

# 恐怖精神的ストレスに対する塩分摂取の抗うつ効果とレジリエンス増強作用の可能性 及び脳内機序の解明

関 健二郎

奥羽大学薬学部薬理学分野

## 概要

**【目的】** 塩分の過剰摂取は、高血圧や脳卒中、腎臓病のリスクを高める。これに対し、塩分不足は不安惹起を促進し、逆に適度の塩分摂取が抗うつ作用を示すことが報告されている。近年、塩分摂取が精神的ストレスに対して積極的コーピングを誘導することが相次いで報告された。積極的コーピングは、心的外傷後ストレス障害(PTSD)やうつ病を発症に繋がる精神的ストレスでも、実際に PTSD やうつ病を発症するのは 10 人に 1 人程度であることから、その他の 9 人は精神的ストレスに対するレジリエンス(ストレスを跳ね除ける力)を有しているという「概念」の資質的要因であると考えられている。また、過剰な塩分摂取は視床下部のコルチコトロピン放出因子(CRF)の発現量を低下させることが報告されており、我々はこれまでに視床下部の神経破壊が恐怖刺激に対するマウスの積極的コーピングを制御することを見出している。

2011 年の東日本大震災では、福島県沿岸部の成人男性の被災者のうち、およそ 20%が 3 年後も PTSD に悩まされており、これは全国平均の 2 倍に及ぶ発症率である。この発症率の高さの理由として、震災、津波、さらには原子力初発電所の爆発など複数の精神的ストレスが連続して生じたためであると考えられており、それぞれを体験した場所やその後の避難場所など、当時の空間記憶の詳細が曖昧になったためにトラウマ記憶の汎化が生じ、PTSD 発症率が高まったとの仮説が提唱されている。しかも、長期精神的ストレスは、塩分嗜好性を高めることが報告されているため、本研究は恐怖や嫌悪を伴う精神的ストレスを連続してマウスに与え、連続した異なる精神的ストレス状況下において、マウスの積極的コーピングに対する塩分摂取の効果と視床下部の CRF 発現量に及ぼす効果を調べた。

**【方法】** 7 ~ 10 週齢の C57BL/6j を用い、水だけを飲ませたマウスをコントロールマウスとし、2%食塩水を 5 日間飲ませたマウスを塩分摂取マウスとした。それぞれのマウスを白紙で四方を覆った 30 cm 立法のアクリルボックスに入れ、5 分間自由行動させた。その後マウスが本能的に恐怖反応を引き起こすキツネの分泌成分 2,4,5 dihydro 2,5 trimethylthiazoline (TMT) をボックスの一角に敷いた直径 2 cm のろ紙に 20  $\mu$ L 滴下した。その後 10 分間マウスの行動パターンを観察した。マウスの行動パターンは、ANY-maze 行動解析ソフトで解析した。また、マウスの恐怖感受性を調べるため、Nano-tag を皮下に埋め込み、TMT による 1 分毎の体温変化を Nano-tag ビューワーで解析した。またすくみ行動(freezing)時間の推移を ANY-maze で解析した。TMT で恐怖刺激した 1 時間後に恐怖と無関係である尾懸垂テスト(TST) 10 分間課し、不動時間を指標に積極的コーピングが誘導されたか否かを評価した。一方、視床下部における CRF 発現量は、別のマウスを用いて TMT 刺激前または刺激 2 時間後に還流固定し、c-fos と CRF の両方を共焦点顕微鏡にて同時に蛍光免疫染色法で観察し、TMT 刺激前、刺激中の CRF 発現量と CRF 陽性細胞における c-fos 発現を Image J で解析した。

**【結果】** TMT 刺激前のコントロールマウスと塩分摂取マウスのボックス内の移動距離に違いは認められなかったが、ボックスの中央エリア内の移動距離は塩分摂取マウスで顕著に長かった。TMT 刺激による生体反応としてマウスの体温変化を測定したところ、コントロールマウスと食洗摂取マウス共に TMT で顕著に体温が低下したが、両者に有意な違いは認められなかった。また、TMT による恐怖刺激中の freezing 時間も両者に違いは認められなかった。また、TMT 刺激中の移動

距離や、回避エリアおよび周囲エリアの移動距離にも顕著な違いは認められなかった。以上から、両者の恐怖感受性に違いは無いことが示唆された。これに対し、ボックス内の中央エリア内の移動距離や滞在時間は食塩摂取マウスで顕著に長いことが分かった。コントロールマウスでは、中央エリアへの侵入回数と freezing 時間が逆相関し、また回避エリア内の移動距離も freezing 時間と逆相関した。これに対し、食塩摂取マウスでは、これらの相関性が消失することが分かった。次に TMT 恐怖刺激 1 時間後の TST 中の不動時間の長さを調べたところ、食塩摂取マウスでは不動時間が顕著に短縮し、不動時間と TMT 中の freezing 時間が有意に相関することが分かった。さらに、TMT 刺激中における中央エリアの移動距離や中央エリアへの侵入回数が TST 中の不動時間と有意に逆相関することも確認された。TMT 刺激を与えていないマウスではこれらの間に相関が認められなかったことから、TMT 刺激中の行動パターンが TST 中の不動時間に影響を与えていることが示唆された。そこで視床下部の CRF 発現量を調べたところ、食塩摂取マウスでは、TMT 刺激を行う前から既に CRF の発現量がコントロールマウスと比べて有意に高く、TMT 刺激を行うとコントロールマウスでは顕著に CRF 発現が増加するものの、食塩摂取マウスでは TMT 刺激を与えても有意な増加は認められなかった。

**【考察】** 以上の結果から、食塩摂取マウスでは、不安レベルが低下しているためにボックス内の中央エリアに積極的に侵入し、空間記憶を高めることで連続した精神的ストレスに対応する可能性が考えられる。また直前の恐怖体験はその後の精神的ストレスに影響を及ぼすが、短期間の食塩過剰摂取が、恐怖体験中のマウスに適切な行動パターンを誘導することで(コーピング方略)、その後の精神的ストレスに対する積極的コーピングを促進(学習性無力感形成の阻止)する可能性が示唆された。これは食塩摂取が恐怖体験中のコーピング方略(適切な行動)を高めることでトラウマ記憶の汎化が阻止され、PTSD やうつ病発症の予防に繋がる可能性を示唆している。今後は PTSD モデル実験を行い、食塩摂取マウスでトラウマ記憶の汎化が阻止されるか、また PTSD 発症やうつ病併発の予防に繋がるかなどの可能性を調べる研究に発展させたい。

## 1. 研究目的

適度な塩分摂取は、低ナトリウム血症の予防と同時に生体機能の維持に必要であることは周知の事実である。しかし、過剰な塩分摂取は、心疾患や高血圧<sup>[1]</sup>、脳卒中<sup>[2]</sup>、また腎臓病<sup>[3]</sup>や発がんリスクを高めることが数多く報告されている<sup>[4]</sup>。さらに、認知症の進行に及ぼす塩分過多の悪影響なども多く報告されており<sup>[5]</sup>、性別、年代別に一日の塩分摂取上限などが定めている<sup>[6]</sup>。興味深いことに、1998 年に敵対的且つ反友好的な若者とそうでない若者の塩分嗜好性についての調査結果が報告され、反友好的な若者の塩分嗜好性が顕著に高いこと、また過剰な塩分摂取が精神的ストレスによる心拍出量や収縮期血圧の増加を促進することが示唆された<sup>[7]</sup>。また、抗うつ薬の服用によりうつ病患者の塩分摂取欲が低下することが報告された<sup>[8]</sup>。これにより、過剰な塩分摂取は、精神的ストレスによる感情障害のリスク因子である可能性が示唆された。一方、動物実験では塩分摂取によりストレスが軽減すること、またそれにより社会性が増加することが報告された<sup>[9]</sup>。さらに、塩分摂取制限は、ラットの不安レベルを増強すること

が報告され<sup>[10]</sup>、さらにヒトでも塩分摂取制限が精神的ストレスを増加することが報告された<sup>[11, 12]</sup>。過剰な塩分摂取が健康を害する可能性が高いことは明確ではあるが、一時的且つ適度な塩分摂取が精神的ストレスに効果的であるか否かは未だ賛否の分かれるところである。

最近、数日間の過剰な塩分摂取により、精神的ストレスに対して積極的コーピングが増強されることがマウスを用いた実験で相次いで報告された<sup>[13, 14]</sup>。両者とも抑うつ症状の一つの指標である学習性無力感形成の評価実験として広く用いられている強制水泳試験<sup>[15]</sup>で積極的コーピングレベルの増強を確認している。そのため、一見すると数日間の過剰な塩分摂取がうつ病患者に特有な学習性無力感形成を阻止する可能性を示唆している。精神的ストレスに対する積極的コーピングは、心理学の分野で広まった「レジリエンス(ストレスを跳ね除ける力)概念」の資質的要因として精神医学の分野でも取り入れられている。これは、同じ精神的ストレスを受けてもうつ病や心的外傷後ストレス障害(PTSD)を発症する確率がおよそ 10 人に 1 ~ 2 人であることから<sup>[16]</sup>、精神的ストレスや恐怖記憶に対する

