

令和 5 年 5 月 22 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K10396

研究課題名(和文) 幼少期に身体抑制を経験したラットの成長後のストレス反応性亢進を緩和できるか。

研究課題名(英文) Can increased stress response in adult rats that were associated with immobilization stress in early postnatal period be relieved?

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：幼少期に身体抑制を経験したラットはストレス反応性が亢進する。本研究では、カテコールアミン代謝回転、CRH産生機能などの神経内分泌学手法、グルココルチコイドレセプター発現量、時計遺伝子発現量などの分子生物学的方法、Open field test、Radial 8-arms maze testなどの行動科学的方法を用いて実験を行った。その結果、生活環境を整えることで幼少期に身体抑制を経験したラットのストレス反応性を緩和できることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果より、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も本研究により示されたので、今後、身体抑制のよる人体への影響を和らげる研究の発展が期待される。

研究成果の概要(英文)：It is well known that stress response in adult rats is increased when they were subjected to immobilization stress in early postnatal period. In this study, several experiments were performed by using neuroendocrinological method such as turn-over rate of catecholamines, expression of CRH-productive cells, molecular biological method such as expression of glucocorticoid receptors and clock gene, and behavioral science method such as open field test and radial 8-arms maze test. This study suggests that environmental enrichment might relieve increased stress response in these rats.

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 (共通)

1. 研究開始当初の背景

不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、呼吸循環器系への影響だけではなく、不快な経験となり、その後の脱感作に苦慮する。研究代表者らは、ラット幼少期に身体抑制を経験すると成長後、ストレスに対する反応性が亢進することを視床下部-下垂体-副腎皮質系(以下、HPA axis)で示し、さらに身体抑制を経験する時期には臨界期が存在することやこの反応には脳幹からの上行性カテコールアミン(以下、CA)ニューロンが関与することを報告するなど、長年にわたり身体抑制について研究してきた。

研究を進めて行く中で、ストレス反応性亢進を緩和する方法はないかという未解明の問いに至った。最近、母子分離後の環境を飼育ケージを広くしたり、遊具設置など良好に整えることで、ストレス反応性亢進を緩和できることが報告されている。さらに研究代表者らは、ストレス反応性亢進と大脳辺縁系扁桃体、海馬、脳幹との中枢神経系ネットワークに注目して、情緒や環境の関与について実験を行ってきた。これらの知見をもとに、母子分離と同様に、身体抑制についても、生活環境を整えることで、成長後のストレス反応性を緩和できるという仮説に至った。

2. 研究の目的

神経内分子的、分子生物学的および行動科学的手法を用いて、上記仮説を統合的に検証することが目的である。

3. 研究の方法

本研究では以下の3つの実験群を作成し、実験1~8を行った。

・実験群：生後1週齢時に1日1回30分の身体抑制を7回行い、続けて次の1週間、広く遊具を設置した良好な環境で飼育し、その後、各ラット毎のケージで飼育した群。

・対照群1：生後1週齢時に1日1回30分の身体抑制を7回行った後、各ラット毎のケージで飼育した群。

・対照群2：身体抑制を一切経験しない群。

実験1。「幼少期身体抑制を経験後、環境を良好に整えることにより、成長後のHPA axisのストレス反応性亢進は減少するか？」

生後90日目(以下、「成長後」)の午前9時に新しい敷きわらの入ったケージにラットを移すという新規環境変化ストレスを負荷し、経時的に採血し、コルチコステロン量をRIAにより測定し、HPA axisの反応性を3群間で比較する。

実験2。「幼少期身体抑制を経験後、環境を良好に整えることにより、成長後の視床下部室傍核CA代謝回転及びCRH産生機能に違いはあるか？」

成長後に新規環境ストレスを負荷し、in vivo microdialysisにより灌流液を採取し、CA量をHPLCにより測定し、CA代謝回転を3群間で比較する。

実験終了後、ラット脳を採取し、凍結ミクロトームを用いて室傍核を含む連続切片を作製し、in situ hybridizationによりCRHmRNAの発現を検出・定量化し、3群間で比較する。

