

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月27日現在

機関番号：72101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22500378

研究課題名（和文） 幼若期におけるストレス応答に対する快情動形成の役割  
—快情動モデルラットでの検証

研究課題名（英文） Role of positive emotion on stress responses in adolescent rats

研究代表者

堀 美代 (HORI MIYO)

公益財団法人国際科学振興財団・バイオ研究所・専任研究員

研究者番号：90399329

研究成果の概要（和文）：

幼若期の社会的隔離によって引き起こされるストレス脆弱性に対する快情動の効果を検証した。仔ラットどうしの遊び(rough and tumble play)をモデルにした tickling 刺激は、50kHz 音声の表出と側坐核のドーパミン分泌を促し、恐怖条件づけの恐怖反応や自律神経系のストレス応答を軽減させた。これらのことは、幼若期において他個体との相互作用を伴う遊び行動が、快情動形成およびストレス応答性の獲得に影響を及ぼす可能性を示唆する。

研究成果の概要（英文）：

In order to demonstrate that a positive affective state, such as play during adolescence, contributes to reverse the changes caused by isolation stress, we analyzed the effects of tickling through behavioral and biochemical indices in post-weaning isolated rats. Tickling stimulation, resembles the rough-and-tumble play behavior in rats, triggers the dopamine release in the nucleus accumbens. Additionally, the tickling could modulate fear-related behavior and sympatho-adrenal response, and recovered the behavioral changes, that were caused by isolated rearing. In conclusion, positive emotion alters directly and/or indirectly neuronal circuitry and behaviors through the play in adolescence.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：融合社会脳科学

キーワード：幼若期、隔離ストレス、快情動、Tickling、50kHz 超音波、

## 1. 研究開始当初の背景

若者の自殺・凶悪犯罪の急増は社会問題化し、幼少期の環境による情動形成との因果関係が示唆されている。特に、乳幼児期の虐待や他者との相互作用の欠如が、集団逸脱行

動・非行・犯罪などの社会的行動の問題の要因のひとつと考えられている。さらに、学習・記憶・情動の形成発達には、社会能力 (Social abilities) の役割が重要であることが注目されており、本問題の解決には、有効な

モデル動物での検証が必要不可欠である。

一般的に脳内の神経細胞は、胎児期の後期から生後にかけて神経突起を介した神経回路網を形成する。その後、発達期において周囲環境の情報、他個体からの刺激を基に、神経回路の配線の組み替えが頻繁に起こり、学習成立や適応的な表現型を獲得し成長する。したがって、決まった期間に脳内の適切な部位で神経回路の再編が起こることによって正常な発達が促されることが推測される。げっ歯類の研究によると、授乳期・幼若期における他者との相互作用の減少がストレスとなって、脳内システムの形成や社会性の発達に悪影響を及ぼすことが知られている。また、慢性ストレスにより仔ラットの学習能力の低下が引き起こされるが、これは過剰に分泌されたグルココルチコイドが海馬歯状回に作用することでグルタミン酸が分泌され、その結果 CA3 錐体細胞の神経新生が抑制されたことで、脳の正常な発達が妨げられるのではないかと考えられている。

一方、離乳後から成体になるまでの時期にみられる仲間との遊びを通しての相互作用は、脳内システムの発達形成、認知行動や社会性の発達に深く関与する。「rough and tumble play」と呼ばれる仔ラットの遊びは、生体になるまでの社会性の学習過程の一環とみなされている。遊びの体験は社会性の発達において重要な役割を担っているが、脳そのものの発達に置いても重要で、遊びを経験したラットは経験していない隔離飼育のラットに比べて c-fos 遺伝子や BDNF 遺伝子発現が様々な脳領域において増加する。tickling 刺激は、この仔ラットどうしの「rough and tumble play」を模倣した、ヒトの手でラットを遊ばせる刺激であり、ラットは快情動として 50kHz 音声を表出する。我々はこれまでに、tickling 刺激を用いて、「遊び」による快刺激が脳内ネットワークを介してストレス応答の中核である視床下部に作用し、特定の遺伝子発現を調節すること、海馬の神経新生などに影響を及ぼすことを見出した。また、拘束ストレスを負荷した仔ラットに一過性に tickling を施すことで、血中アドレナリンが有意に減少することを見出した[20~22 年度科学研究費補助金基盤研究(B)]。このことは tickling 刺激により引き起こされた快情動が、ストレス軽減作用を有していることを示唆している。

