

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 5 月 31 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590118

研究課題名（和文）正および負の環境要因が情動系およびその発達に与える影響の解明

研究課題名（英文）Study for protective and harmful effects of environmental factors on emotional system and its development

研究代表者

白崎 哲哉（SHIRASAKI TETSUYA）

熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授

研究者番号：30264047

研究成果の概要（和文）：生後早期の生存環境が情動系脳機能に与える影響を電気生理学的、神経化学的、行動科学的に検討した。その結果、精神的ストレス環境により海馬、青斑核、腹側被蓋のニューロンで、モノアミンやアミノ酸受容体応答が変化した。遺伝子レベルの影響は見られず、また、短時間の繰り返し母仔隔離で攻撃行動が増加する傾向も示された。一方、小川のせせらぎ等の自然環境音が精神的ストレス環境の影響から保護する環境因子として作用することが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：We studied how environmental factors in early life stage affect emotional brain functions by using electrophysiological, neurochemical and behavioral science techniques. Psychologically stressful environments alter receptor functions to monoamines and/or amino acids or responsiveness to them. Expression levels of GIRK2 and 5-HT_{1A} receptor were not affected. Short but repeated maternal isolation tended to increase aggressive behavior. Environmental natural sounds such as sounds of a stream protected from the effects observed at single neuron level of short but repeated maternal isolation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：環境衛生学

1. 研究開始当初の背景

我々は、平成 20 年度文部科学省「質の高い大学教育改革プログラム」（教育 GP）に採択された「エコファーマを担う薬学人育成プログラム：命と環境を守る行動派薬剤師・薬学研究者をめざして」を現在も継続し、環境教育を推進している。このプログラムを推進する理由の一つは、薬学が化学物質を介して

直接的に環境と関わっているからである。しかし、このプログラムを推進する理由は、それだけではない。環境中の物理的・心理的・社会的因子もまたヒトの健康に大きな影響を与える。最近の基礎および臨床研究から脳の発達やさまざまな精神疾患の発症において、遺伝要因のみならず環境要因の寄与も大きいことが指摘されている。また、不登校や

いじめ、引きこもり、自殺など成長過程にある児童・生徒・学生が引き起こす様々な問題に、問題発生時のみならずそれ以前の成長過程で受けた心的外傷やストレスなどの環境要因が大きくかかわることも指摘されている。一方、エンリッチ環境で実験動物を飼育すると鉛中毒などの影響が緩和されることが報告されており、我々も内分泌かく乱作用を持つジエチルスチルベストロール (DES) の胎仔期暴露による学習障害がエンリッチ環境飼育により改善されることを動物実験で見出している。

このように、環境は、ヒトの健康に対して負の影響を与えるのみならず正の影響も与え、疾病の予防や疾病からの早期の回復、健康の維持が可能となると考えられる。特に、成長の著しい胎生期から乳幼児期、さらにおそらく思春期までの影響は、不可逆的な場合もあり、良くも悪くも成熟後にまでおよぶ長期間の影響を起しうる。

医療経済の観点からすると、今後、疾病治療から予防へとシフトすることは明らかであり、ヒトが心身ともに健康に生存するための環境を整えることが、予防薬学として益々重要になる。しかしながら、環境要因が生体機能、特に脳や精神機能とその発達に与える影響については、まだほとんどが科学的には未解明のまま残されている。

2. 研究の目的

本研究の最終目標は、ヒトが心身ともに健康に生存するための環境を整え、ヒトの健康、特に精神衛生面での健康増進と健全で安定した社会基盤の構築に寄与することである。その最終目標を達成するためには、環境要因が脳機能の発達に及ぼす影響について実験的基礎知見を蓄積する必要がある。

環境要因が神経機能を障害する例として水俣病が良く知られている。また、強いストレスに継続してさらされると海馬が委縮する。これらは、明らかな形態学的異常を伴っている。しかしながら、多くの場合は、微小な形態変化が一部あるものの、主としては機能的変化が起きているようである。脳機能について言えば、その変化は最終的には細胞の興奮性、つまり電気信号の発生やその伝導・伝達メカニズムの変化として表現される。たとえ遺伝子の発現が変化しても、電気信号の変化として現れなければ機能の変化には結びつかないであろう。

