

平成22年 5月 1日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20790834

研究課題名（和文） 脳内ニューロン新生における隔離ストレスの影響

研究課題名（英文） Effects of maternal separation stress on the newly generated cells

研究代表者

福島 菜奈恵（FUKUSHIMA NANAE）

信州大学・医学部・助教

研究者番号：90334888

研究成果の概要（和文）：脳内では生後も神経細胞の増殖が起こる場所が存在し、海馬歯状回と嗅球の傍糸球体細胞層・顆粒細胞層の神経細胞の増殖が知られている。新生児期に母ラットから毎日一定時間隔離するという隔離ストレスを与えたラットを作成し、脳内における新生細胞の生存に与える影響について調べた結果、海馬・嗅球における新生細胞の数が減少し、特に海馬においてはオスがメスよりも減少率が大きく、隔離ストレスの影響には性差があると考えられた。

研究成果の概要（英文）：The numbers of newly generated cells in the hippocampal dentate gyrus, and the bulbar glomerular and granule cell layers were decreased by the repeated maternal separation during the suckling period. The decreases of newly generated cells were more pronounced in the maternally separated male rats than female rats, especially in the hippocampus. The effect of maternal separation stress on survival of the newly generated cells was gender-dependent.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,800,000	540,000	2,340,000

研究分野：神経科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、精神神経科学

キーワード：ストレス

1. 研究開始当初の背景

（1）外傷後ストレス障害（PTSD）は、突然の衝撃的な出来事を経験した後に生じる精神障害であり、現在多くの人がある障害に悩

まされているが、その発生機序についてはいまだ明らかではない。これまでにラットを用いた動物実験によって、新生児期における母ラットからの隔離が、新生児ラットにとってストレスとなることが確認されており、スト

レスホルモンの発現や成長後のストレス反応の研究がなされている。その結果、一定時間隔離されて育った仔ラットは、発達期の隔離の影響が持続し、成長後のストレス反応にも変化が生じること、また、その反応性には性差があることが確認され、この隔離ラットを PTSD モデルとして利用した研究が進められている。しかし、この隔離ラットの脳内における組織学的な変化の有無については明らかではない。

(2) 成熟後の脳内においても、海馬歯状回と側脳室周囲には神経幹細胞が存在し、ニューロン新生 (neurogenesis) が起きていることが知られている。海馬は記憶に関係するとされる脳領域であり、周囲の環境変化によって神経幹細胞の増殖に変化が生じることが知られている。また、側脳室周囲の神経幹細胞は、増殖後 RMS (Rostral Migratory Stream) と呼ばれる構造を移動し、嗅覚に関与する嗅球内のニューロンに分化することが知られている。また、嗅球からの嗅覚情報は海馬にも伝えられ、互いに関連しあっていることがわかっている。

(3) 新生児期に母ラットから隔離した仔ラットを使った予備実験を行った。4週齢のラット海馬において、増殖細胞の数に違いが認められ、隔離ラットでは正常ラットに比べてオスでは79%、メスでは93%に減少していた。

2. 研究の目的

新生児期に母ラットから一定時間繰り返し隔離されたラットを使用し、隔離によるストレスが脳に与える影響について検証することを目的とした。

生後にも神経細胞の増殖が起こることがわかっている海馬と嗅球において、新生細胞の増殖と生存を免疫組織学的な手法を用いることによって調べ、脳の構造的な変化を明らかにしようと考えた。

成長後に新生児期に母ラットから隔離されたラットが示すストレス反応には性差が確認されていることから、隔離ストレスが新生細胞の増殖・生存に対して与える影響を、オスとメスに分けて調査し、比較検討した。

3. 研究の方法

(1) PTSD モデルラットの作成

①妊娠ラットを購入し出産させた。出産後の母ラットの育児行動と新生児ラットの哺乳

行動を観察し、育児・哺乳行動に問題のある動物は実験から除外した。

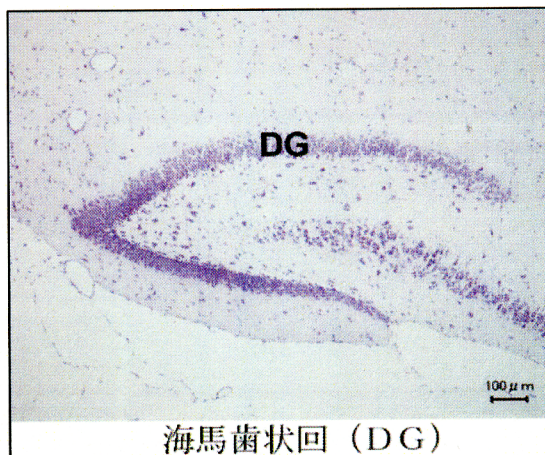
②生後3日目に BrdU (bromodeoxyuridine) を腹腔内へ投与した。BrdU は細胞増殖の際にチミジンの代わりに DNA に取り込まれることから、増殖中の細胞マーカーとして広く利用されている。

