

平成 2 8 年 6 月 1 6 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26640024

研究課題名（和文）生後発達期の皮膚刺激が脳と行動に与える影響

研究課題名（英文）Effects of tactile stimulation in early life on the development of mouse behavior

研究代表者

志賀 隆（Shiga, Takashi）

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：50178860

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000 円

研究成果の概要（和文）：脳と行動の発達は生後早期の母仔分離（Maternal separation: MS）によって障害を受けるが、母親の養育行動によって改善される。皮膚刺激（Tactile stimulation: TS）は養育行動における重要な要素であるが、その働きは不明である。そこで、本研究では生後早期にMSを受けたマウスに対して、TSが仔のストレス応答や成体期での行動にどのような影響を及ぼすかをBALB/cマウスを用いて検討した。その結果、TSはMSによる低体重を回復させ、発声頻度を増加させた。また、TSは成長後の温痛覚感受性とうつ様行動を改善させた。

研究成果の概要（英文）：The development of brain and behavior is impaired by maternal separation (MS) during the early postnatal period, while it is improved by maternal licking and grooming of pups. Tactile stimulation (TS) may be an important factor in the mother-pup interactions, but its exact roles remain to be examined. I examined roles of TS in the development of brain and behavior. Pregnant BALB/c mice were divided into three groups; MS group, MS+TS group and control group. The ultrasonic vocalization (USV) was recorded during tactile stimulation in MS+TS group, and the maternal separation in MS group. The depression level of pups was examined using forced-swimming (FST) test at adulthood. USV frequency was higher in MS+TS group than in MS group. In FST test, MS+TS group showed shorter floating time and longer swimming time compared with MS. In conclusion, the present result suggests that TS during the early postnatal period may reduce the level of depression which was induced by maternal separation.

研究分野：発達神経科学

キーワード：皮膚刺激 養育行動 母仔関係 うつ様行動 痛覚感受性 マウス

1. 研究開始当初の背景

ヒトを含む哺乳類では出生前後の環境要因が遺伝的要因との相互作用により神経回路の構築と行動に対して生涯にわたる影響を及ぼすことが報告されている。たとえば出生前の拘束ストレスが仔マウスの空間記憶を障害すると同時に、不安を亢進させることが申請者を含めて複数のグループによって明らかにされている。一方、生後の環境要因として母仔関係の重要性が“ハンドリング (handling)”実験で示されている。ハンドリングとは生後発達期の仔を母親から毎日短時間 (5~15 分間) 引き離す操作であり、ハンドリングによって記憶力が向上し、不安レベルが低下する。ハンドリングの作用機序としては、仔を母親に戻した後に仔の体を舐めるなどの母親の養育行動が増加することから、母親の養育行動、その中でも仔舐めによる皮膚刺激の重要性が示唆されている。しかしながら、ハンドリング実験では皮膚刺激の役割が直接的に検証されていない。一方、皮膚刺激はタッチケア (またはベビーマッサージ) としてヒトの新生児の育児でも注目されている。

ところで、セロトニン (5-HT) は成体では神経伝達物質として機能するが、発達期では神経栄養因子活性を持ち、神経回路の形成を制御する。申請者らは、5-HT が発達期の脳皮質や海馬などで樹状突起の発達とシナプス形成を調節することを明らかにした (Kondoh et al., 2004; Ishiwata et al., 2005; Hayashi et al., 2010; Yoshida et al., 2012)。さらにハンドリングによって仔の前頭皮質や海馬での 5-HT 受容体 mRNA の発現量が変化することを明らかにした (赤津と志賀, 2010)。

以上のことから環境要因と行動の発達を結ぶ脳内機構として 出生前後の環境要因 神経栄養因子としての 5-HT 神経系 神経回路の形成 行動の発達が考えられる。しかし

ながら、このカスケードに関して現在までに断片的な実験結果しか得られていない。

2. 研究の目的

上記をふまえ、本研究では生後発達期の皮膚刺激が行動の発達に与える影響、および行動への影響を担う脳内機構として 5-HT の役割を解明することを最終目的とし、そのためのモデル実験系の確立を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 実験動物

