

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 17 日現在

機関番号：37604

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25460168

研究課題名(和文) 幼若期ストレスの脳機能への影響と聴覚的環境エンリッチメントの予防効果に関する研究

研究課題名(英文) Effects of early life stress on brain function and preventive effect by auditory enrichment

研究代表者

白崎 哲哉 (Shirasaki, Tetsuya)

九州保健福祉大学・薬学部・教授

研究者番号：30264047

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)：生後2～9日齢または3～10日齢のラットを1日4時間母仔隔離し、聴覚エンリッチ群では隔離中45～55dBの自然環境音を再生した。生後1ヶ月齢のホールボード試験において、コントロール群と隔離群に有意差は見られなかった。ガラス玉覆い隠し行動試験は不適であり、生後9日齢の血中コルチコステロンレベルおよび腹側海馬CA1のGABA_B受容体mRNA発現レベルに有意差はなかった。一方、環境エンリッチ群で壁登り行動が有意に増加し、排尿回数は有意に減少した。母仔隔離で超音波発声(USV)が増加し、環境エンリッチで減少した。生後3・6ヶ月齢の居住者-侵入者試験でもUSVが増えたが、母仔隔離の影響はみられなかった。

研究成果の概要(英文)：Neonatal Wistar rats were isolated from their mother and also siblings in a soundproof chamber for 4 hours a day during post-natal day (PND) 2 to 9 or 3 to 10. In the auditory enrichment group, natural sounds were played back at 45 - 55 dB during maternal isolation. Unfortunately, Wistar rats were not suitable for Marble-burying test. No significant differences were observed between control and isolation groups in Hole-board test (done at PND30), blood corticosterone level (measured at PND9) and mRNA level of GABA_B receptor in ventral Hippocampal CA1 area (measured at PND9). Climbing behavior was significantly increased while urinary frequency was significantly decreased in auditory enrichment group. During maternal isolation, ultra-sonic vocalization (USV) was increased and it was reduced in auditory enrichment group. USV was also increased in resident-intruder test (recorded at post-natal month 3 and 6), but it was not affected by maternal isolation.

研究分野：薬学

キーワード：母仔隔離 脳機能 自然環境音 ストレス 行動試験 超音波発声

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は前任校において、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」を立案・計画・実施し、GP 終了後も継続して推進してきた。その理由は、薬学が医薬品や毒劇物などの化学物質を介して環境問題とヒトの健康に直接的に深く関わっているからである。しかし、薬学と環境の関係は単に化学物質を介するものだけではない。環境中の物理的・心理的・社会的因子に起因する健康影響も衛生薬学に含まれ、予防薬学の観点からその重要性は今後益々増加するであろう。環境要因に起因する健康影響の解明は、薬物療法の確立や創薬ターゲットの明確化の点でも重要であるが、一方、生活習慣や養育環境、育児・幼児教育、住環境、社会構造、都市空間の改善等をも含む早期予防法の確立や、健康に影響する環境要因の排除、健康促進につながる環境要因の活用と薬物療法の併用等により、薬物治療を最小限にし、個人および国家レベルで医療経済性を高めることも可能と考えられ、エコファーマの一部を構成する。特に、成長の早い段階で受ける影響が生涯に亘り影響を及ぼす場合はその重要性が高く、影響が固定する前にできるだけ早く対応する必要がある。このような思想の元、我々は early life stress の影響に注目している。

研究申請時までの報告では、動物実験において、生後早期に 1 日 1 時間から 4 時間の母仔隔離を行うと、見かけ上動物の行動に影響を与えないものの、成熟期にストレスに晒されると強い不安様症状を示すなど、ストレスに対する脆弱性を獲得する原因となることが指摘されていた。しかしそのメカニズム、特に、ストレス暴露中やその後の比較的早期の段階でどのような生理的あるいは病理的变化が起きているかについてはほとんど解明されておらず、中でも、単一ニューロンレベルでの影響の解明は、皆無と言って良い状態であった。不安や情動への影響を考えるとモノアミン神経系と海馬、扁桃核などの情動系に変化が起きていると考えられるが、我々は、生後 2 日目から 9 日目まで 1 日 4 時間の母仔隔離を行うと、情動に関与する腹側海馬の CA1 領域でセロトニン 1A 受容体応答が有意に増強すること、セロトニン神経の起始核である縫線核では変化がないことなどを見いだした。さらに、その時期の母仔隔離は、快楽(喜び)や報酬と深く関与するドパミン神経の起始核・腹側被蓋野のドパミンニューロンにおいて、ドパミン D2 受容体応答の有意な減弱とドパミンに応答するニューロンの割合の減少を惹起することも見いだした。このことは、ドパミン神経のネガティブフィードバック機能が障害されていることを示唆する。一方、ノルアドレナリン神経の起始

