老人介護、医療との併用、環境改善など幅広い場面での活用が期待されている。においのなかでも特に詳細に研究されているものとして、「みどりの香り」がある。緑葉から揮散する青臭いにおい、いわゆる「みどりの香り」は、(Z)-3-ヘキセノール (Hex) を主成分とする4種類の青葉アルコールと(E)-2-ヘキセノール (Hxa) を主成分とする4種類の青葉アルデヒド、すなわち炭素数6の8種類の鎖状アルコール、アルデヒドなどからなる複合的な香りであることが明らかになっている²⁸⁾。炭素数6のエナールは対応するアルコールと香りの特徴が類似しており、香りの強さは対応するアルコールの100から1000倍である²⁹⁾。さらに、「みどりの香り」のなかでも特にHexについてはいくつかの報告がある。Hxaとの混合希釈溶液をラットに曝露すること

により、ストレス誘発性体温上昇の抑制³⁰⁾やストレス後の血中副腎皮質刺激ホルモン (ACTH: Adrenocorticotrop hormone) 濃度上昇の抑制³¹⁾が報告されている。また、ヒトでは Hex の希釈溶液を提示することにより Hex 濃度依存的に鎮静効果が現れることが報告されている²⁶⁾。このようにストレスに対する Hex のストレス緩和作用に関する動物実験はいくつか報告されているが、Hex 単独のマウス不安関連行動への影響は報告されていない。

不安における脳内の神経伝達物質の変化は、主としてモノアミン (セロトニン、ドパミン、ノルアドレナリン) について不安の動物モデルで検討されてきた。セロトニンに関しては、選択的セロトニン再取り込み阻害薬が抗不安作用を示すことから、セロトニン放出が不安を抑制的に制御すると考えられている³²⁾。一方、においによる脳内モノアミンへの影響に関する解析は殆ど報告されていない。

そこで本研究では、Hexのマウスに対する不安関連行動への影響について、高架式十字迷路試験を用いて評価すると同時に、脳内モノアミンに関する神経化学的検討を行った。また、抗不安薬であるジアゼパム (DZP) 及び不安惹起薬である TFMPP(1-(3-trifluoromethyl- phenyl) piperazine)を対照薬物として腹腔内投与後に同様に不安関連行動の評価あるいは脳内モノアミンの定量を行った。

2-1. みどりの香りのマウス不安関連行動への影響

デシケータから出した直後の行動が試験へ影響するのを少なくする目的でHex曝露直後、ホームケージとは別の床敷のあるケージへマウスを移動し、4分後に試験を開始した。試験は、「1. 胎生期・幼若期ストレスのマウス情動・不安関連行動及び学習能力への影響」にて行った高架式十字迷路試験に準じて行った。Hexの7分間あるいは30分間曝露による高架式十字迷路試験におけるマウスの不安関連行動への影響について検討した。その結果、Hexの7分間曝露においては、マウスの行動量に影響することなく、クローズドアームリターンの減少がみられたが、オープンアーム滞在時間の割合への影響はみられなかった。一方、Hexを30分間曝露した場合、マウスの行動量に影響することなくオープンアーム滞在時間の割合の増加がみられた (Fig. 9)。クローズドアームリターンの変化に関しては抗不安作用を示す指標の一つであるという報告があるが³³⁾、高架式十字迷路試験における不安関連行動への影響は、オープンアーム滞在時間の割合の変化を指標とする方法が一般的に用いられることが多い³⁴⁾。よって、Hexの7分間曝露では、オープンアーム滞在時間の割合に有意な変化は見られないが、曝露30分後には抗不安作用がマウスに発現すると考えられる。また、Hexの30分間曝露によるオープンアーム滞在時間の割合の変化は、対照群と比較して154%に増加するのに対し、DZP 2 mg/kg投与では179%に、4 mg/kg投与では205%の増加を確認することができる (Fig. 9)。したがって本実験結果より、Hexをマウスに曝露することにより発現する抗不安作用は代表的な抗不安薬と比較しても十分な抗不安作用であることが明らかになった。