## 2. 研究の目的

本研究では、離乳後から成体になるまでの期間で、遊びを通じた仲間との相互作用が脳の発達や社会性の発達に対してどのような役割を担っているかを、tickling 刺激法を用いて検証する。そして、幼若期の隔離飼育によって引き起こされるストレス脆弱性の増

加や行動学的障害(うつ発症、学習能力の低下、社会性の低下)に対して、快情動を誘発する tickling 刺激がどのような効果を持つのか明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) 倫理規定の遵守

本研究における全ての動物実験は、筑波大学および国際医療福祉大学における動物実験倫理規定を遵守し、当施設の実験動物委員会の承認を受けて実施された。

### (2) tickling 刺激法

快刺激負荷は、上述の tickling 刺激(5 分間/日)を施行した。仔ラットは tickling 刺激に対して快情動の指標である 50kHz の音声表出を示した。

ラットの音声解析は、広帯域マイクロフォンを用いて周波数成分の解析により 22kHz、flat50kHz、frequency-modulated(FM) 50kHz 音声を検出して行った(図 1)。また、刺激の報酬特性は、刺激前後での接近潜時(最大 30 秒)を測定して評価した。

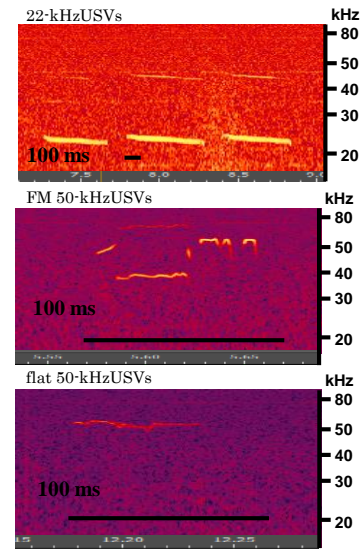


図 1.ラット高周波音声

### (3) 脳内報酬系への作用の検証

tickling 刺激が脳内報酬系に作用することを確認するために、側坐核のドーパミン分泌量を測定し、カウンターバランス実験としてドーパミン受容体阻害実験を行った。実験には、離乳直後より隔離飼育にて他個体との接触を絶った生後 30~35 日齢の Fischer 雄ラットを用いた。

#### ① マイクロダイリシス法による側坐核ドーパミン分泌の測定

5 分間の tickling 刺激中と弁別刺激である light-touch 刺激中のドーパミン分泌量と 50kHz 音声表出量を比較解析した。

#### ② ドーパミン受容体阻害実験

tickling 刺激前に D1 受容体遮断薬 R(+)-SCH-23390 hydrochloride と D2/3 受容体遮断薬の S(-)-Raclopride(+)-tartrate salt の混合液を側坐核に投与し、投与後に tickling 刺激を施し、刺激中の 50kHz 音声表出の継時的変化を解析した。

(2) 隔離飼育によるストレス脆弱性に及ぼす tickling 刺激の効果の検証

#### ① 被験体および飼育条件

Fisher344/Nslc 系雄ラット(21 日齢)を用いた。集団飼育群は 3 匹毎に 1 つのケージ内で飼育した。隔離飼育ラットは 5 日間の飼育環境への馴化の後、27 日齢で体重を測定し、隔離飼育群と隔離飼育+tickling 群の 2 群に分けた。各実験は 4 週間の tickling 刺激終了後の 54 日齢より開始した。

#### ② 恐怖条件づけ

音刺激を CS (10-kHz、65dB)、foot-shock を US (0.3-mA) とした恐怖条件づけを行い、48 時間後と 96 時間後の CS 提示に対する freezing 反応、および、条件づけ時 96 時間後の HPA 系および自律神経系の応答を解析した。

#### ③ Flinch-jump テスト

flinch-jump テストは電撃刺激感受性を評価する課題である。装置は恐怖条件づけと同じ装置を用いた。ラットに対して装置へ馴化の後、15 秒間隔で上昇系列(0.05–0.99 mA)の電気ショックを与えられた。ショック閾値を、flinch (すくみ)、jump (ジャンプ)、可聴域音声、高周波音声の最低値として検出した。

