

個体間認知における生理学的メカニズムの解明

2022年9月

埼玉大学大学院理工学研究科（博士後期課程）

理工学専攻（主指導教員 中村 和昭）

清水 稀 恵

目次

目次	2
要旨	6
序論	9
第一章 C57BL/6j 系マウスにおける母親選好性	12
1-1. 緒言	12
1-2. 材料及び方法	13
1-2-1. 動物	13
1-2-2. 母親の仔集め行動テスト	13
1-2-3. 母親選好性テスト	14
1-2-4. 統計学的解析	15
1-3. 結果	16
1-3-1. 母親選好性テスト	16
1-4. 考察	18
第二章 母親選好性を制御する生理的機序の解明	20

2-1. 緒言	20
2-2. 材料及び方法	22
2-2-1. 母親提示によって活性化する脳領域の同定	22
2-2-2. 抗 c-Fos 抗体と抗 GAD67抗体による免疫二重染色	23
2-2-3. Free-floating を用いた vGLUT1に対する in situ hybridization と抗 c-Fos 抗体 による二重染色	23
2-2-4. マイクロアレイ解析	26
2-2-5. RT-PCR による mRNA 発現解析	26
2-2-6. 血中ホルモンの測定	26
2-2-7. 母仔分離の母親選好性への影響	27
2-2-8. 副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン (CRF) アンタゴニストの投与	27
2-2-9. 統計学的解析	27
2-3. 結果	28
2-3-1. 母親への接触率	28
2-3-2. 母親接触時における前帯状皮質 (ACC) の活性化	28
2-3-3. 母親接触時における分界条床核 (BNST) の活性化	29

2-3-4.	母親接触時における室傍核 (PVN) の活性化.....	29
2-3-5.	母親接触時における扁桃体基底核 (BLA) の活性化	30
2-3-6.	母親接触時における海馬 CA2領域 (CA2) の活性化	30
2-3-7.	ACCにおける c-Fos 陽性細胞の細胞種同定.....	30
2-3-8.	マイクロアレイ解析.....	31
2-3-9.	RT-PCRによる mRNA 発現解析	31
2-3-10.	血中オキシトシン・バソプレシン濃度と母親/新規雌との接触時間.....	32
2-3-11.	母仔分離の母親選好性への影響.....	32
2-3-12.	CRF アンタゴニストの投与による母親選好性テストの影響.....	33
2-4.	考察.....	34
第三章 母親選好性と成体期行動との関連		40
3-1.	緒言	40
3-2.	材料及び方法	42
3-2-1.	動物の飼育.....	42
3-2-2.	行動テスト.....	42

3-2-2-1. 高架式十字迷路	42
3-2-2-2. オープンフィールド	43
3-2-2-3. 物体認知テスト	43
3-2-2-4. 社会認知テスト	44
3-2-3. 統計学的解析	44
3-3. 結果	45
3-3-1. 高架式十字迷路	45
3-3-2. オープンフィールド	45
3-3-3. 物体認知テスト	46
3-3-4. 社会認知テスト	46
3-4. 考察	48
第四章 総括	53
謝辞	54
引用文献	55
図	77

要旨

動物では、親は子の生存に適した産卵場所の確保や営巣を行い、子の誕生や成長を助けるとともに、種によっては子の出生後に給餌や保護などの養育を行う場合がある。哺乳類は一部を除き胎生であり、受精後母親の胎内で保護され、胎盤を介して栄養を供給されながら、一定程度発達した後、生み出される。出生後の哺乳類の子育ての特徴として授乳があり、仔は離乳期までの期間を母乳による栄養供給により成長する。すなわち、哺乳類では特に母親と仔の親子関係が密であり、仔が生存するためには授乳をはじめとした母親との関係が重要である。一方、哺乳類の母子関係の形成には、母親および仔の双方が互いを認知・識別し、それぞれが養育対象としての仔および保護者としての母親を認識し、互いに選好を示す一連の過程が必要であると考えられる。しかし、どのような機構がこれら一連の選好性の形成に関わっているかは不明な点が多く残されている。本博士論文では個体間認知における生理学的メカニズムの解明を目的に、マウスを対象に仔の母親に対する認知、すなわち選好性形成の生理的機構を解析した研究について論じた。

仔の母親に対する選好性の形成機構を解析するため、仔マウスの発達段階における母親選好性を評価した。その結果、出生後14日では母親選好性を示すが、出生後16-28日では母親選好性は観察されなかった。出生後16日を対象に母親/新規雌に対する選好性について個体ごとに詳細に観察すると、母親もしくは新規雌への選好性を有する個体あるいはどちらにも選好性を示さない個体に分類することが可能であり、母親への選好性に個体差が観察された。この個体差の結果、出生後16日以降は母親選好性が群として観察されないと考えられた。この観察結果をもとに、母親に強く選好性を示す群、新規雌に強く選好性を示す群、どちらにも同程度に選好性を示す群に分類し、検討を行った。

母親への選好性の個体差、すなわち個体ごとの母親選好性の強弱を生み出す神経内分泌学的機序を解明することを目的として、出生後16日に母親選好性テストを行った後、社会行動との関連が注目されているオキシトシンおよびバソプレシンの血中濃度を測定した。その結果、オキシトシンの血中濃度と母親選好性に相関は見られなかった。一方、バソプレシンの血中濃度と新規雌への選好性に正の相関が認められた。このことから、バソプレシンが母親選好性を負に制御している可能性が示唆された。

次に、母親選好性を制御する神経学的機序を明らかにする目的で、母親選好性テスト後に母親との接触において活性化する脳領域の同定を行った。その結果、新規雌に強く選好性を示す群において、前帯状皮質（ACC）領域および分界条床核（BNST）領域の神経細胞の活性化が観察された。この神経活性化の機序を明らかにする目的で、ACC領域に着目し、母親との接触において発現が変動する遺伝子の探索を行った。その結果、母親に強く選好性を示す群、新規雌に強く選好性を示す群、どちらにも同程度に選好性を示す群の間で発現量の変動を示す遺伝子を複数見出した。この中で、S100ファミリータンパク質の一種である S100a9遺伝子は母親選好性が強いと発現量が低く、新規雌への選好性が強いと発現量が高いことを見出した。S100a9遺伝子から転写・翻訳される S100a9タンパク質の増加が認知機能の抑制を引き起こすことが知られている。以上の結果から、ACC および BNST 領域の神経細胞の活性化が母親選好性を負に制御するとともに、ACC 領域における S100a9遺伝子発現が母親選好性の制御に関連する可能性が示唆された。