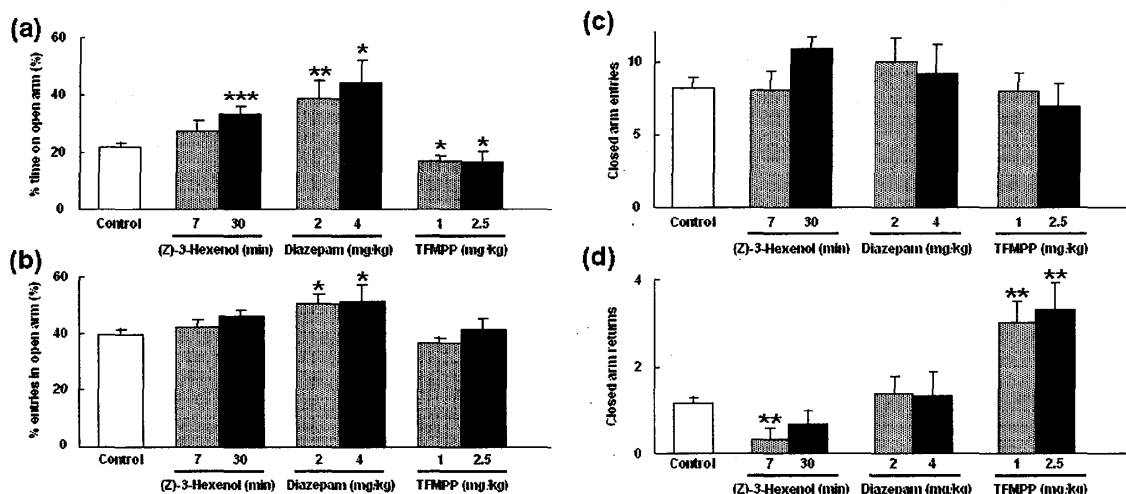


Fig. 9 Effects of (Z)-3-Hexenol, diazepam and TFMPP on % time on open arm (a), % entries in open arm (b), closed arm entries (c) and closed arm returns (d) in the elevated plus-maze. Mice were exposed to 0.3 % (Z)-3-Hexenol (for 7 or 30 min), and 4 min after the exposure the mice were subjected to the experimental session or mice were injected i.p. with diazepam (2 or 4 mg/kg) or TFMPP (1 or 2.5 mg/kg) 30 min before the behavioral experimental session. Data were presented as mean values \pm S.E.M. Asterisks indicate values that differ significantly from control, according to Student's t-test (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$). ; $n = 16-17$ for the (Z)-3-Hexenol group; $n = 12$ for diazepam and TFMPP group; $n = 22$ for control group.

2-2. みどりの香りのマウス脳内モノアミンへの影響

Hex 曝露終了直後または DZP 及び TFMPP を腹腔内投与した 30 分後に、マウスを脱臼致死させ、全脳を摘出し大脳皮質、海馬、線条体を分画し、検体重量測定後ドライアイスにて凍結した。海馬、線条体は摘出日にモノアミン定量を行い、大脳皮質は -80°C にて保存し後日モノアミン定量を行った。

2-2-1. Hex、DZP 及び TFMPP による脳内 5-HT 神経系への影響

Hex の 7 分間あるいは 30 分間曝露による、マウス大脳皮質、海馬及び線条体における 5-HT 神経系活性への影響について検討するために、各脳組織のホモジネート検体を用いて HPLC による神経化学的評価を行った。その結果、Hex の 30 分間曝露により大脳皮質において 5-HT 含量の増加がみられた。また、海馬において Hex の 30 分間曝露による 5-HT 含量の増加がみられ、Hex の 7 分間曝露により 5-HIAA 含量及び 5-HIAA/5-HT の減少がみられた (Table 1)。一方、Hex の 7 分間及び 30 分間曝露による 5-HT、5-HIAA 含量及び 5-HIAA/5-HT への影響は線条体ではみられなかった (Table 1)。すなわち本実験結果では、Hex の 7 分間曝露により 5-HT 神経系活性の減少がみられた。この変化は海馬においてのみ変化が見られた DZP 投与の変化と類似して

| | 5-HT | 5-HIAA | 5-HIAA/5-HT |
|------------------------|----------------|----------------|--------------|
| <i>Cerebral cortex</i> | | | |
| Control | 391.7 ± 15.1 | 148.2 ± 3.9 | 38.5 ± 1.5 |
| (Z)-3-Hexenol (7 min) | 395.7 ± 13.5 | 143.2 ± 10.9 | 36.0 ± 1.9 |
| (Z)-3-Hexenol (30 min) | 459.6 ± 21.8 * | 158.7 ± 9.3 | 34.6 ± 1.3 |
| <i>Hippocampus</i> | | | |
| Control | 352.9 ± 15.6 | 262.8 ± 13.1 | 75.6 ± 4.1 |
| (Z)-3-Hexenol (7 min) | 355.9 ± 7.6 | 216.0 ± 14.5 * | 60.7 ± 3.8 * |
| (Z)-3-Hexenol (30 min) | 426.3 ± 9.7 ** | 285.0 ± 14.1 | 66.8 ± 2.6 |
| <i>Striatum</i> | | | |
| Control | 336.0 ± 15.6 | 238.0 ± 10.6 | 71.8 ± 3.0 |
| (Z)-3-Hexenol (7 min) | 333.7 ± 26.2 | 222.1 ± 24.1 | 66.2 ± 4.1 |
| (Z)-3-Hexenol (30 min) | 324.1 ± 16.4 | 220.3 ± 15.0 | 67.8 ± 1.9 |

