

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：18001

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K23256

研究課題名（和文）母子隔離ストレスモデルによる海馬可塑性変化と下部尿路機能障害発症機序の解明

研究課題名（英文）Hippocampal plasticity changes and the mechanism of lower urinary tract dysfunction in a maternal separation stress model.

研究代表者

上條 中庸 (Kamijo, Tadanobu)

琉球大学・医学（系）研究科（研究院）・助教

研究者番号：30757555

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：子どものネグレクトや虐待などのストレス経験は脳（中枢）だけではなく、腸や膀胱など排泄機能（末梢）の障害に関わり、全身性の影響は成長後も続く。本研究では、母子隔離の影響が排尿機能と行動へ与える影響について離乳直後と成熟期で検証した。母子隔離の影響によって、対照群に対して幼少期と成長後で活動性が逆転し、成長後には不安に対して鈍化することが分かった。排尿機能としては、幼少期には尿生成量、1回排尿量は減少するが、成熟期にはそれらの機能は正常のものと同等に回復した。しかし、排尿間隔が短くなることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果の学術的な意義は次の3点である。（1）幼少期のストレスは膀胱を含めた排尿機能へ影響を与えることを示した。（2）ストレスによる排尿機能障害は成長に伴って一部回復するが影響は残ることを明らかにした。（3）幼少期ストレスは行動にも影響し、成長後、不安に対して鈍化することを示した。これらの結果は、幼少期のストレスは中枢・末梢両方へ影響し、成長に伴い作用が変化する点と、今後実施予定である末梢の排尿機能の治療が中枢へ与えるであろう可能性に社会的意義があると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Childhood experiences of stress, such as neglect and abuse, are related to disturbances not only in the brain (central) but also in excretory functions (peripheral), such as bowel and bladder, and the systemic effects continue after growth. This study examined the effects of maternal separation on urinary function and behavior after weaning and at maturity. The results showed that the effects of maternal separation caused a reversal of activity in childhood and growth terms, and desensitization to anxiety after growth. In urinary function, urine production and voided volume decreased during childhood, but these functions recovered to normal levels by maturity. However, in a cystometry study, the intercontraction interval of the bladder was found to shorten in maturation.

研究分野：神経科学

キーワード：幼少期ストレス 母子隔離 排尿機能 膀胱

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

子供の排尿機能の問題は、生活の質(well-being)に寄与する重要なトピックである。特に、自然災害や疫病など、ストレスが高い状況において、子供の排泄機能に問題が生じることがある。例えば2011年の東日本大震災では、災害の恐怖記憶によるストレスが原因とされる子供の下部尿路機能の問題(二次性夜尿等)が報告されている。

これらの研究で明らかにされてきたことは、子供の排尿障害の背景にはストレスがあり、背後には負の記憶形成(PTSD)があるのではないかと、ということである。これらの知見から、若年期ストレスが海馬の正常な神経回路形成を妨げるため、視床下部-下垂体-副腎(HPA)軸のバランスが崩れ、糖質コルチコイド濃度が上がることによって成長障害が起こり、排尿制御の成熟へ異常を生じさせるのではないかと、という仮説を立てた。

2. 研究の目的

これまでの多くの排尿機能障害の研究は、ヒトを対象とした非侵襲的な手法が主であり、電気生理学的なメカニズムについては未知な点が多い。そこでラットにおける類似の現象に注目し、海馬の電気生理学的手法によって計測された神経可塑性とHPA軸のフィードバック機能、排尿機能の関係についての神経機序を明らかにすることを目指す。

ラットでは、幼若期にストレスに晒されると海馬機能を含む脳機能障害を引き起こすことや下部尿路機能障害を引き起こし、成長後にも影響があることが報告されている。しかし、海馬と排尿機能の関係について直接的に検証した研究は存在しない。