レジリエンスを有しており、レジリエンスの資質的要因である積極的コーピングがストレスを跳ね除けてうつ病や PTSD 発症を阻止するという仮説である<sup>[17]</sup>。PTSD は、恐怖体験した場所以外で恐怖再体験するトラウマ記憶の汎化を特徴とする<sup>[18]</sup>。これは、恐怖体験した場所とその直後のストレス環境の記憶が混在し、次第に恐怖体験した場所と無関係の場所で恐怖再体験(フラッシュバック)を起こす。2011 年の東日本大震災の際、福島県沿岸部の成人男性の被災者のうち、およそ 20%が 3 年後も PTSD に悩まされており、これは全国平均の 2 倍に及ぶ発症率である<sup>[19]</sup>。これは震災、津波、さらには原子力初発電所の爆発が連続して生じたためであると考えられており、それぞれの避難場所の記憶の詳細が曖昧になったためであるという仮説が提唱されている。

最近、私たちは、マウスが本能的に恐怖反応を示す 2,4,5 dihydro 2,5 trimethylthiazoline (TMT)により、視床下部のコルチコトロピン放出因子 (CRF) の発現が増加し、この領域をイボテン酸にて神経破壊すると、TMT 刺激中の積極的コーピングが増加することを見出している。また、5 日間の 2%食塩水の摂取により、視床下部の CRF 発現量が低下することが報告されている<sup>[20]</sup>。そこで本研究は、5 日間の 2%食塩水の摂取がもたらす TMT 恐怖刺激中におけるマウスのコーピングレベルを詳細に解析し、TMT による恐怖ストレスと精神的ストレスを引き起こす尾懸垂テスト(TST)を 1 時間置きに連続で与えた際のマウスのストレスに対するレジリエンスの詳細とそれに及ぼす食塩摂取の効果調べた。

## 2. 研究方法

### 2. 1. 動物

奥羽大学動物実験委員会により承認された動物実験計画書に基づいて行った(No. 2018-29, 2019-39)。室温は  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  に維持し、明暗サイクル(明期; 8:00 - 20:00, 暗期; 20:00 - 翌 8:00)の下、自由に餌と水を摂取する環境の下、1 ケージに 5 ~ 6 匹飼育した。実験には、6 週齢の雄性 C57BL/6J マウスを日本 SLC または日本クレーアより購入し、最低 1 週間動物舎で飼育し、7 ~ 10 週齢の間でテストした。

### 2. 2. 恐怖刺激と恐怖反応 (Freezing) 測定

本研究では、マウスが新しい環境でどのような行動パターンを取るかを観察するために、事前に TMT 試験に用いるテストボックスに馴化させずに行った。マウスが本能的に恐怖反応を示す 2,4,5-dihydro 2,5-trimethylthiazoline (TMT) (Contech (Canada)) 原液を滴下するためのろ紙 (D: 2 cm, Cat#: 1001-025; Whatman GE Healthcare Life Science, Little Chalfont, UK) を側面を白紙で覆ったアクリルボックス (W: 294 mm × D: 294 mm × H: 297 mm) の一角(実験者から見て左手前の一隅)に固定し、TMT を滴下する 5 分前は自由行動パターンを測定し、5 分経過した時点で TMT を 20  $\mu\text{L}$  滴下して 10 分間恐怖環境下におけるマウスの行動パターンを観察した。テストボックスは、中央 (central zone), 回避エリア (avoidance zone), TMT 側の半分のエリア (unavoidance zone), TMT を滴下した床面 4 分の 1 に相当するエリア (TMT zone), 周囲エリア (peripheral zone) に分けし、マウスの恐怖反応は、TMT 滴下後の 10 分 (5 分 × 2) における各ゾーンでの滞在時間、移動距離、侵入回数、さらにすくみ反応 (Freezing) 時間で評価した (Figure 1A-E)。

### 2. 3. TMT 恐怖刺激による体温変化の測定

2% イソフルランを麻酔器 (NARCOBIT-E, 夏目製作所) にて 5 分間麻酔ボックス内で暴露して (スライド式タイト BOX (S サイズ), ブレインサイエンスイデア), その後イソフルラン濃度を 1.5% に下げてその間にマウスの背部皮下に Nano-tag (VSMN-210, 体内埋め込み式運動量/温度計測装置, キッセイコムテック株式会社) を埋め込み、背部を縫合した後、Reflex Kit 100 (9972 (7 mm), 室町機器) で 3 ~ 4 か所クリップ止めして Nano-tag が落ちないように固定した。麻酔の影響が消失するまで複数のマウスと共に 5 日間、飼育ケージで回復を待った。Nano-tag 付属の FeliCa (カードリーダー) を用いて nano-tag ビューアプログラムで測定開始時間と終了時間を設定し、体温のみ 1 分毎に測定するよう TMT 刺激 1 時間前から刺激 30 分後まで測定するようプログラムした。麻酔の影響が消失した後、生体恐怖反応のみを測定するために、新規環境の影響を除外するために、この実験では TMT 恐怖刺激を行う箱に 15 分間入れて箱内の環境に慣らしてから直ぐに飼育ケージに戻した。その後 45 分後に再び箱に入れ、TMT 原液を 20  $\mu\text{L}$  滴下して 1 分毎の体温変化を 30 分間測定した。その後、FeliCa で再び Nano-tag 内のデータを nano tag ビ

ユーアプログラムで読み込み, csv ファイルにて集計して, エクセルにて平均値を計測した。

## 2. 4. 行動解析

マウスの行動解析 (freezing 時間や移動距離, 滞在時間, エリア侵入回数)は, テストボックス上部から web カメラ (C920r, ロジクール)にて撮影し, それを ANY-maze software (version 5.2, Muromachi Kikai Co., Ltd., Tokyo, Japan)を用いてマウスの行動を追跡して解析した。Freezing 時間は, マウスが呼吸以外の動きを 1 秒間以上止めた時点で freezing 反応を示したと評価し, その持続時間の合計で評価した。Freezing 時間は, TMT 滴下 5 分前から滴下 10 分後までの計 15 分間を 1 分毎に測定して恐怖反応レベルの時間経過を調べ, さらに恐怖環境下での逃避行動パターンを TMT 刺激中の前半と後半の 5 分毎に評価を行った。

## 2. 5. 免疫染色

TMT 刺激 2 時間後にマウスを塩酸メドミジン 0.3 mg/kg (和光純薬) + ミダゾラム 4 mg/kg (サンド株式会社) + 酒石酸ブトルファノール 5 mg/kg (和光純薬)の 3 種混合麻酔を行い, 胸部切開により心臓を露呈し, 左心室に冷却した 0.1 M リン酸バッファー (PBS)を投与し, 直ちに右心房を切開して還流した。5 mL の PBS を還流後, 4%パラホルムアルデヒド (PFA)を 15 mL 還流して固定し, 脳を採取して, 48 時間 4°C の 4% PFA 内でさらに固定し, その後 30%スクロースに置換して脱水した。脱水後は視床下部を含む脳ブロックを凍結組織切片作製用包埋剤 (No. 4566, ティッシュテック, サクラファインテックジャパン)で包埋し, -80°Cで 30 分間凍結した。その後, -20°Cの冷凍庫で保管した後, クリオスタット (CM1100, Leica, Wetzlar, Germany)で 20  $\mu$ m の薄切切片を作成してスライドグラス (CRE-01, クレストホワイト, 松浪硝子工業)上に 3 ~ 4 切片ずつ張り付けて乾燥させた。作成した脳切片は, PBS で洗浄後, 0.01% Triton-X100 で処理し, その後クエン酸バッファーで加熱することで抗原抗体反応の賦活化した。その後, 10%ロバ血清を含む PBS で 20 分間ブロッキングし, 続けて Rabbit polyclonal anti-CRF (1:100, H-019-06, Phoenix Pharmaceuticals) および mouse monoclonal anti-c-fos antibody (1:50, SC-166940, Santacruz, USA)を一晩処置した。翌日, PBS で一次抗体を 10 分間 3 回洗浄し, 続けて二次抗体をそれぞれ Donkey anti-rabbit

IgG-alexa 488 (Cat.#ab150073, Abcam, Cambridge, MA, USA)と Donkey anti-mouse IgG-alexa555 (Cat.#ab150074, Abcam)で室温で1時間処置した。二次抗体を PBS で 10 分間 3 回洗浄し, VECTASHIELD Mounting Medium (H-1000, VECTOR, Burlingame, California, USA)用いてカバーガラスを付け, 数分乾燥させた後に共焦点顕微鏡 (LSM510, Carl Zeiss, Germany)にて 20 倍および 40 倍レンズを用いて CRF と c-fos 由来の蛍光画像を取得した。画像データ上の白線の長さは全て 50  $\mu$ m とする。

