

Maternal deprivation in the early versus late postnatal period differentially affects growth and stress-induced corticosterone responses in adolescent rats

(実施時期 (生後早期/後期) の異なる母子分離がラットの成長発育および成長後のストレスに対するコルチコステロン反応性に与える影響)

所属・職 鹿児島大学医学部・歯学部附属病院・助手
(指導教員 山崎要一 教授)

申請者氏名 松本祐子

(はじめに)

生後早期の母子分離が仔ラットに直接的な生理学的変化を引き起こすことが知られており、これらの母子分離による影響は離乳期以降も持続する。生後早期の母子分離は、軽度のストレスに対する HPA 系 (視床下部-下垂体-副腎皮質系) 反応性に永久的変化をもたらすことが報告されている。しかし、ラットへの身体抑制ストレスに対する HPA 系反応性を、生後早期と生後後期の母子分離による影響から調整した報告はない。本研究の目的は、母子分離条件 (①分離の実施時期 ②分離時間) により、仔ラットの成長発育およびラットの成長後のストレスに対する「視床下部-下垂体-副腎皮質系」反応性がどのように影響を受けるかを、経時的な体重測定と身体抑制ストレスに対する血中コルチコステロンの時間変動を測定することにより明らかにすることである。

(対象および方法)

実験には、Wistar 系雄ラット 30 匹を用い、室温 $22 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $60 \pm 5\%$ 、6 時から 18 時までが明期の明暗条件下で、敷きわらの入ったラット用ケージで飼育した。1 匹の母ラットに 6 匹の仔ラットを飼育させ、離乳後個別ケージに移した。

母子分離は、母ラットをホームケージに残し、仔ラットのみを敷きわらを敷いた小ケージに移した。母子分離群は、実施時期 (早期: 生後 1-6 日、後期: 生後 16-21 日) と分離時間 (12 時間: 6-18 時、3 時間: 6-9 時) により、①早期分離 12 時間群 (12E 群: 6 匹)、②早期分離 3 時間群 (3E 群: 6 匹)、③後期分離 12 時間群 (12L 群: 6 匹)、④後期分離 3 時間群 (3L 群: 6 匹) を作製した。また、母子分離しなかった群を⑤対照群 (6 匹) とした。母子分離期間は、養母ラットの哺育を均一化するために毎日母ラットを交換した。母子分離期間を除いて、仔ラットは 24 時間母ラットと一緒に飼育された。

実験日の 9:00 に、9 週齢ラットの体をプラスチック製ボードにテープで固定して 30 分間動けな

いようにする身体抑制ストレス試験を実施した。採血は 9:00 (T0:ストレス開始前)、9:15 (T15)、9:30 (T30)、10:00 (T60)、11:00 (T120)、12:00 (T180)、13:00 (T240)、14:00 (T300)、15:00 (T360)に実施された。血中コルチコステロン濃度は、蛋白競合法で測定した。

また、体重測定は、出生直後から7日ごとに実施した。

(結果と考察)

体重変化について

早期分離群(12E群と3E群)の体重は、実験期間中(生後9週まで)、対照群に追いつけなかった。一方、後期分離群(12L群と3L群)の体重への影響は一時的なものであった。早期分離群間の比較では、生後7日から35日まで12E群の体重は3E群より有意に低かった。

母ラットは主として明期に授乳保育するため、この期間に長時間の母子分離を行うことは仔ラットの栄養補給を著しく低下させる。実験期間前半(35日まで)にみられる12E群と3E群の差は、授乳量の差によるものと考えられた。母子分離による仔ラットのエネルギー消費増加も、体重減少に関与しているかもしれない。母子分離により、低温暴露された仔ラットは熱産生が亢進すると考えられ、その結果体重増加が抑制される可能性がある。

成熟ラットでは、給餌量の一時的低下による体重減少は、その後の過剰摂食により比較的短期間に回復する。早期分離群(12E群と3E群)にみられた長期的な体重増加抑制は、出生直後の栄養不良が摂食調節機構の発達に長期的な影響を与える可能性を示した。また、生後直後の栄養不良が成長ホルモン濃度を抑制するという報告もあり、この成長ホルモン濃度の低下がその後の成長にも影響している可能性が考えられた。