Table. 1 Tissue levels (ng/g tissue) of serotonin (5-HT) and the metabolite (5-HIAA), and the turnover rate (ratio%; 5-HIAA/5-HT) in the cerebral cortex, hippocampus and striatum. Mice were exposed to 0.3 % (Z)-3-Hexenol (for 7 or 30 min), and 4 min after the exposure the mice were decapitated. The content of 5-HT and 5-HIAA were measured using high performance liquid chromatography combined with electrochemical detection (HPLC-ECD). Data were presented as mean values ± S.E.M. Asterisks indicate values that differ significantly from control, according to Student's t-test (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$). ; n = 8 for the (Z)-3-Hexenol (7 min) group; n = 7 for the (Z)-3-Hexenol (30 min) group; n = 16 for control group.

| | 5-HT | 5-HIAA | 5-HIAA/5-HT |
|------------------------|------------------|-----------------|----------------|
| <i>Cerebral cortex</i> | | | |
| Control | 400.3 ± 15.5 | 141.9 ± 4.1 | 35.9 ± 1.4 |
| Diazepam (2 mg/kg) | 397.6 ± 16.5 | 137.8 ± 2.7 | 35.0 ± 1.8 |
| Diazepam (4 mg/kg) | 400.4 ± 18.4 | 151.9 ± 10.3 | 37.8 ± 1.1 |
| TFMPP (1 mg/kg) | 525.1 ± 18.4 *** | 119.8 ± 4.5 ** | 22.9 ± 0.8 *** |
| TFMPP (2.5 mg/kg) | 486.5 ± 12.7 *** | 116.1 ± 6.0 ** | 24.0 ± 1.5 *** |
| <i>Hippocampus</i> | | | |
| Control | 354.3 ± 9.7 | 257.7 ± 8.8 | 73.4 ± 3.5 |
| Diazepam (2 mg/kg) | 341.5 ± 13.5 | 227.2 ± 6.9 * | 67.3 ± 4.1 |
| Diazepam (4 mg/kg) | 357.4 ± 12.0 | 259.0 ± 20.3 | 72.3 ± 4.4 |
| TFMPP (1 mg/kg) | 505.4 ± 13.5 *** | 212.7 ± 11.3 ** | 42.3 ± 2.9 *** |
| TFMPP (2.5 mg/kg) | 472.1 ± 23.4 *** | 211.6 ± 17.1 * | 45.0 ± 3.4 *** |
| <i>Striatum</i> | | | |
| Control | 414.7 ± 22.7 | 270.5 ± 12.9 | 66.1 ± 2.6 |
| Diazepam (2 mg/kg) | 380.6 ± 25.0 | 252.7 ± 7.1 | 68.0 ± 5.5 |
| Diazepam (4 mg/kg) | 399.9 ± 22.5 | 285.5 ± 27.8 | 71.0 ± 4.5 |
| TFMPP (1 mg/kg) | 524.1 ± 22.0 ** | 235.7 ± 6.6 | 45.3 ± 2.2 *** |
| TFMPP (2.5 mg/kg) | 534.8 ± 37.7 ** | 234.0 ± 12.7 | 44.5 ± 2.9 *** |

Table. 2 Tissue levels (ng/g tissue) of serotonin (5-HT) and the metabolite (5-HIAA), and the turnover rate (ratio%; 5-HIAA/5-HT) in the cerebral cortex, hippocampus and striatum. Mice were decapitated 30 min after the injection of diazepam and TFMPP. The content of 5-HT and 5-HIAA were measured using high performance liquid chromatography combined with electrochemical detection (HPLC-ECD). Data were presented as mean values ± S.E.M. Asterisks indicate values that differ significantly from control, according to Student's t-test (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$). ; n = 6 for the Diazepam and TFMPP group; n = 12 for control group.

いる。すなわち本実験において代表的な抗不安薬であるDZP投与によるマウス大脳皮質、海馬においてのみ、DZP 2 mg/kg投与によって対照群と比較して5-HIAA含量が88%に減少した(Table 2)。マイクロダイアリシス(脳微量透析法)による解析では、DZP投与後にラット海馬における5-HT遊離量が減少することが報告されている³⁵⁾。また、DZP投与によりラット海馬における5-HT合成能が低下するが、大脳皮質、線条体では5-HT合成能が変化しないことが報告

されている³⁶⁾。したがって、本実験結果におけるDZP投与による海馬における5-HIAAの減少は、DZP投与により海馬に投射している5-HT作動性神経の5-HT合成能の低下による神経終末からの5-HT遊離量の減少と、それに伴う5-HTの代謝量の減少による5-HIAA含量減少の可能性が考えられる。