最後に出生後16日の母親選好性の特性が、成長後の行動特性と関連するか明らかにすることを目的として、出生後16日で母親選好性テストを行った個体を成熟期まで飼育し、行動実験を行った。その結果、出生後16日の雄において新規雌への選好性が強い個体は成熟後の物体認知機能の低下が観察された。

以上の結果から、離乳前のマウスは出生後14日まで母親への選好性を有し、その後母親選好性の個体差が大きくなることが示唆された。母親選好性の個体差を生じる機構として、バソプレシンならびに ACC および BNST の神経細胞の活性化、さらには ACC の *S100a9* 遺伝子発現の変動が関与している可能性が考えられた。さらに母親選好性の個体特性が成熟期の物体認知機能に影響を及ぼすことが考えられた。

序論

動物は自身の遺伝子を次世代に残すために、生殖により子を残す。より多くの遺伝子を残すために、動物は様々な方法を用いて子の生存率を上げている。例えば、魚類や爬虫類では産卵場所などの確保を行い、より多くの受精卵を作る。その後、卵から孵ると仔は親からの手助けなしに成熟していく。このような種は基本的に親が子育てを行わない代わりに、多くの受精卵を作り仔の生存数を上げている。対して単孔目を除いた哺乳類は胎盤形成を行い、仔は一定期間母親の胎内で過ごし、ある程度発達してから生み出される。また生まれる個体数は卵生動物に比べて少なく、生後は体温の調節、身体の清潔の維持、母乳による栄養供給などの様々な養育が必要である。しかし、仔に対して親が養育行動を行うことにより、確実かつ安定的に仔を成熟させることができる。従って、哺乳類の仔が生存するためには母親との関係が極めて重要になる。

Bowlby は1960年代に「愛着理論」を提唱し、危険な状況から安全を確保するために子が特定の対象者（養育者）に対して接近しようとする一連の行動を愛着と定義している (1)。しかし単に栄養の供給や清潔の維持が提供されるだけでは、それらの提供者に愛着は形成されず、子が養育者に健全な愛着を形成するためには、養育者との社会的な接触が必要であることが示されている。チャウシェスク政権下のルーマニアでは中絶や離婚の禁止といった政策による人口の増加に伴い、多くの子が孤児院に入所した。孤児院では食事や入浴が提供されていたが、子どもと施設の職員との接触などはほとんど行われなかった。その結果、施設で育った子は他者に対する適切な距離がつかめなくなる愛着障害や発達の遅れがみられた (2、3)。アカゲザルでは、針金の人形からミルクを与えられている仔に対して、針金の人形と布の人形を提示すると布の人形に対して接する時間が長くなることが観察されている (4)。この結果から、単にミルクを含めた給餌的な要因ではなく、皮膚感覚を介した接触が母子間の愛着形成に

重要であると考えられている。加えて、アカゲザルでは、母親との接触が少ないと攻撃行動が上昇するなど、社会行動に異常が観察される (5) ことから、愛着形成と情動行動が密接に関連していると考えられる。

哺乳類の母親と子が関係を形成するためには互いが互いを認知・識別する必要がある。人を含めた霊長類では母親と子は互いに識別・認知していることが知られているが (6、7)、他の種でも母親及び仔は互いに識別・認知できることが報告されている。例えば、ラットでは母親は仔のにおいがする床敷きに接近し (8)、マウスでは母親は自身の仔が発する超音波発声 (USV) に対して接近する (9) ことから、嗅覚や聴覚により仔を識別していると考えられる。同様に、マウスあるいはラットの仔は母親 (9、10) とともに、母親が使用した床敷き (11、12) に対しても選好性を示すことが報告されている。従って、仔は嗅覚により母親を認識していると考えられる。このようにげっ歯類は母親と仔が互いに嗅覚あるいは聴覚により認知・識別ができる。

他の哺乳類と同様に、げっ歯類の仔は出生時には養育が必要な状態で生まれる。養育者である母親から授乳を受ける必要があり、そのため仔は母親の乳首から分泌されるにおいを認識し、追跡しなければならない (13、14)。げっ歯類の嗅覚系は出生後 (PND) 0-10日にかけて臨界期があるとされ、この時期に鼻孔を閉塞させると成熟後ににおいの識別ができなくなる (15)。PND3以降に母親に対して人為的ににおいをつけ仔に学習させるにおい学習を行うと、げっ歯類の仔はそのにおいに対し接近行動をしめす (16、17)。従って、げっ歯類の仔は PND3-10の間に嗅覚系が発達しにおいを記憶することにより、母親や母親に関連するにおいを識別できると考えられる。

上述のように、嗅覚系と母親選好性の形成は密接に関連していると考えられる。嗅覚系を介した刺激は、脳内の複数の経路を介して、母親選好性の形成に関与している

と考えられる。例えば、報酬系に関与する μ オピオイド受容体ノックアウトマウスの仔は母親が使用した床敷きに対する選好性が消失する (12)。下垂体後葉から分泌され、社会行動に重要とされているバソプレシンを PND8の仔マウスに投与すると、母親と関連付けたにおいに対する選好性が消失する (18)。従って、母親のにおいは、報酬系や視床下部からのホルモン分泌を介して、母親選好性を制御していると考えられる。また母親の認知には母親を記憶することが必要である。記憶には海馬が重要であり、海馬 CA2領域の神経細胞の活動を抑制すると、マウスの仔は母親に対する選好性を消失させる (10)。従って、嗅覚系を介した母親の記憶が母親選好性の形成に関与すると考えられるが、嗅覚系以外の関与や脳内の母親選好性を制御する領域およびその機能など、母親選好性の形成機序は不明な点が多く残されている。

本研究では個体間認知における生理学的機構の解明を目的として、特に仔の母親に対する選好性の形成に関する生理的機構について、マウスを対象に一連の研究を行った。第一章では C57BL/6j 系統のマウスを用いて、仔マウスの発達段階における母親選好性の解析を行った。第二章では、第一章の結果から母親選好性の強弱が生じる生理的機構を明らかにするために、母親選好性とオキシトシン・バソプレシンとの関連、母親との接触による神経活性化および遺伝子発現変動を検討した。さらに、母親選好性の形成に与えるストレスの影響を明らかにするために、仔マウスに対してストレス暴露や副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン (CRF) のアンタゴニスト投与を行い、母親選好性の変化を解析した。第三章では幼若期の母親選好性と成体期の行動とが関連するか検討を行った。