そこで、幼若期のストレスモデルとしてラットの生後間もない仔を母から一時的に引き離す母子隔離(MS)モデルを用いた。本モデルから脳・HPA軸・排尿機能の相関を目指した。MSモデルを用いて中枢領域で生じる変化がなぜ末梢の排尿障害を誘発するか全身性脆弱性形成メカニズムを検討するために、母子隔離の影響が抹消機能として膀胱へ与える影響と中枢機能として短期記憶と不安様行動へ与える影響について検証した。

3. 研究の方法

本研究は、Sprague Dawley 雌雄ラットを用いた。母ラットは妊娠15日目に動物施設に納入した後、温度(22 ± 0.5)、湿度(50 ± 10%)が制御された動物飼育室で、人工照明下12時間の明暗サイクル(8:00点灯)で飼育され、自由に飲水、摂食させた。

MSモデルは生後2日目(P2)から14日目(P14)まで1日6時間仔ラットから母を引き離し、21日目(P21)に離乳することによって作成した。コントロールは母子一緒に育てP21で離乳された。MSが排尿行動、生理的・形態的な膀胱の変化に及ぼす影響を検討した。また、HPA軸および下部尿路機能とも関連する記憶・不安行動に対するMSの影響を調べるため、Y迷路および高架式十字迷路を実施した。本研究では(1)膀胱機能測定実験2つと(2)行動実験2つを行った。

(1)膀胱機能測定として、下部尿路機能を調べるために代謝ケージによる排尿行動測定と膀胱内圧測定を生後3週と9週で実施した(図1)。

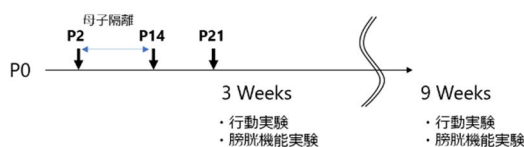


図1: タイムスケジュール

12時間で明期と暗期が切り替わる部屋で飲食自由で自由行動ができる環境の代謝ケージによる24時間のリアルタイム排尿行動を測定し、1回排尿量と排尿回数を算出した。

膀胱内圧測定を行うため、イソフルラン麻酔下で腹部正中を切開して膀胱と尿管を露出させた。両側の尿管を遠位端で結び切断して、先端をフレア状にしたポリエチレン製のカテーテル(PE-50)を膀胱ドームから膀胱内に挿入し結紮した。ラットは閉腹後イソフルラン麻酔を中止し、ウレタン麻酔(1.0 g/kg)を腹腔内および皮下に投与して2時間回復期間とした。膀胱の活動は膀胱のカテーテルと三方活栓を介して圧力変換器と生理食塩水の入った輸液ポンプに接続した。データの収集と操作はPowerLabにて行った。膀胱には生理食塩水を0.05 ml/minの速度で注入し、注水後30分以降のデータを使用した。基線圧、閾値圧、最大排尿圧、収縮間隔、排尿量、残尿量および非排尿性収縮の回数を測定した。

(2)母子隔離が行動に与える影響を調べるためにY字迷路による行動量と短期記憶の評価と高架式十字迷路(EPM)による不安様行動評価を実施した。

3本のアームがY字に設置されたY字迷路の1つのアームの端にラットを入れ、8分間自由行動をさせ、各アームへの侵入回数と短期記憶の指標として自発的交替行動率(Alternation percentage)として求めた。

Alternation percentage = [(Number of alternations)/(Total arm entries - 2)] × 100

EPM は高さ 100 cm の十字のアームで構成されており、2 本のオープンアーム(50 cm×幅 10 cm)と 2 本のクローズドアーム(長さ 50 cm×幅 10 cm、高さ 40cm の壁)がそれぞれ向かい合って配置されている。実験開始時ラットを中央に置き、5 分間自由行動させた。動画を後ほど Any-maze で解析し、身体の総移動距離、頭の移動距離、不動時間、オープンアームとクローズドアームの訪問回数、滞在時間、平均速度で評価した。