核である青斑核ニューロンでは、主伝達物質(グルタミン酸、GABA)の応答も含め影響を受けなかった。ところが、母仔隔離と同様に 1 日 4 時間の白色雑音暴露を行うと、白色雑音暴露も母仔隔離と同様に精神的ストレスを与えると考えられるにもかかわらず、その影響は母仔隔離の場合と異なり、腹側海馬 CA1 錐体ニューロンでのセロトニン応答の増強や腹側被蓋ドパミンニューロンでのドパミン応答の減少などは見られず、青斑核ニューロンでグルタミン酸応答が減弱した。これらは、early life stress (生後早期ストレス)の影響がストレスの種類に依存することを示す。

さらに興味深いことには、母仔隔離時に小川のせせらぎや雨音、虫の音、鳥の鳴き声などの自然環境音を聞かせていると、単一ニューロンレベルで見られた母仔隔離の影響が完全に解除された。最近、種々の疾患動物モデルにおいて、エンリッチ環境(遊具があり仲間がいる広い空間)で飼育すると疾病様症状の発症が抑制されるとの報告が相次いでおり、我々も同様の結果を得ている。しかし、これまで聴覚的環境エンリッチメントという概念は確立されておらず、自然環境音の効果が示されたのはおそらく初めてであろう。我々人類は、やすらぎがストレスを軽減すると認識しており、動物福祉の観点から犬の遠吠えや猿の攻撃行動が音楽を聞かせることで減少したとの報告も一部あるが、我々の知見は、聴覚的環境エンリッチメントという概念を確立し、その効果の詳細を動物実験レベルで明らかにする手がかりを与えると期待される。

2. 研究の目的

本研究では、これまでの成果をさらに発展させ知見を広げるため、情動系を制御する上位中枢の内側前頭前野、恐怖反応などの情動発現に重要な役割を果たす扁桃核基底外側部、ストレス反応の中心となる室傍核、攻撃行動に係わる視床下部腹内側核と背内側核でいかなる影響を受けるかを明らかにする。また、腹側海馬 CA1 領域と腹側被蓋でみられた自然環境音の持つストレス軽減作用について、環境エンリッチメント効果を発揮する条件をより詳細に探索する。最近、げっ歯類が人には聞こえない超音波を発してコミュニケーションし、快状態と不快状態でその周波数が異なることや、母仔隔離により仔ラットが超音波を発することが知られている。そこで、ストレス軽減作用のメカニズム解明の一環として、仔ラットの発する超音波を心理状況の指標としてモニターする。そのほか、受容体・チャネル・細胞内伝達修飾系の発現量やリン酸化状態、血液中コルチコステロンレベルの測定も行う。さらに、白色雑音暴露を生後早期ストレスとして採用している実験系はなく、母仔隔離も研究者により条件が異なることと、いずれの生後早期ストレスに

においてもラットの攻撃性が増加している感
触を得ていることから、社会性・攻撃性行動
や注意力などの行動に有意な影響が見られ
るか明らかにする。

3. 研究の方法

九動株式会社から購入した生後2日~9日
齢の Wistar Kyudo ラット、または SLC から
購入した生後3日~10日齢の Wistar または
Wistar ST ラットの同腹仔を2群に分け、1
群は常時母ラットと飼育する (control 群)
一方、他群は、室温 28-32°Cの小型防音庫内
で1日4時間母仔隔離し、隔離後は直ちにホ
ームケージに戻した。また、聴覚エンリッチ
群には、防音庫内で母仔隔離する際に、
45-55dB の自然環境音をスピーカーから再生
して聴かせた。自然環境音には、デジタルプ
レーヤーにロスレスでコピーした静寂な小
川のせせらぎ、雨音、自然環境中の虫の声、
小鳥のさえずりなどのCD音源を用いた。