身体抑制ストレスに対する血中コルチコステロン反応について

早期分離群(12E群と3E群)では、身体抑制ストレス開始直後から血中コルチコステロン濃度は急激に増加し、その後の減少は他群と比較して遅く、他の3群(12L群、3L群、対照群)が360分経過後には基礎値と有意差がなくなったのに対し、360分経過後でも基礎値に戻らなかった。一方、後期分離群(12L群と3L群)の血中コルチコステロン濃度変化には、対照群との間に有意差は認められなかった。早期分離群間の比較では12E群の方が3E群よりも変化の程度が大きく、ピーク後の減少も遅かった。

ストレスに対する反応経路の1つである内分泌系の視床下部-下垂体-副腎皮質系(HPA系)では、最終的に副腎皮質からコルチコステロンが分泌される。HPA系の基礎値は負のフィードバックで制御されており、12E群のコルチコステロン濃度の基礎値への復帰が遅いのは、この負のフィードバックシステムにおける何らかの変化が関係している可能性がある。

今回の結果から、生後早期(1週齢)に行われた母子分離が、ラットのストレスに対するHPA系反応性に長期的な影響を与える可能性が示された。

(Brain Research, 1115(1):155-161, 2006.)

様式15

報告番号	歯論第 64 号	氏名	松本 祐子
論文審査担当者	主査	山崎 要一	
	副査	植村 正憲	於保 孝彦 福永 智広

Maternal deprivation in the early versus late postnatal period differentially affects growth and stress-induced corticosterone responses in adolescent rats

（実施時期（生後早期/後期）の異なる母子分離がラットの成長発育および成長後のストレスに対するコルチコステロン反応性に与える影響）

生後早期の母子分離が仔ラットに直接的な生理学的変化を引き起こすことが知られており、これらの母子分離による影響は離乳期以降も持続する。生後早期の母子分離は、軽度のストレスに対する HPA 系（視床下部-下垂体-副腎皮質系）反応性に永久的変化をもたらすことが報告されている。しかし、ラットへの身体抑制ストレスに対する HPA 系反応性を、生後早期と生後後期の母子分離による影響から調査した報告はない。本研究の目的は、母子分離条件（母子分離実施時期 母子分離時間）により、仔ラットの成長発育およびラットの成長後のストレスに対する「視床下部-下垂体-副腎皮質系」反応性がどのように影響を受けるかを、経時的な体重測定と身体抑制ストレスに対する血中コルチコステロン濃度の時間変動を測定することにより明らかにすることである。

（対象および方法）

実験には、Wistar 系雄ラット 30 匹を用い、室温 $22 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $60 \pm 5\%$ 、6 時から 18 時までが明期の明暗条件下で、敷きわらの入ったラット用ケージで飼育した。1 匹の母ラットに 6 匹の仔ラットを飼育させ、離乳後個別ケージに移した。

母子分離は、母ラットをホームケージに残し、仔ラットのみを敷きわらを敷いた小ケージに移した。母子分離群は、実施時期（早期：生後 1-6 日、後期：生後 16-21 日）と分離時間（12 時間：6-18 時、3 時間：6-9 時）により、①早期分離 12 時間群（12E 群：6 匹）、②早期分離 3 時間群（3E 群：6 匹）、③後期分離 12 時間群（12L 群：6 匹）、④後期分離 3 時間群（3L 群：6 匹）を作製した。また、母子分離しなかった群を⑤対照群（6 匹）とした。母子分離期間は、養母ラットの哺育を均一化するために毎日母ラットを交換した。母子分離期間を除いて、仔ラットは 24 時間母ラットと一緒に飼育された。

実験日の 9:00 に、9 週齢ラットの体をプラスチック製ボードにテープで固定して 30 分間動けないようにする身体抑制ストレス試験を実施した。採血は 9:00 (T0：ストレス開始前)、9:15 (T15)、9:30 (T30)、10:00 (T60)、11:00 (T120)、12:00 (T180)、13:00 (T240)、14:00 (T300)、15:00 (T360) に実施された。血中コルチコステロン濃度は、蛋白競合法で測定した。

また、体重測定は、出生直後から 7 日ごとに実施した。

様式15

(結果と考察)