一方、Hexの30分間曝露による大脳皮質、海馬及び線条体においてみられたモノアミン含量に関する神経化学的変化は、海馬においてのみ変化が見られたDZP投与の影響とは全く異なる。また、5-HT含量増加と5-HT代謝回転の減少がみられた不安惹起作用のあるTFMPP投与による場合 (Table 2) とも異なる結果である。不安惹起薬であるTFMPPは、5-HT_{1B/2C}作動薬であり、神経終末からの5-HT遊離を促進し³⁷⁾、5-HT神経の起始核である縫線核及びその投射領域において5-HT_{1B}受容体を介して5-HT合成能を低下させる³⁸⁾ことが報告されている。したがって、本結果においてTFMPP投与後にみられた大脳皮質、海馬及び線条体での5-HTの増加、5-HIAAの減少、5-HT代謝回転の指標である5-HIAA/5-HTの減少は、神経終末からの5-HT遊離量の増加により神経終末における5-HTの5-HIAAへの代謝量が減少した結果、5-HT作動性神経の投射領域における5-HT量は増加し、5-HIAA量は減少した可能性が考えられる。また、海馬へのTFMPPの微量注入によりラットの高架式十字迷路試験における不安関連行動の増加がみられ、この行動変化には海馬のシナプス後膜における5-HT_{2C}受容体の活性化が関与していることが報告されている³⁹⁾。本結果においてもTFMPP投与後のHPLC解析によって、神経終末からの5-HT遊離量の増加が予想されることから、シナプス間隙に増加した5-HTがシナプス後膜における5-HT_{2C}受容体を活性化することにより、マウスの不安関連行動が増加した可能性が考えられる。

2-2-2. Hex、DZP及びTFMPPによる脳内DA神経系への影響

Hexの7分間あるいは30分間曝露による、マウス大脳皮質、海馬及び線条体におけるDA神経系活性への影響について検討するために、各脳組織のホモジネート検体を用いてHPLCによる神経化学的評価を行った。その結果、Hexの7分間及び30分間曝露によるDA、DOPAC、HVA、3-MTおよびDAの代謝回転を反映するDOPAC/DA、HVA/DA、3-MT/DAへの影響は大脳皮質ではみられなかった。また、線条体においてHexの30分間曝露によりHVA/DA及び3-MT/DAの減少がみられたが、Hexの7分間曝露による影響はみられなかった (Table 3)。また、海馬におけるDAおよびその代謝物であるDOPAC、HVA及び3-MTはHPLCの検出限界下であった。

本実験結果では、大脳皮質及び線条体ではDZP 2 mg/kg及び4 mg/kg投与によるDA、DOPAC、HVA、3-MT含量、DOPAC/DA、HVA/DA及び3-MT/DAへの影響はみられなかった (Table 4) が、ラットにDZP 10 mg/kgを投与することにより大脳皮質におけるDA代謝回転を減少し、またストレス誘発性NA増加を相殺することが報告されており、この変化はDAおよびNA神経の発火頻度の減少によるものであると考えられている⁴⁰⁾。また、麻酔下のラットの線条体にTFMPPを微量投与すると用量依存的に細胞外DA濃度が増加し、細胞外DA濃度の増加は5-HT遊離促進薬のフェンフルラミンあるいは5-HT再取り込み阻害薬のフルオキセチンにおいてもみられる⁴¹⁾。

Table. 3 Tissue levels (ng/g tissue) of dopamine (DA) and the metabolites (DOPAC, HVA, 3-MT), and the turnover rate (ratio%; DOPAC, HVA, 3-MT) in the cerebral cortex and striatum. Mice were exposed to 0.3 % (Z)-3-Hexenol (for 7 or 30 min), and 4 min after the exposure the mice were decapitated. The content of DA, DOPAC, HVA and 3-MT were measured using high performance liquid chromatography combined with electrochemical detection (HPLC-ECD). Data were presented as mean values \pm S.E.M. Asterisks indicate values that differ significantly from control, according to Student's t-test ($*P < 0.05$). ; n = 8 for the (Z)-3-Hexenol (7 min) group; n = 7 for the (Z)-3-Hexenol (30 min) group; n = 16 for control group.

