

令和元年6月4日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K11659

研究課題名(和文)母子分離による脳の形成不全に対する代理母の効果 - ラットを用いた形態機能学的解析

研究課題名(英文) Effects of nursing by foster-mothers against brain hypoplasia caused by maternal separation - Morphofunctional analyses using rats.

研究代表者

河野 史 (Kawano, Hitoshi)

佐賀大学・医学部・教授

研究者番号：10152985

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：代理母による養育が脳の形成・成熟に与える影響について、脳内化学物質を指標としてラットを用いて調べた。また、思春期に相当するラットを円筒内に拘束し、そのストレスからの回復に対する代理母の影響を調べた。実仔の養育経験のあるメスに養育されたラットにおいて、いくつかの領域(分界条床核、室傍核、扁桃核)のCRF細胞数が減少していた。一方、拘束ストレス後のCRF細胞数は増加していた。以上のことから養育経験のあるラットによる養育は仔ラットの脳の形成に何らかの影響を及ぼしている可能性が示唆されたが、他の代理母による影響や他の脳内化学物質、他の領域についても解析し、脳の形成・成熟を総合的に解明する必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

乳幼児期に虐待を受けると脳の構造や機能の形成・成熟に影響を受け、生涯持続する精神疾患を生じるリスクが高い。動物実験においては授乳期の実母からの隔離(母子分離)がネグレクトによる虐待に相当する。本研究課題では実母に代わる代理母(養母)による仔の養育が脳の形成・成熟にどのように影響するかを解析することにより、現代社会の問題となっている子供の養育環境について示唆するものである。

研究成果の概要(英文)：Effects of nursing by foster-mothers on formation and maturation of brain were investigated morphofunctionally using rats. Effects of foster-mothers on recovery from acute arrest stress loaded in the age of puberty. The number of neurons immunoreactive to corticotropin-releasing factor (CRF neurons) in the bed nucleus of the stria terminalis, paraventricular hypothalamic nucleus and amygdaloid nucleus were decreased in the rats that were nursed by the foster-mothers with an experience in nursing of their own babies. On the other hand, the number of CRF neurons after acute arrest stress were increased. The findings suggest a possibility that nursing by the experienced foster-mothers has some effects on formation and maturation of brain. It is necessary to judge inclusively nursing by other kinds of foster-mothers. Further investigations concerning other brain region and neurochemical substances are also required.

研究分野：神経科学 基礎看護学

キーワード：母子分離 代理母 脳の形成

## 1. 研究開始当初の背景

(1) ネグレクトや性的、身体的、精神的暴力を受けたこどもは、のちに精神疾患を生じるリスクが高く、虐待を受けたこどもは成人して不安障害や凶暴、うつ病、外傷後ストレス障害（PTSD）、注意欠如・多動性障害（ADHD）となるリスクも高い。この原因の一つが視床下部-下垂体-副腎皮質（HPA）系のプログラミングの破綻で、これは生涯持続するといわれている。

(2) 現代社会では、0歳児を持つ夫婦の4割ほどが共稼ぎ世帯であり、子の養育を他者に頼らざるを得ない状況である。また子に対する虐待件数も多い。しかし親が子を十分に養育できないとき、あるいは子に危険がおよぶとき、各種の保育・養育施設などにおいて保母・保父、養母・養父などが親代わりとなり子の成長をサポートしうる可能性が存在している。この親代わりは子の成長に大きく関わる存在となりうるが、形態機能的な分析については、研究対象の確保の困難さなどから、ほとんどなされていない。

(3) 動物実験モデルにおいては、生後早い時期の母親からの分離がこれらの危険因子のひとつになると考えられている。母子分離された動物では、脳の種々の部位に存在する化学物質の含有量や産生細胞の数に影響が生じている [1, 2, 3, 4, 5]。例えば、コルチコステロン、ACTH、CRF（それぞれ、HPA系における副腎皮質、下垂体、視床下部から分泌されるホルモン）のみならず、神経成長因子（NGFやNT-3）、オキシトシン（子宮をはじめとする生殖器の平滑筋の収縮に加え、家族愛や円滑な対人関係を築くのに関わるといわれるホルモン）、カルシウム結合タンパク（カルビンディンやカルレチニンなどがあり、恒常性維持や記憶・学習に関与）などが母子分離されていないコントロール動物と比べて大きく異なっている。そのような差異は海馬（学習・記憶や恐怖・不安などに関わる）や室傍核（CRFやオキシトシンを持つニューロンの存在部位）をはじめ、多くの部位において見られている。さらに母子分離された動物では、単発ストレス負荷（身体拘束、強制水泳、落下の恐れのある平均台のようなものの通行など）のあとに、脳内の化学物質含有量に変化が引き起こされ、さらにその回復に遅延が生じることも多い。このように母子分離は新生ラットにおいて大きな危険因子となり、脳の構造や機能の形成・成熟に重大な影響を与えている。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究ではラットを用いて4種類の代理母モデルを設定し、脳内の種々の部位に生じる神経化学物質の変動を指標として、子の脳の構造や機能の形成・成熟に効果的な代理母はどれか、思春期相当時期に単発で受けるストレス反応からの回復に対して効果的な代理母はどれか、さらに代理母による関与が決定的となる子との接触時期がいつなのかについて実験により検証する。代理母を用いた研究はこれまでに報告されておらず、得られた結果は、乳幼児期の効果的な養育に関して理想的な代理母像を考察するための基礎的データとなりうる。