以上のように本研究では仔マウスの母親に対する選好性の形成機構および母親選好性と成体期の行動予後について理解を深めるために多面的なアプローチにより検討を行った。

第一章 C57BL/6j 系マウスにおける母親選好性

1-1. 緒言

哺乳類の仔は、安全基地としての母親（養育者）に対して愛着を形成し、その関係を維持することにより自身の安全を確保している（1）。ヒトを含めた多くの種が母親と他個体を識別し、母親に対して愛着（母親選好性）を示すことが報告されている（6、19、20、21）。

げっ歯類においても床敷きに対する選好性解析やにおい学習を含む様々な方法を用いて母親選好性について検討が行われ、仔は自身の巣や母親から発せられる特定のにおいに対して選好性を示すことが報告されている（12、18、22、23）。PND3および14の C57BL/6j 系統マウス、あるいは PND17-21の ICR 系統のマウスに対して母親と他個体を提示すると、両系統とも母親選好性を示すことが報告されている（9、10）。しかし、PND18の ICR 系統のマウスに対し母親と他個体を提示しても母親への選好性を示さなかったとの報告もある（24）。従って、報告あるいはマウスの系統によって、母親選好性に関する知見には相違がある。C57BL/6j 系統を用いた検討では、離乳後には母親よりも新規雌に対して選好性を示すことが報告されている（10）。上記から少なくとも C57BL/6j 系統では、PND14までは母親選好性を示し、離乳後は母親選好性が新規雌への選好性に移行すると考えられる。

本研究では、母親選好性の形成機序を解明するために、近交系として遺伝的背景が均一である C57BL/6j 系統を用いて母親選好性の遷移を明らかにすることにした。

1-2. 材料および方法

本研究で行った全ての動物実験は国立成育医療研究センターの動物実験に関する指針を遵守して実施し、実験動物委員会による事前の実験計画の承認（A2018-001）に基づいて、動物に対しての苦痛を最小限に留めるように配慮して行った。

1-2-1. 動物

妊娠14から17日の C57BL/6JJmsSlc 系統マウスを購入し（三協ラボサービス）、飼育室にて12時間ごとの明暗周期、 24 ± 2 °Cの室温条件のもと個別飼育を行った。飼育室では床替えは最低7日に一度行い、水は最低1週間に1回交換を行った。飼育期間中、午前9時から午後2時の間にケージ内を観察し、出産の有無を確認した。出産を確認できた日を出生0日齢（PND0）とした。仔が PND7あるいは PND8に達した日に、母親と仔を行動テスト室に移動した（明暗周期および温度は共に飼育室と同一環境で維持された）。PND21で仔を離乳した。この間、後述する各テストを行った。

1-2-2. 母親の仔集め行動テスト

後述する母親選好性の評価のため、母親の養育行動の指標として仔集め行動テストを行った。PND9あるいは10に、母親を新規ケージに入れ10分間過ごさせた。この間、仔はパネルウォーマー（SANKO、パネルウォーマー32W）を敷きケージ内を 28 ± 2 °Cに維持した新規ケージに移動した。新規ケージへ導入した10分後に、母親をホームケージに戻し、5分間自由に行動させた。その後、ホームケージ内の巣から最も離れた2か所のケージの隅に仔を1匹ずつ置き、母親の行動を5分間観察した。母親の行動はケージ上部に設置されたビデオカメラ（sony、HDR-CX680）を用いて記録した。記録された動画より、母親が2匹の仔を巣に回収するまでの時間を算出した。

1-2-3. 母親選好性テスト

PND14、16、18および28で母親選好性テストを行った。PND14、16、18での母親選好性テストに対しては、PND9あるは10の時点から、1日10分、計3回、母親をワイヤーケージ（直径10cm、高さ10cm、CleverSyS.）に導入し、実験装置（幅65cm、横40cm、高さ20cm、CleverSyS.）の末端領域（幅20cm、横40cm）に置き、母親を実験装置に馴化した。母親を実験装置に馴化している間、仔がいるホームケージはパネルウォーマー（ $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ）を用いて保温した。PND28での母親選好性テストに対しては、テスト8日前から1日5分間、計5回、実験装置に対して母親の馴化を行った。母親を実験装置に馴化している間、仔がいるホームケージはパネルウォーマー（ $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ）を用いて保温した。馴化終了後、母親をケージに戻し、ワイヤーケージと実験装置はアルコールで消毒を行った。

仔の母親選好性を評価するにあたり、母親の養育行動の差異による仔の選好性への影響を低減させるため、母親の仔集め行動テストの結果から、母親が1匹目の仔を回収する時間が60秒以内かつ2匹目の仔を回収するまでの時間が1匹目の仔の回収から50秒以内の条件を満たした母親（30匹）の仔を母親選好性テストに使用した。仔マウスを新規ケージに移し、母親から30分隔離した。PND14では装置中央に線を引き、装置中央から10cm離れた位置に母親あるいは新規雌をそれぞれ導入したワイヤーケージを置き実験装置の中央に仔マウスを1匹ずつ導入し、15分間の行動観察をおこなった。PND16以降では、実験装置の両末端領域の中央に母親あるいは新規雌をそれぞれ導入したワイヤーケージを置き、15分間の行動観察をおこなった（Fig.1A）。実験装置上部に設置したビデオカメラを用いて行動の記録を行った。行動観察終了後、仔マウスの体重を体重計（Cole-Parmer、PL602-S）を用いて計測し、個体番号を付けてホームケージに戻した。また試験終了ごとに、70%エタノールを用いて実験装置およびワイヤ

一ケージの汚物等を拭き取った。母親選好性は母親あるいは新規雌を導入したワイヤーケージに仔が鼻先を接触 (Fig. 1B) した時間を指標として、行動解析ソフト (TopScan) を用いて評価した。発達段階ごとに母親選好性を比較するために接触時間から各個体の標準得点 (Z-score) を以下により求めた。