ガラス玉覆い隠し行動試験とホールボ
ード試験は、生後1ヶ月齢で行った。ガラス玉
覆い隠し行動試験では、30 cm (W) × 20 cm (D)
× 20 cm (H) の透明な飼育ケージに床敷を平坦
に敷き詰め、その上にガラス玉を前後左右等
間隔に配置した。ケージの中央に生後1カ月
目のラットを静かに入れ、床敷上のガラス玉
を埋め隠す行動を10分間測定した。床敷は、
試験ごとに新品と交換した。また、ホールボ
ード試験は、50 cm (W) × 50 cm (D) × 40 cm (H)
で床の四隅に直径 38mm の丸い穴があいた観
察装置を用いて行った。観察フィールドの中
心に生後1カ月目のラットを静かに入れ、穴
覗き込み行動、立ち上がり行動、壁立ち登り
行動、脱糞、排尿の5項目について10分間
測定した。フィールドの照度は全面ほぼ 50 lx
とした。試験ごとに観察装置内をエタノール
で拭拭し、次の試験まで5分以上の間隔をあ
けた。試験室は、匂いの影響を排除するため
空気清浄機により常時空調した。

超音波発声は、防音庫内に設置した
Avisoft Bioacoustics の特殊マイクと庫外の
記録装置およびPCソフトを用いて記録・解
析した。記録は、母仔隔離中、生後2~10日、
1、3、6ヶ月齢で行い、3ヶ月齢と6ヶ月齢
のラットで行った居住者-侵入者試験でも超
音波発声を記録した。

血中コルチコステロン量は、母仔隔離終了
後ただちに下大動脈より採血し、enzyme
immunoassay (EIA) 法によりを測定した。採
血は、コントロール群と母仔隔離群を交互に
行った。また同様に、腹側海馬スライスを作
成し、実体顕微鏡下にCA1領域を切り出した
後、直ちに液体窒素で急速冷凍し、GABA_B受容
体mRNA発現量をPCR法により測定した。

4. 研究成果

まず、パッチクランプ法、微小電極法によ
る急性単離神経細胞や脳スライスからの記
録は、転任校に電気生理のセットがなく、本

研究費とは別に現在準備中であるが、本研
究期間中には実施できなかった。今後、実験セ
ットが完成したのちに検討を再開する。

これまでの検討で、母仔隔離により、腹側
海馬 CA1 錐体細胞で 5-HT_{1A} 受容体を介するセ
ロトニン誘発 GIRK チャンネル電流の増加が見
られ、その影響が母仔隔離中の環境音再生に
より減少する一方、GABA_B 受容体を介するバク
ロフェン誘発 GIRK チャンネル電流は母仔隔離
により影響されないこと、5-HT_{1A} 受容体と
GIRK2 チャンネルの mRNA 発現レベルに変化は見
られないことなどを明らかにしてきた。そこ
で今回、5-HT_{1A} 受容体と同じく GIRK1/GIRK2
チャンネルと共役する GABA_B 受容体の mRNA 発現
レベルが母仔隔離により変化するか検討した。
その結果、両群で有意な差は見られなかつ
た。このことから、セロトニン誘発 GIRK
チャンネル電流の増加は、5-HT_{1A} 受容体の機能
亢進によるものと考えられた。

母仔隔離によるストレスの程度を知る目
的で、母仔隔離終了とともにエーテル麻酔下
に開腹し、下大動脈から採血して、EIA 法に
より血中コルチコステロン量を測定した。そ
の結果、コントロール群と母仔隔離群の間に
有意な差は見られなかった。成熟ラットとは
異なり、生後9日齢の幼若ラットから採血す
るためには、開腹して下大動脈から採血する
必要があった。このため、採血にかかる時間
も長く、過大なストレスを与えた可能性がある。
よって、幼若ラットなど体長数センチの
小動物では、ストレス度の解析に非侵襲的方
法として超音波発声を利用した解析が有用
になると思われる。

ガラス玉覆い隠し行動試験は、マウスで経
験があったが、Wistar Kyudo ラットでは、ガ
ラス玉を怖がる様子が見られず、むしろ、ガ
ラス玉を転がしたり、床敷き内に潜って遊ぶ
などマウスとは異なる行動を示した。床敷き
の厚さやガラス玉の数、並べ方、サイズや色、
観察フィールドの照度、測定時間など条件を
変えて最適条件を検討したが改善されず、ラ
ットがガラス玉を怖がらない原因は不明で
あった。既報では、Wistar 系ラットでガラ
ス玉覆い隠し行動試験を行った報告がある。
しかし、Wistar ラットは飼育所毎の特性の違
いも大きいようで、九動 (株) の Wistar 系ラ
ットには向かないのかもしれない。

