

研究種目：若手研究(B)
研究期間：2007 ～ 2009
課題番号：19791591
研究課題名（和文）：身体抑制ストレス反応に対する幼少期母子分離の影響 —中枢神経系メカニズムの解明—
研究課題名（英文）：Effect of maternal deprivation in the early period on immobilization stress reaction in the adult rat, -the evaluation of a central nervous system mechanism-
研究代表者
松本 祐子 (MATSUMOTO YUKO)
鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・助教
研究者番号：20315443

研究成果の概要（和文）：MD(6-OHDA)群の身体抑制ストレス後のコルチコステロン濃度のピーク値は他の2群と比較して有意に低値を示した。また実験開始後180分には対照群が基礎値に戻ったのに対し、MD(saline)群は有意に高値を示し、MD(6-OHDA)群もピーク値が低いにもかかわらず、減少は遅く基礎値には戻らなかった。母子分離両群のピーク後の減少速度が遅いという今回の結果は、生後初期の母子分離によりMDラットの海馬のステロイドレセプター発現が変化し、HPA系の負のフィードバック機構を低下させた影響と考えられた。

研究成果の概要（英文）：The immobilization stress-induced corticosterone levels were significantly lower in the MD(6-OHDA) group than in MD(saline) group and control group at T30. Plasma CORT levels were significantly higher in the MD(saline) group than other groups at T180, on the other hand, plasma CORT levels in control group returned to the basal level at T180. In MD(6-OHDA) group, although the peak of plasma CORT levels were low, plasma CORT levels decreased more slowly following termination of stress, and did not return to the basal level at T180. These results suggested that the maternal deprivation in early period produce a long-term effect on the hippocampus of MD rat that was involved in the negative feedback regulation of glucocorticoids.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度			
2006年度			
2007年度	1,300,000	0	1,300,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,200,000	570,000	3,770,000

研究分野：小児歯科学

科研費の分科・細目：歯学、矯正・小児系歯学

キーワード：ラット、母子分離、身体抑制ストレス、カテコールアミン作動性ニューロン

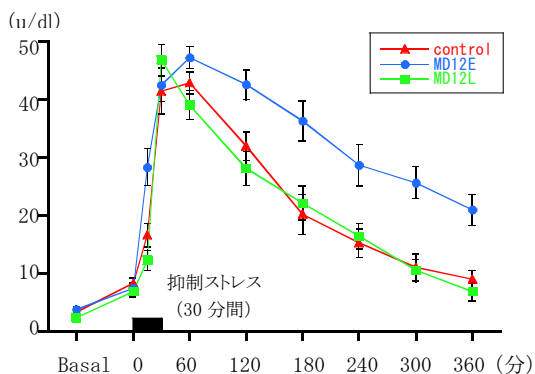
## 1. 研究開始当初の背景

新生児期に母親が側にいることは、母子関係確立に重要な意味を持つ。母と子のつながりが母子分離によって損なわれることにより、様々な問題が起こると考えられている。

例えば、maternal deprivation syndrome (母性剥奪症候群) では、母親の愛情を得られない子どもは、肉体的に大きな疾患はなくても、精神的因子によってその成長発育が大幅に遅れることが知られている。動物実験においても、幼弱期の生活環境が、成長や生体機能の発達、成長後の環境応答性などに影響することが報告されている。

一方、小児歯科臨床において、年少児や障害者の緊急的処置を要する場合にレストレーナーによる身体抑制が行われることがある。患児は抑制具により固定され身動きできず恐怖感は増大し、身体的・精神的に極度なストレス状態にある。しかし、身体抑制を受ける患児によりその反応にかなり個人差があるのも事実である。

研究代表者は、ラットを用いたストレス反応に関する実験的研究を行っており、「母子分離」、「抑制」、「ストレス」というキーワードから、ラットの身体抑制ストレス反応に対する母子分離の影響について、ストレスに対する視床下部-下垂体-副腎皮質系 (HPA axis) の最終分泌物質である血中コルチコステロン濃度を測定し、「幼弱時に母子分離された個体群は、母子分離されなかった個体群と比較して身体抑制によるストレス反応が強くその回復も遅い」との結果を得た。



