

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25463160

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中枢神経系、特に視床下部の機能

研究課題名(英文) Effects of repeated immobilization stress in the early postnatal period on central nervous system, especially the hypothalamus in adult rats

研究代表者

吉原 俊博 (Yoshihara, Toshihiro)

北海道大学・歯学研究科(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) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、幼少期に身体抑制ストレスを経験したラットがどのように成長し、成長後のストレス反応のメカニズムや特徴を考察し、さらに生活リズム、摂食行動、生殖機能に關与する中枢神経系の機能を神経内分泌学的、分子生物学的手法などを用いて調べる。幼少期に身体抑制ストレスを経験したラット群は対照群に比較して、体重、摂食量、成長ホルモン量、いずれも有意に少なかった。また幼少期に身体抑制ストレスを経験したラット群は対象群に比較して、有意にストレス反応が大きかった。以上の結果より、身体抑制ストレスを受ける時期や程度により、成長及びHPA axis反応性が異なることが示唆された。

研究成果の概要(英文)： Effects of repeated restraint stress in the early postnatal period were examined on the growth of the developing rats and responsibility of the HPA axis to the subsequent novel stress in adulthood.

Repeated restraint stress in the early postnatal period induced long-term effects on growth of developing rats and stress responsibility of the HPA axis to the novel stress in adulthood.

研究分野：小児歯科学

キーワード：中枢神経 ストレス 身体抑制

### 1. 研究開始当初の背景

保護者や歯科スタッフの手を用いても抑制できない重度の非協力的小児に対する歯科治療において、レストレーナーなどの抑制具を使用する身体抑制法は、患児にとって不快な経験となりその後の脱感作に苦慮する、抑制具による身体的外傷、全身疾患(特に循環器系)への悪影響などの理由のため、可能な限り用いるべきではないとされている。

幼少期のストレスは動物に対して、ストレスを受けた時期だけではなく、その後、長期にわたり中枢神経系に様々な影響を与えることが報告されている。我々は幼少期に母子分離や身体抑制のストレスを受けたラットは成長後、視床下部-下垂体-副腎皮質系(以下、HPA axis)が通常より大きなストレス反応を示すことを報告した。

### 2. 研究の目的

本研究では、幼少期に身体抑制ストレスを経験したラットがどのように成長し、成長後のストレス反応のメカニズムや特徴を考察し、さらに生活リズム、摂食行動、生殖機能に関与する中枢神経系の機能を神経内分泌学的、分子生物学的手法などを用いて調べ、その背景にあるメカニズムを考察する。

### 3. 研究の方法

#### 【研究1】

生後1週齢時に1日1回30分の身体抑制を1回(1日)行う群(A群)・生後1週齢時に1日1回30分の身体抑制を7回(7日)行う群(B群)・生後3週齢時に1日1回30分の身体抑制を1回(1日)行う群(C群)・生後3週齢時に1日1回30分の身体抑制を7回(7日)行う群(D群)・対照群(身体抑制を一切経験しない群)について、以下の実験を行った。

#### 研究1-1)

「幼少期身体抑制ストレスの成長に対する影響について」

3か月間にわたり、体重、摂食量の測定、血漿中の成長ホルモン量の測定を行った。幼少期身体抑制ストレスが成長(体重変化)摂食量、成長にどのように影響しているか、5群間で比較検討した。

#### (研究1-2)

「幼少期身体抑制ストレスを受ける時期や程

度が成長後のHPA axisのストレス反応性に対する影響について」出生から3か月後に新規環境変化ストレスを負荷し、経時的に血漿中のコルチコステロン量を測定した。

#### 【研究2】

#### (研究2-1)

「上行性カテコールアミンニューロンのCRH産生分泌促進機能について」

幼少期に身体抑制を行い、成長後に新規環境ストレスを負荷し、in vivo micridialysisにより灌流液を採取し、カテコールアミン量を高速液体クロマトグラフィーにより測定した。さらに実験終了後、各ラットを断頭し、凍結マイクロームを用いて、室傍核を含む連続切片を作製し、in situ hybridizationによりCRH mRNAの発現を定量化した。

#### (研究2-2)

「視床下部視交叉上核の時計遺伝子発現について」

幼少期に身体抑制ストレスを与えた3か月後の正午に、各ラットを断頭し直ちに脳を採取し、-80℃にて保存し、凍結マイクロームを用いて、SCNを含む凍結切片を作製し、in situ hybridizationにより時計遺伝子(per2)の発現を検出し定量化することにより、幼少期身体抑制ストレスが成長後のラット時計遺伝子(per2)の発現にどのように影響しているか、検討した。