ヒトで特に発達している精神機能については、霊長類以外の実験動物でそのメカニズムを解明することは難しい。しかし、幼少期の子供の脳は本能的であり、発生学的に古い脳の機能の影響が大きい。また、ヒトの精神疾患と関連が深い情動も、辺縁系を中心とした古い脳の機能であり、動物実験によく用い

られるげっ歯類でも共通性が高いと考えられる。

これまでの研究では、ラットなどの動物実験により、1) 内外環境からのストレス刺激に対して、青斑核のノルアドレナリンニューロン、室傍核の CRF ニューロン、扁桃体中心核、中脳中心灰白質などが活性化されること、2) 強いストレスが継続すると海馬が委縮すること、3) 快刺激では中脳ドパミン神経系が活性化されること、4) 50dB 程度の騒音が HPA 系を活性化しストレス反応を引き起こすこと、5) 母仔隔離がストレス脆弱性を引き起こすこと、6) 天敵の匂いが不安行動や皮質辺縁系、視床下部、A10 ドパミンニューロン、PAG などの活性化 (c-Fos 発現) を引き起こすこと、7) 植物芳香の吸入が脳内 GABA 含量を増加させ、グルタミン酸含量を減少させること、8) 幼若期の音楽による聴覚エンリッチメントが聴覚野と前帯状回の GluR2 受容体および聴覚野の NR2B NMDA 受容体発現量を増加させること、9) トロイメライ (シューマン作曲ピアノ曲) がラットで聴覚野、SCN、ヒスタミン神経を介して血圧を下げることなどが報告されている。しかし、これらの報告ではニューロンの機能を見ていなかったり、詳細なメカニズムが明らかでないほか、多くは一過性の効果について検討している。また、自然環境音がラットの情動に与える影響などは知られていない。さらに、一般に不快なストレスに対する反応については比較的良く検討されているが、快刺激については、薬物依存や耽溺性の観点からの検討が主で、環境が与える快い刺激についての研究は未だ進んでいない。本研究では、上記のような刺激がラットなどの実験動物の脳に影響しているとの知見を踏まえ、まだ明らかでない環境要因の影響を探ると共に、保育環境を念頭に正および負の環境刺激を幼若期に1週間負荷した時の情動系を中心としたニューロンの機能とその発達に与える影響を、電気生理学的、行動科学的、神経化学的に解析する。これにより、今後の基礎研究やヒトでの応用研究への発展と環境保健政策および予防医薬学推進のための科学的基礎知見を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 母仔隔離: Wistar 系ラットを用い、生後2日目~9日目まで1日4時間母ラットから隔離し、防音庫内で飼育した。この時、仔ラット同志の接触も避けるため、1匹ずつ直径約8cmのカップに入れ、カップ間も約10cm以上離れた。防音庫内は、白熱球により照度を得るとともに、白熱球とヒーターにより室温が28°C~30°Cとなるように自動調節した。また、水道水の自然蒸発により湿度の低下を防止した。母仔隔離時以外は、12時間/12時

間の明暗サイクルで、母ラットと共に通常飼育した。

(2) 白色雑音刺激：生後2日目～9日目まで1日4時間、防音室内にて85dBの白色刺激を与えた。この時、仔ラットは母ラットから隔離されているが、仔ラット同志は1つのケージ内で群飼育した。その他の条件は、母子隔離と同様とした。

(3) 環境音刺激：母子隔離と同時に防音庫内で自然環境音を再生した。この時の音圧は、45～55dBとなるよう、騒音計で測定して調節した。その他の条件は、母子隔離と同様とした。

(4) ニューロンの急性単離：エーテル麻酔下に断頭し、厚さ375～500 μ mの脳スライスを作製した後、31 $^{\circ}$ Cにてプロナーゼ(1mg/8cc)とサーモリジン(1mg/8cc)により酵素処理した。酵素処理後、顕微鏡下に目的の脳部位を眼科用メスで切りだし、微小ピペットを用いて機械的に単離した。細胞外液にはクレブス液を用い、常時95%O₂/5%CO₂を通気した。

