

令和 5 年 6 月 29 日現在

機関番号：72101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K03488

研究課題名(和文) 幼若期におけるストレス脆弱性の発症と快情動による修復機序の解明

研究課題名(英文) THE NEURAL AND BEHAVIORAL EFFECTS UNDERLYING POSITIVE EMOTION ON STRESS
VULNERABILITY 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・その他部局等・特任主席研究員

研究者番号：90399329

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：行動解析手法や生物学的手法を用いて、離乳後のラットにおける快情動の神経メカニズムを検証した。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、幼若期急性ストレスや、社会隔離飼育による慢性ストレスを原因とするいくつかの行動変容を改善させた。一方、腸-脳相関を解析したところ、社会隔離飼育によって変化した腸内細菌叢がみられたが、tickling刺激によって適正化されることが示唆された。結論として、幼若期において他個体との相互作用を伴う遊び行動が、成体後のストレス脆弱性を改善する効果があることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

発達期のストレスの受容によって、ストレス脆弱性が増加するが、陽性情動によりそれらは緩和されると考える。本研究の推進により、他個体との相互作用でもたらされる陽性情動が心身に及ぼす効果を科学的に明らかにすることができれば、陽性情動を喚起する良好な幼少期の環境や人間関係の重要性についての科学的根拠を提供することになる。さらに、薬だけに頼らない医療(ケア)の根源的な役割や、予防医学の重要性、新しい科学的根拠に基づく青少年の健全な教育学等へ応用・展開し、社会へ波及できる。

研究成果の概要(英文)：We examined the neural mechanisms underlying positive affective behaviors in post-weaning rats using behavioral and biological analysis methods. Tickling stimulation, modeled after rough and tumble play among rat pups, improved several behavioral alterations caused by acute stress during early development or chronic stress resulting from social isolation. On the other hand, analysis of the gut-brain correlation revealed altered gut microbiota due to social isolation, which was suggested to be normalized through tickling stimulation. In conclusion, interactive play behavior involving social interactions during early development demonstrated the ability to improve stress vulnerability in adulthood.

研究分野：社会脳

キーワード：快情動 幼少期ストレス ストレス脆弱性 超音波音声 扁桃体 レジリンス 向社会性

1. 研究開始当初の背景

幼少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・犯罪などの社会的問題行動の要因となっていることが指摘されている。Yule W らの研究では、幼少期の環境要因がストレス脆弱性の形成に関与し、成長後の心身の脆弱さや心的外傷後ストレス障害 (PTSD) の基盤となることを指摘している (Yule W, et al. 2001)。

一方で、ストレスが心身に悪影響を与える仕組みとして、ストレスへの適応やストレスからの回復に対する障害が指摘されており、近年、アンガーマネジメント、ストレスレジリエンスの重要性が注目されている。さらに、ポジティブ心理学で提唱されているように、ポジティブ感情を育むことが、ウェルビーイングを高めることに効果的であり (Seligman & Csikszentmihalyi, 2000)、その神経基盤の早急な解明が期待されている。

ストレスレジリエンスの獲得という点で、母子間の絆形成の役割・重要性が脳科学的側面から指摘されている (Mogi M, et al. 2014)。また、Gordon N S らの研究によって遊びの効果が分子レベルで実証され (Gordon N S, et al. 2003)、遊びの有効性も脳科学的側面からアプローチされている。このような背景から、仲間との遊びから得られるポジティブ感情や向社会性が、ストレスレジリエンスに関連すると推察できるが、そのメカニズムは未だ明らかにされていない。

2. 研究の目的

幼少期に受けるストレスは、ストレス脆弱性発症の要因となる。これまでの申請者らの研究から、幼少期の隔離ストレスによって引き起こされる脆弱性は、快情動の喚起によって、ストレスレジリエンス力を高め修復されることを見出した。さらに、各脳部位の遺伝子発現解析により、快情動によるストレスレジリエンスの獲得は、扁桃体のエピジェネティクス変化を経て修復されるという仮説に至った。

本研究の目的は、離乳後のストレス負荷により発症する成体期のストレス脆弱性に対して、快情動の喚起がもたらす修復機序、すなわちストレスレジリエンス獲得の神経メカニズムを解明することである。

これらの神経基盤や細胞レベルの詳細な解析には動物モデルの作製が欠かせないが、申請者らの研究の独自性は、動物が発声する超音波を測定することにより快情動 (50kHz 超音波) を確実に検出できることである。さらに、ストレスに対する快情動の有効性を詳細な行動分析と分子生物学的解析を用いて捉えることである。

