

令和元年6月21日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K13069

研究課題名(和文) 集団の中でいじめに関わる神経機構の解明

研究課題名(英文) Neural activity during social behaviour, with particular reference to bullying behaviour

研究代表者

三谷 章 (MITANI, Akira)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：50200043

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：いじめ発現に関わる神経機構を探究するために、マウス集団行動中の神経活動記録を可能にする小型無線神経活動送信システムを開発した。一群のグループ飼育した群れの中に、体格・体重がより大きな個別飼育した個体を入れ、その内側前頭前皮質の前辺縁皮質(PL)と下辺縁皮質(IL)の神経活動を記録した。個別飼育マウスが他マウスへ繰り返す攻撃行動中においてPLとILは活動増加しなかった。これまでの研究により、PLとILはしばしば拮抗的に活動し、適切な行動を発現させると考えられている。本研究において観察された執拗な攻撃行動の発現には、PLとILの活動バランスに何らかの機能不全が起こっている可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

国や地方自治体は、いじめの防止や早期発見のためにさまざまな対策を取っているが、抜本的な解決に至っていない。その原因の一つとして、いじめ発現の神経機構が未明のままであることが挙げられる。本研究では、いじめ発現に関わる神経機構を探究するために開発した集団行動中のマウス神経活動を記録可能にする装置を用いて、我々の社会性発現に重要な働きを担っていると考えられている内側前頭前皮質に通常とは異なる神経活動を観察した。このような集団行動中の脳活動を明らかにすることは、いじめ発現に関わる神経機構を解く糸口になると期待される。

研究成果の概要(英文)：We made a wireless telemetry system to study neural activity of freely moving mice during social behaviour, especially during bullying behaviour. The prelimbic cortex (PL) and infralimbic cortex (IL) have direct projections the amygdala that is a critical structure for expression of emotion. We implanted a stainless wire electrode into the PL or IL of the male mice. The wireless transmitter, we named "TOSAKA-mini", was attached to the head of the dominant mouse. The mouse was placed in an open field box with a group of male mice, and the social behaviour and neural activity of the PL and IL were examined. The PL and IL neurons did not show increase in spike activity when the dominant mice attacked subordinate mice. It has been proposed that the PL and IL exert distinct, sometimes opposing, influences over behaviour. The dysfunction of neural activity between the PL and IL may be related to the neural mechanisms underlying the aggression like bullying behaviour.

研究分野：リハビリテーション神経科学

キーワード：集団行動 いじめ ニューロン活動 マウス

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

1. 研究開始当初の背景

(1) 文部科学省初等中等教育局児童生徒課の調査報告(2017年)によると、小・中・高・特別支援学校におけるいじめの認知件数は依然として高い発生水準にあり、このことは関係者に深刻な心的苦痛を与えるだけでなく、安寧な国民生活を劣化させる一因となっている。国や地方自治体は、その防止や早期発見のための措置など、さまざまな対策を取っているが、抜本的な解決に至っていない。この原因の一つとして、いじめ発現の神経機構についてこれまで全く探究されてこなかったことが挙げられる。その理由の一つとして、複数の個体によって形成される集団行動の中で神経活動を記録することが技術的に困難であったことが考えられる。

(2) いじめの原因としては、当該児童の対人関係の不得手、思いやりの欠如、欲求不満耐性の欠如などが挙げられる(2003年 東京学校臨床心理研究会)。神経科学分野では、この他者に対する思いやりの欠如やモラルの低下は脳腫瘍摘出手術などのために内側前頭前皮質の一部分を失った患者で認められること、さらに頭部外傷などにより内側前頭前皮質に損傷を受けた患者では、欲求不満耐性が減弱し、衝動的攻撃性が出現することなどが報告されている。このようにいじめ発現に関与していることが示唆される内側前頭前皮質は、ヒトでも齧歯類でも前頭葉内側面に存在し、その内部には前辺縁皮質(PL)と下辺縁皮質(IL)が存在する。PLとILは、社会行動発現に関連する脳領域として知られ、直接線維投射によって不安や恐怖などの情動発現に深く関わる大脳辺縁系の扁桃体の活動を制御しており、集団行動中にこれらの脳領域の神経活動が示す変化を明らかにすることは、いじめ発現に関わる神経機構を解く糸口になると期待される。