③生後4日目から10日間にわたり、毎日6時間ずつ隔離ストレスを与えた。母ラットから隔離しない仔ラットをコントロール群とした。仔ラットは超音波を発することから、母ラットとは別の部屋に1匹ずつ個別に隔離し、隔離中は温度 $27 \pm 2^\circ\text{C}$ ・湿度30%の状態を保った。隔離時間中には哺乳できないことから、成長への影響を考慮し、6時間連続で隔離する実験と3時間ずつ2回に分けて隔離する実験を行った。

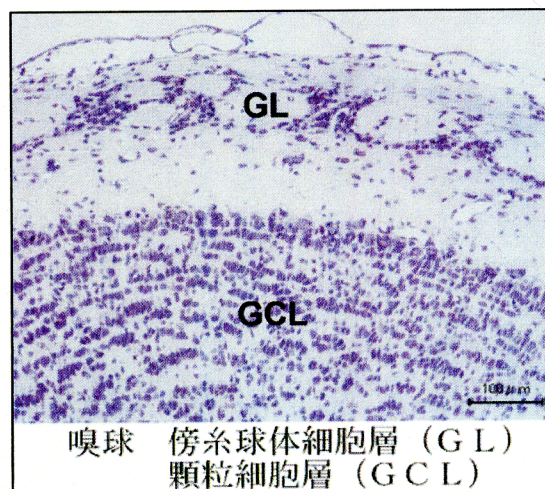
④BrdU 投与4週間後 (生後31日目) まで生育させた。

(2) 試料作成・免疫染色・計測

①生後31日で固定液 (4%パラフォルムアルデヒド) を用いて還流固定し、脳を取り出



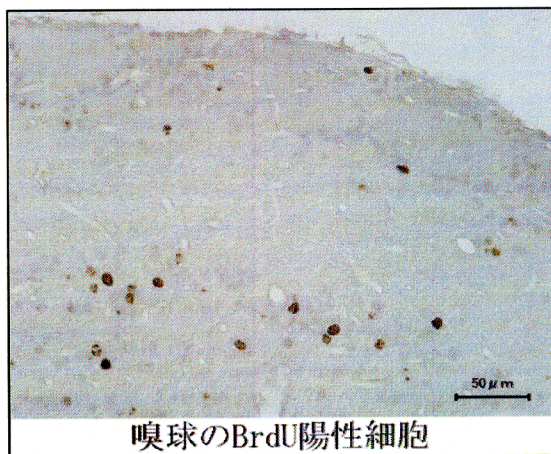
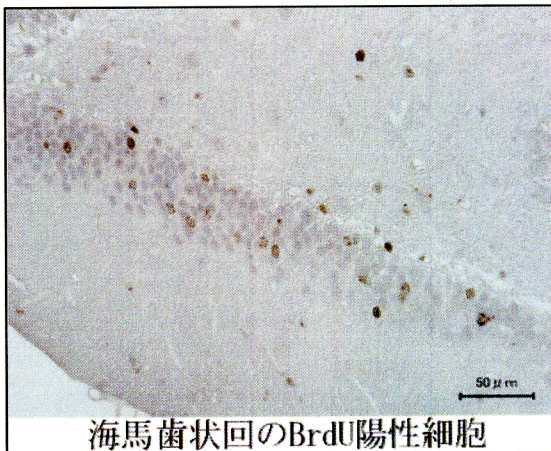
海馬歯状回 (DG)



嗅球 傍糸球体細胞層 (GL)
顆粒細胞層 (GCL)

した。海馬と嗅球を含む部位を切り出し、前額断で5 μ mのパラフィン切片を作成した。

②抗 BrdU 抗体を用いて免疫染色を行い、顕微鏡下で単位面積 (1 mm²) 当たりの新生細胞の数を計測した。計測は、海馬は歯状回、嗅球は傍糸球体細胞層と顆粒細胞層でそれぞれ行い、コントロール群とストレス群について、性差を考慮して比較した。