「Z-score = (接触時間 - 全個体の接触時間の平均値) / 全個体の標準偏差」

1-2-4. 統計学的解析

母親との接触時間および接触率は平均値±標準誤差で表した。データの統計は GraphPad Prism8 を用いて対応のある t 検定、50% をチャンスレベルとした 1 標本の t 検定、あるいは one-way ANOVA およびピアソンの積率相関係数を用いて検討を行い、 $p < 0.05$ の場合を統計的有意とした。

1-3. 結果

1-3-1. 母親選好性テスト

最初に、発達段階ごとに母親および新規雌の接触時間を検討した。母親接触時間の Z-スコアは、PND14 (n=10匹) において PND16 (n=150匹)、18 (n=10匹)、28 (n=15匹) と比較して有意に高かった ($F_{2, 168} = 1.39$: PND14 vs PND16 : $p < 0.0001$, PND14 vs PND18 : $p = 0.0068$, PND14 vs PND28 : $p = 0.002$, Fig. 2A)。一方、新規雌に対する接触時間 Z-スコアには発達段階ごとの差は見られなかった (Fig. 2B)。母親接触時間の Z-スコアが PND14 に比べ PND16 以降で減少したことから、PND16 における仔マウス (n=150匹) の母親選好性について検討を行った。仔マウスの母親および新規雌に対する接触時間に差は見られなかった (Fig. 3A)。雌雄における母親選好性の差異を検討するため、雄 (n=78匹) および雌 (n=68匹) に分けて母親および新規雌に対する接触時間の比較を行ったが、いずれも母親と新規雌への接触時間に差は見られなかった (Fig. 3B、C)。次に、PND16 における母親と新規雌への接触時間を個体ごとに解析した。母親 (Fig. 4A) および新規雌 (Fig. 4B) への接触時間は 0 秒の個体もいれば、900 秒近い値を示すような個体もいた。これらの結果から PND16 における母親および新規雌への接触時間には大きな個体差があることが示された。これら個体差が生じる原因として、成長段階の指標として体重との関連を調べたが、体重と母親 (Fig. 4C) あるいは新規雌 (Fig. 4D) への接触時間の間に相関は見られなかった。さらに、接触時間の個体差と同腹仔数、すなわち母親が 1 匹当たりで費やす養育の時間の違いが、母親および新規雌に対する接触時間の個体差の原因となっているかを検討するため、産仔数 (養育仔数) ごとの母親 (Fig. 4E) および新規雌 (Fig. 4F) への接触時間を比較したが、産仔数間における接触時間に差は見られなかった。また雌雄それぞれで母親及び新規雌に対する接触時間に違いがあるかを検討した。雄では、

母親 (Fig. 5A) および新規雌 (Fig. 5B) への接触時間は0秒の個体もいれば、900秒近い値を示すような個体もいた。これらの結果から PND16の雄にける母親および新規雌への接触時間には大きな個体差があることが示された。体重と母親 (Fig. 5C) あるいは新規雌 (Fig. 5D) への接触時間の中に相関は見られなかった。さらに、産仔数 (養育仔数) ごとの母親 (Fig. 5E) および新規雌 (Fig. 5F) への接触時間を比較した。8匹の兄弟を持つ仔は兄弟数が5、6匹の仔と比較して母親への接触時間に有意に長かった ($F_{6, 71} = 2.58$: 兄弟数8匹 (n=11匹) vs 5匹 (n=8匹) : $p=0.0042$ 、兄弟数8匹 vs 6匹 (n=16匹) : $p=0.0024$ 、Fig. 5E)。産仔数と新規雌への接触時間には差は見られなかった (Fig. 5F)。雌では、母親 (Fig. 6A) および新規雌 (Fig. 6B) への接触時間は0秒の個体もいれば、900秒近い値を示すような個体もいた。これらの結果から PND16の雌にける母親および新規雌への接触時間にも大きな個体差があることが示された。体重と母親 (Fig. 6C) あるいは新規雌 (Fig. 6D) への接触時間の中に相関は見られなかった。さらに、産仔数 (養育仔数) ごとの母親 (Fig. 6E) および新規雌 (Fig. 6F) への接触時間を比較した。産仔数と母親あるいは新規雌への接触時間に差は見られなかった。

1-4. 考察

本研究では C57BL/6JmsSlc 系統マウスを用いて、仔マウスの母親選好性について検討を行った。本研究では PND14と PND16以降では仔の発達に合わせて選好性を評価する実験系が異なることから、Z-スコアを用いて各発達段階における母親選好性の比較を行った。Z-スコアによる母親への接触時間は PND16、18、28と比較して PND14で有意に長かった。一方、Z-スコアによる新規雌への接触時間は発達段階ごとには差が見られなかった。このことから仔は PND14までは母親に対する選好性を有しているが、それ以降では消失する一方で、母親選好性の消失に伴って、必ずしも新規雌への選好性が亢進するものではないと考えられた。これまでに Lham らは、C57BL/6J 系マウスを用いた検討から、PND3、6、14では母親に対する選好性を示すのに対して、PND30以降では母親選好性は消失し新規雌に対する選好性を有することを報告している (10)。本研究結果と合わせて考えると、C57BL/6J 系マウスでは母親に対する選好性は PND14以降で消失すると考えられる。

本研究では PND16以降母親選好性が消失することに着目し、PND16における母親選好性テストについてさらに詳しく検討を行った。その結果、雌雄を問わず PND16では母親および新規雌に対する接触時間について個体差が大きいことが明らかとなった。従って、PND16の仔が必ずしも母親選好性を消失したわけではなく、個体によって母親選好性の程度（強弱）に差が生じていると考えられた。従って、PND16では母親および新規雌に対する選好性が全体として観察することができなかつたと考えられる。

げっ歯類において、仔舐め行動や毛繕い行動の頻度が低い母親の仔は体重が低いことが報告されている (25)。PND16における母親及び新規雌に対する選好性に個体差がみられたことから、その要因が仔マウスの体重、すなわち発達度合いや兄弟数、すなわち母親が同時に養育しなければならない個体数にあるか検討を行った。雄および

雌ともに母親及び新規雌に対する接触時間と体重との相関はみられなかった。一方、雄でのみ兄弟数が8匹の場合、5匹及び6匹と比較して母親への接触時間が増加していた。雄でのみこのような現象が観察された理由は不明であるが、雄においては適切な母親選好性を形成する要因の一つとして兄弟数が関連している可能性が考えられる。