そこで、ホールボード試験により、穴覗
き込み行動、立ち上がり行動、壁立ち登り行
動、排尿、脱糞の5項目について正常飼育群
と母仔隔離群の測定結果を比較したところ、
いずれの項目においても有意な差は認められ
なかった。一方、聴覚エンリッチ群では、立
ち登り行動が有意に多く、逆に、排尿回数
は0回と有意に少なかった。また、脱糞も有
意ではないが、大幅に減少した。(Fig. 1) 壁
立ち行動の増加の意味は、今後さらに検討
する必要がある。排尿回数の減少は、脱糞
の減少傾向とあわせて考えると、新規環境
に対するストレスの低下を示しているかもし
れない。

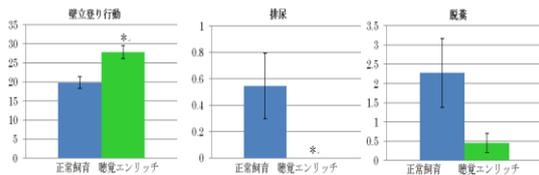


Fig. 1 *: $p < 0.05$ student t-test

超音波発声の記録はこれまで経験がなく、長らく苦戦してきたが、漸く記録できるようになってきた。これまで、生後2日齢から10日齢の母仔隔離がストレスとなっているか明確ではなかったことから、まず、生後8日齢で母仔隔離の影響を観察した。母ラットと一緒にホームケージごと防音庫に入れて測定したところ、超音波発声はまれであり、音圧も弱く、発声の持続も短いものが殆どであった。(Fig. 2)ところが、母仔隔離とともに同腹仔ともバラバラに隔離したところ、22kHz から90kHz 程度の高周波まで、様々な発声が多く記録された。また、その音圧も高く、発声の持続も長かった。詳細は、解析中である。(Fig. 3)

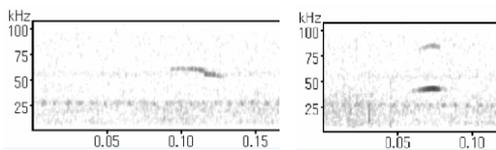


Fig. 2 25 kHz 付近と50 kHz 付近薄い連続した信号は、ノイズ

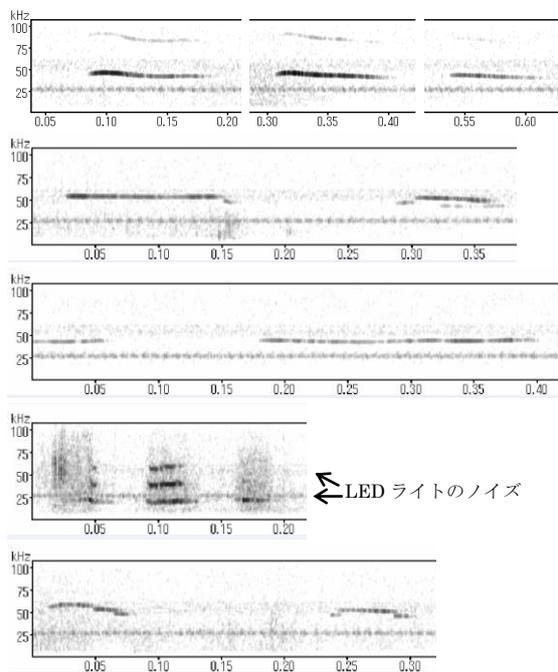


Fig. 3

この超音波発声は、環境エンリッチ群では激減した。(Fig. 4)

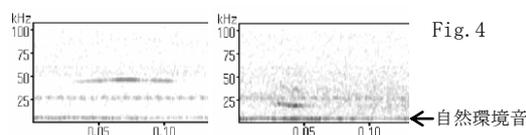


Fig. 4

ところが、生後2日齢では、隔離前のホームケージでも、4時間の母仔隔離中でもほとんど超音波発声が観察されなかった。また、母仔隔離後に母ラットのいるホームケージに移しても、超音波発声が増えることはなかった。母ラットが仔ラットを口に銜えて特定の場所に集めたり、仔ラットを舐めてケアしている時も、特に超音波発声が増えることはなかった。2日齢では、母仔隔離の認識もできず意味がないのかもしれない。あるいは、9時~13時という隔離の時間帯が適していないことも考えられるし、そもそも超音波発声の機能を獲得していないのかもしれない。