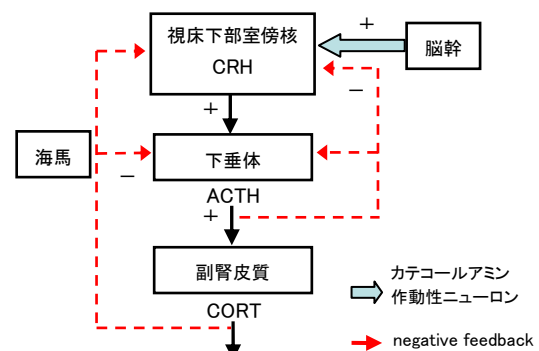
生後1日から6日まで毎日12時間の母子分離をした群 (MD12E) は、生後16日から21日まで毎日12時間の母子分離をした群 (MD12L) と対照群 (control) に比べ、ラットの成長後に行った30分間の身体抑制ストレスに対する血中コルチコステロン濃度は、急激な増加を示し、ストレス開始から360分経過しても基礎値に戻らなかった。

## 2. 研究の目的

身体抑制ストレスによって血中コルチコステロン濃度が上昇するメカニズムとして、(1) HPA axis系における negative feedback の機能が低下する

(2) カテコールアミン作動性ニューロンが視床下部室傍核にあるCRH産生細胞に促進的に作用する

という2つの要因が考えられる。



そこで本研究では、生後初期に行われた母子分離が成長後の身体抑制ストレス反応に与える影響について、中枢神経系のメカニズムを解明することを目的とし、以下の実験計画を立てた。

[実験1] 上行性カテコールアミン作動性ニューロン遮断ラットの作製

血中コルチコステロン濃度上昇に、カテコールアミン作動性ニューロンによる視床下部室傍核のCRH産生細胞への促進作用が関係しているかどうかを調べるために、カテコールアミン枯渇剤である6-hydroxydopamineを

用いて遮断ラットを作製する。

[実験 2] 生後初期に行われた母子分離による成長後のラットの身体抑制ストレス反応調節機構に与える影響について

遮断ラットの使用で上行性カテコールアミン作動性ニューロンによる経路を遮断することにより、生後初期に母子分離 (Maternal Deprivation :MD) を受けたラットの成長後のストレス反応に、上行性カテコールアミン作動性ニューロンがどのように関与しているかを調べる。

### 3. 研究の方法

[実験 1] 上行性カテコールアミン作動性ニューロン遮断ラットの作製

注入部位の特定

#### ①6-OHDA 注入

ラットを麻酔下で定位脳固定装置に固定し、カテコールアミン枯渇剤である 6-OHDA (6-hydroxydopamine) を上行性カテコールアミン作動性ニューロンが存在する部位へ注入する。

#### ②カテコールアミン枯渇の確認

断頭後、視床下部室傍核 (PVN) を punch-out し、攪拌・遠心分離後、Lowry 法で組織蛋白量を、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) でカテコールアミン量を測定し、対照群と比較してカテコールアミンの枯渇を確認する。

[実験 2] 生後初期に行われた母子分離による成長後のラットの身体抑制ストレス反応調節機構に与える影響について

#### ①実験群の作製

MD (6-OHDA) 群：母子分離 (生後 1-6 日、12 時間/日) を行い、生後 53 日目に上行性カテコールアミン作動性ニューロンに 6-OHDA を注入する群 (n=6)

MD (saline) 群：母子分離 (生後 1-6 日、12 時間/日) を行い、生後 53 日目に上行性カテコールアミン作動性ニューロンに生理食塩水を注入する群 (n=6)

対照群：母子分離・注入を行わない群 (n=6)

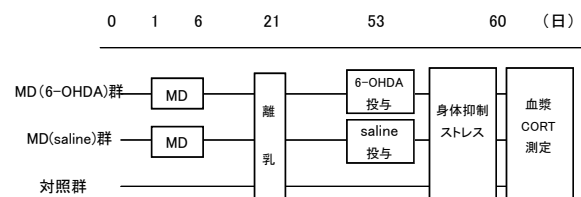
②生後 60 日目に 30 分間身体抑制ストレスを与え、ストレス終了直後に尾先端から採血を

する。血液サンプルは直ちに遠心分離し、血漿は $-40^{\circ}\text{C}$ にて凍結保存する。

③得られたサンプルを用いて血中コルチコステロン濃度をラジオイムノアッセイ (RIA) にて測定する。

④測定結果から、遮断ラットを用いることにより、生後初期に母子分離を受けたラットの成長後の身体抑制ストレス反応に、上行性カテコールアミン作動性ニューロンがどのように関与しているかについて、3 群間で比較を行う。