(5) パッチクランプ法：急性単離したニューロンにニスタチン穿孔パッチクランプ法を適用し、保持電位-80mVにて全細胞電流を記録した。まず、クレブス液中にてシールを形成後、5mVの脱分極パルスに対するピペット容量を補正し、さらに、膜容量とシリーズ抵抗が一定になったところで、膜電位依存性Na⁺チャンネル電流を測定し、空間固定も良好であることを確認した。GIRKチャンネル電流は、クレブス液中のNaClを一部KClで置換し、K⁺濃度を20mMとした細胞外液中で記録した。グルタミン酸誘発カチオン電流およびGABA誘発Cl⁻電流の記録にも同じ細胞外液を用いた。薬液は、Yチューブ用により投与した。電極内液の組成は、80mM KCl, グルコン酸カリウム70mM, HEPES 10mMでpHは、7.2とした。腹側被蓋野においては、既報に従い、過分極誘発K⁺電流(I_h)が観察されるニューロンをドパミンニューロンとした。

(6) mRNA量の定量：ジエチルエーテル麻酔下にラットを断頭後、速やかに脳を摘出し、氷冷したショ糖リンガー液に1分間浸漬した後、ブレインスライサーを用いて脳切片を作成した。実体顕微鏡下に海馬、または海馬CA1領域をすばやく切り出し、液体窒素にて凍結後、RNA抽出まで-80 $^{\circ}$ Cで保存した。Total RNAは、TRIzol[®] Reagent (Invitrogen)を用い、定法に従って抽出した。iScript[™] cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad)を用い、Total RNA 0.2 μ gからsingle strand

cDNAを合成した。合成したcDNA 1 μ lにラットGIRK2チャンネルまたは5-HT_{1A}受容体に特異的なプライマーとSYBR Green Supermix (Bio-Rad)を加え、Chromo4[™] (Bio-Rad)を用いてリアルタイムPCRを行った。内部標準にはラットGAPDHを用いた。発現レベルの解析は、まずOpticon Monitor Version3.1 (Bio-Rad)を用いてthreshold cycle (Ct)を求め、GIRK2または5-HT_{1A}のスタンダードカーブよりDNA量を算出した。その値をGAPDHのDNA量で補正したものを各サンプルのmRNAレベルとした。

(7) オープンフィールド試験：防音室内で、高さ50cmの壁に覆われた100 \times 100cmのオープンフィールドの中央にラットを入れ、フィールドの中央で高さ2mの位置に設置したCCDカメラを用いてその行動を5分間観察した。自発行動量の解析には、LimeLite2自動追尾システム(ACTIMETRICS社、ウィルメット、イリノイ州、米国)を用い、総行動量、10 \times 10cmのエリアを横切った回数、壁から20cm以上離れたエリアに滞在した時間を測定した。測定開始前には、嗅覚情報によるエラーを防ぐため、必ず70%エタノールでフィールドを拭いて匂いを消去した。

(8) ホールボード試験：縦横50cmで、4辺の角に直径5cmの穴が各1個、合計4個開いた床があり、床上45cm、床下5cmの壁で囲まれたオープンフィールド(図3参照)の中心にラットを入れ、CCDカメラで行動を5分間観察した。自発行動量の解析には、Lime Lite 2自動追尾システムを用い、穴を覗いた回数は、防音室外のモニターを介して目視で計数した。

(9) 高架式十字迷路試験：高さ60cm、走路長90cm、走路幅10cmの高架式十字迷路(アイテック社)を縦横1mのオープンフィールド内に設置し、LimeLite2自動追尾システム(ACTIMETRICS社、ウィルメット、米国)を用いて、オープンアーム滞在時間、オープンアーム侵入回数、クローズドアーム滞在時間、クローズドアーム侵入回数、センタープラットホーム滞在時間を測定した。

(10) 居住者-侵入者試験：床敷を敷いた17 \times 28 \times 12cmの飼育用プラスチックケージに被験ラット(居住者)を1匹ずつ入れ、90分以上環境に馴れさせた後、防音室内で3週齢のWistarラット(侵入者)1匹をケージの中央に入れた。直後より、ケージ上に設置したCCDカメラと防音室外のモニターを介して、被験ラットが侵入ラットに対して最初に攻撃を仕掛けるまでの時間、観察中攻撃行動に費やした総時間、総攻撃回数を10分間計測

