

様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 22年 5月 21日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20790766

研究課題名 (和文)

胎生期にアルコール曝露されたラットのセロトニン神経系の異常と行動異常の関係

研究課題名 (英文)

Relation between abnormalities of serotonergic neurons and anxiety-related behaviors in prenatally ethanol-exposed rats

研究代表者

太田 健一 (OHTA KENICHI)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号：50403720

研究成果の概要 (和文)：

胎生期にエタノール曝露されたラットのセロトニン(5-HT)神経系とその神経系との関係が深い不安様行動の解析を行った。その結果、曝露ラットでは不安への感受性は低下しているが、強度が高い嫌悪刺激を受けた場合は、むしろ不安発現が促進されることが明らかとなった。これは、本研究で観察された成熟後まで持続した中脳縫線核5-HT神経細胞数の減少、あるいは脳発達期の脳5-HT量の異常な変動によって5-HT神経系の機能が低下したためであると推察される。

研究成果の概要 (英文)：

We investigated the serotonergic system and anxiety-related behavior of rats prenatally exposed to ethanol. Anxiety-related behavior tests revealed that the susceptibility to anxiety was decreased in prenatally ethanol-exposed rats. However, their innate fears were facilitated only when they were exposed to intensive aversive stimuli. The abnormalities of anxiety-related behaviors might be attributed to the depressed serotonergic action as a result of a reduced number of serotonergic cells in the midbrain raphe nuclei or the abnormal fluctuation in brain serotonin during development.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・胎児・新生児医学

キーワード：胎生期エタノール曝露、セロトニン、不安様行動、先天異常学

1. 研究開始当初の背景

胎生期エタノール曝露は中枢神経系の発達障害を引き起こし、それに伴って不安障害や抑うつ症状などの精神症状にも影響を与えることが報告されている。しかし、成熟後の情動への影響についての報告は少なく、実験動物を用いた研究でも不安に関しての報告は一致していない。またこれら不安等の情動と関連が深い5-HT神経系は、胎生期エタノール曝露の影響を受けることがよく報告されている。しかしその報告の多くは胎生期から幼若期であり、成熟後の報告は少ないため情動への関与はまだ不明である。

これらのことから本研究では、胎生期エタノール曝露された動物の成熟後の5-HT神経系と不安様行動に着目して研究を行った。

2. 研究の目的

- (1) 不安などの情動と関係が深い5-HT神経系について、胎生期から幼若期に報告されているような細胞数減少や脳5-HT量の減少が成熟後も持続する影響であるか否かを明らかにすること
- (2) 5-HT神経系の投射域によって不安発現に関する5-HTの働きが異なることから、不安状況を分類してより詳細な不安様行動の解析を行うこと

3. 研究の方法

(1) 動物の作製

妊娠SDラットに10~21日の間2.5~5.0%エタノール含有液体飼料を与えその仔を各解析に用いた(Et群)。また対照群には、エタノールを等カロリーのショ糖で置換した液体飼料を与えた母獣の仔(Pf群)と固形飼料を与えた母獣の仔(Int群)を用いた。各解析にはすべて雄を用いた。

(2) 中脳縫線核5-HT神経細胞数の計測

各群を60~70日齢でブアン固定液により灌流固定し、脳を取り出しパラフィン切片にした。5-HTの合成酵素であるトリプトファン水酸化酵素(TPH)に対する抗体を用いて免疫染色を行い、中脳縫線核のTPH陽性細胞数、すなわち5-HT神経細胞数を計測し比較した。

(3) 脳5-HT、5-HIAA量の解析

各群を胎生20日、生後2、4、7、21、28日齢で断頭して脳を取り出し、除蛋白処理を行ってサンプルを作製した。液体高速クロマトグラフィー法によって各サンプルの5-HT量及びその代謝産物である5-ヒドロキシインドール酢酸(5-HIAA)量を測定した。

(4) 不安様行動解析

60~70日齢で以下の行動解析を行い、不安様行動を評価した。

① 高架式十字迷路試験

壁のある走行路(closed arm)と壁のない走行路(open arm)を高さ50cmで十字に設置した装置(Fig. 1A)を用いて測定した。Open armへの進入回数及び滞在時間を測定し不安様行動を評価した。