4. 研究成果

離乳時(P21)における体重はMS群で有意に軽くなっていたが成熟期(P63)には差が見られなかった(図2)。

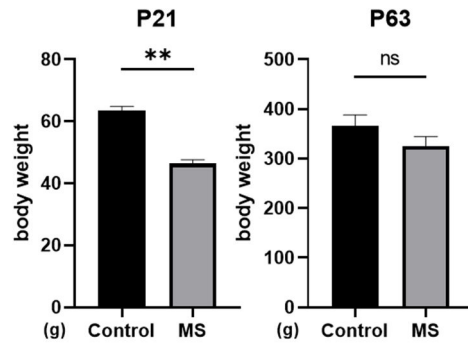


図2. 体重比較 **P<0.01

代謝ケージ実験では、3週齢MS群は24時間の総排尿が少なく、明期、暗期共に1回排尿量が少なかった。排尿回数には差が見られなかった。9週齢では母子隔離の影響はなかった。3週齢MS群は体重も軽いことから成長が阻害されたための未熟であった可能性が考えられる。

膀胱内圧測定では、3週齢MS群で1回排尿量が多かった。膀胱への生理食塩水の注入量は同じであるため、排尿量が多くなっていると考えられる。9週齢では1回排尿量がMS群で少なくなり、排尿間隔が短くなっていった。つまり頻尿になり、排尿回数が増えて排尿量が減っていた。

行動実験の結果、Y字迷路では、3週齢、9週齢共にAlternationに差はなく短期記憶には影響がないことが分かった。各アームへの侵入回数は3週齢も9週齢もMS群で多かった。EPMの結果では、総移動距離は3週齢MS群で短かったが、9週齢では逆転しMS群で長くなっていった(図3A)。不動時間には差がなかった。オープンアームの訪問回数、滞在時間共に3週齢MS群で少なく9週齢では多くなった(図3B)。クローズドアームへの侵入回数も3週齢MS群で少なく9週齢では逆転し多くなっていった(図3C)。しかし、クローズドアームの滞在時間は3週齢MS群で長く、9週齢では有意に短くなっていった。平均速度も3週齢MS群で遅く、9週齢ではMS群が早かった。まとめると、3週齢のMS群では静止はしていないが、ゆっくりとクローズドアームの中を移動していた。成長後には正常群と比べより多く移動し、オープンアームにいる時間が長くなっていった。つまり、MS群は成長後、不安に対して鈍化していると考えられる。

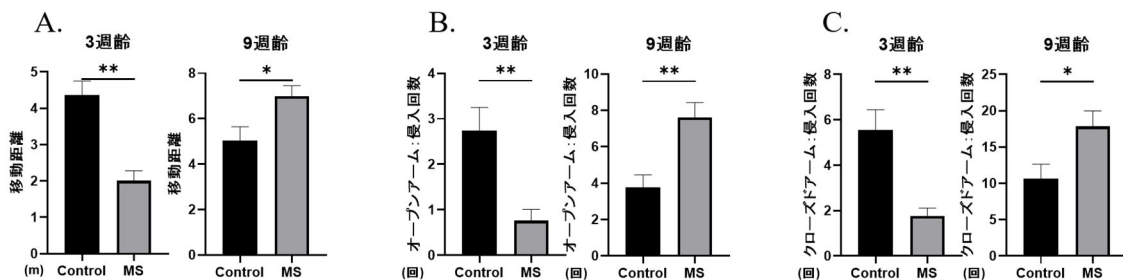


図3: 高架式十字迷路

*P<0.05, **P<0.01

本研究では、幼少期ストレスは成長後に排尿機能に対して頻尿になるように作用し、行動は多動になり、不安に対して脱感作しているように作用することが明らかとなった。今後、幼少期ストレスが脳機能、特に海馬と排尿に与える影響を検証する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 上條中庸、宮里実
2. 発表標題 母子隔離ストレスモデルによる海馬可塑性変化と下部尿路機能障害発症機序の解明
3. 学会等名 2020排尿研究セミナー in 沖縄
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 上條中庸、荒川礼行、宮里実
2. 発表標題 ラット母子隔離ストレスモデルによる行動変化と下部尿路機能障害
3. 学会等名 第28回排尿機能学会
4. 発表年 2021年

〔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
---------	---------