体重変化について

早期分離群 (12E 群と 3E 群) の体重は、実験期間中 (生後 9 週まで)、対照群に追いつかなかった。一方、後期分離群 (12L 群と 3L 群) の体重への影響は一時的なものであった。早期分離群間の比較では、生後 7 日から 35 日まで 12E 群の体重は 3E 群より有意に低かった。

母ラットは主として明期に授乳哺育するため、この期間に長時間の母子分離を行うことは仔ラットの栄養補給を著しく低下させる。実験期間前半 (35 日まで) にみられる 12E 群と 3E 群の差は、授乳量の差によるものと考えられた。母子分離による仔ラットのエネルギー消費増加も、体重減少に関与しているかもしれない。母子分離により、低温暴露された仔ラットは熱産生が亢進すると考えられ、その結果体重増加が抑制される可能性がある。

成熟ラットでは、給餌量の一時的低下による体重減少は、その後の過剰摂食により比較的短期間に回復する。早期分離群 (12E 群と 3E 群) にみられた長期的な体重増加抑制は、出生直後の栄養不良が摂食調節機構の発達に長期的な影響を与える可能性を示した。また、生後直後の栄養不良が成長ホルモン濃度を抑制するという報告もあり、この成長ホルモン濃度の低下がその後の成長にも影響している可能性が考えられた。

身体抑制ストレスに対する血中コルチコステロン反応について

早期分離群 (12E 群と 3E 群) では、身体抑制ストレス開始直後から血中コルチコステロン濃度は急激に増加し、その後の減少は他群と比較して遅く、他の 3 群 (12L 群、3L 群、対照群) が 360 分経過後には基礎値と有意差がなくなったのに対し、360 分経過しても基礎値に戻らなかった。一方、後期分離群 (12L 群と 3L 群) の血中コルチコステロン濃度変化には、対照群との間に有意差は認められなかった。早期分離群間の比較では 12E 群の方が 3E 群よりも変化の程度が大きく、ピーク後の減少も遅かった。

ストレスに対する反応経路の 1 つである内分泌系の HPA 系では、最終的に副腎皮質からコルチコステロンが分泌される。HPA 系の基礎値は負のフィードバックで制御されており、12E 群のコルチコステロン濃度の基礎値への復帰が遅いのは、この負のフィードバックシステムにおける何らかの変化が関係している可能性がある。

今回の結果から、生後早期 (1 週齢) に行われた母子分離が、ラットのストレスに対する HPA 系反応性に長期的な影響を与える可能性が示された。

以上、本論文は、ラットの母子分離実験において、生後早期に行われた母子分離は、生後後期に行われた母子分離よりも、仔ラットの成長と成長後の身体抑制ストレスに対する反応性に強く影響を与え、その影響度は、母子分離時間の長さに関連し、1 日 3 時間より 1 日 12 時間の方が大きいという結果を示した。過去に、母子分離実施時期と母子分離時間という 2 つの分離条件から身体抑制ストレスに対するコルチコステロン反応性について考察した報告はなく、動物実験ではあるが、幼少期の環境 (特に母子関係) がその後の成長発育や身体抑制ストレス反応性に影響を与えるという知見は、小児歯科・障害者歯科臨床における抑制治療時のリスク評価として可能性を示唆するものと考えられる。

よって、本審査委員会は、本論文が学位論文として十分に価値があるものと判断した。

(Brain Research, 1115(1):155-161, 2006.)

試験(学力確認)の結果の要旨および担当者

様式16

報告番号	歯論第64号	氏名	松本 祐子	
論文審査担当者	主査	山崎 要一		
	副査	植村 正憲	於保 孝彦	福永 智広
<p>審査委員会は平成17年3月2日(金)、上記学位申請者に面接して、学位論文の内容について説明を求めるとともに、これに関する事項について試問を行った結果、満足すべき回答が得られた。</p> <p>なお、第1外国語(英語)については平成17年9月1日(木)に施行された学位取得のための第1外国語試験に合格していることが確認され(平成17年度外国語試験合格第50号)、第2外国語(独語)についても独文和訳の結果から、大学院博士課程修了者と同等の学力があると判断された。</p> <p>以上のことから、申請者は大学院歯学研究科博士課程修了者と同等の学力と識見を有するものと認め、博士(歯学)の学位を与えるに十分な資格をもつものと判断した。</p>				