2. 研究の目的

(1) 集団行動を容易に観察できるマウスやラットなどにおいて、集団行動中の神経活動記録を可能にする小型の無線神経活動送信システムを開発する。

(2) その開発した小型無線神経活動送信システムを用いて、集団行動中のPLとILの神経活動を記録し、いじめをはじめその関連行動中の活動変化を検索する。

3. 研究の方法

(1) 小型無線神経活動送信システムの開発

我々はラット用の無線神経活動送信システムを既に開発済みである(Minami et al., 2017)。このラット用無線送信機は2段FM方式の全重量8.8gの装置(ラットの頭部に装着したときの様子がニワトリのトサカに似ているのでTOSAKAと命名した)で、ラットの自由行動を拘束しない。一方、マウスは集団の中で社会的順位付けが起こるために、より高い確率でいじめ様行動が発現すると考えられるので、本研究ではマウス用の小型無線神経活動送信システムを開発した。頭部に取り付ける無線送信機の重量は、マウスの自由行動に支障を与えないために3g以下であることが望ましい。そのため送信方式を2段から1段FM方式に変更することにより装置構成部品数を減らし、軽量・小型化を図った。また、搭載するコイン電池は、ラットに使用する電池(CR2032)と同様に電圧3Vを供給するもののうち、より小型の電池(CR1220)を使用した。

(2) 実験対象および処置

マウス(C57BL6)またはラット(SD)を用いた。イソフルラン2%、酸素30%・笑気70%の混合ガス麻酔下において、動物を脳定位固定装置に固定し、マルチユニット記録電極(ステンレス製ワイヤー、直径50 μ mを2本束ねたもの)をそのPLまたはILに装着した。その後、デンタルセメントを用いて頭蓋に固定し、切開部皮膚を注意深く縫合した。

(3) 集団行動と神経活動の観察

術後回復したマウスに前述の小型無線送信機を取り付けた。グループ飼育した1群のマウスと一緒に暗実験室(照度5ルクス)内のオープンフィールドボックスに入れ、その集団行動を観察した。その際、動物の行動はオープンフィールドボックス上に設置したデジタルビデオカメラにて撮影した。無線送信された神経活動は、同室に設置した受信機にて復調後、デジタルデータ記録用PCにビデオ画像とともに保存した。ラットの場合も、ほぼ同様の手順を用いた。

(4) データ解析

集団行動の分類として、神経活動を記録している動物が、他の動物から離れている単独行動と他の動物と一緒にグループを形成しているグループ行動に分けた。さらに、単独行動のうち、特に他の全動物から疎外されているような状態時は疎外行動として細分類した。グループ行動のうち、他の動物を攻撃している時を攻撃行動とし、他動物から攻撃を受けている時を防御行動として細分類した。本研究で使用した電極では、通常、電極先端周囲に位置する2-3個のニューロンが発生する活動電位(マルチユニット)が記録できる。その記録されたデータを独自開発した解析ソフトMuscat-8(Multiunit sorting, counting and analyzing tools, ver. 8)を用いてオフライン処理した。分類したそれぞれの行動時の神経活動のうち、信号/ノイズ比が2倍以上の振幅が記録できた活動電位をカウントし、評価した。

4. 研究成果

(1) 小型無線神経活動送信システム

送信機重量 1.8 g にコイン電池 (0.9 g) を加えた総重量 2.7 g の小型無線神経活動送信機を作製した (図 1A)。本装置をマウス頭部に装着後の行動観察結果、マウスの行動に特に大きな支障を与えないと考えられた (図 1B, C)。図 2 は、動物麻酔下にて通常の有線記録と本無線記録を同時に行い、無線送信機の性能を比較検討した図である。同調周波数の復調過程の影響によると考えられる多少の波形変化はあるものの、有線方式で記録された活動電位を表すスパイク電位が無線記録でも再現されていることがわかった。マルチユニット数の評価には支障はないものと考え、本装置を用いてマウス集団行動中の神経活動を記録することにした。本送信機をトサカミニ (TOSAKA-mini) と命名した。なお、ラットの無線神経活動記録には前述のトサカを用いた。

(2) 集団行動中の PL と IL の神経活動 行動

いじめ様行動はマウスの集団行動において比較的高頻度に観察されたが、ラット (SD) においてはあまり観察することができなかった。以下、マウスを用いた実験結果を記述する。オープンフィールド観察箱にグループ飼育した一群のマウス群と個別飼育した 1 頭のマウスを同時に入れ、集団行動を観察した。この個別飼育した 1 頭のマウスには、グループ飼育した一群のマウス群よりも体格・体重において明らかに上回る動物を用いることによって、闘争などの社会行動が誘発されやすい実験条件で観察を行った。マウスは実験開始後、まず集団内で個々の動物それぞれが個別に探索行動を起こした (図 3A)。その後、さまざまな社会的相互行動 (social interaction) が観察された。その際、しばしば、その力関係において上位の個別飼育したマウスが下位のグループ飼育マウス群のマウスに対して一方的な攻撃行動を起こすことが観察された (図 3B)。その後、徐々に個別飼育した 1 頭のマウスがグループ飼育した一群のマウス群から疎外されるような行動が見られ (図 3C)、これ以降、個別飼育した 1 頭のマウスが孤立する疎外行動と他のマウスを攻撃する攻撃行動が繰り返し、観察された。