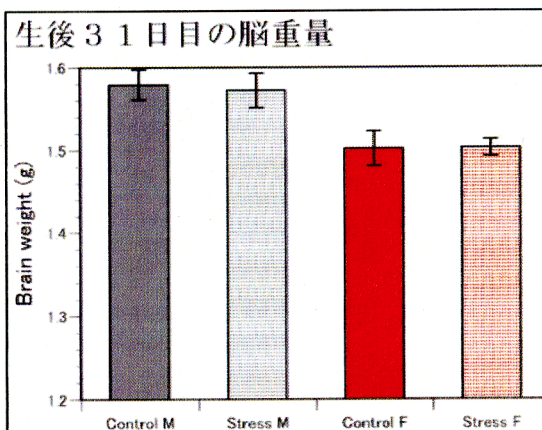
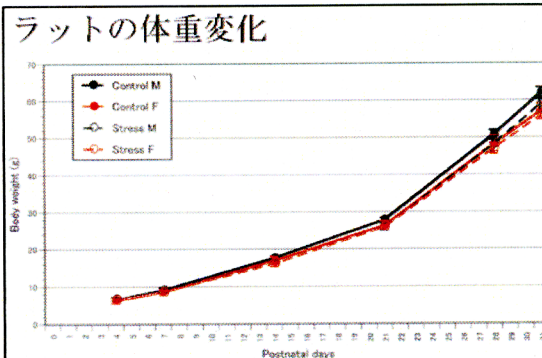


4. 研究成果

生後4日目から10日目まで毎日6時間連続で母ラットから隔離した実験では、実験終了時(生後31日目)の体重がコントロール群50 \pm 2 g / 53 \pm 2 g (オス/メス)、ストレス群45 \pm 1 g / 43 \pm 1 g (オス/メス)と、コントロール群とストレス群の間に統計的な有意差が生じてしまった。長時間隔離による栄養不良が原因として疑われたため、隔離時間を3時間ずつ2回に分け再度実験を行った(合計隔離時間は6時間)。1回目と2回目の隔離時間の間には母ラットの元へ戻し十分に哺乳させた。

生後4日目から10日目まで毎日3時間ずつ2回(合計6時間)、母ラットから隔離

したラットの実験終了時(生後31日目)の体重は、コントロール群62 \pm 2 g / 57 \pm 2 g (オス/メス)、ストレス群59 \pm 2 g / 56 \pm 1 g (オス/メス)で、コントロール群とストレス群の間には有意差は認められなかった。また、生後31日目における脳重量にも、コントロール群とストレス群の間に有意差は認められなかった。

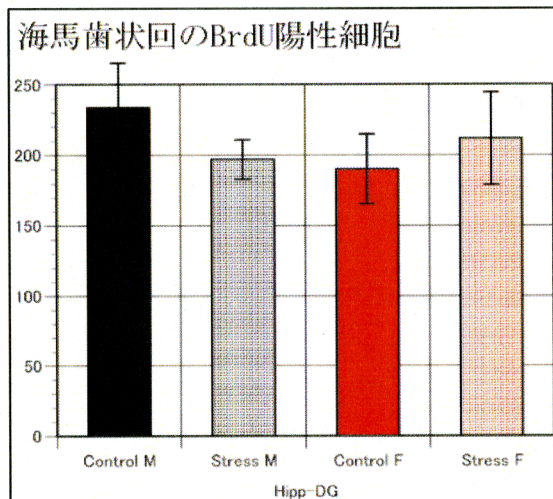


単位面積 (1 mm²) 当たりの新生細胞の数を計測すると、海馬歯状回ではコントロール群234 \pm 32 g / 190 \pm 25 g (オス/メス)、ストレス群197 \pm 14 g / 212 \pm 33 g (オス/メス)で、コントロール群を100%とすると、ストレス群では84% / 111% (オス/メス)と、オスでは新生細胞の数が減少していた。

嗅球傍糸球体細胞層では、コントロール群91 \pm 12 g / 92 \pm 20 g (オス/メス)、ストレス群77 \pm 10 g / 82 \pm 13 g (オス/メス)で、新生細胞数がストレス群では85% / 89% (オス/メス)に減少していた。嗅球顆粒細胞層では、コントロール群25 \pm 5 g / 29 \pm 8 g (オス/メス)、ストレス群25 \pm 12 g / 25 \pm 4 g (オス/メス)で、新生細胞数はストレス群では102% / 87% (オス/メス)であった。しかし、海馬・嗅球ともに、統計的な有意差は検出できなかった。

今回の実験では、脳内の新生細胞の生存に

隔離ストレスが影響を与えること、海馬においてはその影響に性差が存在することが考えられた。



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)

[学会発表] (計1件)

① 福島菜奈恵, 新生児ラット海馬および嗅球における新生細胞の生存に隔離ストレスが与える影響の性差について, 第32回日本神経科学大会, 2009.9.16, 名古屋

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福島 菜奈恵 (FUKUSHIMA NANAE)

信州大学・医学部・助教

研究者番号: 90334888