第二章 母親選好性を制御する生理機序の解明

2-1. 緒言

仔の母親選好性は、摂食行動、不安関連行動、恐怖反応、記憶などの脳内機構の制御を受けることにより生じていると考えられる。これらを制御する脳内領域として、前帯状皮質 (ACC)、分界条床核 (BNST)、室傍核 (PVN)、扁桃体基底核 (BLA)、海馬 CA2領域 (CA2) が知られている。ACC 領域は恐怖反応 (26) や意思決定 (27) の制御に関わることが報告されている。さらに、Yoshida らは ACC 領域の神経細胞の活性が愛着行動の指標となる輸送反応を抑制させることを報告している (7)。BNST 領域は不安関連行動 (28)、摂食行動 (29) や接近行動 (30) を制御していることが知られている。PVN 領域は社会行動に重要とされているオキシトシンやバソプレシンを産生し、BNST 領域からの投射を受ける (29)。BLA 領域は ACC 領域から投射を受けることにより、恐怖反応を抑制することが報告されている (26)。近年、CA2領域は幼若期から成体期に渡り仔が母親を記憶し、発達段階ごとの社会的選好性の制御していることが報告されている (10)。従って、これら脳内領域が母親選好性の形成に関与している可能性がある。近年、視床下部で産生されるバソプレシンおよびオキシトシンが仔マウスの社会行動形成に重要であることが報告されており (18, 31)、これらホルモンも母親選好性の制御に関与している可能性が考えられる。

第二章では、第一章で明らかとなった PND16における選好性の個体差を生じる生理的機序を解明することを目的に、実験を行った。母親選好性を制御する脳領域を特定するために、神経活性化マーカーである c-Fos に対する免疫染色法により、母親との接触において活性化する脳領域、神経細胞種を検討した。さらに母親との接触において発現が変動する遺伝子の探索を行った。さらに母親選好性とオキシトシン・バソプレシンのとの関連を検討した。合わせて、ストレスが母親選好性の形成に与える影響

を検討するため、母仔分離ストレスまたは副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン（CRF）のアンタゴニスト投与による母親選好性への影響について検討を行った。

2-2. 材料および方法

2-2-1. 母親提示によって活性化する脳領域の同定

PND16にて母親選好性テストを行った仔マウスに対して、2日後に母親提示実験を以下のように行った。仔マウスを新規ケージに移し、母親から30分間隔離した。その後、仔マウスがいるケージに母親を導入（母親提示あり）または導入せず（母親提示なし）、30分間維持した。その後再度母親から隔離し、母親提示から1.5時間後、イソフルランにて仔マウスを深麻酔し、ザンボニ溶液（20mg/ml パラホルムアルデヒド、0.2%飽和ピクリン酸水溶液1.3%、0.1M リン酸衝動液）を用いて灌流固定を行い、脳の摘出を行った。摘出脳をザンボニ液中に4℃で一晩浸漬固定した。固定後、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）で溶解した30%ショ糖溶液に2日間浸漬した。ショ糖溶液へ浸漬後、脳を OCT（optimal cutting temperature compound）に包埋し、液体窒素を用いて凍結ブロックを作製した。凍結ブロックからクリオスタット（LEICA、CM3050S）を用いて40μmの脳切片を作成した。切片をPBSで5分3回洗浄した後、3%過酸化水素液 / PBS により15分間室温で処理し、PBS で5分3回洗浄した。1%正常ウマ血清、0.4%Triton X/ PBS（TNBS）にて室温で60分間処理し、ウサギ抗 c-Fos 抗体（SC-5、santa cruz）を TNBS で20000倍になるように希釈し、4℃で一晩反応させた。PBS で5分3回洗浄した後、TNBS により3倍希釈した EnVision+ System- HRP Labelled Polymer Anti-Rabbit（DAKO）を室温で1時間反応させ、その後 PBS で5分3回洗浄した。Liquid DAB+ Substrate Chromogen System（DAKO）で免疫陽性反応を可視化し、PBS で5分3回洗浄した。洗浄後、スライドガラスに切片を貼付し、乾燥させた。スライド標本をアルコール・キシレン系列により脱水・透徹後、マリノール（松浪）にて封入し顕微鏡（オリンパス）で観察し、撮影（BX53、オリンパス）した。領域の面積と c-Fos 陽性細胞の数を Image J を用いて、計測し密度（cell/cm²）を求めた。第一

章の結果から、PND16では母親選好性に大きな個体差が存在することが明らかとなった。従って、以下の計算式より母親接触率を求め、仔を3群にわけた。

「母親接触率＝母親への接触時間／（母親への接触時間+新規雌への接触時間）×100」

2-2-2. 抗 c-Fos 抗体と抗 GAD67抗体による免疫二重染色

母親提示を行った仔マウスの脳切片に対して前述の抗 c-Fos 抗体による免疫組織化を行った。ウサギ抗 c-Fos 抗体反応時に、同時にマウス抗 GAD67抗体 (Abcam) を500倍希釈として、4℃で一晩反応させた。PBS で10分間洗浄した後、さらに PBS で5分2回洗浄した。二次抗体として TNBS により2000倍希釈したロバ抗ウサギ IgG 血清 (Alexa 594、Invitrogen) および500倍希釈したロバ抗マウス IgG 血清 (Alexa 488、Invitrogen) を用いて、遮光しながら室温で1時間反応させた。PBS にて10分間3回洗浄した後、切片をスライドガラスに貼付し、VECTASHIELD Hard・set Mounting Medium with DAPI (VECTOR LABORATORIES) にて封入し、顕微鏡 (BZ-9000、KEYENCE) にて観察、撮影した。

2-2-3. Free-floating を用いた vGLUT1に対する in situ hybridization と抗 c-Fos 抗体による二重染色

マウス脳より RNeasy Mini (QIAGEN) を用いて total RNA を抽出した。Total RNA を鋳型として、primerscript II 1st strand cDNA Synthesis Kit (Takara) を用いて cDNA を得た。vGLUT1に対する in situ hybridization を行うため、マウス vGLUT1 cDNA の部分配列のクローニングを行った。クローニングのため、マウス vGLUT1 cDNA 配列の1885-2861塩基を標的としたセンスプライマー5'- ACTCCATACACCTCTAGCCTGA-3'、アンチセンスプライマー5'- GAGACAGACACCAAGACACGAC-3'にて、Thermal