#### ④ モリス水迷路課題

実験は、幼若期(56 日齢)と成熟期(95 日齢)のラットに対し場所学習訓練を連続 5 日間(計 20 試行)行った。6 日目にプール内からプラットフォームを取り除き、プローブテストを行った。幼若期に訓練を行ったラットに対しては、成熟期(95 日齢)に 3 日間の記憶保持テストおよび 4 日間の逆転学習を行った。

#### ⑤ 放射状迷路学習課題

成熟期(95 日齢)のラットに対して食餌制限(体重の 85-90%)の後、装置(高架式 8 方向放射状迷路)への馴化を行った。習得訓練では、8 本のアームの先端に報酬ペレットを置き、ラットを装置の中央に入れて、全報酬を取り終えるまでの選択反応を記録した。全ペレットを取り終える「所要時間」を「正選択数」と「誤選択数」で割った 1 選択あたりの時間「走行時間(秒) (running/choice)を測定した。最初の 8 選択中の正選択が 7 以上である試行が 5 回連続するまで行った。

#### ⑥ オープンフィールド課題

オープンフィールドでの自発活動を解析し、新奇場面における情動反応性、探索傾向、さらには新奇場面への慣れ(馴化)を検証した。装置に 5 分間放置し、総移動距離、中央(3×3 区画)滞在時間、grooming 時間、rearing

回数を解析した。

#### ⑦ 強制水泳課題

ラットを脱出不可能な円筒状のプール内(直径 24×高さ 45cm)に深さ 35cm まで水を満たし強制的に 15 分間泳がせた(強制水泳ストレス負荷)。翌日に再びラットを 5 分間強制的に泳がせた(テスト)。テスト時のプール入水後から無動になるまでの時間(回避潜時)と総無動時間を測定し解析した。この回避潜時や水泳(活動)時間の減少を指標として、動物の「鬱状態」や「絶望状態」を測定する。

### 4. 研究成果

(1) tickling 刺激による側坐核のドパミン分泌の検証

#### ① ドパミン分泌確認実験

ドパミン分泌量は、tickling 刺激によって刺激前の規定値と比較し 125.7±2.9%まで増加した。light-touch 刺激中や刺激後には変化が見られなかった。また、ラットの 50kHz 音声は、tickling 刺激中に確認され light-touch 刺激中より有意に増加していた。逆に不快な情動を表す 22kHz 音声は light-touch 刺激中のみ確認できた。

#### ② ドパミン受容体阻害効果

tickling 刺激中の 50kHz 音声は、vehicle の投与では変化が見られなかったが、ドパミン受容体遮断薬の両側側坐核投与によって刺激前の規定値より有意に減少した。特に、投与後 40 分後では、快情動音声の主要成分とされる FM50kHz 音声成分が有意に減少し、flat50kHz 音声成分には変化が見られなかった。

これらの結果から、幼若期の仔ラットは、遊びをモデルにした tickling 刺激によって、脳内報酬系を介し快情動を表出していることが初めて確認できた。今回、D1、D2/3 受容体遮断薬の混合投与により、ドパミン分泌と音声表出を検証したが、今後は、個々の受容体と音声表出との関わりを検証し、側坐核ニューロンと快情動の関わりを解明する必要がある。

(2) 隔離飼育によるストレス脆弱性に及ぼす tickling 刺激の効果

#### ① 恐怖条件づけに及ぼす効果

集団飼育群では条件づけ 96 時間後に行った 2 回目の保持テストの freezing 反応は、1 回目(48 時間後)に比べて約 50%減少し、恐怖の消去が見られた。しかし、隔離飼育群では 2 回目は 1 回目と同程度の freezing 反応が維持されており、消去の阻害が認められた。一方、tickling 群の freezing 率は集団飼育群と同程度の 50%まで減少しており、隔離飼育に

