

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16633

研究課題名（和文）社会的隔離および親との接触の認識に関わる脳領域の解明

研究課題名（英文）Research of the brain region associated with recognition of social isolation and contact with parents

研究代表者

倉地 卓将（Kurachi, Takuma）

国立研究開発法人理化学研究所・脳神経科学研究センター・研究員

研究者番号：10836662

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の結果から、コモンマーマセットにおいて親哺育と人工哺育では恐怖刺激に対する反応が異なること、新生児において親から隔離すると翌日には鳴き声が減少すること、juvenile個体で同様に親から隔離した2日後に再会させると遊び行動のような向社会性行動が増加し海馬台が活性化することなどが明らかとなった。以上の結果から、自身の社会的状況の認識に海馬台が関わっており、その状況認識が成長後まで影響を及ぼしている可能性が示唆された。新生児においては隔離・再会を認識する脳部位の解明までは至れなかったが、今後の研究でjuvenileとの活性化部位の比較を行う予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

虐待やネグレクトなどの不適切な養育が思春期以降の鬱や自殺、犯罪などのリスク増大につながることはよく知られている。人間以外の哺乳類でも幼少期の社会的隔離はストレス感受性の増大や探索行動の減少、恐怖反応の増大、社会行動の異常などを引き起こす。しかし、社会的隔離が子の脳でどのように感知され、どのように成長後の行動に影響するのかは分かっていなかった。本研究の成果から、その機構の一部を解明することができた。さらに研究が進むことで虐待やネグレクトによる負の影響を除去するためのより効果的なケアの開発に貢献できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：We showed fear response was different between artificial and parental rearing, infants decreased calling after 1 day isolation from parents, juveniles increased prosocial behaviors such as social play and subiculum activated by reunion with parents after 2 days isolation. Therefore, it was suggested subiculum was associated with the recognition of contact with parents and the recognition affected after growing. We could not reveal the brain region associated with social isolation and/or reunion with parents in infants. We intend to compare brain activation between infant and juvenile in the near future.

研究分野：行動学

キーワード：親子関係 脳神経 行動 霊長類

### 1. 研究開始当初の背景

虐待やネグレクトなどの不適切な養育環境は、思春期以降の鬱や自殺、犯罪などのリスクを増加させることが知られている。人間以外の哺乳類においても、幼少期に親から隔離すると成長後のストレス感受性の増加、探索行動の減少、恐怖反応の増大、社会行動の異常などが引き起こされる(黒田, 2004; 大村&黒田, 2018; 村山&黒田, 2019)。しかし、幼少期の隔離が子の脳でどのように感知され、またどのように行動・生理的变化を制御する脳部位に影響するのかは明らかになっていなかった。

コモンマーモセットは人間同様に一夫一妻で繁殖し、家族が協力して子を背負うなどの子育てを行うなど、人間に近い養育行動を示す。また、人工哺育新生児と親哺育新生児では行動観察の結果が異なることが申請者の所属研究室における先行研究から明らかとなっている(Yano et al. under submission)。

上記の理由から、申請者はマーモセットを対象として幼少期に親からの隔離実験を行うことで、子供が親からの隔離・接触を認識している脳部位を明らかとすることを考案した。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、新生児期に親から隔離および隔離後に再接触させる処置を行うことで、親からの隔離・接触を認識する脳部位を明らかとすることで、その後の行動・生理的变化の制御に与える影響の機序や、幼少期の虐待などの不適切な養育による負の影響の除去のためのケアの開発につなげることである。

まず始めに、親哺育および人工哺育した成体マーモセットを対象として恐怖反応実験を行うことで、マーモセットにおいても新生児期の親からの隔離が成長後まで影響を及ぼしているかを確認した。

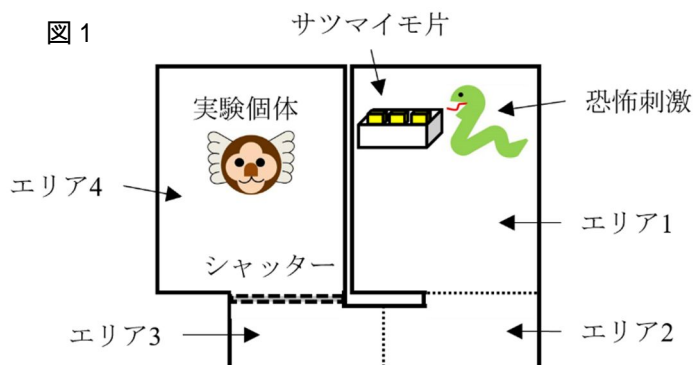
次に、新生児マーモセットを対象として2日間の隔離・再会実験を行うことで、親からの隔離および隔離後の親との再会時に活性化される脳部位を探索し、自身の置かれた社会的状況の認識に関わる脳部位の候補を選定することを目的とした。