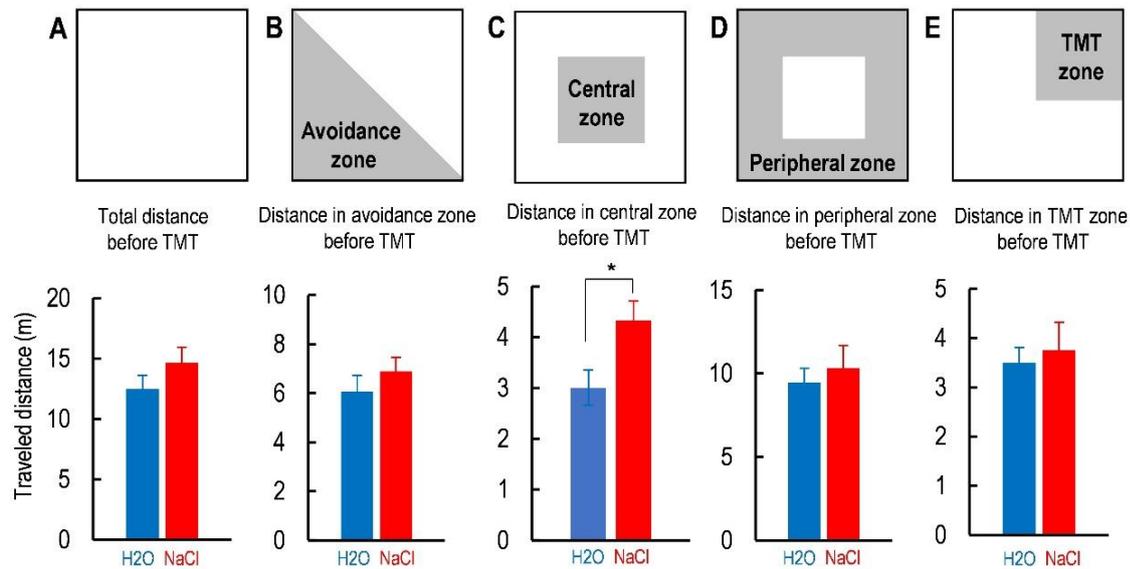
## 2. 6. 統計

2 群間の相関は, Kolmogorov-Smirnov テストで正規性を検定し, 有意差がある場合は Pearson の積率相関係数で, 正規性が認められない場合は Spearman の順位相関で算出して有意性を確認した。TMT 実験および TST 実験については, Two-way repeated measures ANOVA で分散分析検定を行い, その後 *t*-test または Bonferroni *post hoc* test にて群間比較を行った。CRH の発現率に関しては, One-way repeated measures ANOVA で分散分析した後, Bonferroni *post hoc* test にて群間比較を行った。全ての統計計算は, EZR ソフトウェアを用いて検定した<sup>[21]</sup>。なお,  $p < 0.05$  の時に有意差ありとし,  $p < 0.01$  の時に「\*\*」と表記し,  $p < 0.05$  の時は「\*」で表記した。

## 3. 研究結果

### 3. 1. 恐怖感受性に及ぼす塩分摂取の効果

恐怖ストレスに対する食塩摂取の効果を調べる前に, 恐怖刺激前のマウスの行動量や行動パターンおよび TMT に対する恐怖感受性について検討した。TMT による恐怖刺激を行う前のマウスの移動距離や周辺エリアや中央エリアに対する嗜好性を調べたところ, コントロールマウスと比べて食塩摂取による移動距離に違いは認められなかったが (Figure 1A), 食塩摂取マウスの中央エリアにおける移動距離がコントロールマウスと比べて有意に長いことが分かった ( $p < 0.05$ , Figure 1C)。しかし, それ以外の場所嗜好性は認められなかった (Figure 1A, B, D, E)。この結果から, 食塩摂取マウスは, コントロールマウスと比べて不安レベルが低い可能性が示唆された。そこで, TMT 刺激を行った時のマウスの恐怖反応を体温変化と freezing 反応時間で調べたところ, 食塩摂取マウスで体温低下レベルがコントロールマウスと比べて大きい傾向が認



**Figure 1.** TMT 恐怖刺激前のオープンフィールド内の探索行動様式に及ぼす食塩摂取の効果

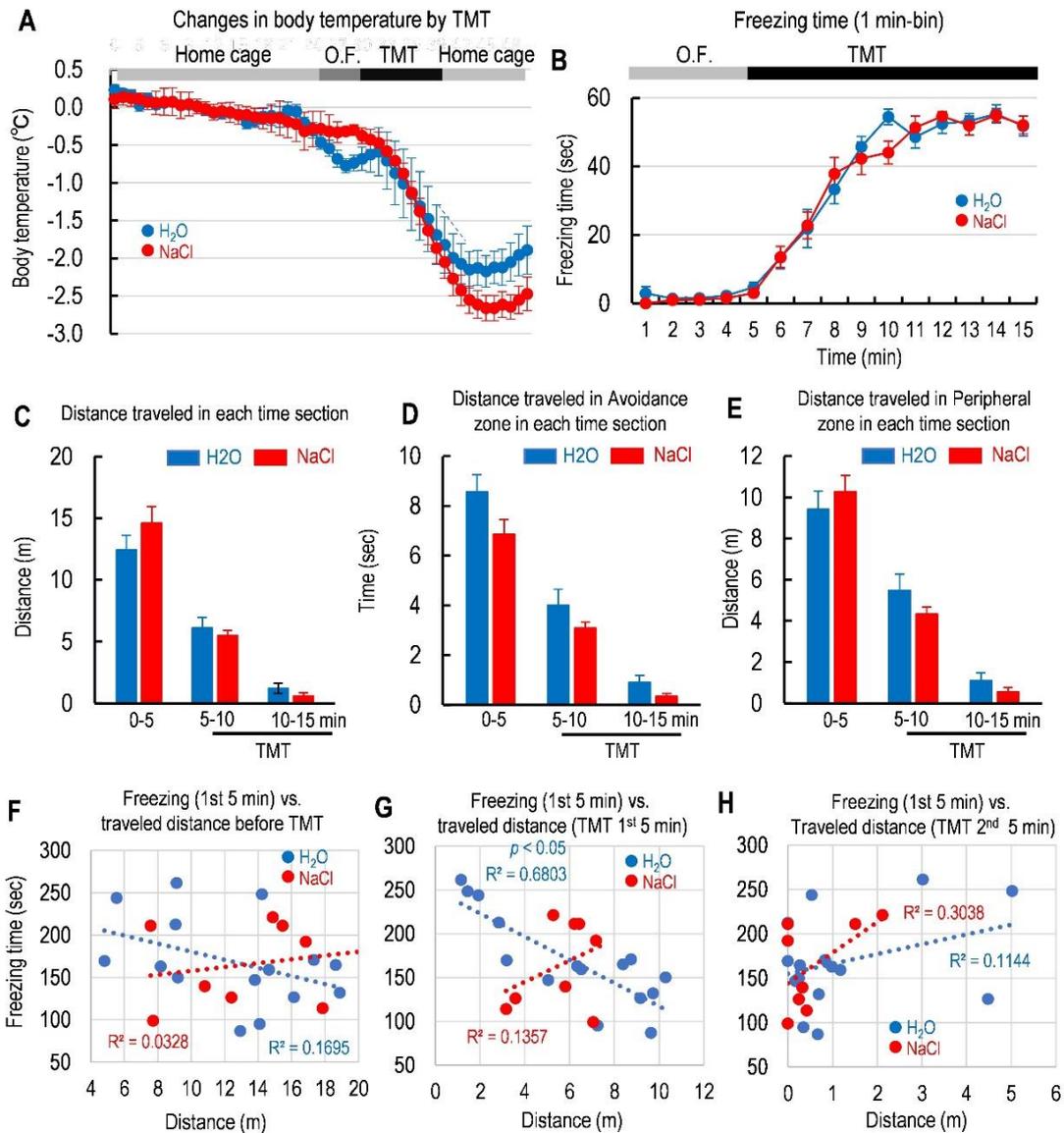
A) 総移動距離, B) 回避エリアにおける移動距離, C) 中央エリアにおける移動距離, D) 周囲エリアにおける移動距離, E) TMT ゾーンにおける移動距離

められたが、統計学的に有意な差は認められなかった (Two-way repeated measures ANOVA,  $F_{(1, 550)} = 0.0$ , **Figure 2A**)。また、TMT 恐怖刺激に対する freezing 時間を調べたところ、食塩摂取マウスはコントロールマウスの freezing 時間と有意な差は認められなかった (Two-way repeated measures ANOVA,  $F_{(14, 336)} = 0.7626$ ,  $p = 0.7096$ , **Figure 2B**)。そこで TMT 刺激によりマウスの移動距離が変化し、いずれは移動を止めて freezing を起こすことが分かっているが、食塩摂取マウスで移動距離に変化が認められるかを調べたところ、テストボックス全範囲の移動距離には違いは認められず、さらに回避エリアでも周囲エリアにおいても TMT による恐怖刺激中でもマウスの移動距離に及ぼす食塩摂取の効果は認められなかった (Whole areas: Two-way repeated measures ANOVA,  $F_{(2, 50)} = 2.1269$ ,  $p = 0.1299$ , **Figure 2C**; 回避エリア: Two-way repeated measures ANOVA,  $F_{(2, 50)} = 2.0625$ ,  $p = 0.1378$ , **Figure 2D**; 周囲エリア: Two-way repeated measures ANOVA,  $F_{(2, 50)} = 1.1172$ ,  $p = 0.3352$ , **Figure 2E**)。次に、マウスの移動距離と freezing 時間に相関が認められるかを調べたところ、TMT 刺激前の移動距離は freezing 時間に

影響を及ぼさない一方、TMT 刺激開始 5 分間の移動距離と freezing 時間の関係について調べたところ、コントロールマウスでは移動距離と freezing 時間が有意に逆相関することが分かった (コントロール:  $p < 0.05$ , **Figure 2G**)。これに対し、食塩摂取マウスでは、コントロールマウスで認められたような移動距離と freezing 時間との関係が成立しないことが分かった ( $p =$ , **Figure 2H**)。以上の結果から、食塩摂取マウスでは、興奮レベルの指標となる運動量や恐怖反応に影響を及ぼさないが、不安レベルがコントロールマウスと比べて低いことから、恐怖ストレスに対して個々のマウスが異なる行動パターンを取る可能性が示唆された。