実験には BALB/cCrSlc 系統のマウスを用いた。BALB/c マウスは、5-HT 合成の律速酵素である Tryptophan Hydroxylase-2 遺伝子 (*Tph2*) の 1473 番塩基に一塩基多型 (SNP) があり、その部分にコードされているアミノ酸のプロリンがアルギニンに置換されている。その結果、他の系統のマウスと比較して *Tph2* の酵素活性が低く、脳皮質や線条体のセロトニン量の減少が報告されている (Zhang et al., 2004)。行動の観点からは、空間記憶におけるハンドリングの効果が C57BL/6 では見られなかったのに対して、BALB/c では見られたとの報告や (Zaharia et al., 1996)、他の系統よりも不安レベルが高いとの報告があり (Brodkin et al., 2007)、うつ病モデルマウスとして用いられることもある。これらから、BALB/c マウスは C57BL/6 のような不安レベルの低いマウスにストレスが付加されたのと近い状態にあると考えられ、皮膚刺激による効果もより大きいことが期待されるため、当系統のマウスを用いることとした。なお、雌マウスの行動は性周期によって影響を受けることがあるため、実験には雄マウスのみを用いた。

(2) 皮膚刺激と母仔分離

妊娠 14-15 日目のマウスを用い (日本エスエルシーから購入)、以下の 3 つの群に分けた。出生日を P0 とし、生後 1 日目から 10 日

目(P1-10)までの10日間、13:30-17:00の間で毎日3時間、母仔分離(maternal separation、MS)または皮膚刺激(tactile stimulation、TS)を行った。MSでは、あらかじめ準備しておいた仕切りのあるケージに仔を移し、1匹ずつ母親および兄弟から隔離した。TSでは上記の母仔分離を行い、その間1時間あたり5分間(合計15分間)仔を乾いた絵筆(毛先の長さ:約2.5 cm)を用いて頭から尾の方向に背部をなでるように実験者が刺激した。なお、MSまたはTSを行う際にケージの下に電気毛布を敷き、ケージ底の温度を約33℃に保つことで仔の体温低下を防いだ。コントロール(C)群は、実験操作を加えずに通常飼育した。P21で離乳し、1匹ずつ飼育した。

(3) 超音波発声測定

母仔分離(MS群)または皮膚刺激(TS群)の間に集音マイク(UltraSoundGate 116Hm recorder (Avisoft Bioacoustics))を仔マウスの頭上2~3 cmに設置し、超音波発声を録音した。P2、5、7、10に行い、Avisoft-Pro (Avisoft-Bioacoustics)を用いて解析した。

(4) 行動実験

不安様行動

生後57日目に、高架式十字迷路(小原医科産業株式会社)を用いて不安様行動を評価した。すなわち床から60 cmの高さに、Open arm(壁なし)とClosed arm(armの両脇に高さ15 cmの壁あり)(どちらのarmも底面は幅5 cm×長さ25 cm)がそれぞれ中心から左右に1本ずつ伸びて十字に交差している装置を使用した。十字の中央部に顔をClosed armに向けてマウスを置き、2種類のアームそれぞれへの侵入回数と滞在時間を5分間計測し、さらにその間の排便回数と排尿の有無を調べた。実験は10:00-13:00の間に、室温23℃、290 Luxの明るさの下で1試行ずつ行った。

温痛覚感受性

生後59日目に、動物実験用ホットプレート(hot/cold plate 35100、Ugo Basile)を用いて温痛覚感受性を評価した。10:00-11:00の間に、54℃に設定したホットプレートに1匹ずつマウスを載せ、足を舐める、足を擦る、または飛び上がるなどのいずれかの反応をするまでの時間(潜時)を計測した。実験の様子はビデオカメラで記録し、1匹の測定ごとに十字迷路をアルコールで拭いた。

空間学習・記憶能力

生後62から67日目の6日間で、モリス式水迷路実験装置(小原医科産業株式会社)を用いて空間学習・記憶を評価した。直径100 cm、深さ30 cmの円形プールに水深20 cmになるように水を入れ、ポスターカラーで白濁させた。プールの周囲の壁に目印(キュー)を3つ設置した。10:00-13:30の間に、室温23℃、62 Luxの明るさの下、水温22±1℃で行った。1試行ごとに、透明で直径10 cmのプラットフォーム(PF)を、内壁から15 cmの4地点のうち各個体に固有に決めた地点に水深1 cmに隠れるように設置した。マウスを水に入れる位置(スタート位置)は4地点からランダムに決めた。以下のトレーニング(Training)を5日間行い、6日目にプローブテスト(Probe test)と視覚テスト(Visible test)を行った。