Cycler Dice Real Time System II TP800 (Takara) を用いて PCR 反応を行った。PCR 反応は premix EXtaq (Perfect Real Time) を用いて、95°C・5分間の pre-PCR heat サイクルの後、94°C・30秒、60°C・30秒、70°C・1分間を1サイクルとして、30サイクル反応させ、その後72°Cで10分間の伸長反応を行った。PCR 終了後、臭化エチジウム (和光) を含む2%アガロースゲルを用いた電気泳動により PCR 産物を確認した。

pGEM-T Easy Vector System (Promega) を用いて、pGEM-T Easy ベクターに PCR 産物を組み込み、コンピテント細胞 DH5 α 株に導入した。その後、X-gal (20mg/ μ l)、IPTG (1.0M) を添加したアンピシリン (1 μ l/ml) を含む LB 寒天培地上にベクターを導入したコンピテントセルを塗布し培養した。X-gal/IPTG によるカラーセレクションから、白色を示すコロニーを複数選択し、さらに液体 LB 培地にてコンピテントセルを培養し、菌体を得た。得られた菌体から M13 Primer を用いてコロニーPCR を行い、臭化エチジウム (和光) を含む1%のアガロースゲルを用いた電気泳動によりサイズを確認した。サイズが一致したものに対して、ミニプレップ法によりベクターを回収し、シーケンスにより配列の確認を行い、マウス vGLUT1 cDNA の目的の断片がクローニングされていることを確認した。目的のプラスミドを、Nco I (Takara) および Pst I (Takara) でそれぞれ切断し、これを鋳型として、DIG RNA Labeling Mix (Roche) を用いて SP6ポリメラーゼあるいは T7ポリメラーゼにより、それぞれ DIG 標識 cRNA センスプローブおよびアンチセンスプローブを作製した。

上述のように、母親提示を行った仔マウスの脳をザンボニ溶液にて灌流固定、ショ糖溶液置換後、40 μ m の凍結切片を作製した。PBS で5分2回洗浄し、protease K (1 μ g/ml、和光) により37°Cで5分間処理した。PBS で5分2回洗浄し、0.25%無水酢酸 (ニッポンジーン) で10分間処理し、再び PBS で5分2回洗浄した。ハイブリダイゼーションバッファー (50%ホルムアミド、3 \times SSC、0.12M リン酸バッファー (PB)、

1×Denhardt solution、125µg/ml tRNA、0.1µg/ml サケ精子 DNA、10%デキストラン硫酸ナトリウム) にて室温で、5分間プレハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーションバッファーへ500ng/ml になるように DIG 標識 cRNA プローブを加え、85°Cで3分間変性させた後、切片と共に60°Cで一晩ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション後、2×SSC バッファー/50%ホルムアミドにより60°Cで15分2回洗浄し、NTE バッファー (ニッポンジーン) により37°Cで10分間、RNaseA (SIGMA、20µg/ml NTE バッファー) により37°Cで30分間反応させた。さらに37°Cで10分間 NTE バッファーで洗浄し、2×SSC により60°Cで15分間2回、0.5×SSC により60°Cで15分間2回洗浄した。その後、DIG1 (0.1M Tris-HCL (pH7.5)、0.15M NaCl、0.1% tween 20%) により室温で15分間洗浄し、1.5%ブロッキング試薬 (Roche) / DIG1により37°Cで1時間反応させた。DIG1で5分間洗浄し、アルカリフォスターゼ標識抗 DIG 抗体 (Roche) を DIG1により2000倍になるように希釈し、4°Cで一晩反応させた。DIG1により15分間4回洗浄した後、DIG3 (0.1M Tris-HCL (pH9.5)、0.01M NaCl、0.05M MgCl₂) により3分間処理した。発色液 (75mg/ml Nitro blue tetrazolium (NBT)、50mg/ml 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphate-5-Toluidine salt (BCIP) / DIG3) により、室温で発色が確認されるまで反応させた。発色を確認後、PBS により1分間洗浄し、4%パラホルムアルデヒド・リン酸衝動液 (富士フィルム) で10分間処理した。その後、c-Fos 免疫組織化学の方法により、TNBS によるブロッキングを行った後、ウサギ抗 c-Fos 抗体を TNBS で1000倍になるように希釈し、4°Cで一晩反応させた。PBS で5分3回洗浄した後、TNBS により3倍希釈した EnVision+ System- HRP Labelled Polymer Anti-Rabbit (DAKO) を室温で1時間反応させ、PBS で5分3回洗浄した。Liquid DAB+ Substrate Chromogen System (DAKO) で免疫陽性反応を可視化し、PBS で5分3回洗浄した。その後グリセロール溶液にて封入し顕微鏡 (BX53、オリン

パス)で観察、撮影した。

2-2-4. マイクロアレイ解析

上述のように、母親接触率により分けた3群の各3匹に対して母親を30分間提示した後、脳より前帯状皮質領域を切り出し、凍結保存を行った。凍結組織より、RNeasy Mini (QIAGEN) を用いて total RNA を抽出した。その後、群ごとに total RNA を混合し、3D-Gene メッセンジャーRNA チップ (TORAY) を用いてマイクロアレイ解析を行った。

2-2-5. RT-PCR による mRNA 発現解析

マイクロアレイ解析のために抽出した RNA を鋳型として、primerscript II 1st strand cDNA Synthesis Kit (Takara) を用いて cDNA を作成した。マイクロアレイ解析の結果を検証するために、マイクロアレイ解析により発現変動が認められた35遺伝子 (表1) と内在性のコントロールとして *Gapdh* 遺伝子の発現をリアルタイム PCR により検討した。RT-PCR 反応は SYBR premix EXtaq II (Perfect Real Time、Takara) を用いて、Thermal Cycler Dice Real Time System II TP800 (Takara) にて行った。用いたプライマー配列は表1に示す。リアルタイム PCR により得られた結果から $\Delta\Delta C_t$ 法により MP 群における各目的遺伝子の mRNA 発現量を1.0とし、NP 群および SP 群における相対的な遺伝子発現量を算出した。

2-2-6. 血中オキシトシン・バソプレッシンの測定

PND16での仔マウスの母親選好性テスト終了後、イソフルランにて仔マウスを深麻酔し、心臓から血液を採取した。採血後、血液を30分間常温に置き、2000rpm、4℃、

30分間遠心し、血清を採取した。オキシトシンおよびバソプレシン測定のために、血清を assay buffer によりそれぞれ5倍及び100倍希釈し、Oxytocin ELISA kit (ENZO) あるいは Arg8-Vasopressin (ENZO) を用いて血中濃度を測定した。