した。

4. 研究成果

すでに、母仔隔離により腹側海馬 CA1 錐体ニューロンのセロトニン誘発 GIRK チャンネル電流 (I_{5-HT}) が有意に増強されることを見出していたので、まず、母仔隔離の各種イオン電流に対する影響を検討した。CA1 において、ノルアドレナリン (NA) 誘発 GIRK チャンネル電流 (I_{NA}) は、錐体細胞、非錐体細胞いずれにおいても有意な差はなく、また、日齢による明らかな差も見られなかった。しかし、母仔隔離により NA に応答する割合が錐体ニューロンで 50.0%から 76.5%に増加し、非錐体ニューロンでも 43.8%から 60.9%増加傾向が見られた。一方、グルタミン酸誘発カチオンチャンネル電流 (I_{Glu}) ならびに GABA 誘発 Cl 電流 (I_{GABA}) は、電流密度、応答率ともに有意な影響を受けず、 I_{Glu} と I_{GABA} の比も影響されなかった。

NA ニューロンの起始核である青斑核においては、 I_{NA} 、 I_{Glu} 、 I_{GABA} 、 I_{Glu}/I_{GABA} いずれも影響されなかった。中脳-辺縁系ドパミン (DA) ニューロンの起始核である腹側被蓋野 (VTA) の DA ニューロンにおいては、バクロフェン誘発 GIRK チャンネル電流 (I_{Bac})、 I_{GABA} と I_{Glu}/I_{GABA} に響がみられなかったものの、DA 誘発 GIRK チャンネル電流 (I_{DA}) の電流密度が 2.12 ± 0.57 pA/pF から 0.90 ± 0.19 pA/pF に有意に減少し、 I_{Glu} も 16.33 ± 2.17 pA/pF から 10.75 ± 1.29 pA/pF に有意に減少した。DA に対する応答率は、87.5%から 70.6%に減少傾向を示し、Glu に対しては、いずれも 100%の応答率を示した。

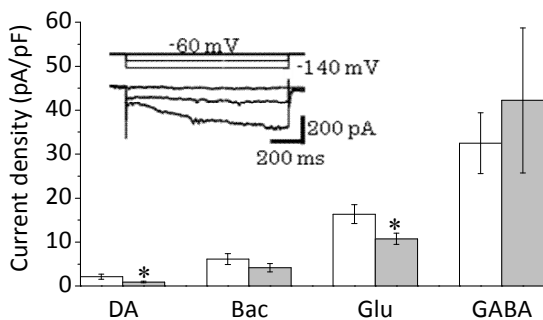


図 1 VTA DA ニューロンにおける $DA10^{-6}M$ 、 $Bac10^{-4}M$ 、 $Glu10^{-4}M$ 、 $GABA10^{-5}M$ 誘発電流の電流密度に対する母仔隔離の影響。白：コントロール、灰：母仔隔離、*： $p < 0.05$ 。挿入図は、過分極活性化 K^+ 電流を示す。

母仔隔離が海馬の $GIRK2$ mRNA レベルに与える影響については、以前減少する結果を得ていたが、再度検討した結果、今回も母仔隔離により 7.31 ± 0.28 (コントロール群) から 6.24 ± 0.37 に有意に減少していた。そこで、海馬の $5-HT_{1A}$ 受容体 mRNA レベルについて検

討した結果、有意な差は見られなかった。しかしこれらの結果は、電気生理学的影響がみられた腹側海馬 CA1 領域に限ったものではないため、さらに同領域に限って mRNA 発現レベルを検討した。その結果、 $GIRK2$ 、 $5-HT_{1A}$ いずれも有意な差は確認されなかった。このことは、母仔隔離の影響が遺伝子発現レベルではなく、タンパク質の機能的調節機構に影響する可能性を示すものと考えられる。

白色雑音暴露では、腹側海馬 CA1 錐体ニューロンで I_{5-HT} の電流密度減少が期待されたが、電流密度には影響せず、応答率が 81.0%から 55.6%に減少した。また、 I_{Bac} も電流密度に影響されないものの応答率がセロトニンとは逆に 44.4%から 76.0%に大幅に増加した。一方、 I_{GABA} は 54.8 ± 10.8 pA/pF から 36.2 ± 3.7 pA/pF に有意に減少した。アデノシン (Ado) 誘発 GIRK チャンネル電流 (I_{Ado}) は、 1.29 ± 0.58 pA/pF から 2.78 ± 0.65 pA/pF に増加したが、有意差は見られなかった。今後コントロールの例数を増やして有意差の有無を確認する必要がある。 I_{NA} と I_{Glu} は、電流密度、応答率ともに影響を受けず、 I_{Glu}/I_{GABA} も影響されなかった。