### 3. 2. 恐怖ストレスに対するマウスの行動パターンに及ぼす塩分摂取の効果

一般的にマウスは不安を感じると、オープンフィールド内では周囲を好む傾向があるが、食塩摂取マウスは積極的に中央エリアを移動することから、不安レベルが低下している可能性がある。これは新規環境に対して不安を感じない素質を獲得している可能性が高い。TMT に対する食塩摂取マウスの恐怖反応はコントロールマウスと同程度で



**Figure 2.** TMT による恐怖刺激が引き起こす生体反応と食塩摂取の効果

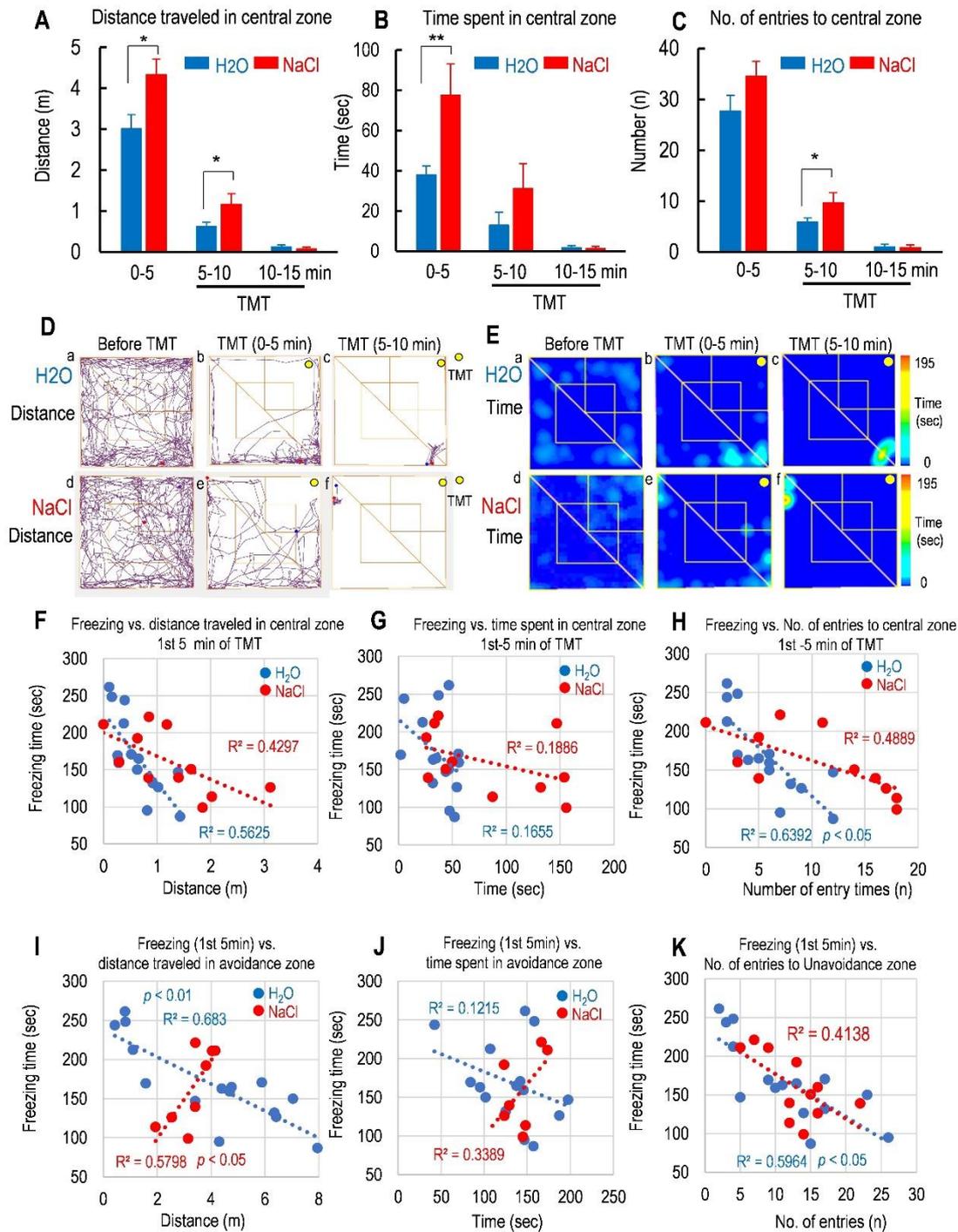
**A)** TMT 恐怖刺激によるマウスの体温変化, **B)** TMT によるマウスのフリージング時間の推移, **C)** TMT 刺激前、刺激中のマウスの移動距離, **D)** 回避ゾーンにおける TMT 前および TMT 刺激中のマウスの移動距離, **E)** TMT 刺激前および刺激中における周囲エリアのマウスの移動距離, **F)** Freezing 時間と TMT 刺激前のマウスの移動距離との関係, **G)** Freezing 時間と TMT 刺激前半 5 分間のマウスの移動距離との関係, **H)** Freezing 時間と TMT 刺激後半 5 分間のマウスの移動距離との関係

あるが, TMT による恐怖刺激に対してマウスがどのような対処行動を取るのかを調べた。その結果, 食塩摂取マウスでは TMT 刺激開始 5 分間も積極的に中央エリア内の移動距離が長いことが分かった ( $p < 0.05$ , **Figure 3A and D**)。これに対し, TMT 刺激前では食塩摂取の中央エリア

の滞在時間が有意に長いものの ( $p < 0.01$ , **Figure 3B and E**), TMT 刺激を行うと中央エリアの滞在時間の有意差が消失し, 侵入回数においてはコントロールマウスとほぼ同程度であった (**Figure 3B, C**)。コントロールマウスで認められるように, 中央エリアの移動距離や滞在時間, 侵入回

数が多いマウスでは、不安レベルが低い傾向にあると同時にこれらの中央エリアにおける移動距離や侵入回数は TMT 刺激開始 5 分間における freezing 時間と統計学的に有意に相関した (control: 移動距離,  $p < 0.05$ , **Figure 3F**; 侵入回数,  $p < 0.05$ , **Figure 3H**)。これに対し、食塩摂取マウスでは、freezing 時間が長いマウスでも積極的に

中央エリアを移動し、侵入することが分かった。さらに、食塩摂取マウスの恐怖に対する生体反応はコントロールマウスと同程度であるのに対し、回避エリアにおける移動距離や滞在時間、侵入回数は、コントロールマウスでは逆相関するのに対し、食塩摂取マウスではこれらの関係が消失することが分かった (**Figure 3 I - K**)。

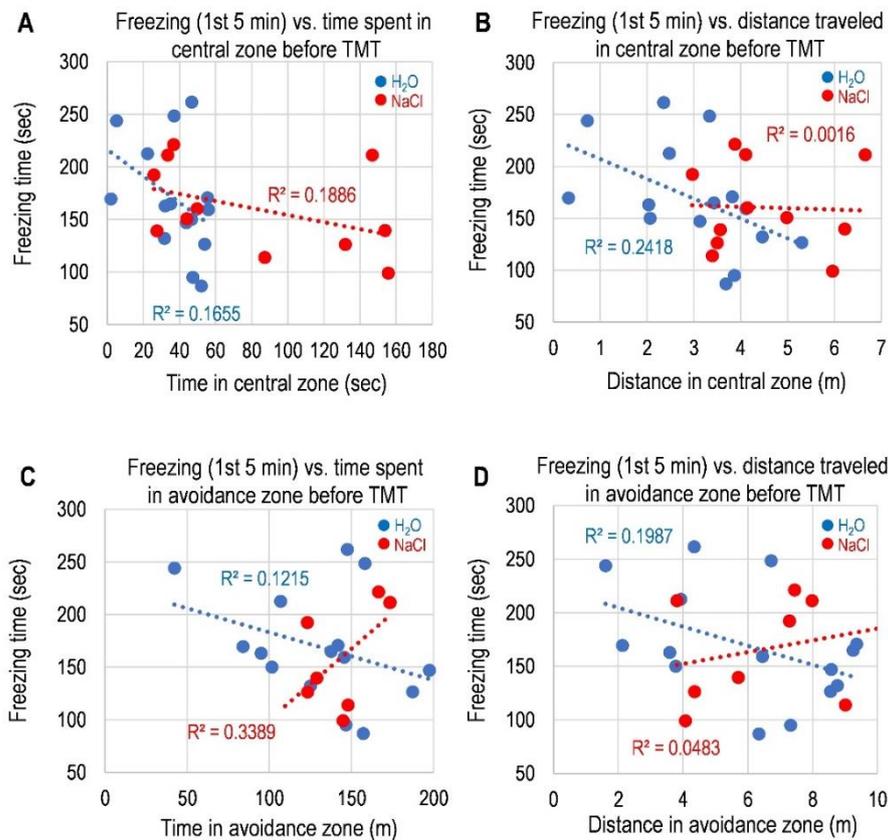


**Figure 3.** TMT 刺激中のセンターエリアにおける滞在時間および移動距離とフリージング時間との関係に及ぼす食塩摂取の効果

A) 中央エリアにおける移動距離, B) 中央エリア内の滞在時間, C) 中央エリアへの侵入回数, D) 食塩を含まない水を摂取しているマウスと食塩水摂取マウスの TMT 恐怖刺激前, 刺激中前半, 後半 5 分の移動パターン, E) 食塩を含まない水を摂取しているマウスと食塩水摂取マウスの TMT 恐怖刺激前, 刺激中前半, 後半 5 分の場所嗜好性(滞在時間), F) Freezing 時間と TMT 刺激前半 5 分間のマウスの中央エリアにおける移動距離との関係, G) Freezing 時間と TMT 刺激前半 5 分間のマウスの中央エリアにおける滞在時間との関係, H) Freezing 時間と TMT 刺激前半 5 分間のマウスの中央エリアへの侵入回数との関係, I) Freezing 時間と TMT 刺激前半 5 分間のマウスの回避エリアにおける移動距離との関係, J) Freezing 時間と TMT 刺激前半 5 分間のマウスの回避エリアにおける滞在時間との関係, K) Freezing 時間と TMT 刺激前半 5 分間のマウスの回避エリアへの侵入回数との関係