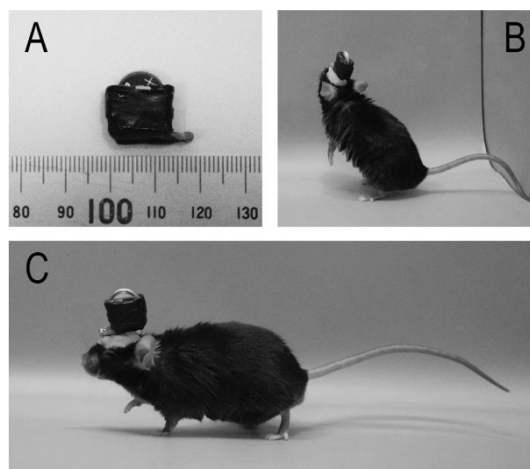


図 1 小型無線神経活動送信機

A: マウス用に開発された無線送信機。送信機の両側壁に送信用電子回路が組み込まれており、その間に駆動電源となるコイン電池が挿入されるように設計されている。B, C: 送信機を動物頭部に装着したときのマウスの行動を示す写真。動物の行動に特に支障は観察されず、通常の探索行動 (B) や歩行運動 (C) が観察された。

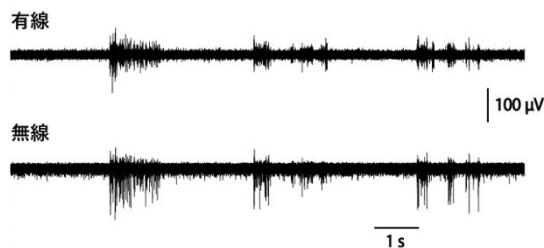


図 2 有線記録と無線記録の比較

通常の有線記録と本無線記録を同時に行った。通常の有線記録法によって記録されたスパイク電位 (活動電位) (上図) が、本無線記録システムによっても記録された (下図)。

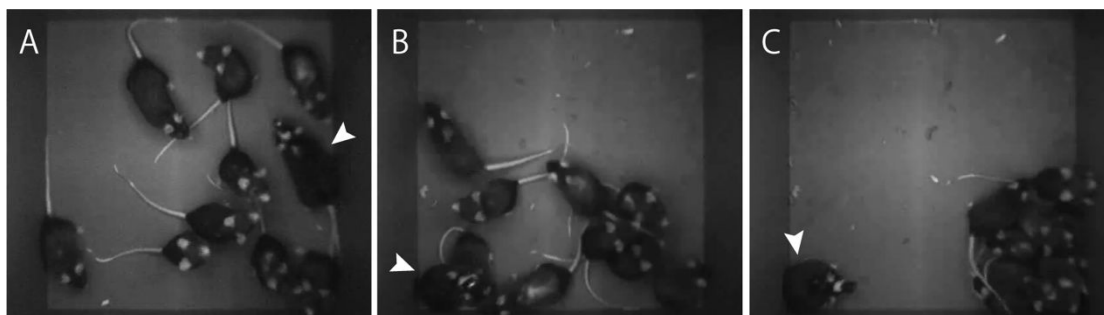


図 3 集団行動

個別飼育マウス (矢頭) には、あらかじめマルチユニット記録用電極が埋め込まれ、実験当日にその頭部に無線送信機 TOSAKA-mini が装着されている。個別飼育マウスは、他の一群のグループ飼育された 9 頭のマウスと同一オープンフィールド観察箱に入れられた。体格・体重において、他の一群のグループ飼育されたマウスよりも大きい。実験開始後、まず集団内で個々の動物がそれぞれ個別に探索行動を起こした (A)。その後、社会的相互行動を示した。その際、しばしば、その力関係において上位の個別飼育マウスが下位のグループ飼育マウスに対して執拗な攻撃行動を起こした。(B) では、個別飼育マウスが 1 頭のグループ飼育マウスを押さえつけ、その頭部に噛みついてる。そして徐々に、個別飼育した 1 頭のマウスがグループ飼育した一群のマウス群から疎外されるような場面が見られ (C)、これ以降、個別飼育マウスが孤立する場面 (C) と個別飼育マウスが他のマウスを攻撃する場面 (B) が繰り返し、観察された。

神経活動

10頭のマウスのPLあるいはIL(それぞれ5頭)にマルチユニット電極を装着した。現時点では統計学的検定を行うに足りるN数が得られていない。以下、これまでに得られた結果を記述する。