② 高架式T字迷路試験

Closed armとopen armを高さ50cmでT字に設置した装置(Fig. 1B)を用いて測定した。測定はclosed armからopen armに出るまで(受動的回避行動)の潜時を3回、open armからclosed armにでるまで(逃避行動)の潜時を1回測定した。各測定間のインターバルは30秒とし、1回の測定のカットオフ時間は300秒とした。

③ 高架式プラットホーム試験

高さ60cm、直径30cmの透明なシリンダー(Fig. 1C)上にラットを置き、強照明下(直接照明、600 lux)で、不安様行動の一つであるすくみ行動が見られた時間を測定し、総すくみ時間を各群で比較した。

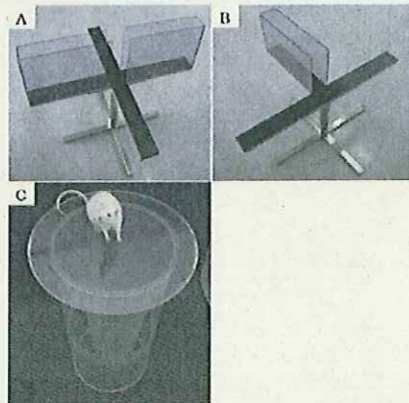


Fig. 1 不安様行動解析の各装置 (A: 高架式十字迷路、B: 高架式T字迷路、C: 高架式プラットホーム)

4. 研究成果

(1) 5-HT神経系への影響

① 中脳縫線核5-HT神経細胞数

中脳縫線核である背側縫線核(Dorsal raphe nucleus: DR)と正中縫線核(median raphe nucleus: MR)で、Et群はPf、Int群と比較して有意に5-HT神経細胞数の減少が見られた(Table 1)。

② 脳5-HT及び5-HIAA量

Et群では胎生20日齢でPf群と比較して5-HT、5-HIAA量ともに減少していたが、生後2、4日齢では著名な増加を示し、以降の日齢ではPf群と同程度まで回復していた(Fig. 2)。

Table 1 DR 及びMRにおけるTPH陽性細胞数

Area	Group		
	Int (n=5)	Pf (n=4)	Et (n=5)
DR	1552 ±43	1556 ±43	1315 ±16
MR	321 ±12	327 ±15	260 ±13

Mean ± SE, ** p<0.01, ## p<0.01

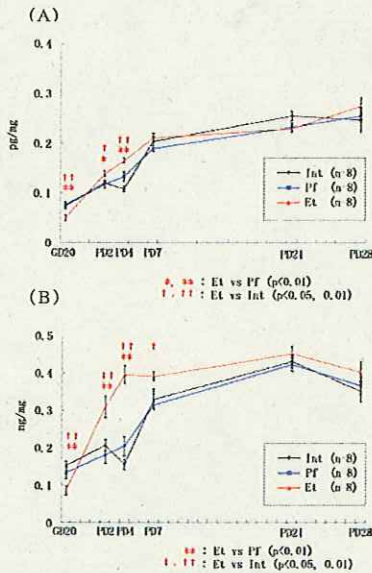


Fig. 2 胎生20日齢から生後28日齢までの5-HT量(A)および5-HIAA量(B) (Mean±SE)

(2) 不安様行動の解析結果

① 高架式十字迷路試験

Open armへの進入回数と滞在時間共にEt群はPf, Int群と比較して有意に増加しており、不安に対する感受性の低下が認められた (Fig. 3)。しかし、一方で不安様行動の一つであるすくみ行動を示す個体がEt群では他の2群と比較して有意に認められた (Table 2)。

② 高架式T字迷路試験

Closed armからopen armにでるまでの潜時はPf, Int群では3回の試行で徐々に増加しopen armを避けているのに対して、Et群ではその増加があまり見られず受動的回避行動が抑制されていた。一方でopen armからclose armへ逃げ込むまでの時間には差はなく逃避行動は変わっていないことが示された (Fig. 4)。