食塩摂取マウスの中央エリアにおける移動距離や滞在時間の長さは, TMT 刺激前のオープンフィールドでも有意にコントロールマウスよりも長いことから, マウスの不安を感じるレベルが低いことが freezing 時間に影響を及ぼし

ているか否かを調べた。その結果, TMT 刺激前の行動パターンが freezing 時間に影響しないことが分かった (Figure 4 A - D)。



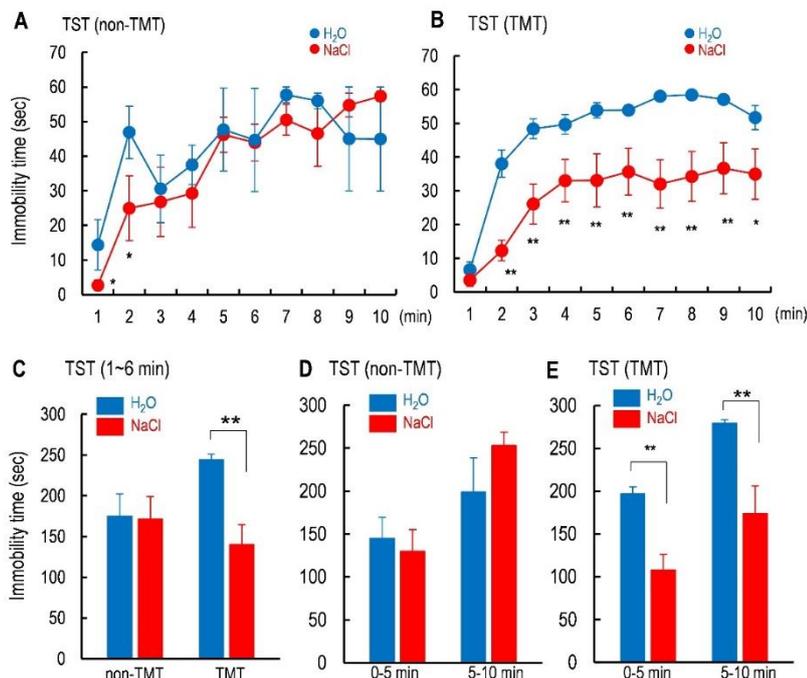
**Figure 4.** Freezing 時間と TMT 刺激前の行動パターンとの関係

A) Freezing 時間と TMT 刺激前の中央エリアにおけるマウスの滞在時間との関係, B) Freezing 時間と TMT 刺激前のマウスの中央エリアにおける移動距離との関係, C) Freezing 時間と TMT 刺激前のマウスの回避エリアへの侵入回数との関係, D) Freezing 時間と TMT 刺激前のマウスの TMT ゾーン内の移動距離との関係

### 3. 3. 恐怖ストレス暴露後のマウスのコーピング方略に及ぼす塩分摂取の効果

一般にマウスは嫌悪体制に置かれると、そこから逃れるための行動を取る。しかし、逃れられないことが分かると諦めて逃れようとする努力を止める(学習性無力感の形成)。学習性無力感が形成されるか否かは、抑うつ状態の評価に広く使われており、うつ状態の強いマウスほど学習性無力感が形成されやすいことが知られている。そのため、抗うつ薬の効果を評価する際には、TST や強制水泳試験(FST)が使われる<sup>[22, 23]</sup>。たとえば、尾懸垂テスト(TST)のように、マウスの尻尾を吊ると、マウスがその体制から逃れるために激しく身体を揺さぶるが、逃れられないことを学ぶと動きを止める<sup>[24]</sup>。嫌悪ストレスに対してマウスが積極的に逃れようとする行動は積極的コーピングの一つであることが報告されている。上述通り、積極的コーピングは、ストレスに対するレジリエンスの資質的要因の一つであること<sup>[25]</sup>、また食塩摂取が積極的コーピングを誘導することから<sup>[13, 14]</sup>、本研究ではTMTによる恐怖ストレスがマウスの積極的コーピングにどのような影響を及ぼすかを調べるためにTST実験を行い、それに食塩摂取がどのような効果を及ぼすかを調べた。

最初に、TMTによる恐怖ストレスを体験していないマウスを用い、2%食塩水の摂取がTSTの積極的コーピングにどのような影響を調べた。マウスの尻尾を吊ると、最初は嫌悪体制から逃れようと身体を揺さぶり続けるが、次第に身体の動きを止める時間が延長し、不動時間の時間推移は、コントロールマウスと2%食塩水摂取マウスと同程度であり(Figure 5A and D)、2%食塩水摂取は、積極的コーピングを誘導しないことが分かった。ところが、事前にTMTによる恐怖ストレスを与えると、2%食塩水摂取マウスの不動時間が有意に短縮し、これは1分毎における不動時間の時間推移でも5分間単位の不動時間でも有意に不動時間が短縮することが分かった(Figure 5B and C)。また、抑うつ症状を伴わない学習性無力感形成は、後半で不動時間に差が出てくる傾向が高いが、TMTで恐怖ストレスを与えた2%食塩水摂取マウスの不動時間は、コントロールマウスと比べて前半5分から有意に不動時間が短縮することが分かった(Figure 5E)。FST実験では、2%食塩水摂取では顕著な積極的コーピングが観察されず、濃度は4%が積極的コーピングの誘導に効果的であることが報告されているが<sup>[14, 26]</sup>、事前に与えた恐怖ストレスが、積極的コーピングの誘導に及ぼす2%食塩水摂取の効果を増強することが示唆された。



### Figure 5. TMT 刺激中のフリージング時間とその後の学習性無力感形成との関係に及ぼす食塩摂取の効果

A) TMT 刺激を与えていない食塩水非摂取マウスと食塩水摂取マウスの TST 中の不動時間の推移, B) TMT 刺激を与えた後の食塩水非摂取マウスと食塩水摂取マウスの TST 中の不動時間の推移, C) TMT 刺激を与えていない食塩水非摂取マウスと食塩水摂取マウスおよび TMT 刺激を与えた後の食塩水非摂取マウスと食塩水摂取マウスの TST 1 分後から 6 分後までの 5 分間の不動時間の比較, D) TMT 刺激を与えていない食塩水非摂取マウスと食塩水摂取マウスの前半および後半 5 分間の不動時間の比較, E) TMT 刺激を与えた後の食塩水非摂取マウスと食塩水摂取マウスの前半および後半 5 分間の不動時間の比較

そこで、事前の恐怖ストレスが、TST 中の不動時間に影響を及ぼしているか否かを調べるために、TMT による恐怖ストレス中の移動距離や freezing 時間、freezing 回数や中央エリアの移動距離や滞在時間、侵入回数との関係を調べた。コントロールマウスでは、TMT 恐怖刺激中の移動距離や freezing 時間、侵入回数のいずれも、TST 中の不動時間と相関性が認められなかったのに対し、2% 食塩水摂取マウスでは、TMT 恐怖刺激中に freezing 時間が短縮したマウスほど TST 中の不動時間も短縮し、これら 2 つの関係に有意な相関が認められた ( $p < 0.05$ , Figure 6B)。さらに、コントロールマウスと異なり、2% 食塩水摂取マウスでは、TMT 恐怖刺激中における中央エリア内の移動距離が長く、また中央エリアへの侵入回数の多いマウスほど TST 中の不動時間が短縮し、これらの関係に有意な相関が認められることが示唆された (Distance:  $p < 0.05$ ; No. of entries:  $p < 0.05$ , Figure 6D and F)。以上の結果から、食塩水摂取により積極的コーピングが誘導しやすくなるよう、事前のストレスでどのような行動を取るかが誘導されやすくなることが示唆された。つまり、食塩水摂取は、ストレスに対して有効な対処行動を誘導し、ストレスに対するレジリエンスの獲得を増強する可能性が示唆された。