## 3. 研究の方法

(1) 代理母の種類は次の3群とする。(a) FP群：母子分離中のみ、過去に一度出産し、自身の子育てを経験したメスラット、(b) FN群：未經産ラット、(c) FL群：本来の母とは別の授乳可能なメスラット。この実験群に加え、(d) OM群：出生後から離乳まで実母と同居させ母子分離しないネガティブ・コントロール群、および(e) MS群：母子分離中に他の成ラットとの同居をしないポジティブ・コントロール群を準備し、全部で5種類の養育環境とした。代理母(a-c)あるいは母子分離(e)による養育は「生後2日目から離乳する21日目まで、毎日3時間(8:00-11:00)」とし、それ以外の時間は実母に戻した。実母による養育(d)は、

他のラットの分離作業中（約 10 分）は実母と離れるのもの、それ以外の時間帯は実母と同居とした。研究開始当初は「出生後から離乳まで、人工哺乳装置のもとで未經産ラットと同居」群も想定したが、人工哺乳装置の入手や作成が不可能であったため、(a)-(c) の 3 種類とした。

(2) 生後 6 週目にラットを屠殺し、脳の標本を採取した。通常、ラットの繁殖可能時期は生後 9 週目ころからであり、生後 6 週目は思春期ころに相当する。一部のラットは屠殺前に身動きのできないチューブ内に拘束する 30 分間のストレスを負荷し、拘束の解除から 90 分後に屠殺した。

(3) CRF, カルレチニン, オキシトシン, バソプレッシンに対する免疫組織化学を行い、免疫組織化学により標識されたニューロン数を計測した。対象は前脳から間脳とするが、これまでの同様の研究で報告のある分界条床核 (BST), 視床下部 (PVN), 扁桃核 (Amy) に着目した。

#### 4. 研究成果

(1) これまでに、FP 群の BST, PVN, Amy における CRF ニューロンについて解析した。CRF ニューロンはいずれの領域においても認められた (Fig. 1)。1 mm<sup>2</sup>あたりの CRF ニューロン数は、BST において OM 群 58.3, MS 群 65.8, FP 群 39.8, PVN において OM 群 104.2, MS 群 126.5, FP 群 52.0, Amy において OM 群 79.2, MS 群 81.9, FP 群 64.3 であった (Fig. 2)。BST および PVN において MS 群の CRF ニューロン数はわずかに増加したが、有意差は見られなかった。一方、いずれの領域においても FP 群の CRF ニューロン数の減少が見られたが、PVN においては有意に減少していた。

(2) 母子分離による CRF の動向については研究によりまちまちである。CRF ニューロン数については、母子分離により PVN では変化しない [③], PVN や扁桃核で減少する [④], 母子分離後に慢性ストレスを負荷した際に PVN では増加する [①, ④] との報告がある。CRF mRNA については、PVN では変化しない [②], 減少する [⑨, ⑦], 増加する [⑥], 扁桃核では変化しない [⑨], 増加する [⑦], ♀では変化しないが♂では増加する [②], 視床下部で増加する [⑧], BST では変化しない [⑦] などが報告されている。また CRF の含有量については視床下部で減少する [⑤], 正中隆起で増加する [⑧] などの報告がある。

本研究で、母子分離により BST, PVN, Amy のいずれにおいても CRF ニューロン数に変化は見られておらず、これらの領域の CRF ニューロンの成熟には母子分離の影響はほとんどなかったと思われる。一方、過去に一度出産し自身の仔を育てた経験のある代理母が養育した群 (FP 群) において、これらの領域で CRF ニューロン数が減少していた。このことから、母子分離よりむしろ他のラットとの接触が CRF ニューロンの成熟に影響したことが考えられる。しかし、その解釈については、他の代理母による養育の結果も含めて総合的に判断する必要がある。