| | DA | DOPAC | HVA | 3-MT | DOPAC/DA | HVA/DA | 3-MT/DA |
|------------------------|----------------|------------------|------------------|------------------|----------------|-----------------|------------------|
| <u>Cerebral cortex</u> | | | | | | | |
| Control | 1300 \pm 54 | 169.5 \pm 4.9 | 135.9 \pm 4.9 | 146.5 \pm 4.7 | 13.2 \pm 0.4 | 10.6 \pm 0.4 | 11.4 \pm 0.4 |
| (Z)-3-Hexenol (7 min) | 1453 \pm 143 | 183.8 \pm 16.1 | 136.9 \pm 13.8 | 149.0 \pm 10.7 | 12.9 \pm 0.7 | 9.4 \pm 0.6 | 10.3 \pm 0.8 |
| (Z)-3-Hexenol (30 min) | 1416 \pm 124 | 173.8 \pm 14.5 | 144.2 \pm 12.2 | 149.3 \pm 21.2 | 12.4 \pm 0.5 | 10.2 \pm 0.2 | 10.4 \pm 0.8 |
| <u>Striatum</u> | | | | | | | |
| Control | 7014 \pm 319 | 704.1 \pm 33.1 | 576.1 \pm 23.8 | 840.6 \pm 32.7 | 10.2 \pm 0.5 | 8.3 \pm 0.3 | 12.1 \pm 0.4 |
| (Z)-3-Hexenol (7 min) | 7626 \pm 330 | 790.4 \pm 45.3 | 553.1 \pm 40.8 | 830.2 \pm 77.3 | 10.4 \pm 0.5 | 7.3 \pm 0.5 | 10.9 \pm 0.9 |
| (Z)-3-Hexenol (30 min) | 7837 \pm 472 | 671.5 \pm 40.0 | 543.4 \pm 26.0 | 797.5 \pm 49.5 | 8.6 \pm 0.4 | 7.0 \pm 0.4 * | 10.3 \pm 0.6 * |

Table. 4 Tissue levels (ng/g tissue) of dopamine (DA), the metabolites (DOPAC, HVA, 3-MT), and the turnover rate (ratio%; DOPAC/DA, HVA/DA, 3-MT/DA) in the cerebral cortex and striatum. Mice were decapitated 30 min after the injection of diazepam and TFMPP. The content of DA, DOPAC, HVA and 3-MT were measured using high performance liquid chromatography combined with electrochemical detection (HPLC-ECD). Data were presented as mean values \pm S.E.M. Asterisks indicate values that differ significantly from control, according to Student's t-test ($*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$). ; n = 6 for the Diazepam and TFMPP group; n = 12 for control group.

| | DA | DOPAC | HVA | 3-MT | DOPAC/DA | HVA/DA | 3-MT/DA |
|------------------------|-----------------|------------------------|----------------------|-------------------|-------------------|--------------------|---------------|
| <u>Cerebral cortex</u> | | | | | | | |
| Control | 1463 \pm 96 | 149.6 \pm 5.4 | 136.5 \pm 5.6 | 133.3 \pm 8.2 | 10.6 \pm 0.6 | 9.6 \pm 0.4 | 9.3 \pm 0.6 |
| Diazepam (2 mg/kg) | 1443 \pm 89 | 141.0 \pm 3.5 | 134.5 \pm 4.6 | 118.6 \pm 6.5 | 10.0 \pm 0.8 | 9.4 \pm 0.4 | 8.4 \pm 0.7 |
| Diazepam (4 mg/kg) | 1451 \pm 93 | 148.1 \pm 8.2 | 140.6 \pm 8.7 | 129.4 \pm 9.9 | 10.3 \pm 0.5 | 9.7 \pm 0.5 | 9.1 \pm 0.8 |
| TFMPP (1 mg/kg) | 1779 \pm 73 * | 170.5 \pm 9.5 | 159.8 \pm 8.5 * | 136.0 \pm 8.7 | 9.6 \pm 0.5 | 9.0 \pm 0.4 | 7.7 \pm 0.5 |
| TFMPP (2.5 mg/kg) | 1685 \pm 89 | 225.6 \pm 14.7 *** | 198.7 \pm 9.4 *** | 138.8 \pm 9.4 | 13.8 \pm 1.8 * | 12.0 \pm 1.1 * | 8.2 \pm 0.3 |
| <u>Striatum</u> | | | | | | | |
| Control | 7735 \pm 509 | 789.8 \pm 47.2 | 587.7 \pm 33.9 | 715.3 \pm 36.6 | 10.3 \pm 0.4 | 7.7 \pm 0.2 | 9.5 \pm 0.6 |
| Diazepam (2 mg/kg) | 7208 \pm 548 | 723.6 \pm 61.1 | 550.9 \pm 33.9 | 675.1 \pm 81.9 | 10.1 \pm 0.5 | 7.7 \pm 0.2 | 9.4 \pm 0.7 |
| Diazepam (4 mg/kg) | 7826 \pm 1067 | 784.9 \pm 61.1 | 607.2 \pm 70.5 | 761.7 \pm 111.8 | 10.5 \pm 0.8 | 8.0 \pm 0.5 | 9.9 \pm 0.8 |
| TFMPP (1 mg/kg) | 7925 \pm 362 | 947.3 \pm 80.0 | 674.8 \pm 48.7 | 632.5 \pm 44.4 | 12.0 \pm 1.0 | 8.6 \pm 0.8 | 8.1 \pm 0.6 |
| TFMPP (2.5 mg/kg) | 8527 \pm 186 | 1238.0 \pm 122.0 *** | 872.7 \pm 57.7 *** | 703.2 \pm 27.7 | 14.6 \pm 1.7 ** | 10.3 \pm 0.8 *** | 8.2 \pm 0.2 |