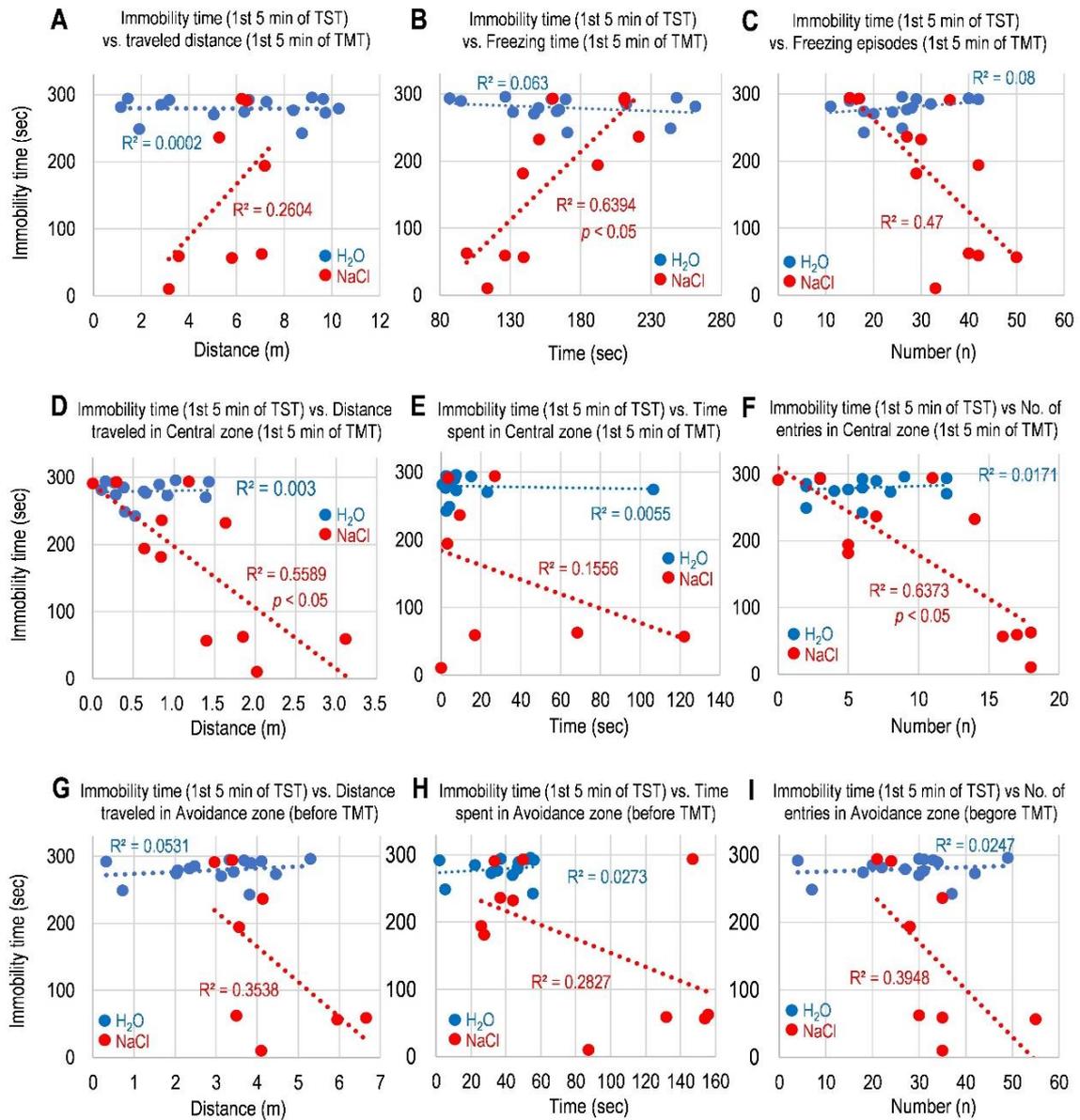
#### 3. 4. 恐怖ストレス暴露後のマウスのコーピング方略に及ぼす塩分摂取の効果

我々はこれまでに視床下部が恐怖ストレスに対するコーピング方略を制御する可能性を見出している (Kamimura *et al.*, 投稿中)。視床下部には、コルチコトロピン放出ホルモン (CRF) やバソプレシン、オキシトシンなどのストレスに対して放出が促進されるホルモンが存在する。特に視床下部の CRF は、TMT による恐怖刺激で発現レベルが増加することを既に見出していること、また食塩水摂取により CRF 発現レベルの増加が抑制されることが奉

公されていることから<sup>[20]</sup>、本研究では食塩水摂取による視床下部における非ストレス化における CRF 発現レベルと恐怖ストレスを与えた時の発現レベルをコントロールマウスと比較検討した。コントロールマウスと食塩水摂取マウス共に、TMT による恐怖刺激では扁桃体の CRF の有意な発現増加は確認されなかったが (Figure 7A - D, I)、視床下部の CRF 発現量を有意に増加させた ( $p < 0.05$ , Figure 7E - H, J)。さらに、食塩水摂取マウスでは、視床下部の CRF 発現レベルが非ストレス環境でもコントロールマウスと比べて有意に高いことが確認された ( $p < 0.05$ , Figure 7E - H, J)。しかし、食塩水摂取マウスでは、TMT による恐怖刺激を与えてもそれ以上有意な増加を示さなかった (One-way repeated measures ANOVA (time  $\times$  treat),  $F_{(6,30)} = 4.3892$ ,  $p = 0.0026891$ , Bonferroni *post hoc* test,  $p = 0.01023$ , Figure 7E - H, J)。つまり、食塩水摂取マウスでは既に CRF が持続的に増加しており、恐怖刺激による反応が低下することが分かった。以上の結果から、この CRF 発現レベルの変化の低下が、新規環境や恐怖ストレス、嫌悪体制に対する積極的コーピングを誘導するためのレジリエンスを意味する可能性が示唆された。

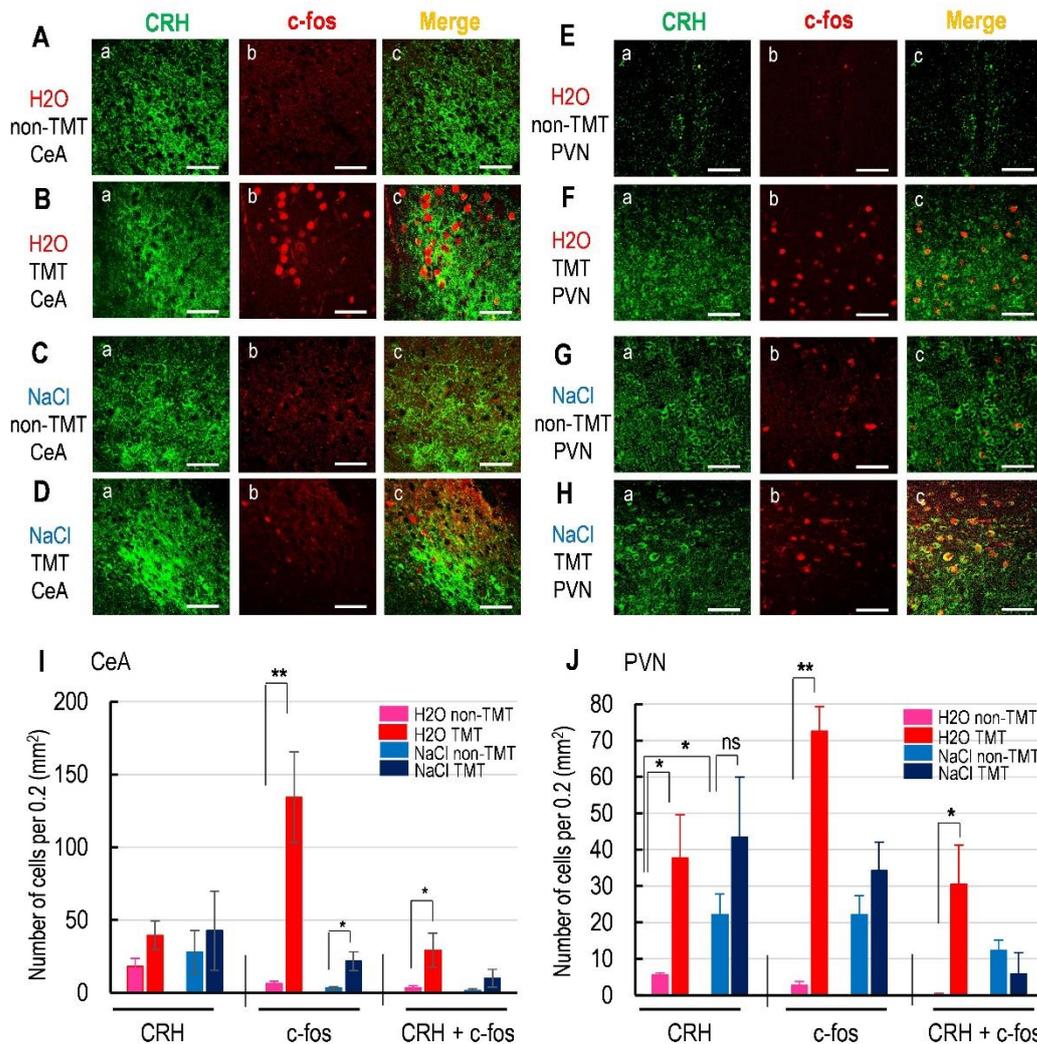
#### 4. 考 察

本研究は、5 日間の 2% 食塩水摂取が精神的ストレスに対するレジリエンスを獲得するのに十分である可能性について、積極的コーピングレベルを指標に示唆したものである。これまでヒトや動物実験で食塩摂取に抗うつ効果や抗不安効果が示唆されてきており<sup>[9-12]</sup>、本研究では塩分摂取による抗うつ効果もしくは抗不安効果を示す理由として、食塩を摂取することが精神的ストレス環境下で適切なコーピング方略を誘導し、それが結果として精神的ストレスに