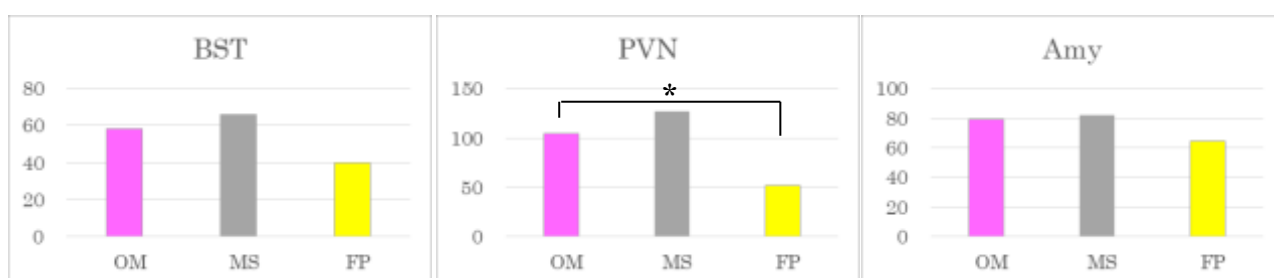


Fig. 2 Mean number of corticotropin-releasing factor neurons in the bed nucleus of the stria terminalis, paraventricular hypothalamic nucleus and amygdaloid nucleus of own mother, maternal separation and foster of primipara groups. \*p<0.05. Abbreviations as for Fig. 1.