うつ様行動

生後69日目に、強制水泳試験によってうつ様行動を評価した。室温23℃で、水(22℃)が入った大きなビーカー(直径20 cm、水深7 cm)にマウスを入れ、10分間行動をビデオカメラで記録し、無動(Floating)、よじ登り(Climbing)、遊泳(Swimming)時間を計測した。

(5) 統計学的処理

SPSS (SPSS Japan Inc.)を用いて、モリス水迷路のトレーニングの解析では反復測

定分散分析を、その他の解析では t 検定を行った。p 値が 0.05 未満の場合を統計的有意差があると定義した。

4. 研究成果

(1) 体重

P1 から P56 までの期間で、仔の体重に対する MS と TS の影響を比較した。C 群と MS 群間では P14 で MS 群が有意に減少していた。C 群と TS 群間では有意差は認められなかった。一方、MS 群と TS 群間では P1、P14 で有意に TS 群が増加していた。

(2) 超音波発声頻度への影響

P2、5、7、10 での MS あるいは TS 時におけるそれぞれの操作が仔の超音波発声頻度に与える影響について比較した。MS 群と比較して、TS 群には P2、P5、P7 において 1 分間あたりの発声回数の有意な増加が見られた。

(3) 不安様行動

高架式十字迷路を用いて不安様行動に対する MS と TS の影響を評価した。今回の実験では成体期において MS と TS の影響は見られなかった。また、成長期 (P21) における有意差も見られなかった。

(4) 温痛覚感受性

ホットプレートテストを用いて温痛覚感受性への影響を評価した。TS 群は C 群、MS 群と比較して有意に潜時を増加させた。一方、MS 群と C 群間には有意差は見られなかった。

(5) 空間学習・記憶

モリス水迷路を用いて空間学習・記憶に対する影響を評価した。TS 群は MS 群と比較してトレーニングの 2 日目での PF 到達時間が有意に短縮した。視覚テストでは MS 群の PF 到達時間が延長し、C 群と TS 群間に有意差はなかった。その他のテストでは有意差は見られなかった。

(6) うつ様行動

強制水泳試験を用いてうつ様行動への MS と TS の影響を調べた。その結果、TS 群は MS 群と比較して Floating が短縮し、Swimming 時間が増加した。

上記のように、P1 から P10 までの 10 日間、毎日 3 時間、母仔分離中に皮膚刺激を毎日 15 分間行くと、皮膚刺激によって母仔分離による体重の減少が回復し、成長後の温痛覚感受性とうつ様行動を改善させることが明らかになった。従って、本研究はヒトでのタッチケアの神経機構を解析する上でのマウスモデルと成りうる可能性が示された。現在、行動への影響の脳内機構を解明するために、成長後の前頭皮質、海馬、扁桃体、視床下部、線条体における 5-HT 受容体や脳由来神経成長因子 (BDNF) の mRNA の発現量を解析中である。合わせて、同様の行動実験と脳の解析を C57BL/6 でも行っている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

Akatsu S, Ishikawa C, Takemura K, Ohtani A, Shiga T. Effects of prenatal stress and neonatal handling on anxiety, spatial learning and serotonergic system of male offspring mice. *Neurosci. Research*. 査読有、101(2015)15-23. doi: 10.1016/j.neures.2015.07.002.

[学会発表] (計 5 件)

吉村由祐子、石川千尋、増田知之、志賀隆。セロトニン神経系のグルタミン酸受容体発現における役割。日本解剖学会関東支部第103回学術集会。2015年11月7日、慶応大学日吉校舎 (神奈川県横浜市)

橋本奈々、増田知之、志賀隆。生後発達期の皮膚刺激が脳と行動の発達に与える

集会。2015年11月7日、慶応大学日吉校舎（神奈川県横浜市）

石川千尋、増田知之、志賀隆。生後発達期のセロトニンとセロトニン1A受容体が不安やうつにおける脳の発達に与える影

30日、神戸国際会議場（兵庫県神戸市）

吉村由祐子、石川千尋、増田知之、志賀隆。セロトニン神経系のグルタミン酸受容体発現における役割。第38回日本神経科学大会、2015年7月30日、神戸国際会議場（兵庫県神戸市）

志賀隆。行動の発達における生後発達期のセロトニン神経系の役割。第120回日本解剖学会第92回日本生理学会合同大会シンポジウム、2015年3月23日、神戸国際会議場（兵庫県神戸市）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.md.tsukuba.ac.jp/basic@med/anatomy/shiga^group/anatomy3rd.html>

6．研究組織

(1)研究代表者

志賀 隆 (SHIGA, TAKASHI)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：50178860