よる消去の障害を改善した可能性が示唆された。しかしながら、1回目の保持テストで tickling 群は集団飼育より低い freezing 率を示したため、条件づけ時のストレス応答性を検証した。各群間の HPA 系のストレス応答性には相違が認められなかった。しかし、各群の血中アドレナリン・ノルアドレナリン濃度は1回目の保持テストの freezing 率と同じ傾向を示しており、tickling 群は集団飼育群に比べて低かった。しかし、flinch-jump テストでは tickling 群の電気刺激の感受性の低下は認められなかった。ことから、tickling 群は恐怖条件づけによる自律神経のストレス反応に対して強い抑制を示すことが示唆された。また、心筋の $\alpha$ および $\beta$ アドレナリン受容体の遺伝子発現量は血中のカテコラミン濃度と相関が認められなかった。しかし、 $\alpha$ アドレナリン受容体の遺伝子発現量は、隔離飼育群では集団飼育群より増加していた。このことは、本研究の心筋の $\alpha$ アドレナリン受容体の遺伝子発現は恐怖条件づけの急性的なストレス応答によるものではなく、隔離飼育による慢性的なストレスによる変化の可能性が考えられた。そして、tickling 群の受容体発現量は集団飼育群と同程度の発現量であり、隔離飼育による変化を正常化した可能性が示唆された。これらのことから、幼若期の tickling 刺激は、隔離飼育によって脆弱性が増加したストレス応答や消去過程の障害を軽減させる可能性が示唆された。

## ②空間学習に及ぼす効果

モリス水迷路学習課題においては、幼若期(生後 56 日齢)に訓練を実施した場合、隔離飼育による障害は認められず、この時期における各群による空間学習能力の相違はないことが示唆された。しかしながら、成体期(生後 95 日齢)に訓練を実施した場合、隔離飼育群は場所学習訓練における 3 日目の平均逃避潜在時間が集団飼育群より長い傾向があり、場所学習の障害が示唆された。しかし、tickling 群は、隔離飼育群より到達が有意に早く、この遅延を正常化したことが推測された。一方、放射状迷路課題においては、統計的有意差はないが、成体期のラットが学習基準に達するまでに要した日数は、隔離飼育により増加し、空間学習能力を障害された可能性が示唆された。しかし、本課題の結果からは、tickling がその障害に対して何らかの影響を示すような明確な効果は得られなかった。

以上のことから、隔離飼育によって成体期に顕著化したある種の空間学習の獲得の遅延が、幼若期に遊び刺激を受けることによって正常化された可能性が考えられ、快情動が記憶・学習の中核である海馬に作用することが示唆された。この結果は tickling 刺激により海馬歯状回の神経新生が促進されることを確認した我々の研究結果[Yamamuro T et al,

2010, 20~22 年度科学研費補助金基盤研究(B)]を支持するものと思われる。

## ②オープンフィールドに及ぼす効果

オープンフィールドでの自発活動に対する影響を検証したところ、5 分間の総移動距離は、tickling 群は集団飼育群より長く、活動性の増加が考えられた。また、隔離飼育群は集団飼育群より grooming が時間減少したが、tickling 群は集団飼育群と変わらなかった。隔離飼育群が集団飼育群に比べて活動量が変わらず、grooming 時間が減少したことは、新奇場面での freezing 行動が長くなった可能性が推測され、幼若期の tickling 刺激は隔離飼育による新奇場面での freezing の増加を抑制させ、慣れを促進した可能性が考えられた。

## ③強制水泳課題に及ぼす効果

プールへの入水から無動になるまでの回避潜時や総無動時間には群間差が無く、幼若期の隔離飼育による影響は認められなかった。

本研究では、幼若期の tickling 刺激が、脳内ネットワークや行動の変容に関わることを示した。特に、これらの結果は、社会隔離飼育によって引き起こされるストレス脆弱性の増加が、遊びなどの他個体との相互作用によって生じる快情動によって回避できる可能性を示唆するものであった。

## 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)

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① 堀美代、Tickling は幼若期のラットの情動応答に作用する。日本生理学雑誌、2013 年、査読無  
<http://physiology.jp/exec/nisseishi/>
- ② Hori M, Shimoju R, Tokunaga R, Ohkubo M, Miyabe S, Ohnishi J, Murakami K, Kurosawa M. Tickling increases dopamine release in the nucleus accumbens and 50 kHz ultrasonic vocalizations in adolescent rats. *Neuroreport*; 24(5), 241-245, 2013, 査読有  
DOI: 10.1097/WNR.0b013e32835edbfa.
- ③ Hori M, Yamada K, Ohnishi J, Sakamoto S, Takimoto-Ohnishi E, Miyabe S, Murakami K, Ichitani Y. Effects of repeated tickling on conditioned fear and hormonal

responses in socially isolated rats. *Neurosci Lett.* :536, 85-89, 2013 査読有  
DOI: 10.1016/j.neulet.2012.12.054.