青斑核では、 I_{Glu} が 20.87 ± 1.64 pA/pF から 14.58 ± 2.33 pA/pF に有意に減少し、 I_{Glu}/I_{GABA} も 0.80 ± 0.19 から 0.44 ± 0.06 に有意に減少した。Glu の応答率は 100%で変わらなかった。興味深いことに、コントロールではセロトニンの応答率が 0 (n=8) であったが、白色雑音暴露群では 14 例中 3 例 (21.43%) で応答が見られた。今後例数を増やして確認する必要がある。 I_{NA} と I_{GABA} は、電流密度、応答率ともに影響を受けなかった。

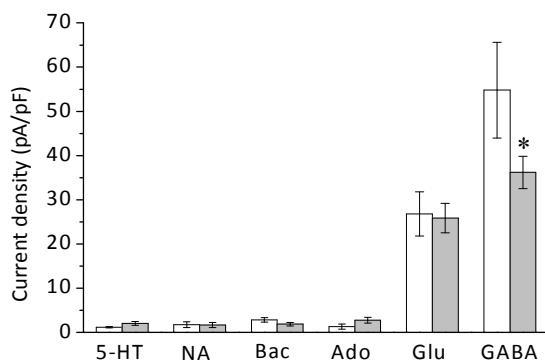


図 2 腹側海馬 CA1 錐体ニューロンにおける $5-HT10^{-7}M$ 、 $NA10^{-6}M$ 、 $Bac10^{-4}M$ 、 $Glu10^{-4}M$ 、 $GABA10^{-5}M$ 誘発電流の電流密度に対する白色雑音暴露の影響。白：コントロール、灰：母仔隔離、*： $p < 0.05$ 。

母仔隔離が動物の行動に与える影響を調べるため、生後 1 ヶ月齢でオープンフィールド試験、高架式十字迷路試験、ホールボード

試験、居住者-侵入者試験を6カ月齢でオープンフィールド試験と高架式十字迷路試験を、12ヶ月齢でホールボード試験を、20ヶ月齢で高架式十字迷路試験をおこなった。1ヶ月齢では、居住者-侵入者試験で、コントロール群と比べ攻撃性が増加している傾向を示した。6ヶ月齢と12ヶ月齢では、有意な影響は見られなかった。20ヶ月齢では、オープンアームから落下し、観察が中止になる個体が母仔隔離群で多く見られた。このことは、意識レベル、注意力あるいは不安レベルの低下、または筋力や平衡感覚などの低下を示しているかもしれない。攻撃性の増加が成長のどの段階まで継続するか今後検討する必要がある。

白色雑音暴露の影響は、生後1ヶ月齢で、高架式十字迷路試験とホールボード試験、生後12ヶ月齢でホールボード試験により検討した。その結果、生後1ヶ月齢において、ホールボード試験の穴覗き行動が増加し、観察フィールドの中心エリアを横切る回数、中心エリアでの滞在時間も増加した。高架式十字迷路試験では有意な差は見られなかった。このことは、不安全感ではなく、特定の不安が減弱することを示唆している。ところが、ホールボード試験への影響は、生後12ヶ月齢では見られなかった。影響が一過的なものか今後検討する必要がある。また、白色雑音暴露群も母仔隔離群と同様に、仔ラットの気性が荒く、その影響が継続するように感じている。今後、居住者-侵入者試験で確認する必要がある。