2-2-7. 母仔分離の母親選好性への影響

PND1から PND14まで、1日3時間プラスチック製のケージ (3.5cm×4.5cm、Fig. 7A) に導入し、母親と隔離した。隔離している間、ホットプレート (Leica、HI1220、 $31 \pm 2^{\circ}\text{C}$) に置き保温した (Fig. 7B)。コントロール群として隔離処理を行わない群を設定した。コントロール群 (6匹) と隔離群 (14匹) の PND16の仔を用いて、上記に記載した、母親選好性テストを行い、同様に母親選好性を評価した。

2-2-8. 副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン (CRF) アンタゴニストの投与

PND16 (27匹) の母親選好テストの30分前に溶媒 (15% DMSO、3% ポリオキシエチレン (10) ヒマシ油 (フジフィルム) /生食) もしくは CRF アンタゴニスト (60mg/kg) を腹腔に投与した。その後、母親選好性テストを行い、母親選好性を評価した。

2-2-9. 統計学的解析

データは平均値 \pm 標準誤差または分散分布図で表した。データの統計は GraphPad Prism8を用いて one-way ANOVA およびピアソンの積率相関係数を用いて検討を行い、 $p<0.05$ の場合を統計的有意とした。

2-3. 結果

2-3-1. 母親への接触率

母親選好性の差異による群分けを行うために、各個体における母親接触率 (Fig. 8A) をもとに、母親接触率が80%以上の個体を MP 群、母親接触率が20%以上かつ80%未満の個体を NP 群、母親接触率が20%未満の個体を SP 群とし、母親選好性の異なる3群を設定した。すなわち、母親接触率の高い群を MP 群、母親接触率が低い群 (新規雌への接触率が高い群) を SP 群、母親および新規雌のいずれにも接触する群を NP 群とした。上記群分けにより、50%をチャンスレベルとして各群の母親接触率を比較し、MP 群で母親接触率がチャンスレベルよりも有意に高く ($t=67.53, df=58$)、SP 群では有意に低く ($t=79.38, df=42$)、NP 群では母親および新規雌のいずれにも接触していることが確認できた (Fig. 8B)。全個体のうち MP 群は39%、NP 群は29%、SP 群は32%であった (Fig. 8C)。

2-3-2. 母親接触時における前帯状皮質 (ACC) の活性化

母親提示ありまたは母親提示なしの条件下で、ACC 領域 (Fig. 9A) の c-Fos 陽性細胞を観察した (Fig. 9B)。母親提示なしの条件下で、MP 群、NP 群、SP 群間の c-Fos 陽性細胞密度の比較を行ったが、統計的に有意な差は見られなかった (Fig. 9C)。一方、母親提示ありの条件下では、MP 群と比較して、SP 群と NP 群で ACC 領域の c-Fos 陽性細胞密度が有意に増加していた ($F(2, 12) = 13.37; p = 0.023$ SP vs. MP, $p = 0.00009$ NP vs. MP, Fig. 9D)。次に母親および新規雌への接触時間と c-Fos 陽性細胞密度の相関を検討した。母親提示なしでは c-Fos 陽性細胞密度と母親 (Fig. 10A) および新規雌 (Fig. 10C) との接触時間に相関はみられなかった。母親提示ありでは c-Fos 陽性細胞密度と母親接触時間には相関がみられなかったが (Fig. 10B)、新規雌に対す

る接触時間とは統計的に有意な正の相関がみられた ($r^2=0.57$ 、 $p=0.012$ 、Fig. 10D)。

2-3-3. 母親接触時における分界条床核 (BNST) の活性化

母親提示ありまたは母親提示なしの条件下で、BNST 領域 (Fig. 11A) の c-Fos 陽性細胞を観察した (Fig. 11B)。母親提示なしの条件下で、MP 群、NP 群、SP 群間の c-Fos 陽性細胞密度の比較を行ったが、統計的に有意な差は見られなかった (Fig. 11C)。母親提示ありの条件下では、MP 群と比較して、SP 群では c-Fos 陽性細胞密度が有意に増加していた ($F_{2, 10} = 4.53$; $p = 0.034$ SP vs. MP、Fig. 11D)。

次に母親および新規雌への接触時間と c-Fos 陽性細胞密度の相関を検討した。母親提示なしでは c-Fos 陽性細胞密度と母親 (Fig. 12A) および新規雌 (Fig. 12C) との接触時間に相関はみられなかった。母親提示ありでは c-Fos 陽性細胞密度と母親接触時間には統計的に有意な負の相関がみられ ($r^2=0.29$ 、 $p=0.021$ 、Fig. 12B)、c-Fos 陽性細胞密度と新規雌に対する接触時間には統計的に有意な正の相関がみられた ($r^2=0.47$ 、 $p<0.001$ 、Fig. 12C)。

2-3-4. 母親接触時における室傍核 (PVN) の活性化

母親提示ありまたは母親提示なしの条件下で、PVN 領域 (Fig. 13A) の c-Fos 陽性細胞を観察した (Fig. 13B)。母親提示なしおよびありの条件下で MP 群、NP 群、SP 群間の c-Fos 陽性細胞密度の比較を行ったが、統計的に有意な差は見られなかった (Fig. 13C、D)。次に母親および新規雌への接触時間と c-Fos 陽性細胞密度の相関を検討した。母親提示なし/ありのいずれの条件においても、c-Fos 陽性細胞密度と母親 (Fig. 14A、B) および新規雌 (Fig. 14C、D) との接触時間に相関はみられなかった。

2-3-5. 母親接触時における扁桃体基底核 (BLA) の活性化

母親提示ありまたは母親提示なしの条件下で、BLA 領域 (Fig. 15A) の c-Fos 陽性細胞を観察した (Fig. 15B)。母親提示なしおよびありの条件下で MP 群、NP 群、SP 群間の c-Fos 陽性細胞密度の比較を行ったが、統計的に有意な差は見られなかった (Fig. 15C、D)。次に母親および新規雌への接触時間と c-Fos 陽性細胞密度の相関を検討した。母母親提示なし/ありのいずれの条件においても、c-Fos 陽性細胞密度と母親 (Fig. 16A、B) および新規雌 (Fig. 16C、D) との接触時間に相関はみられなかった。