TFMPPには神経終末からの5-HT遊離作用があることから、本結果においてみられたTFMPP投与による大脳皮質及び線条体におけるDA含量及びDA代謝回転の増加 (Table 4) は、TFMPP投与によりシナプス間隙に増加した5-HTが、DAの遊離を促進したと考えられる。

2-2-3. まとめ

本結果から、Hexを曝露することにより、マウスに抗不安作用を生ずることが明らかとなった。さらに神経化学的解析から、代表的な抗不安薬であるDZPとは異なる作用機序で抗不安作用を発現している可能性が考えられる。現在、ヒトにおいて、心身のリラックス効果を期待し

てアロマセラピーが行われている。マッサージとアロマセラピーを同時に行うことにより、作用は緩和であるが一時的な抗不安作用を得ることができる²⁷⁾。また、ヒトではHexの希釈溶液を提示することにより濃度依存的に鎮静効果が現れることが報告されている²⁶⁾。アロマセラピーに関する科学的根拠を示した報告は未だ少数であるが、本研究成果は、本結果は気分をリフレッシュさせる森林浴効果や、不安に対するアロマセラピーの効果における科学的根拠となる可能性が期待できる。

3. おわりに

本研究では、環境刺激として、ヒトに有益な効果をもたらすにいと、有害な影響をもたらすストレス刺激が生体に及ぼす影響について、マウスを用いた解析をおこなった。環境刺激の一つであるストレスに関する本実験結果では、マウスの発達過程において授乳期ストレス負荷が最も情動、不安、空間学習能力への影響を受けやすい可能性が示唆された。さらに、これらのストレスの影響は、雌よりもむしろ雄マウスにおいて顕著であり、発達期におけるストレスには性依存性の影響がある可能性が考えられる。また、授乳期における複合ストレス負荷（音刺激と強制水泳）では、雄性マウスに対して、情動行動及び不安関連行動には明らかな影響を及ぼしたが、空間学習能力には授乳期に単一ストレス負荷した場合とは異なり影響を及ぼさなかった。このことから、複合ストレス負荷により単一ストレスの影響が増強あるいは減弱される可能性が示唆される。本研究結果におけるマウスのストレス応答性の相違や性依存性に関する詳細なメカニズムについては今後更なる検討が必要であるが、胎生期、授乳期におけるストレス負荷による行動変化には、脳内モノアミン神経系の発達障害が少なくとも一部関連しているかもしれない。また、マウスにおいても、脳発達過程において不安関連行動あるいは学習能力に対するストレスの影響を最も受けやすいことが明らかとなった。マウスによる実験結果から推測すると、ヒトにおいても胎生期から出生後早期の間に臨界期が存在する可能性があり、妊婦に関しては、ストレスのかかる仕事は控え、育児に対する家族や社会からの支援が必要であると考えられる。

現代社会は急激な高齢化、経済・情報システムの急速な変化という改革の時代であり、個々に対するストレスは多種多様で限りがない。また、近年、社会の急激な変化に伴って自殺や凶悪犯罪の若齢化、心的外傷後ストレス障害、いじめ、登校拒否、学級崩壊など『こころの疾患』に起因する事件や事故の急増が深刻な社会問題となっている。若齢期に発現するこころの疾患の原因の一つとして、妊娠中あるいは幼若期に曝されるストレスが長期的な機能変化を伴って出生児の成長過程で重大な影響を及ぼす可能性を考えると、成人におけるストレス性精神疾患の一部には周産期におけるストレスの影響があるかもしれない。今後は、分子、細胞レベルの更なる検討が必要であると考えられるが、ストレス刺激による脳機能障害機構を解明することによって、ストレス性精神疾患の予防法あるいは治療法開発に本研究が貢献することを期待する。

また、環境刺激の一つであるにおいに関する本実験結果から、Hexを曝露することにより、マ

ウスに抗不安作用が生ずることが明らかとなった。さらに神経化学的解析から、代表的な抗不安薬であるDZPとは異なる作用機序で抗不安作用を発現している可能性が考えられる。動物実験の結果をヒトに外挿することは慎重に行うべきであるが、本実験結果から得られたHex曝露による抗不安作用は、においを利用した不安障害の新たな補助治療法の開発につながる可能性が期待される。

謝辞

最後に、本研究のために尊い命を失った数多くの動物に対してご冥福をお祈りするとともに、本研究で得られた結果が、今後更に発展し、医学、薬学及び環境科学の分野に貢献することを切に願います。