最後に、新生児マーモセットを対象として2つめの実験で候補となった脳部位にアデノ随伴ウイルス(AAV)を注入しDREADDを発現させ、行動薬理試験を実施することで、該当脳部位が状況認識に関わっているかを立証することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1). 親哺育個体・人工哺育個体の恐怖反応比較

成長後の個体における人工哺育の影響を調べるために恐怖反応実験を行った。この実験では、恐怖刺激としてゴム製のヘビ(霊長類が先天的に恐怖反応を示す)およびプラスチック製の怪獣のおもちゃ(新規物)を使用した。観察は普段生活しているケージで行い、恐怖刺激の隣にサツマイモ片(約1cm角)を3つ置いた状態でシャッターを開け、10分間観察した。ケージは恐怖刺激からの距離に応じて4つに区分し、セッティングは図1のようにした。観察項目は、サツマイモ片を取るまでの時間(1つ目~3つ目)、各エリアにいた時間、恐怖時に発する鳴き声の回数(Tsik, Tsik-ek)とした。人工哺育群・親哺育群それぞれ3匹(同腹仔3ペア)ずつ実施し、各観察項目を群間で比較した。



#### (2). 自身の状況認識に関わる候補脳部位の選定

新生児マーモセットを生後7日齢で親から隔離し、インキュベーター内で人工哺育した。隔離は7日齢の11時~15時の間に開始し、隔離中は9時、11時、14時半、17時に授乳を行った。新生児は9日齢の11時に親と再会させる reunion 群と、隔離のみを行うコントロール群に分けられた。9日齢の13時から灌流固定を行い、凍結ミクロトームで20μmもしくは40μmの脳切片を作成した。C-Fos抗体を使用した免疫染色により活性化脳部位を調べ、各群で活性化している脳部位を比較した。

### (3). AAV 注入による行動薬理試験

上記(2)で明らかとなった活性化脳部位に AAV を注入し DREADD を発現させる。生後 7 日齢に脳定位手術を行い該当脳部位に AAV を注入し、DREADD の発現後に DCZ を腹腔内投与し隔離時および再会時の行動の変化を観察する。該当脳部位が隔離を認識していれば、活性化により再会時でも親を呼び、抑制により隔離時でも親を呼ばなくなると予想される。また、親との接触を認識している部位であれば、活性化により隔離中でも親を呼ばず、抑制により再会しても親を呼ぶと予想される。

## 4. 研究成果

### (1). 人工哺育個体・親哺育個体の恐怖反応比較

群間で恐怖反応に差が見られ、人工哺育個体は親哺育個体よりも顕著な恐怖反応を示したが、発現した恐怖反応には大きな個体差が見られた。そのため、統計解析による有意差の検出は困難となってしまい、結果をまとめるのに時間がかかっている。例えば、カビー・マイケル間ではヘビを提示した際の tsik の回数に大きな差が見られたが、良美・せなこはほとんど鳴かなかった(図 2)。一方で各エリアにいた時間は、マイケルは徐々にヘビの近くにいる時間が延びていったが、しりこはヘビがある時はエリア 1 に一步も入らなかった(図 3)。このように、恐怖刺激に対しては人工哺育個体の方が顕著な恐怖反応を示してはいたものの、予想に反して発現する恐怖反応のパターンには大きな個体差があり、統計的な比較が困難となってしまった。