- ④ Yamamuro T, Hori M, Nakagawa Y, Hayashi T, Sakamoto S, Ohnishi J, Takeuchi S, Mihara Y, Shiga T, Murakami K, Urayama O. Tickling stimulation causes the up-regulation of the kallikrein family in the submandibular gland of the rat. *Behav Brain Res*; 236(1):236-243, 2013 査読有  
DOI: 10.1016/j.bbr.2012.09.001.

- ⑤ 堀美代・山田一夫・大西淳之・坂本成子・村上和雄・一谷幸男. 社会隔離飼育された幼若ラットの恐怖条件づけに及ぼす tickling の効果。動物心理学研究: 61 巻 2 号 236, 2011 年 査読無  
[https://www.jstage.jst.go.jp/article/janip/61/2/61\\_61.2.5/\\_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/janip/61/2/61_61.2.5/_pdf)

[学会発表] (計 7 件)

- ① Hori M, et al., Effects of tickling on hormonal responses to restraint stress and conditioned fear in socially isolated rats. Society for Neuroscience Neuroscience 2013. 2013 年 11 月 09~13 日, San Diego Convention Center, 米国
- ② Ohnishi J et al., Molecular insights into mind-body medicine: Effect of "laughter" on gene expression. 4th World Gene Convention-2013, 2013 年 11 月 13~16 日、Hainan International Convention & Exhibition Center, 中国
- ③ Takimoto-Ohnishi E et al., Molecular insights into mind-body medicine: Effect of "laughter" on gene expression. 3rd Annual World ongress of Molecular Medicine-2013, 2013 年 11 月 13~16 日, Hainan International Convention & Exhibition Center, 中国
- ④ 堀美代ら. 側坐核のドーパミンの分泌及ぼす tickling の効果。第 73 回日本動物心理学会大会, 2013 年 09 月 14~16 日, 筑波大学
- ⑤ 堀美代. 隔離飼育ラットにおける快情動刺激 (Tickling) の効果。第 45 回筑波実験動物研究会講演会 (招待講演)、2013 年 06 月 7 日, 文部科学省研究交流センター
- ⑥ Hori M. Tickling alters emotional responses in adolescent rats. 第 90 回日

本生理学会大会 (招待講演)、2013 年 03 月 27~29 日, タワーホール船堀

- ⑦ 堀美代ら. 社会隔離飼育された幼若ラットの恐怖条件づけに及ぼす tickling の効果。Animal2011 日本動物心理学会・日本動物行動学会・応用動物行動学会/日本家畜管理学会合同学会、2011 年 9 月 8~11 日、慶應義塾大学

[その他]  
ホームページ等  
<http://mind-gene.com/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

堀 美代 (HORI MIYO)

(公財)国際科学振興財団・バイオ研究所・専任研究員  
研究者番号: 90399329

### (2) 研究分担者

村上 和雄 (MURAKAMI KAZUO)

(公財)国際科学振興財団・バイオ研究所・所長  
研究者番号: 70110517

坂本 成子 (SAKAMOTO SHIGEKO)

(公財)国際科学振興財団・バイオ研究所・専任研究員  
研究者番号: 60419869

大西 英理子 (OHNISHI ERIKO)

(公財)国際科学振興財団・バイオ研究所・専任研究員  
研究者番号: 90396284

大西 淳之 (OHNISHI JUNJI)

東京家政大学・家政学部・准教授  
研究者番号: 40261276

一谷 幸男 (ICHITANI YUKIO)

筑波大学・人間系  
研究者番号: 80176289

山田 一夫 (YAMADA KAZUO)

筑波大学・人間系  
研究者番号: 30282312