③ 高架式プラットホーム試験

Et群はPf, Int群と比較してすくみ行動を示した合計時間が有意に増加していた (Fig. 5)。

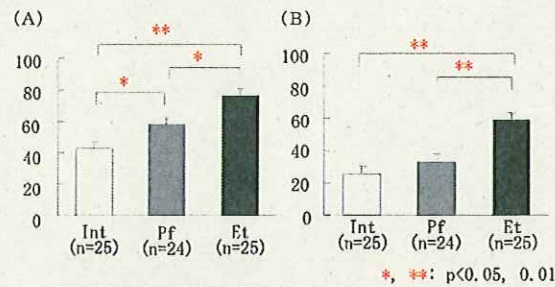


Fig. 3 高架式十字迷路におけるopen armへの進入回数(A)および滞在時間(B) (Mean±SE)

Table 2 高架式十字迷路上ですくみ行動が見られた個体数

Number (%)	Group		
	Int (n=25)	Pf (n=24)	Et (n=25)
0 (0)	3 (12.5)	11 (44.0)	

*: p<0.05

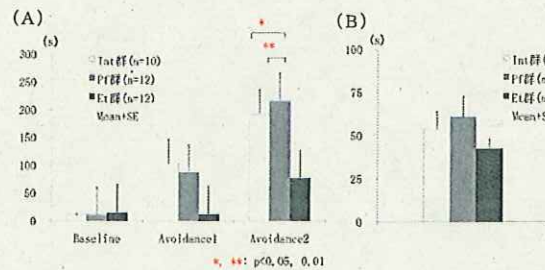


Fig. 4 高架式T字迷路試験における受動的回避行動 (A) 及び逃避行動 (B)

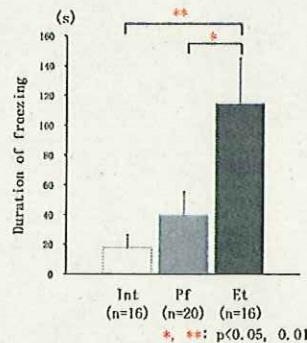


Fig. 5 高架式プラットホーム試験における総すくみ時間 (Mean±SE)

以上の結果から胎生期エタノール曝露ラットは、経験に基づいて獲得される不安の発現 (= conditioned fear) は抑制されているのに対して、新奇の嫌悪刺激に対する不安発現 (=unconditioned fear) は、その不安の強度が低い場合は変化が見られないが、高い場合はすくみ行動などの不安様行動が増加し、過剰な不安発現が見られることが示された。5-HT神経系が関与する不安発現では、このような不安状況の違いによって投射域で

の5-HTの役割が異なっていることが報告されている。今回見られた胎生期から生後初期にかけての5-HT、5-HIAA量の異常あるいは中脳縫線核における成熟後まで続く不可逆的な5-HT神経細胞数の減少が胎生期エタノール曝露動物の不安様行動異常の原因となっている可能性がある。今後は行動試験中の投射域における5-HT動態を調べる必要があると思われる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

1. Ohta, K., Sakata-Haga, H. and Fukui Y. (2010) Alteration in anxiety-related behaviors and reduction of serotonergic neurons in raphe nuclei in adult rats prenatally exposed to ethanol. *Congenital Anomalies*, 50(2) : 105-114. (査読有)

[学会発表] (計3件)

1. 太田健一、坂田ひろみ、福井義浩 胎生期アルコール曝露によって障害される受動的回避行動. 第64回日本解剖学会中国四国支部学術集会 2009年10月24-25日・高知県
2. 太田健一、坂田ひろみ、福井義浩 母獣のアルコール摂取による仔の行動異常と中脳縫線核5-HT神経系. 第48回日本先天異常学会学術集会 2009年6月28-30日・東京都
3. 太田健一、坂田ひろみ、福井義浩 胎生期エタノール曝露による周期性5-HT動態の変化. 第49回日本先天異常学会学術集会 2009年6月25-27日・鹿児島県

6. 研究組織

(1) 研究代表者

太田 健一 (OHTA KENICHI)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号 : 50403720

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者