実験3。「幼少期身体抑制を経験後、環境を良好に整えることにより、成長後の大脳辺縁系扁桃体、海馬、脳幹および視床下部グルココルチコイドレセプター(以下、GR)発現量に違いはあるか？」

成長後、ラット脳を採取し、凍結ミクロトームを用いて扁桃体、海馬、脳幹、視床下部を含む連続切片をそれぞれ作製し、in situ hybridizationによりGR発現を検出・定量化し、3群間で比較する。

実験4。「幼少期身体抑制を経験後、環境を良好に整えることにより、成長後の睡眠および摂食行動リズムに違いはあるか？」

成長後、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、睡眠および摂食行動に費やす時間を3群間で比較する。

実験5。「幼少期身体抑制を経験後、環境を良好に整えることにより、成長後の生活リズムを司る時計遺伝子の発現量に違いはあるか？」

成長後、ラット脳を採取し、視床下部視交叉上核を含む凍結切片を作製し、in situ hybridizationにより時計遺伝子(per1)の発現を定量化し、3群間で比較する。

実験6。「幼少期身体抑制を経験後、環境を良好に整えることによって、成長後の行動抑制に違いはあるか？」

Forced swim testを用いて行動抑制を評価する。成長後の1日目に、ラットをタンク中で5分間泳がせる。はじめは水泳、よじ登りといった逃避行動が起こるが、次第に動きが少なくなり、無動が多くなる。2日目(24時間後)に、ラットを再びタンク中で5分間泳がせ、行動を録画し、無動の行動の割合を算出し、3群間で比較する。

実験7。「幼少期身体抑制を経験後、環境を良好に整えることによって、成長後の不安関連行

動に違いはあるか？」

Open field testを用いて、不安関連行動を評価する。成長後の1日目に、ラットを底面は区画がされた段ボールの隅に置き、5分間の行動を録画し、行動距離および区画移動数を算出し、3群間で比較する。

実験8。「幼少期身体抑制を経験後、環境を良好に整えることによって、成長後の空間・記憶行動に違いはあるか？」

Radial 8-arms maze testを用いて、空間・記憶行動を評価する。成長後に、放射状に8本伸びた arm のうちの4本の先端に餌を置き、プラットフォームに置いたラットは arm の先端に進み、餌を食べ次の arm に入るが、既に餌をとった arm に再び入れば、エラーとする。すべての餌を食べるまでを1試行として、1日2回の試験を行う。試験は連続して、7日間行う。arm に侵入した回数(総侵入回数)とエラー数より、「正選択の割合」や「参照記憶」などを算出し、3群間で比較する。

4. 研究成果

実験1

成長後のHPA axisのストレス反応性は対照群1が対照群2に比較して高かったが、実験群では、2つの対照群に比較して低かった。

実験2

CA代謝回転、CRHmRNAの発現量ともに、実験群では、2つの対照群に比較して低かった。

実験3

実験群では、2つの対照群に比較して、扁桃体において、GRの発現量が高かった。

実験4

実験群では、2つの対照群に比較して、明期の睡眠と暗期の摂食行動の違いが明瞭に示されていた。

実験5

実験群では、2つの対照群に比較して、日中と夜間の時計遺伝子の発現量の差が大きく、特に夜間の発現量が多かった。

実験6

実験群では、2つの対照群に比較して、逃避行動に比較して無動行動の割合が多かった。

実験7

不安関連行動の行動距離および区画移動数ともに、対照群2、実験群、対照群1の順で、大きかった。

実験8

空間・記憶行動において、「正選択の割合」や「参照記憶」とともに、対照群2、実験群、対照群1の順で、大きかった。

以上の結果より、遊具設置など生活環境を良好に整えることで、成長後のストレス反応性亢進を緩和できることが示唆された。このメカニズムの背後には、HPA axis negative feedback を司る海馬のGR発現や大脳扁桃が関与していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	大島 昇平 (OSHIMA SYOUHEI) (00374546)	北海道大学・大学病院・講師 (10101)	
研究分担者	高崎 千尋 (TAKASAKI CHIHIRO) (60451449)	北海道大学・歯学研究院・助教 (10101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関