引用文献

- 1) Ising H, Rebentisch E, Poustka F, Curio I. (1990) Annoyance and health risk caused by military low-altitude flight noise. *Int Arch Occup Environ Health*. **62**. 357-363.
- 2) Stott DH. (1973) Follow-up study from birth of the effects of prenatal stresses. *Dev Med Child Neurol*. **15**. 770-787.
- 3) Nishio H, Kasuga S, Ushijima M, Harada Y. (2001) Prenatal stress and postnatal development of neonatal rats--sex-dependent effects on emotional behavior and learning ability of neonatal rats. *Int J Dev Neurosci*. **19**. 37-45.
- 4) Romeo RD, Mueller A, Sisti HM, Ogawa S, McEwen BS, Brake WG. (2003) Anxiety and fear behaviors in adult male and female C57BL/6 mice are modulated by maternal separation. *Horm Behav*. **43**. 561-567.
- 5) Bodnoff SR, Suranyi-Cadotte B, Quirion R, Meaney MJ. (1987) Postnatal handling reduces novelty-induced fear and increases [3H]flunitrazepam binding in rat brain. *Eur J Pharmacol*. **144**. 105-107.
- 6) Ueno KI, Togashi H, Mori K, Matsumoto M, Ohashi S, Hoshino A, Fujita T, Saito H, Minami M, Yoshioka M. (2002) Behavioural and pharmacological relevance of stroke-prone spontaneously hypertensive rats as an animal model of a developmental disorder. *Behav Pharmacol*. **13**. 1-13.
- 7) Zaharia MD, Kulczycki J, Shanks N, Meaney MJ, Anisman H. (1996) The effects of early postnatal stimulation on Morris water-maze acquisition in adult mice: genetic and maternal factors. *Psychopharmacology (Berl)*. **128**. 227-239.
- 8) Oitzl MS, Workel JO, Fluttert M, Frosch F, De Kloet ER. (2000) Maternal deprivation affects behaviour from youth to senescence: amplification of individual differences in spatial learning and memory in senescent Brown Norway rats. *Eur J Neurosci*. **12**. 3771-3780.
- 9) Vallee M, Mayo W, Dellu F, Le Moal M, Simon H, Maccari S. (1997) Prenatal stress induces high anxiety and postnatal handling induces low anxiety in adult offspring: correlation with stress-induced

- corticosterone secretion. *J Neurosci.* **17.** 2626-2636.
- 10) Magarinos AM, McEwen BS. (1995) Stress-induced atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3c neurons: comparison of stressors. *Neuroscience.* **69.** 83-88.
 - 11) Magarinos AM, McEwen BS. (1995) Stress-induced atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3c neurons: involvement of glucocorticoid secretion and excitatory amino acid receptors. *Neuroscience.* **69.** 89-98.
 - 12) Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M. (1977) Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* **229.** 327-336.
 - 13) Fernandez-Teruel A, Escorihuela RM, Nunez JF, Goma M, Driscoll P, Tobena A. (1992) Early stimulation effects on novelty-induced behavior in two psychogenetically- selected rat lines with divergent emotionality profiles. *Neurosci Lett.* **137.** 185-188.
 - 14) Matsumoto M, Higuchi K, Togashi H, Koseki H, Yamaguchi T, Kanno M, Yoshioka M. (2005) Early postnatal stress alters the 5-HTergic modulation to emotional stress at postadolescent periods of rats. *Hippocampus.* **15.** 775-781.
 - 15) Chung S, Son GH, Park SH, Park E, Lee KH, Geum D, Kim K. (2005) Differential adaptive responses to chronic stress of maternally stressed male mice offspring. *Endocrinology.* **146.** 3202-3210.
 - 16) Fride E, Weinstock M. (1988) Prenatal stress increases anxiety related behavior and alters cerebral lateralization of dopamine activity. *Life Sci.* **42.** 1059-1065.
 - 17) Alonso SJ, Arevalo R, Afonso D, Rodriguez M. (1991) Effects of maternal stress during pregnancy on forced swimming test behavior of the offspring. *Physiol Behav.* **50.** 511-517.
 - 18) Henry C, Arsaut J, Arnauld E, Demotes-Mainard J. (1996) Transient neonatal elevation in hypothalamic estrogen receptor mRNA in prenatally-stressed male rats. *Neurosci Lett.* **216.** 141-145.
 - 19) Walf AA, Frye CA. (2005) ERbeta-Selective Estrogen Receptor Modulators Produce Antianxiety Behavior when Administered Systemically to Ovariectomized Rats. *Neuropsychopharmacology.* **30.** 1598-1609.
 - 20) Dringenberg HC, Richardson DP, Brien JF, Reynolds JN. (2001) Spatial learning in the guinea pig: cued versus non-cued learning, sex differences, and comparison with rats. *Behav Brain Res.* **124.** 97-101.
 - 21) Peters DA. (1982) Prenatal stress: effects on brain biogenic amine and plasma corticosterone levels. *Pharmacol Biochem Behav.* **17.** 721-725.
 - 22) Peters DA. (1990) Maternal stress increases fetal brain and neonatal cerebral cortex 5-hydroxytryptamine synthesis in rats: a possible mechanism by which stress influences brain development. *Pharmacol Biochem Behav.* **35.** 943-947.
 - 23) Okado N, Cheng L, Tanatsugu Y, Hamada S, Hamaguchi K. (1993) Synaptic loss following removal of serotonergic fibers in newly hatched and adult chickens. *J Neurobiol.* **24.** 687-698.