集団内で単独行動を取っている時のPLおよびILのニューロン発火数(マルチユニット数)は4.2 Hzから4.5 Hzであった。これは、従来のラットのsocial interaction testにおいて、ラットが単独行動をしている時のPLおよびILの活動レベル(Minami et al., 2017)とほぼ同程度であった。他の動物から疎外された時あるいは孤立したとき、PLニューロンは単独行動時の発火頻度と比べて特に顕著な変化を示さなかったが、ILニューロンは発火頻度を約2倍に増加させる傾向が観察された。この結果は、前述のラットのsocial interaction testにおいて観察された結果と同様であった。2頭のラットをオープンフィールドに入れ、social interactionを行わせた実験では、相手ラットから離れる離去行動を取るときにILニューロンは有意に発火頻度を増加させたが、一方、PLニューロン活動は有意な変化を示さなかった(Minami et al., 2017)。一方、他のマウスに噛みつくなどの攻撃時には、ILニューロンは単独時の発火頻度と比べて特に顕著な変化を示さなかった。また、PLニューロンも発火頻度を増加させなかった。この結果は、前述のラットのsocial interaction testにおいて観察された結果と相違する。ラットsocial interactionでは、攻撃時においてPLニューロンの活動は有意に増加した(Minami et al., 2017)。

これまでの研究により、PLとILはその個体の行動発現においてそれぞれ異なる働きをしており、しばしば拮抗的に作用し、適切な行動を発現させると考えられている。そして、その適切な行動発現のためにはPLとILの活動バランスが重要であると考えられている。恐怖条件付けを用いた多くの研究では、PLの活性化は恐怖発生に関与し、一方ILの活性化は恐怖消去に関与することが報告されている。前述のラットのsocial interactionでは、PLは他ラットに対して積極的に関わって行く時に活性が高くなるのに対し、ILは他ラットとの関わりから解放されるときに活性が高くなることが示唆されている(Minami et al., 2017)。また、高架式十字迷路を使って、抗不安行動の発生を探索した実験では、電気刺激によってILを活性化すると抗不安行動が誘発されるのに対し、PLの電気刺激ではその効果は発現しないことが報告されている(Shimizu et al., 2018)。本実験で観察された上位マウスが下位マウスを一方向的に攻撃する行動時には、PLもILもそのニューロン活動を増加させなかった。前述のsocial interaction testで用いられた2頭のラットは体格・体重が互いにほぼ等しく、力関係に差のない個体を選ばれており、そこで観察された攻撃行動の持続時間は短く、一過性であった。本研究で観察された上位マウスが下位マウスを攻撃する攻撃行動は繰り返し行われる執拗な攻撃であった。このような力関係が明らかな場合に起こる攻撃行動の発現には、PLとILの活動バランスに何らかの機能不全が起こっているのかもしれない。

今後の展望

本研究では、集団中での自由行動時の神経活動の解析を可能にする装置を開発した。今回は、攻撃や防御行動が出現しやすいように、一群のグループ飼育した群れの中に個別飼育した個体を入れ、個別飼育した個体の内側前頭前皮質の神経活動を記録した。今後は、グループ中で社会的順位が上位のマウスのPLやILから神経活動を記録し、集団が示すいじめ様行動時の神経活動を解析することが必要であろう。

<引用文献>

Chihiro Minami, Tomoko Shimizu, [Akira Mitani](#). Neural activity in the prelimbic and infralimbic cortices of freely moving rats during social interaction: Effect of isolation rearing. PLOS ONE, 2017, 12, e0176740, DOI:10.1371/journal.pone.0176740

Tomoko Shimizu, Chihiro Minami, [Akira Mitani](#). Effect of electrical stimulation of the infralimbic and prelimbic cortices on anxiolytic-like behavior of rats during the elevated plus-maze test, with particular reference to multiunit recording of the behavior-associated neural activity. Behavioural Brain Research, 2018, 353, 168-175. DOI:10.1016/j.bbr.2018.07.055

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計1件)

Saki Ito, Chihiro Minami, Tomoko Shimizu, Mei Ito, [Akira Mitani](#). Neural activity in the medial prefrontal cortex during social interaction in rats. Society for Neuroscience Annual Meeting, 2018年11月7日, サンディエゴ(米国)。

〔その他〕

ホームページ等

http://www.med.kyoto-u.ac.jp/organization-staff/research/human_health/ot0101/

6 . 研究組織

(1) 研究協力者

研究協力者氏名：三上 隆

ローマ字氏名：(MIKAMI, takashi)

研究協力者氏名：伊藤 幸希

ローマ字氏名：(ITO, saki)

研究協力者氏名：高橋 里奈

ローマ字氏名：(TAKAHASHI, rina)

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。