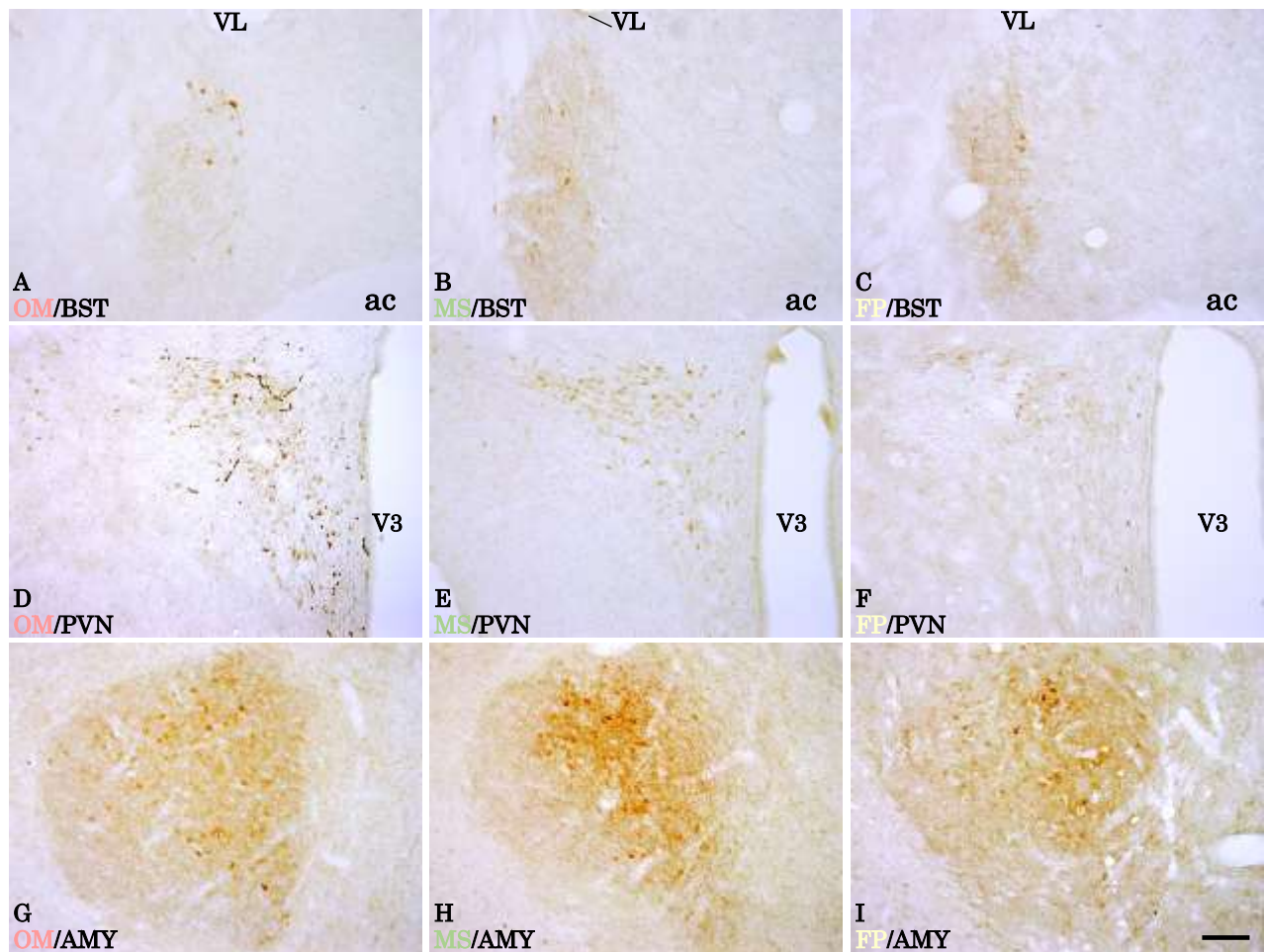


Fig. 1 Occurrence of corticotropin-releasing factor neurons in the bed nucleus of the stria terminalis (A-C), paraventricular hypothalamic nucleus (D-E) and amygdaloid nucleus (G-I) of own mother (left column), maternal separation (middle column) and foster of primipara (right column) groups. Low to moderate number of neurons are found. BST, bed nucleus of the stria terminalis; PVN, paraventricular hypothalamic nucleus; Amy, amygdaloid nucleus; OM, own mother group; MS, maternal separation group; FP, foster of primipara group. ac, anterior commissure; V3, third ventricle; VL, lateral ventricle. Bar = 100  $\mu$ m.

<引用文献>

- ① Babygirija R, Yoshimoto S, Gribovskaja-Rupp I, Bułbuł M, Ludwig K, Takahashi T, Social interaction attenuates stress responses following chronic stress in maternally separated rats, *Brain Res*, 1469, 2012, 54-62
- ② Barna I, Bálint E, Baranyi J, Bakos N, Makara GB, Haller J, Gender-specific effect of maternal deprivation on anxiety and corticotropin-releasing hormone mRNA expression in rats, *Brain Research Bulletin*, 62, 2003, 85-91
- ③ Bülbül M, Babygirija R, Cerjak D, Yoshimoto S, Ludwig K, Takahashi T, Impaired adaptation of gastrointestinal motility following chronic stress in maternally separated rats, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 302, 2012, G702-G711
- ④ Desbonnet L, Garrett L, Daly E, McDermott KW, Dinan TG, Sexually dimorphic effects of maternal separation stress on corticotrophin-releasing factor and vasopressin systems in the adult rat brain, *Int. J. Devl Neuroscience*, 26, 2008, 259-268

- ⑤ Greisen MH, Bolwig TG, Husum H, Nedergaard P, Wörtwein G, Maternal separation affects male rat copulatory behaviour and hypothalamic corticotropin releasing factor in concert, *Behavioural Brain Research*, 158, 2005, 367-375
- ⑥ Huot RL, Gonzalez ME, Ladd CO, Thirivikraman KV, Plotsky PM, Foster litters prevent hypothalamic-pituitary-adrenal axis sensitization mediated by neonatal maternal separation, *Psychoneuroendocrinology*, 29, 2004, 279-289
- ⑦ Ladd CO, ThirivikramanKV, Huot RL, Plotsky PM, Differential neuroendocrine responses to chronic variable stress in adult Long Evans rats exposed to handling-maternal separation as neonates, *Psychoneuroendocrinology*, 30, 2005, 520-533
- ⑧ Plotsky PM, Meaney MJ, Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats, *Molecular Brain Research*, 18, 1993, 195-200
- ⑨ Vázquez DM, Eskandari R, Phelka A, López JF, Impact of Maternal Deprivation on Brain Corticotropin-Releasing Hormone Circuits: Prevention of CRH Receptor-2 mRNA Changes by Desipramine Treatment, *Neuropsychopharmacology*, 28, 2003, 898-909

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計0件）

〔学会発表〕（計1件）

- ① 中村美佳, 河野 史, 新生仔期の養育母タイプの違いが脳内 corticotropin-releasing factor ニューロンの分布に及ぼす影響, 第124回日本解剖学会総会, 2019

〔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〕

該当なし

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：鈴木 智恵子

ローマ字氏名：(SUZUKI, Chieko)

所属研究機関名：佐賀大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号（8桁）：20569636

研究分担者氏名：柿原 奈保子

ローマ字氏名：(KAKIHARA, Nahoko)

所属研究機関名：新潟大学

部局名：医歯学系

職名：准教授

研究者番号（8桁）：50588762

研究分担者氏名：中河 亜希

ローマ字氏名：(NAKAGAWA, Aki)

所属研究機関名：佐賀大学

部局名：医学部

職名：助教

研究者番号（8桁）：70453222

## (2)研究協力者

研究協力者氏名：中村 美佳

ローマ字氏名：(NAKAMURA, Mika)

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。