図 2

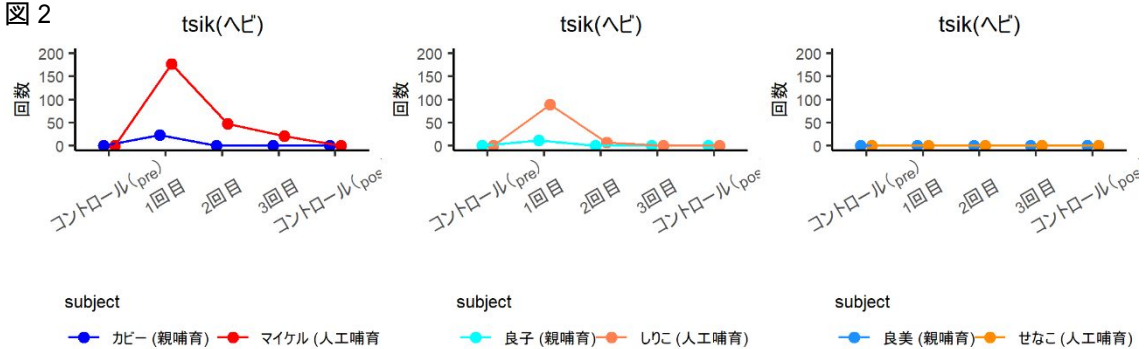
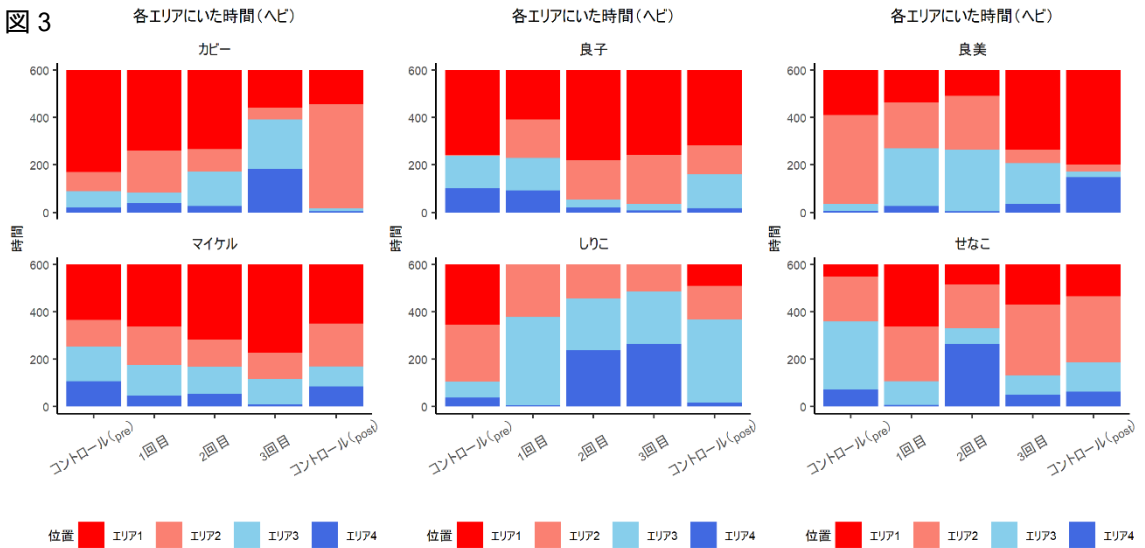


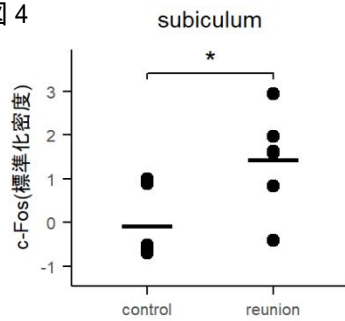
図 3



### (2). 自身の状況認識に関わる候補脳部位の選定

新生児マーモセットの脳を染色し群間で活性化脳部位を比較する予定であったが、新生児の脳は成体に比べて染まりにくく、難航してしまっ。そのため、生後 6~12 ヶ月齢の若齢個体を使用して同様の実験を行い、候補脳部位の選定及び染色条件の検証を行った。その結果、海馬台の一部である subiculum において群間で c-Fos 発現に有意な差が見られ、reunion 群において活性細胞数が多かった(図 4: 脳の染色強度は個体差が大きかったため、個体内で標準化した値を統計解析に使用した)。この結果から、若齢個体の subiculum に AAV を注入・DREADD を発現させる実験を考案・検討している。また、若齢個体での脳染色を行ったことで新生児脳の染色の条件設定も行うことができた。こちらに関しても、染色が終了次第順次解析を行う予定である。

図 4



### (3). AAV 注入による行動薬理試験

上記の理由により、新生児の脳において活性化脳部位の選定が十分に行えずウイルスを注入すべき脳領域の特定ができなかったため、行動薬理試験による立証は実施できなかった。こちらの実験は、今後の新生児脳染色の結果・進捗に合わせて再度実施時期を検討する。また、若齢個体での実験結果から subiculum が親との接触を認識している可能性があるため、若齢個体を対象とした手術・ウイルス注入・行動実験も検討している。

行動薬理試験の実施はできなかったが、追加で行った若齢個体での実験結果を考慮すると、得られた結果としては十分なものであったと考えている。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Kazutaka Shinozuka, Saori Yano-Nashimoto, Chihiro Yoshihara, Kenichi Tokita, Takuma Kurachi, Ryosuke Matsui, Dai Watanabe, Ken-ichi Inoue, Masahiko Takada, Keiko Moriya-Ito, Hironobu Tokuno, Michael Numan, Atsuko Saito, Kumi O. Kuroda	4. 巻 5
2. 論文標題 A calcitonin receptor-expressing subregion of the medial preoptic area is involved in alloparental tolerance in common marmosets	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 1243
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-022-04166-2	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 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------