一方、3日齢では、隔離前のホームケージで超音波発声が記録され、4時間の母仔隔離の中間で可聴閾の発声も含めると発声回数が増加する傾向にあった。(Fig. 5)しかし、Fig. 3のような時間経過の長い発声や音圧の高い発声は稀であった。今後、超音波発声を指標に母仔隔離に最適な条件を見つける必要があるだろう。

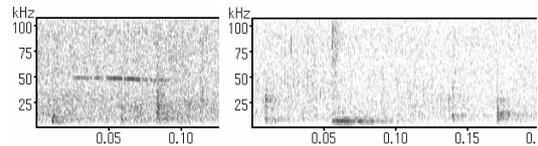


Fig. 5

3ヶ月齢、6ヶ月齢で、集団飼育しているケージから1匹のみ観察ケージに移したところ、しきりに探索行動をしたり、その後落ち着いてから身づくろいをしているときも、ほとんど超音波発声は記録されなかった。また、母仔隔離や環境エンリッチの影響は見られなかった。

そこで、6ヶ月齢ラットのケージに3ヶ月齢のラットを入れて居住者-侵入者試験を行うと同時に、超音波発声を記録した。互いに関心を示し、社会的インタラクションを頻繁に行うとともに、超音波発声も増加した。しかし、攻撃性は見られず、母仔隔離の影響も見られなかった。

以上、超音波発声が幼若ラットのみならず成熟ラットでも記録できるようになったことから、本研究成果を基盤に、今後さらなる発展と応用が期待される。

最後に、28年夏頃に、これまで Wistar 系ラットを購入していた九動株式会社の飼育施設でトラブルが発生し、その後供給が途絶えていたが、29年度に入り、正式に今後の供給を断念する旨の通知があった。トラブル発生後、しばらく様子を見ていたが、動物が入らないため、SLC より一時的に購入することとしたが、納入された Wistar 系ラットの性格が Wistar Kyudo とは明らかにことなること、九動と同じく生後2日齢で納入されても、その後の飼育中に多数死亡や喰殺が起き、時にはほとんど残らないこともあった。死亡時期は、生後3日目から11日目頃までバラバラであり、10日目に異常なかったラットが

11 日目にはほとんどいないこともあった。そこで、納入を生後 3 日齢にしたり、Wistar ST ラットに変え、さらに妊娠 15 日齢や 18 日齢での納入に変更しても、状況は変わらなかった。また、SLC の輸送箱から本学のケージに移す際に、輸送箱内の床敷きを一定量ケージに入れたり、ストレス軽減のためにハンドリングを行うなどの改善策も試みたが、いずれも効果はなかった。死亡する仔ラットに群分けの偏りは見られず、コントロール群のみほとんど死ぬ場合や、逆に母仔隔離群のみ死亡する場合もあった。このようなことから、母仔隔離の実験を安定して行うことが困難であり、また、Wistar ST が Wistar より Wistar Kyudo に近いとはいえ、やはり性格の違いが感じられる。以上のことから、今後母仔隔離を継続するには、クレアからの購入や自家繁殖の必要があるとともに、クレアの幼若ラットやクレアまたは SLC から成熟ラットを購入し自家繁殖した Wistar 系ラットで、これまでの結果が再現できるかの検討も必要となり、大きな痛手である。動物実験に対する厳しさが増していることも九動が供給断念に至った理由かもしれないが、これで、九州地方には、特殊な動物を除き、自社生産して実験動物を供給する業者はついになくなった。他の地域の状況はわからないが、地方の小規模大学にあっては、様々な制約がある中で、小数の大手飼育所から長距離輸送を経て実験動物を購入しなければならない状況になると研究内容も限定され、大学としての機能低下や科学の発展を阻害するよう感じる。今後、地域ごとに実験動物の安定供給を可能にする観点からの科学研究支援事業も必要になるのではないだろうか。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 0 件)

〔学会発表〕 (計 0 件)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

白崎 哲哉 (SHIRASAKI, Tetsuya)

九州保健福祉大学・薬学部・教授

研究者番号：30264047

(2) 研究分担者

副田 二三夫 (SOEDA, Fumio)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教

(現・第一薬科大学・准教授)

研究者番号：10336216