- 24) Hayashi A, Nagaoka M, Yamada K, Ichitani Y, Miake Y, Okado N. (1998) Maternal stress induces synaptic loss and developmental disabilities of offspring. *Int J Dev Neurosci.* **16.** 209-216.
- 25) Lemaire V, Koehl M, Le Moal M, Abrous DN. (2000) Prenatal stress produces learning deficits associated with an inhibition of neurogenesis in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97.** 11032-11037.
- 26) Sano K, Tsuda Y, Sugano H, Aou S, Hatanaka A. (2002) Concentration effects of green odor on event-related potential (P300) and pleasantness. *Chem Senses.* **27.** 225-230.
- 27) Cooke B, Ernst E. (2000) Aromatherapy: a systematic review. *Br J Gen Pract.* **50.** 493-496.
- 28) Hatanaka A. (1999) Biosynthesis of so-called "green odor" emitted by green leaves. *Comprehensive Natural Products Chemistry (Vol.1-9 series)*, Barton-Nakanishi, Elsevier Sci., Amsterdam. **1.** 83-116.
- 29) Hatanaka A, Kajiwara T, Horino H, Inokuchi K. (1992) Odor-structure relationships in n-hexenols and n-hexenals. *Z Naturforsch [C].* **47.** 183-189.
- 30) Akutsu H, Kikusui T, Takeuchi Y, Sano K, Hatanaka A, Mori Y. (2002) Alleviating effects of plant-derived fragrances on stress-induced hyperthermia in rats. *Physiol Behav.* **75.** 355-360.
- 31) Nakashima T, Akamatsu M, Hatanaka A, Kiyohara T. (2004) Attenuation of stress-induced elevations in plasma ACTH level and body temperature in rats by green odor. *Physiol Behav.* **80.** 481-488.
- 32) Hashimoto S, Inoue T, Koyama T. (1999) Effects of conditioned fear stress on serotonin neurotransmission and freezing behavior in rats. *Eur J Pharmacol.* **378.** 23-30.
- 33) Rodgers RJ, Cole JC, Davies A. (1994) Antianxiety and behavioral suppressant actions of the novel 5-HT_{1A} receptor agonist, flesinoxan. *Pharmacol Biochem Behav.* **48.** 959-963.
- 34) Rodgers RJ, Cole JC, Cobain MR, Daly P, Doran PJ, Eells JR, Wallis P. (1992) Anxiogenic-like effects of fluprazine and eltoprazine in the mouse elevated plus-maze: profile comparisons with 8-OH-DPAT, CGS 12066B, TFMPP and mCPP. *Behav Pharmacol.* **3.** 621-634.
- 35) Gibson EL, Barnfield AM, Curzon G. (1996) Dissociation of effects of chronic diazepam treatment and withdrawal on hippocampal dialysate 5-HT and mCPP-induced anxiety in rats. *Behav Pharmacol.* **7.** 185-193.
- 36) Nishikawa T, Scatton B. (1986) Neuroanatomical site of the inhibitory influence of anxiolytic drugs on central serotonergic transmission. *Brain Res.* **371.** 123-132.
- 37) Auerbach SB, Rutter JJ, Juliano PJ. (1991) Substituted piperazine and indole compounds increase extracellular serotonin in rat diencephalon as determined by in vivo microdialysis. *Neuropharmacology.* **30.** 307-311.
- 38) Hjorth S, Suchowski CS, Galloway MP. (1995) Evidence for 5-HT autoreceptor-mediated, nerve impulse-independent, control of 5-HT synthesis in the rat brain. *Synapse.* **19.** 170-176.
- 39) Alves SH, Pinheiro G, Motta V, Landeira-Fernandez J, Cruz AP. (2004) Anxiogenic effects in the rat elevated plus-maze of 5-HT_{2C} agonists into ventral but not dorsal hippocampus. *Behav Pharmacol.* **15.** 37-43.

- 40) Corrodi H, Fuxe K, Lidbrink P, Olson L. (1971) Minor tranquilizers, stress and central catecholamine neurons. *Brain Res.* **29**. 1-16.
- 41) Benloucif S, Galloway MP. (1991) Facilitation of dopamine release in vivo by serotonin agonists: studies with microdialysis. *Eur J Pharmacol.* **200**. 1-8.