#### 【研究3】

#### (研究3-1)

「幼少期身体抑制ストレスが成長後の睡眠行動や摂食行動に対する影響について」

幼少期に身体抑制ストレスを与えた3か月後に、行動量(明期の睡眠と暗期の摂食行動)テレメーターシステムにより測定した。テレメーターシステムは超小型センサーを備えた送信器をラット体内に埋め込み、受信器の上に飼育ケージを置き、長時間にわたり行動量を収録するシステムである。

#### (研究3-2)

「幼少期身体抑制ストレスが成長後の生殖機能に対する影響について」幼少期に身体抑制ストレスを与えた3か月後に、視床下部内側視索前野における性腺刺激ホルモン放出ホルモンの濃度を測定した。

### 4. 研究成果

#### 【研究1】

B 群は対照群に比較して、体重、摂食量、成長ホルモン量、いずれも有意に少なかった。A 群、C 群、D 群は対照群とは有意差がなかった。幼少期の身体抑制は摂食量や成長ホルモン分泌に影響し、これには中枢神経系(脳下垂体-視床下部)が関与していることが示唆された。

#### 【研究 2】

1. 幼少期に身体抑制を行い、成長後に新規環境ストレスを負荷したラット室傍核のカテコールアミンおよび CRHmRNA 発現量は対象群に比較して、有意に上昇していた。幼少期の身体抑制は中枢神経系(脳下垂体-視床下部-副腎皮質) axis の調節に関与することが示唆された。

2. 幼少期に身体抑制を行い、成長後に新規環境ストレスを負荷したラットの時計遺伝子(per2)の発現量は対象群に比較して、有意な差はなかった。幼少期の身体抑制は視床下部視交叉上核には影響を与えないことが示唆された。

#### 【研究 3】

1. 幼少期に身体抑制を経験したラットは成長後、睡眠時間がフリーランする傾向にあり、一定かつ十分な睡眠ではなかった。摂食行動については、明期にも摂食が見られ、摂食時間の乱れがあった。以上より、幼少期に身体抑制を経験したラットは成長後の生活習慣の乱れが起きている可能性が示唆された。

2. 幼少期に身体抑制を経験したラットは成長後、性腺刺激ホルモン放出ホルモンの濃度が低く、ホルモン合成能が低下している可能性が示された。

#### 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)

##### 〔雑誌論文〕(計 2 件)

Toshihiro Yoshihara, Yasutaka Yawaka  
The ventral ascending noradrenergic bundles are involved in the stress response to immobilization.  
Journal of Behavioral and Brain Science  
査読有

Vol.5 No.3: 88-95, Mar 2015

DOI: [10.4236/jbbs.2015.53008](https://doi.org/10.4236/jbbs.2015.53008)

Toshihiro Yoshihara, Yasutaka Yawaka

Restricted daily feeding of liquid meal reduces the motivation of rats to get food.  
Journal of Behavioral and Brain Science  
査読有

Vol.5 No.4: 130-136, April 2015

DOI: [10.4236/jbbs.2015.54013](https://doi.org/10.4236/jbbs.2015.54013)

〔学会発表〕(計 2 件)

北村 かおる, 吉原 俊博, 星野 恵, 大島 昇平, 種市 梨紗, 八若 保孝

小児の歯科診療における RR 間隔変動解析を用いた自律神経機能の評価

第 32 回日本障害者歯科学会総会および学術大会(名古屋) 2015, 11月6 - 8 日

K. Kitamura, T. Yosihara, Y. Yawaka

Autonomic Nervous System (ans) Reactions During Dental Treatments

45<sup>th</sup> Annual Meeting & Exhibition of AADR (LOS ANGELES CALIF), 2016, 3月16 -19 日

〔図書〕(計 0 件) 00

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

なし

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

吉原 俊博 (YOSHIHARA TOSHIHIRO)

北海道大学歯学研究科・准教授

研究者番号: 60261319

(2)研究分担者

大島 昇平 (OSHIMA SHOHEI)

北海道大学病院・講師

研究者番号: 00374546

菊入 崇 (KIKUURI TAKASHI)

北海道大学歯学研究科・助教

研究者番号: 10322819

高崎 千尋 (TAKASAKI CHIHIRO)  
北海道大学歯学研究科・助教  
研究者番号：60451449

(3)連携研究者  
なし