

令和元年6月12日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11799

研究課題名(和文) 幼少期身体抑制を経験したラットのストレス反応性亢進と大脳辺縁系及び視床下部の関係

研究課題名(英文) The relationship between the stress response and central nervous system in the the adult rat experienced immobilization stress in the early postnatal period

研究代表者

吉原 俊博 (YOSHIHARA, TOSHIHIRO)

北海道大学・歯学研究院・准教授

研究者番号：60261319

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ラット4実験群(A群：生後1週齢時に1日1回30分の身体抑制を7回(7日)行う群、B群：生後3週齢時に1日1回30分の身体抑制を7回(7日)行う群、C群：生後5週齢時に1日1回30分の身体抑制を7回(7日)行う群、対照群(身体抑制を一切経験しない群)について、実験を行った。生後1週齢時に身体抑制を経験したラットは対照群に比較して、成長後のストレス反応性が亢進しており、扁桃体、海馬、視床下部のGRの発現量が多かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果より、身体抑制が成長後の中枢神経系機能に影響することが示され、身体抑制具を用いる上での問題点のエビデンスとなり、小児歯科学・障害者歯科学の発展に大きく寄与するものである。また、中枢神経系機能への影響を緩和する方策の道筋についても、本研究より示されたので、今後、身体抑制のよる人体への影響を和らげる研究が発展することが期待される。

研究成果の概要(英文)： Twenty-four male pups were divided into 4 groups: A (the rats was subjected to immobilization stress for 30 min per day from P7 to P13), B (the rats was subjected to immobilization stress for 30 min per day from P21 to P27), C (the rats was subjected to immobilization stress for 30 min per day from P35 to P41), and D (the unmanipulated control group). A group indicated higher stress responsivity to the novel stress and increased evpressions of glucocorticoid reseptor in the amygdala, hippocampus, and hypothalamus compared with other 3 groups.

研究分野：小児歯科学

キーワード：身体抑制 中枢神経系 ラット

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

非協力児に対してレストレーナーなどを使用する身体抑制法は、患児にとって不快な経験となり、その後の脱感作に苦慮する、呼吸循環器系への悪影響などのため、可能な限り用いるべきではない。我々も、身体抑制を受けたラットの HPA axis や循環器系の反応について報告した。

一方、幼少期に経験したストレスはその後、長期にわたり中枢神経系に様々な影響を与えることが報告されている。しかし、身体抑制によるストレスに関する研究は少なく、幼少期の身体抑制が成長後もラット HPA axis のストレス反応性を亢進させること、身体抑制を経験する時期には臨界年齢が存在することを示した我々の研究が国内外で最初の報告である。

現在、「幼少期の身体抑制経験による成長後の HPA axis のストレス反応性亢進」について以下の点が解明されていない。

1. 中枢神経系の関与と視床下部領域に投射するニューロン
2. 臨界年齢が存在するメカニズム

2. 研究の目的

上記に示した未解決点を明らかにするために、幼少期の中のいくつかの時点で身体抑制を経験したラットを作製して、ラットがどのように成長し、成長後のストレス反応、生活リズム、摂食行動の特徴を観察する。観察後、ラット脳を取り出し、扁桃体、海馬、視床下部のグルココルチコイドレセプター (以下 GR) 発現程度を調べる。さらに、視床下部に CA ニューロンが投射する扁桃体と脳幹に着目して、これらの中枢が成長後のストレス反応にどのように関与するかを神経内分泌学的、分子生物学的手法などを用いて調べ、そのメカニズムを考察する。

3. 研究の方法

以下の4つの実験群を作製して、実験1から6を行う。比較検討する。

- ・生後1週齢時に1日1回30分の身体抑制を7回(7日)行う群:A群
- ・生後3週齢時に1日1回30分の身体抑制を7回(7日)行う群:B群
- ・生後5週齢時に1日1回30分の身体抑制を7回(7日)行う群:C群
- ・対照群(身体抑制を一切経験しない群:D群)