本研究の推進により、ポジティブ感情が心身に及ぼす効果を科学的に明らかにすることができれば、良好な幼少期の環境や人間関係の重要性についての科学的根拠を提供することになる。さらに、薬だけに頼らない、医療 (ケア) の根源的な役割や予防医学の重要性、新しい科学的根拠に基づく青少年の健全な教育学等へ応用・展開し、社会へ波及できる。

上述の目的を達成するために、離乳後にストレスを負荷した仔ラットに、成体になるまで持続的に快情動を喚起させたモデル動物を作成し、以下2点に着目して検証する。

成体期の社会性へ与える影響

幼若期の環境が、成体期の社会行動、社会的および非社会的記憶能力に及ぼす影響について分析し、ストレスと向社会性との関連を探る。

ストレス応答としての腸内細菌叢の解析

申請者らはこれまでの研究から、幼若期の快情動を喚起する経験が、ストレス耐性の獲得や恐怖記憶の消去に重要な役割を果たし、その脳基盤として扁桃体の微少環境の変容を引き起こす可能性を見出した。「腸内細菌-腸-脳」相関は、ストレスと関連している。ストレスが腸内細菌を変化させ、腸内環境の乱れを引き起こし、その乱れは腸-脳軸を介し、脳のストレス応答や情動に影響することが示唆されている。また、腸内細菌が視床下部-下垂体-副腎軸 (HPA 軸) の発達に関与し、腸内情報が脳機能に影響する。これらから、腸内細菌-腸-脳相関はストレス応答で重要な役割を示しているといえる。本研究では、幼少期ストレスも HPA 軸に長期的な影響を与えることからストレス脆弱性に対する腸-脳軸の関連を検証する。

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。tickling 刺激は既報 (Hori, et al. 2009) の手法で行った。この tickling 刺激は 1 回/日実施する。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および超音波解析装置を用いて、tickling 刺激中や行動解析中にラットの発声を解析するを用いて周波数成分の解析により 22kHz, 50kHz 音声を検出して行った。22kHz 音声は不快な情動の指標であり、50kHz 音声は快情動の指標である。また、刺激の報酬特性は、tickling 刺激後での接近潜時(最大 30 秒)を測定して評価した。

(3) 初期生育環境が成長後の社会行動や情動の発達に及ぼす影響

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 匹ずつに 1 つのケージ内で飼育した。集団飼育群 (G 群), 隔離飼育群 (S 群), 隔離育/快情動喚起群 (T 群) を設けた。幼若期仔ラットの遊び刺激として, T 群のラットに対して幼若期フットショック直後とその後成体になるまでの tickling 刺激を行った。成体期の各実験は 4 週間の tickling 刺激終了後, さらに 4 週間の通常飼育を行い 80 日齢以降に開始した。

幼若期急性ストレス負荷

ラットを装置に 5 分入れた後, フットショック (0.5mA, 2 秒) を 30 秒ごとに 5 回与えた。5 回目のフットショックから 30 秒後にラットを装置から取り出し tickling 刺激箱に入れた。このフットショックを 3 日間繰り返した。

オープンフィールド課題

オープンフィールド (90×90×30cm) 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 回数, rearing 回数を解析した

個体間の社会相互作用に及ぼす影響

各群のラットと, 集団飼育で飼育された新奇のラット (体重差のない) を 2 個体/組で 3 チャンバー装置を用いて個体間の相互作用を検証した。sniffing 行動を指標としての相互作用総述べ時間を定量・数値化し評価した。具体的には, 装置馴化の後, 3 チャンバー装置の両端に金網の円筒を設置し, 一方には新奇のラットを一方には空の円筒を置き, 実験個体を自由に探索させ, 上部の web カメラにより撮影を行った。

社会的および非社会的記憶能力に及ぼす影響

本実験では, 黒色塩化ビニール製の円形のオープンフィールドを実験時のアリーナとして用い, 3 日間の装置馴化の後に実施した。各実験は上部の web カメラで撮影した。

・物体再認課題: 2 種類および 4 種類の自発的再認課題を成体期で行った。自発的物体再認課題は, ラットが既知の物体よりも新奇な物体の方をより長く探索する傾向を用いて, ラットの物体記憶を評価する課題である。物体は様々な素材でできた物体 (高さ 7~15 cm) を用いた。

・社会的再認課題: 物体再確認課題の物体に替えて上述の 3 チャンバー装置で使用した円筒に同種他個体を提示することで, ラットが既知の個体と新奇な個体を弁別できるかどうかを評価した。