**Figure 6.** TST 中の不動時間と TMT 恐怖刺激中の行動パターンとの関係

**A)** TST 中の不動時間と TMT 刺激前半 5 分間の移動距離との関係, **B)** TST 中の不動時間と TMT 刺激前半 5 分間の freezing 時間との関係, **C)** TST 中の不動時間と TMT 刺激前半 5 分間の freezing 回数との関係, **D)** TST 中の不動時間と TMT 刺激前半 5 分間の中央エリアにおけるマウスの移動距離との関係, **E)** TST 中の不動時間と TMT 刺激前半 5 分間の中央エリアにおけるマウスの滞在時間との関係, **F)** TST 中の不動時間と TMT 刺激前半 5 分間の中央エリアへのマウスの侵入回数との関係, **G)** TST 中の不動時間と TMT 刺激前半 5 分間の回避エリア内におけるマウスの移動距離との関係, **H)** TST 中の不動時間と TMT 刺激前半 5 分間の回避エリアにおけるマウスの滞在時間との関係, **I)** TST 中の不動時間と TMT 刺激前半 5 分間の回避エリアへのマウスの侵入回数との関係



**Figure 7.** TMT 恐怖刺激による扁桃体および視床下部室傍核の CRH と c-fos 発現に及ぼす食塩摂取の効果

A) 食塩を摂取していないマウスの扁桃体中核領域における CRH および c-fos 発現, B)食塩を摂取していないマウスの TMT による扁桃体中核領域における CRH および c-fos 発現, C) 食塩摂取マウスの扁桃体中核領域における CRH および c-fos 発現, D)食塩摂取マウスの TMT 刺激による扁桃体中核領域における CRH および c-fos 発現, E) 食塩を摂取していないマウスの視床下部室傍核における CRH および c-fos 発現, F)食塩を摂取していないマウスの TMT による視床下部室傍核における CRH および c-fos 発現, G) 食塩摂取マウスの視床下部室傍核における CRH および c-fos 発現, H) 食塩摂取マウスの TMT 刺激による視床下部室傍核における CRH および c-fos 発現, I) TMT 刺激による扁桃体中核領域における  $0.2 \text{ mm}^2$  あたりの CRH と c-fos および CRH と c-fos の両方を発現する神経細胞数, J) TMT 刺激による視床下部室傍核における  $0.2 \text{ mm}^2$  あたりの CRH と c-fos および CRH と c-fos の両方を発現する神経細胞数

に対するレジリエンスを獲得し、その結果抗うつ効果や抗不安効果につながっていると考えている。

5 日間の 2% 食塩水摂取は、血中  $\text{Na}^+$ 濃度を 4%ほど上昇させるという報告があるのに対し<sup>[20]</sup>、他の研究グループの結果では、7 日間の 2% 食塩水摂取では顕著な血清

$\text{Na}^+$ 濃度も血圧上昇もどちらも認められず、7 日間で血清  $\text{Na}^+$ 濃度や血圧上昇を引き起こすには 4%濃度の食塩水の摂取が必要との報告もある<sup>[26]</sup>。2% 食塩水を摂取すると、その分、飲水量も増加して  $\text{Na}^+$ 排泄も同時に増加することが報告されている<sup>[13]</sup>。したがって精神的ストレス下では、

2%の食塩水を5日間ほど摂取することは過剰な塩分摂取として高血圧のリスク因子として捉えるよりも、むしろ精神状態の維持に必要な摂取量である可能性が考えられる。

視床下部には、CRFのみならずバソプレシンやオキシトシンなどのホルモンを分泌する神経が密集しており、視床下部室傍核におけるCRFのmRNA発現量は食塩水の摂取により減少することが報告されている<sup>[20]</sup>。ところが、その研究結果以前の報告では、視床から視床下部室傍核に投射する小細胞性神経分泌細胞は、食塩摂取により視床下部室傍核におけるCRF分泌を増加させることが報告されている。したがって、本研究の視床下部室傍核におけるCRFタンパクレベルの増加は、視床由来のCRF分泌亢進の結果である可能性が高い。今後はshRNA法を用い、視床下部室傍核のCRF発現を抑制して塩分摂取の効果を確かめる予定である。CRFに対し、塩分摂取による積極的コーピングの増加に伴いバソプレシンが増加することも報告されている<sup>[13]</sup>。バソプレシンは、血漿浸透圧の上昇に伴い視床下部から分泌されるホルモンであり、塩分摂取により血漿浸透圧が上昇することが原因であり、このバソプレシンが精神的ストレスに対する積極的コーピングの誘導に関与していることが示唆されている<sup>[13]</sup>。この研究では、2%ではなく、4%という高い濃度の食塩水を摂取させていることから、2%食塩水摂取よりもバソプレシン分泌が生じやすい可能性は高いが、CRFもバソプレシンもそれらの発現量や分泌量が塩分摂取の影響を受ける可能性は十分高く、どちらが精神的ストレスに対する積極的コーピングを誘導するかを調べる必要がある。

本研究では、恐怖ストレスを与えた後にTSTを行うことで2%食塩水による顕著な積極的コーピングの誘導が確認された。恐怖ストレスは、PTSDなどの原因となり得るが、PTSDの特徴は恐怖記憶がトラウマ記憶として保持され、それが実際のトラウマ体験した場所以外でも恐怖再体験するというトラウマ記憶の汎化が引き起こされることが特徴である。これは、トラウマ恐怖体験後に他のストレスを続けて受けると、時間と共に実際に恐怖体験したトラウマ記憶とその後の他のストレス体験の空間的記憶が曖昧になることで、実際のトラウマ体験した場所以外でも恐怖再体験を引き起こしてトラウマ記憶の汎化が生じるようになるという可能性が示唆されている<sup>[27]</sup>。事実、2011年の東日本大震災から3年後の福島県沿岸部における成人被災者PTSD

発症率は、全国平均の2倍にあたる20%である<sup>[19]</sup>。これは、当時の福島県沿岸部の被災者の多くが、大震災と津波による被害のために避難し、その直後に原子力発電所の爆発のためにより遠くへの避難を余儀なくされた結果であると考えられている。本研究では、異なる2種類の精神的ストレスを1時間間隔で与えることで、最初のストレス体験が次のストレス体験に影響を及ぼすことを示唆しており、さらにそれが2%食塩水の摂取により積極的コーピングを誘導することで精神的ストレスに対するレジリエンスを獲得し、PTSDやそれに関連するうつ病の併発を阻止する可能性を示唆している。認知行動療法は、ストレスに対してどのような行動を取るかをアドバイスすることで、患者自身の判断に基づく心理的負担を減らすことを目的としているが、上述通り、PTSD発症率だけを見ると、認知行動療法だけでは決して効果的な改善は期待できない。しかもアドバイスに従った行動を取るには精神状態のコントロールが困難な場合も予想され、理解していても行動に移せない場合も少なくない。近年、長期精神的ストレスを受けると、スナック菓子など塩分嗜好性が高くなることが報告されている<sup>[18]</sup>。この研究は、身体に悪影響を及ぼす演習嗜好性を避けるためにも精神的ストレスをできるだけ避ける必要があるとの趣旨で発表された論文であるが、7日間の2%食塩水塩分摂取は、血圧や心機能に対して有意な影響を及ぼさないこと<sup>[26]</sup>、さらに塩分摂取による身体への悪影響を懸念するよりも、塩分摂取により精神的ストレスに対して適切な行動(コーピング方略)を誘導し、精神的ストレスに対するレジリエンスを増強し、その結果PTSDやうつ病発症を阻止する可能性に期待する新たな塩分摂取の意義を見直す必要があると考えている。本研究は、まだ入り口研究で、今後さらなる研究結果を必要とする段階ではあるが、認知行動療法では不十分な治療効果を、適度な塩分摂取により精神的ストレスに対して効果的なコーピング方略を自らが誘導し、適切な薬物治療(SSRIやベンゾジアゼピン系抗不安薬の服用)と組み合わせることで、PTSDやうつ病発症を阻止する有効性を科学的に証明できる可能性を秘めた研究結果である。

## 5. 今後の予定

本研究により、適度な塩分摂取が連続した精神的ストレスに対してコーピング方略を誘導することでストレスに対

するレジリエンスを高め、PTSD やうつ病発症の予防につながる可能性を示唆しているが、今後は PTSD モデル実験をマウスにて遂行し、それに及ぼす塩分摂取の効果を確認することを考えている。また、その神経機構として本研究では視床下部室傍核の CRF 発現レベルに注目し、塩分摂取により発現レベルが増加しているが、精神的ストレス刺激による反応が低下していたことから、今後も CRF と積極的コーピングとの関係を調べるために、shRNA-CRF を作成し、これをアデノ随伴ウイルスに組み込むことで室傍核にける CRF 発現をノックダウンして検証することを考えている。さらに、CRF の過剰発現コンストラクトをアデノ随伴ウイルスに組み込み、室傍核で過剰に CRF を発現させ、積極的コーピングに及ぼす影響を調べる予定でいる。