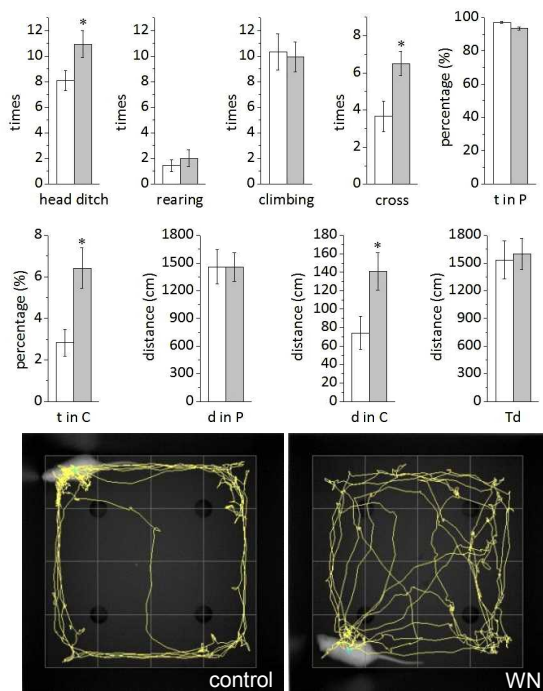


図3 生後1ヶ月齢のホールボード試験に対する白色雑音暴露の影響。白：コントロール、

灰：白色雑音暴露、cross:周辺領域と中心領域の境界を交差した回数、t in P:周辺領域にいた時間、t in C:中心領域にいた時間、d in P:周辺領域内を移動した距離、d in C:中心領域内を移動した距離、Td:総移動距離、WN:白色雑音暴露群、*: p < 0.05。

興味深いことに、正の環境要因として母仔隔離時に小鳥のさえずりと小川のせせらぎ音をランダムに自然環境音として聞かせたところ、母仔隔離により腹側海馬CA1錐体ニューロンで観察されていた I_{5-HT} 電流密度の減少が見られなくなった。セロトニンの応答率は、母仔隔離群と同様コントロール群に比べて減少傾向がみられた。また、海馬におけるGIRK2mRNA発現レベルも母仔隔離群と同様有意に減少していた。

さらに、腹側被蓋DAニューロンで観察された I_{DA} および I_{Glu} の減少も観察されなくなった。また、DAに応答する応答率の減少も見られなかった。

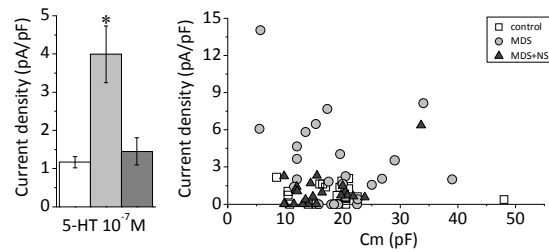


図4 腹側海馬CA1錐体ニューロンの I_{5-HT} に対する母仔隔離の影響と自然環境音によるその保護効果。MDS:母仔隔離、NS:自然環境音、Cm:膜容量、*: p < 0.05。

自然環境音の効果は、生後1ヶ月齢のオープンフィールド試験と高架式十字迷路試験には影響を与えなかった。今後、居住者-侵入者試験に対する影響を検討する必要がある。

以上、本知見は、軽度から中程度以下と考えられる2つの精神的ストレス環境要因が、急性単離中枢ニューロンに対して異なる影響を与えることを示し、生後の生活環境が脳機能に及ぼす影響について単一ニューロンレベルから詳細に検討する手がかりを提供する。また、脳機能保護性の環境因子として、自然環境中の環境音が動物実験レベルで明確に抽出され、記憶学習や情動に関わる海馬CA1錐体ニューロンと快楽・喜びやうつと関わるVTAのDAニューロンに対する障害性環境要因の影響を保護することが明らかにできたことは特に重要で、意義が大きい。今後さらなる詳細な検討が期待される。

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）

〔学会発表〕（計2件）

- ① Tetsuya Shirasaki, Ryota Hamasaki, Fumio Soeda, Kazuo Takahama. Effects of early life stress on ionic currents in the CNS neurons and neuro-behaviors and its attenuation by natural sounds. Neuroscience 2012 2012.10.13 - 17 New Orleans USA Ernest N. Morial Convention Center.
- ② Tetsuya Shirasaki, Ahmed M. Shehata, Fumio Soeda, Kazuo Takahama. Maternal isolation affects function of GIRK channels in neurons of the hippocampus but not the raphe nucleus. Neuroscience 2010 2010.10.13 - 17 San Diego USA San Diego Convention Center

6. 研究組織

(1) 研究代表者

白崎 哲哉 (SHIRASAKI TETSUYA)

熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授
研究者番号：30264047

(2) 研究分担者

高濱 和夫 (TAKAHAMA KAZUO)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授
研究者番号：80150548

副田 二三夫 (SOEDA FUMIO)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教
研究者番号：10336216