これらの再認課題は, 見本期とテスト期から構成される。具体的に見本期では, 円形のオープンフィールド (直径 80cm, 高さ 30cm) 内に複数 (2 および 4 個) の物体あるいは他個体を配置し, 被験体のラットを装置内に入れ, 5 分間自由に探索させる。5 分間の遅延の後, テスト期を行う。テスト期では, 見本期と同様にラットに 5 分間装置内を探索させるが, 配置されている物体あるいは他個体のうちの 1 つが新奇なものに置き換えられる。このとき, ラットがそれぞれの物体あるいは個体を探索する時間を測定し, ラットの物体あるいは社会的記憶能力 (記憶容量) を評価した。

恐怖条件付けによる消去反応に及ぼす効果

音刺激を CS (10-kHz, 65dB), foot-shock を US とした恐怖条件づけを行い, 翌日より消去装置において, 音提示 (CS) に対するフリージング反応を指標に, 消去を検証した。実験では US (0.5mA, 2 秒, 5 回) を条件とした。消去は, ラットを装置に入れてから 120 秒ごとに 30 秒の音提示 (10kHz, 65dB) を 2 回行い, 2 回目の音提示から 120 秒後にラットを装置から取り出し飼育箱に戻した (計 7 分間)。

(4) ストレス応答としての遺腸内細菌叢の解析

本実験用に, 別の動物を用いて行動解析実施時期に採血と糞の採取を行った。腸内細菌叢は,

NGS による 16SrRNA アンプリコン・シーケンス法を用いて解析を行った。

4. 研究成果

(1) 幼若期急性ストレス負荷が幼若期の快情動表出に及ぼす影響

すべてのラットにおいて、フットショック直後の tickling 刺激および飼育期間中の全 tickling 刺激中に 50kHz の音声表出が観察された。また、tickling 刺激後での接近潜時の解析により tickling 刺激の報酬特性が確認された。

(2) 初期生育環境が成長後の社会行動や情動の発達に及ぼす影響

個体間の社会相互作用に及ぼす影響

本実験では、新奇他個体が入った円筒への sniffing の述べ時間を、空の円筒への sniffing 時間の比率で解析した。その結果、群間で有意な差がみられた。特に tickling 群とグループ飼育群は、個別飼育群と比較して有意に長い sniffing 時間だった。このことは、個別飼育による新奇個体への向社会的性が低下し、tickling による快情動の喚起によってその弊害が解消されることを示唆する結果と言える。

社会的および非社会的記憶能力に及ぼす影響

・物体再認課題

本実験において、2種類の物体を用いたテストでは、新奇物体に対する sniffing による探索時間に差がみられなかったが、さらに複雑な4種類の物体を用いたテストでは、群間で有意な差がみられた。このことは、幼少期の飼育環境によって記憶能力に影響を及ぼす可能性を示唆する結果となった。

・社会的再認課題

本実験において、2個体を用いたテストでは、全ての群において新奇物体に対する sniffing による探索時間に差がみられなかったが、さらに複雑な4個体を用いたテストでは、群間で有意な差がみられた。このことは、幼少期の飼育環境によって社会的認知能力に影響を及ぼす可能性を示唆する結果となった。

恐怖条件づけによる消去反応に及ぼす効果

本実験では、音提示後のフリージング率を消去反応の指標として使用した。結果として、音提示後のフリージング率には日にちと群の交互作用が見られた。さらに、群による有意な差も観察され、特にT群はS群とG群よりも低いフリージング率を示した。

この結果は、幼少期の快情動の喚起が成体期のストレス脆弱性に影響を与える可能性を示している。具体的には、幼若期ストレスや社会隔離飼育による慢性ストレスによって引き起こされるストレス応答を軽減することができることである。

このことは、幼少期の環境や経験が成体のストレス応答に及ぼす影響を理解する上で貴重な示唆を与える。また、快情動の喚起を通じてストレス脆弱性を改善する可能性があることは、ストレス関連の疾患や精神障害の治療や予防において新たなアプローチを提供する可能性を示す。