なお、本研究の助成により、室傍核の CRF 測定を行うために、エイコム社のペプチドダイアリシス用ローラーポンプとシリンジポンプを購入し、TMT 刺激による CRF 濃度の変化の測定を試みたが、期待に反して安定した CRF 測定までたどり着くことができず、また失敗の繰り返しにより高価な消耗品(ダイアリシス用透析プローブなど)を大量に消費し、満足した結果を得るには予算が足りなかったことが反省点である。現在もなお挑戦中であるため、今後は食塩摂取による室傍核における CRF 分泌量が TMT 刺激で免疫染色と同様の変化を示すか等の検討を継続していきたいと考えている。

## 6. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、研究助成を賜りました公益財団法人ソルト・サイエンス研究財団ならびに関係者の皆様に厚く御礼申し上げます。

## 7. 文献

1. Khan, M.S., Jones, D.W., and Butler, J. (2020). Salt, No Salt, or Less Salt for Patients With Heart Failure? *The American journal of medicine* 133, 32-38.
2. Kario, K. (2015). Key Points of the Japanese Society of Hypertension Guidelines for the Management of Hypertension in 2014. *Pulse (Basel, Switzerland)* 3, 35-47.
3. Lopez-Vargas, P.A., Tong, A., Sureshkumar, P., Johnson, D.W., and Craig, J.C. (2013). Prevention, detection and management of early chronic kidney disease: a systematic review of clinical practice guidelines. *Nephrology (Carlton, Vic.)* 18, 592-604.
4. Rodler, I., and Zajkás, G. (2003). [Healthy nutrition and the prevention of cancer]. *Orvosi hetilap* 144, 413-418.
5. Faraco, G., Hochrainer, K., Segarra, S.G., Schaeffer, S., Santisteban, M.M., Menon, A., Jiang, H., Holtzman, D.M., Anrather, J., and Iadecola, C. (2019). Dietary salt promotes cognitive impairment through tau phosphorylation. *Nature* 574, 686-690.
6. Brown, I.J., Tzoulaki, I., Candeias, V., and Elliott, P. (2009). Salt intakes around the world: implications for public health. *International journal of epidemiology* 38, 791-813.
7. Miller, S.B., Friese, M., Dolgoy, L., Sita, A., Lavoie, K., and Campbell, T. (1998). Hostility, sodium consumption, and cardiovascular response to interpersonal stress. *Psychosomatic medicine* 60, 71-77.
8. De Gobbi, J.I., Omoto, A.C., Siqueira, T.F., Matsubara, L.S., Roscani, M.G., and Matsubara, B.B. (2015). Antidepressant treatment decreases daily salt intake and prevents heart dysfunction following subchronic aortic regurgitation in rats. *Physiology & behavior* 144, 124-128.
9. Krause, E.G., de Kloet, A.D., Flak, J.N., Smeltzer, M.D., Solomon, M.B., Evanson, N.K., Woods, S.C., Sakai, R.R., and Herman, J.P. (2011). Hydration state controls stress responsiveness and social behavior. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31, 5470-5476.
10. Leshem, M. (2011). Low dietary sodium is anxiogenic in rats. *Physiology & behavior* 103, 453-458.
11. Shimizu, Y., Kadota, K., Koyamatsu, J., Yamanashi, H., Nagayoshi, M., Noda, M., Nishimura, T., Tayama, J., Nagata, Y., and Maeda, T. (2015). Salt intake and

- mental distress among rural community-dwelling Japanese men. *Journal of physiological anthropology* 34, 26.
12. Goldstein, P., and Leshem, M. (2014). Dietary sodium, added salt, and serum sodium associations with growth and depression in the U.S. general population. *Appetite* 79, 83-90.
  13. Mitchell, N.C., Gilman, T.L., Daws, L.C., and Toney, G.M. (2018). High salt intake enhances swim stress-induced PVN vasopressin cell activation and active stress coping. *Psychoneuroendocrinology* 93, 29-38.
  14. Gilman, T.L., Mitchell, N.C., Daws, L.C., and Toney, G.M. (2019). Neuroinflammation Contributes to High Salt Intake-Augmented Neuronal Activation and Active Coping Responses to Acute Stress. *The international journal of neuropsychopharmacology* 22, 137-142.
  15. Petit-Demouliere, B., Chenu, F., and Bourin, M. (2005). Forced swimming test in mice: a review of antidepressant activity. *Psychopharmacology* 177, 245-255.
  16. Hourani, L.L., Williams, J., Forman-Hoffman, V., Lane, M.E., Weimer, B., and Bray, R.M. (2012). Influence of spirituality on depression, posttraumatic stress disorder, and suicidality in active duty military personnel. *Depression research and treatment* 2012, 425463.
  17. Thompson, N.J., Fiorillo, D., Rothbaum, B.O., Ressler, K.J., and Michopoulos, V. (2018). Coping strategies as mediators in relation to resilience and posttraumatic stress disorder. *Journal of affective disorders* 225, 153-159.
  18. Barton, S., Karner, C., Salih, F., Baldwin, D.S., and Edwards, S.J. (2014). Clinical effectiveness of interventions for treatment-resistant anxiety in older people: a systematic review. *Health technology assessment (Winchester, England)* 18, 1-59, v-vi.
  19. Oe, M., Fujii, S., Maeda, M., Nagai, M., Harigane, M., Miura, I., Yabe, H., Ohira, T., Takahashi, H., Suzuki, Y., et al. (2016). Three-year trend survey of psychological distress, post-traumatic stress, and problem drinking among residents in the evacuation zone after the Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant accident [The Fukushima Health Management Survey]. *Psychiatry and clinical neurosciences* 70, 245-252.
  20. Krause, E.G., Pati, D., and Frazier, C.J. (2017). Chronic salt-loading reduces basal excitatory input to CRH neurons in the paraventricular nucleus and accelerates recovery from restraint stress in male mice. *Physiology & behavior* 176, 189-194.
  21. Kanda, Y. (2013). Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for medical statistics. *Bone marrow transplantation* 48, 452-458.
  22. Harris, J.C. (1989). Experimental animal modeling of depression and anxiety. *The Psychiatric clinics of North America* 12, 815-836.
  23. Thiébot, M.H., Martin, P., and Puech, A.J. (1992). Animal behavioural studies in the evaluation of antidepressant drugs. *The British journal of psychiatry. Supplement*, 44-50.
  24. Powell, T.R., Fernandes, C., and Schalkwyk, L.C. (2012). Depression-Related Behavioral Tests. *Current protocols in mouse biology* 2, 119-127.
  25. Cabib, S., Campus, P., and Colelli, V. (2012). Learning to cope with stress: psychobiological mechanisms of stress resilience. *Reviews in the neurosciences* 23, 659-672.
  26. Gilman, T.L., George, C.M., Andrade, M.A., Mitchell, N.C., Toney, G.M., and Daws, L.C. (2019). High Salt Intake Lowers Behavioral Inhibition. *Frontiers in behavioral neuroscience* 13, 271.
  27. Kostek, J.A., Beck, K.D., Gilbertson, M.W., Orr, S.P., Pang, K.C., Servatius, R.J., and Myers, C.E. (2014). Acquired equivalence in U.S. veterans with symptoms of posttraumatic stress: reexperiencing symptoms are associated with greater generalization. *Journal of traumatic stress* 27, 717-720.

## The Short-term High Salt Intake Decides the Adequate Coping Style through Acquiring the Resilience against the Sequential Combination of Different Type of Psychological Distress

Kenjiro Seki

Department of Pharmacology, School of Pharmaceutical Science, Ohu University

### Summary

High salt intake is associated with numerous adverse health effects. However, high salt intake mitigates the psychological stress. Recent studies suggested that the short-term high salt intake induces the active coping against psychological stress through regulating the paraventricular nucleus of hypothalamus (PVN) activity, including the expression of corticotropin-releasing factor (CRF). Active coping is an innate factor of resilience against psychological distress which is causable of the over-generalization in the patients with post-traumatic stress disorder (PTSD) and depressive symptoms. We found that the intra-PVN injection of ibotenic acid, a chemical neurotoxin regulated the mouse active defensive strategy during innate fear of 2,4,5 dihydro 2,5 trimethylthiazoline (TMT) (TMT), a component of fox faces. Therefore, we hypothesized that high salt intake induces the active coping by acquiring the resilience against psychological stress through regulating the CRF expression in PVN. The mice with 2% salt intake (salt intake mice) for 5 days entered the central zone in the test box more than non-salt intake mice (control mice). The changes in body temperature, freezing duration and travelled distance during TMT exposure in salt intake mice are similar level with control mice, indicating that the fear sensitivity was not affected by salt intake. In control mice, the number of entries into the central zone during TMT exposure is negatively correlated with freezing duration ( $R^2 = 0.6392$ ,  $p < 0.05$ ). However, this correlation was disappeared in salt intake mice. In the tail suspension test (TST), as an aversive stress was subsequently subjected to the mice in an hour after the TMT, salt intake mice exhibit significantly shorter duration of immobility during TST than control mice. Interestingly, the immobility time during TST in salt intake mice was significantly negative correlated with those of freezing duration ( $R^2 = 0.6394$ ,  $p < 0.05$ ) and the number of entries in central zone ( $R^2 = 0.6373$ ,  $p < 0.05$ ) during innate fear of TMT. Expression level of CRF in PVN in salt intake mice without the TMT exposure is significantly higher than control mice. These results have a possibility that the short-term high salt intake contribute to decide the adequate coping strategy by acquiring the resilience to prevent the over-generalization by sequential combination of psychological distress.