実験1。「幼少期身体抑制を経験する年齢により、成長が異なるか？」

幼少期に身体抑制を与えた後、3か月間にわたり経時的に体重、摂食量及び成長に關与するホルモ濃度を測定し、4群間で比較する。

実験2。「幼少期身体抑制を経験する年齢により、成長後の HPA axis のストレス反応性が異なるか？」

幼少期に身体抑制ストレスを与えた3か月後に、新規環境変化ストレスを与え、HPA axis の反応を4群間で比較する。

実験3。「幼少期身体抑制を経験する年齢により、成長後の生活リズムが異なるか？」

幼少期に身体抑制ストレスを与えた3か月後に、生活リズムをつかさどる基礎分泌(サーカディアンリズム)を制御する視交叉上核(以下、SCN)に存在する時計遺伝子 *per1* の発現量を *in situ hybridization* により測定し、4群間で生活リズムを比較する。

実験4。「幼少期身体抑制を経験する年齢により、成長後の摂食行動が異なるか？」

幼少期に身体抑制ストレスを与えた3か月後に、行動量(明期の睡眠と暗期の摂食行動)をテレメーターシステムにより測定し、4群間で比較する。テレメーターシステムは超小型センサーを備えた送信器をラット体内に埋め込み、受信器の上に飼育ケージを置き、長時間にわたり行動量を収録するシステムである。

実験5。「幼少期身体抑制を経験する年齢により、成長後の視床下部の CA 代謝回轉及び CRH 産生機能が異なるか？」

幼少期に身体抑制ストレスを与えた3か月後に、視床下部室傍核における細胞外液を *in vivo microdialysis* により経時的に採取し、細胞外液中 CA 量を測定し、その代謝回轉を算出する。また室傍核における CRH mRNA の発現量を *in situ hybridization* により測定し、4群間で比較する。

実験6。「幼少期身体抑制を経験する年齢により、成長後の大脳辺縁系扁桃体、海馬、視床下部の GR 発現量が異なるか？」

幼少期に身体抑制ストレスを与えた3か月後に、ラット脳を取り出し、扁桃体、海馬、視床下部を含む連続切片をそれぞれ作製し、GR ribonucleotide probe を用いた *in situ*

hybridization により GR の発現を検出し、4 群間で比較する。

4. 研究成果

実験 1.

A 群は他 3 群に比較して、有意に体重増加率が低かった。また、成長ホルモン濃度や insuline-like growth factor の濃度も低かった。

実験 2.

A 群は他 3 群に比較して、新規ストレスに対する HPAaxis 系のストレス反応が大きかった。

実験 3.

幼少期に身体抑制ストレスを与えた 3 か月後に行動量を測定した。A 群は他の 3 群に比較して、明期の睡眠が不安定で、暗期の行動にもばらつきが見られた。

実験 4.

A 群は他の 3 群に比較して、新規環境ストレスに対する CA が大きく反応した。さらに、室傍核における CRHmRNA の発現量も多かった。

実験 5.

実験日に新規環境ストレスを負荷し、CA 量を測定した。A 群は他の 3 群に比較して、CA 量が多かった。また、室傍核 CRHmRNA の発現量を定量化した。A 群は他の 3 群に比較して、CRHmRNA の発現量が多かった。

実験 6.

扁桃体、海馬、視床下部の GR の発現を定量化した。A 群は他の 3 群に比較して、扁桃体、海馬、視床下部の全てにおいて、GR の発現量が多かった。

以上の結果より、生後 1 週齢というきわめて早期の身体抑制が成長後のストレス反応に影響を与え、臨界年齢があることが示唆された。背後には、HPAaxis negative feedback をつかさどる海馬の GR 発現や大脳扁桃が関与していることが示唆された。また成長にも影響を与えるのは、成長ホルモンや insuline-like growth factor の活性低下が考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 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)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年：

国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：大島 昇平
ローマ字氏名：OSHIMA SYOUHEI
所属研究機関名：北海道大学
部局名：大学病院
職名：講師
研究者番号（8桁）：00374546

研究分担者氏名：菊入 崇
ローマ字氏名：KIKUIRI TAKASHI
所属研究機関名：北海道大学
部局名：歯学研究科
職名：助教
研究者番号（8桁）：10322819

研究分担者氏名：高崎 千尋
ローマ字氏名：TAKASAKI CHIHIRO
所属研究機関名：北海道大学
部局名：歯学研究科
職名：助教
研究者番号（8桁）：60451449

(2) 研究協力者

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。