(3) ストレス応答としての遺腸内細菌叢の解析

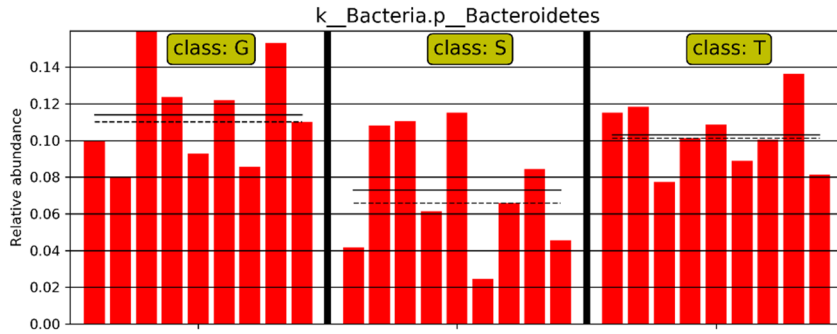
「腸内細菌-腸-脳」相関は、ストレスと密接に関連している。ストレスは腸内細菌の組成や活動を変化させ、腸内環境の乱れを引き起こす可能性がある。この乱れは、腸-脳軸を介して脳に信号を送り、ストレス応答や情動の制御に影響を与えることが示唆されている。また、腸内細菌のバランスの乱れは炎症反応を引き起こし、神経伝達物質やストレス関連ホルモンの産生にも影響を及ぼすことがわかっている。さらに、腸内細菌が視床下部-下垂体-副腎軸（HPA 軸）の発達にかかわる可能性も報告されており、腸内細菌に由来する腸内情報が中枢に伝達されて脳機能に影響を及ぼすことが報告されている。

これらの知見から、腸内細菌-腸-脳相関はストレス応答において重要な役割を果たしていることが示唆される。また、母子分離による幼少期ストレスは HPA 軸を介して長期的な影響を及ぼすことが報告されている。

本研究では、個別飼育群と集団飼育群で異なる腸内細菌叢が存在し、個別飼育群で増減したそれぞれの細菌叢が tickling 刺激により集団飼育群に近づく複数の細菌叢が存在することが明らかになった（図）。つまり、幼少期ストレスによる腸内細菌叢の変化は、幼少期に快情動を喚起することで修復できる可能性が示されたのである。

今後、さらなる解析を行い、幼少期ストレスによって特異的に変化する腸内細菌叢と快情動によって回復される腸内細菌叢を特定し、快情動が関与する「腸内細菌-腸-脳」相関を確定することが求められる。

(図)



幼少期に受けるストレスは、ストレス脆弱性発症の要因となる。本研究では、そのストレス脆弱性が、幼少期に遊びをモデルにした tickling 刺激による快情動を喚起することで改善される可能性を見出した。しかしながら、本実験における結果は特定の条件下で得られたものであり、他の要因が結果に影響を与える可能性もあることから、さらなる研究や追加の実験が必要である。

総じて、本実験の結果は幼少期の快情動の喚起が成体後のストレス脆弱性を改善する効果があることを示しており、ストレス応答の制御や精神的健康の向上に向けた新たな展望を提供する結果となった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 M Hori, E Yoshikawa, D Hayama, S Sakamoto, T Okada, Y Sakai, H Fujiwara, K Takayanagi, K Murakami, J Ohnishi	4. 巻 13
2. 論文標題 Sense of Coherence as a Mediator in the Association between Empathy and Moods in Healthcare Professionals: the Moderating Effect of Age	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers Psychology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fpsyg.2022.847381	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Rie Shimoju, Hideshi Shibata, Miyo Hori, Mieko Kurosawa	4. 巻 70(1):41
2. 論文標題 Stroking stimulation of the skin elicits 50-kHz ultrasonic vocalizations in young adult rats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Physiol Sci .	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12576-020-00770-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 M. Hori, M. Toyoshima, R. Tachihara, K. Igarashi, Y. Ichitani, K. Yamada
2. 発表標題 THE NEURAL AND BEHAVIORAL EFFECTS UNDERLYING POSITIVE EMOTION ON STRESS VULNERABILITY IN ADOLESCENT RATS.
3. 学会等名 11th IBRO World Congress of Neuroscience（国際学会）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<https://mind-gene.com/>

<https://www.facebook.com/mindgene.murakami/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	村上 和雄 (Murakami Kazuo) (70110517)	公益財団法人国際科学振興財団・その他部局等・主席研究員 (72101)	
研究分担者	山田 一夫 (Yamada Kazuo) (30282312)	筑波大学・人間系・教授 (12102)	
研究分担者	大西 淳之 (Ohnishi Junji) (40261276)	東京家政大学・家政学部・教授 (32647)	
研究分担者	一谷 幸男 (Ichitani Yukio) (80176289)	東京成徳大学・応用心理学部・教授 (32521)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	坂本 成子 (Sakamoto Shigeko)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	仙波 恵美子 (Senba Emiko)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関