実験プロトコール

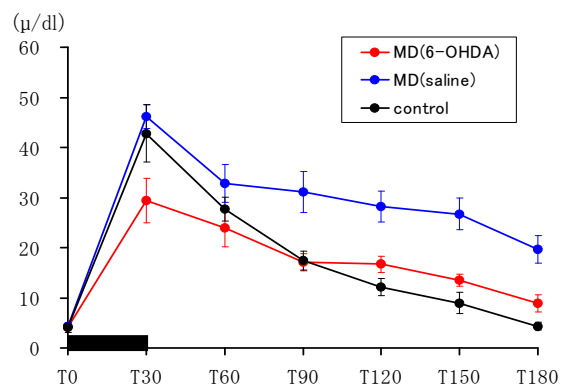


### 4. 研究成果

[実験 1] 上行性カテコールアミン作動性ニューロン遮断ラットの作製

カテコールアミン作動性ニューロン存在部位の定位脳座標は、視床下部室傍核 (PVN) 内のプレグマから 2.7mm 後方、正中線から 0.5mm 側方、脳表面から深さ 8.0mm の部位に同定された。

[実験 2] 生後初期に行われた母子分離による成長後のラットの身体抑制ストレス反応調節機構に与える影響について



身体抑制ストレスを行った T0-T30 の変化を phase I、ピーク後の T30-T180 の変化を

phase II として、3 群間の経時的変化について以下に述べる。

[phase I] T0-T30

MD(6-OHDA) 群のピーク値は他の 2 群 (MD(saline)群、対照群) と比較して有意に低値を示した。身体抑制ストレスによる HPA 系の活性はラットをプラスチックチューブに入れる restrain stress や tail-nick stress よりも非常に強く、過去の母子分離実験においても、身体抑制ストレス直後の急激なコルチコステロン濃度の上昇に群間差はみられなかった。しかし今回、MD(6-OHDA) 群のピーク値が低値を示したのは、カテコールアミン枯渇剤である 6-OHDA により脳幹からの上行性カテコールアミン作動性ニューロンが遮断され、CRH 産生細胞の活性が促進されず、結果として HPA 系最終分泌物質であるコルチコステロン分泌が抑制されたためと考えられた。

[phase II] T30-T180

T180 (身体抑制解除から 150 分後) に対照群が基礎値 T0 に戻ったのに対し、MD(saline) 群は有意に高値を示し、MD(6-OHDA) 群もピーク値が他の 2 群よりも低いにもかかわらず、減少は遅く基礎値には戻らなかった。

海馬の糖質コルチコイドレセプターは、HPA 系におけるステロイドの負のフィードバックを調節していると報告されている。母子分離 (MD) 両群のピーク後の減少速度が遅いという今回の結果は、生後初期の母子分離により MD ラットの海馬のステロイドレセプター発現が変化し、成長後の HPA 系の負のフィードバック機構を低下させた影響と考えられた。

以上の結果から、身体抑制ストレスによって血中コルチコステロン濃度が上昇するメカニズムとして考えられる 2 つの要因である (1)HPA axis 系における negative feedback の機能低下、(2)カテコールアミン作動性ニューロンが視床下部室傍核にある CRH 産生細胞の活性を促進、のうち生後初期に行われた母子分離による成長後のラットの身体抑制ストレス反応調節機構に与える影響は、(1) の海馬のステロイドレセプター発現の変化

による成長後の HPA 系の負のフィードバック機能低下の方が大きいことが示唆された。

今後は、他のさまざまなストレスにおける母子分離の影響についても比較して検討していく必要があると思われた。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

1. Kubota N, Hayasaki H, Saitoh I, Iwase Y, Maruyama T, Inada E, Hasegawa H, Yamada C, Takemoto Y, Matsumoto Y, Yamasaki Y. Jaw motion during gum-chewing in children with primary dentition. The journal of craniomandibular practice 2010;28(1):19-29. 査読有

2. Hayasaki H, Saitoh I, Iwase Y, Inada E, Hasegawa H, Tokutomi J, Matsumoto Y, Yamasaki Y. Movement of the instantaneous center of rotation and the position of the lateral excursion center during lateral excursion. The journal of craniomandibular practice 2008; 26(4):253-262. 査読有

3. Inada E, Saitoh I, Hayasaki H, Yamada C, Iwase Y, Takemoto Y, Matsumoto Y, Yamasaki Y. Cross-sectional growth changes in skeletal and soft tissue cephalometric landmarks of children. The journal of craniomandibular practice 2008;26(3):170-181. 査読有

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松本 祐子 (MATSUMOTO YUKO)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・助教

研究者番号：20315443