2-3-6. 母親接触時における海馬 CA2領域 (CA2) の活性化

母親提示ありまたは母親提示なしの条件下で、CA2領域 (Fig. 17A) の c-Fos 陽性細胞を観察した (Fig. 17B)。母親提示なしおよびありの条件下で MP 群、NP 群、SP 群間の c-Fos 陽性細胞密度の比較を行ったが、統計的に有意な差は見られなかった (Fig. 17C、D)。次に母親および新規雌への接触時間と c-Fos 陽性細胞密度の相関を検討した。母親提示なし/ありのいずれの条件においても、c-Fos 陽性細胞密度と母親 (Fig. 18A、B) および新規雌 (Fig. 18C、D) との接触時間に相関はみられなかった。母親提示ありでも c-Fos 陽性細胞密度と母親接触時間には負の相関傾向がみられた (Fig. 18B)。

2-3-7. ACC における c-Fos 陽性細胞の細胞種の同定

前述のように、母親提示ありの条件下における仔マウスの ACC 領域では MP 群と比較し、NP 群あるいは SP 群で c-Fos 陽性細胞密度の増加が観察されたことから、これから c-Fos 陽性細胞の細胞種を同定するために、抗 c-Fos 抗体および抗 GAD67抗体を用

いた二重免疫染色を行った。その結果、両抗体に対する免疫陽性反応の共局在は観察されなかった (Fig. 19)。

同様に、c-Fos 陽性細胞の細胞種を同定するために、抗 c-Fos 抗体および vGLUT1 に対する in situ hybridization を用いた二重染色を行った。その結果、アンチセンスプローブを用いた vGLUT1 に対する in situ hybridization の陽性シグナルと抗 c-Fos 抗体の陽性シグナルの共局在が確認された (Fig. 20)。

2-3-8. マイクロアレイ解析

前述のように、母親提示ありの条件下における仔マウスの ACC 領域では3群間における c-Fos 陽性細胞密度に違いがみられた。従って、ACC における神経活性化の差異が母親選好性を制御している可能性が考えられた。ACC の神経活性化の差異がどのような変化を引き起こすか検討するため、MP 群、NP 群および SP 群の ACC 領域における遺伝子発現をマイクロアレイにより検討した。マイクロアレイ解析の結果から、MP 群とくらべ NP 群および SP 群で発現変動を示す遺伝子を探索したところ、MP 群に比べ NP 群では1050遺伝子、SP 群では702遺伝子の発現上昇がみられた。これら遺伝子の中で、発現変動が大きい上位20遺伝子を表に示した (表.2、3)。一方、MP 群に比べ、NP 群では9遺伝子、SP 群では13遺伝子で発現の減少がみられた (表.4、5)。また、NP 群と比較した場合、SP 群では50遺伝子の発現が上昇したのに対して、173遺伝子の発現が減少を示した。これらの遺伝子の中で発現変動が大きい上位20遺伝子を表に示した (表.6、7)。

2-3-9. RT-PCR による mRNA 発現解析

上記結果を踏まえ、MP 群と比較して NP 群と SP 群で遺伝子発現が上昇もしくは減

少した上位20遺伝子（合計40遺伝子）のうち、NM 番号が付与されている RIKEN cDNA を除いた35遺伝子について、リアルタイム PCR のよる遺伝子発現検討を行った。

次に母親および新規雌への接触時間と遺伝子発現量の相関を検討した。検討した35遺伝子のうち母親への接触時間と *Malat1* 遺伝子の発現量に統計的に有意な正の相関がみられ ($r^2=0.56$ 、 $p=0.020$ 、Fig. 21R)、一方、母親への接触時間と *S100a9* 遺伝子の発現量に統計的に有意な負の相関みられた ($r^2=0.52$ 、 $p=0.028$ 、Fig. 21AC)。検討した35遺伝子のうち新規雌への接触時間と *Ptgds* 遺伝子の発現量 ($r^2=0.74$ 、 $p=0.0029$ 、Fig. 22Y) および *S100a9* 遺伝子の発現量 ($r^2=0.86$ 、 $p=0.0004$ 、Fig. 22AC) に統計的に有意な正の相関がみられた。新規雌への接触時間と *Malat1* 遺伝子発現量は負の相関傾向がみられた ($r^2=0.37$ 、 $p=0.08$ 、Fig. 22R)。

2-3-10. 血中オキシトシン・バソプレシン濃度と母親/新規雌との接触時間

PND16での母親選好性テスト後にオキシトシンまたはバソプレシンの血中濃度を測定し、母親および新規雌との接触時間の相関を検討した。オキシトシンの血中濃度は母親または新規雌に対する接触時間と相関は見られなかった (Fig. 23)。バソプレシンの血中濃度と母親に対する接触時間は統計的に有意な負の相関がみられた ($r^2=0.23$ 、 $p=0.028$ 、Fig. 24A)。同時に、新規雌に対する接触時間とバソプレシンの血中濃度では統計的に有意な正の相関がみられた ($r^2=0.24$ 、 $p=0.024$ 、Fig. 24B)。

2-3-11. 母仔分離の母親選好性への影響

コントロール群と母仔分離群に対して PND16に母親選好性テストを行い、母親および新規雌への接触時間の比較を行った。コントロール群と母仔分離群における母親および新規雌への接触時間を比較したが、2群間に差はみられなかった (Fig. 25)。

2-3-12. CRF アンタゴニストの投与による母親選好性テストの影響

コントロール群とアンタゴニスト投与群に対して PND16 に母親選好性テストを行い、母親および新規雌への接触時間を比較した。両群間で母親選好性の差はみられなかった (Fig. 26)。

2-4. 考察

本研究では PND16に母親選好性テストを行い、その結果から母親接触率により仔マウスを母親接触率の高いMP群、母親接触率の低いSP群およびいずれにも該当しないNP群の3群に分け、母親選好性を制御する脳領域、遺伝子、オキシトシン・バソプレッシンの関与およびストレスの関与を検討した。

本研究から、ACC領域とBNST領域では母親との接触により3群間でc-Fos陽性細胞数に違いがあることを見出した。母親との接触によりACC領域におけるc-Fos陽性細胞数がMP群と比較してNP群とSP群で増加していた。この結果から、母親選好性が低い個体は母親と接触することによりACC領域の活性化神経細胞の数が増加していると考えられた。さらに母親との接触によりc-Fos陽性細胞数と新規雌に対する接触時間に正の相関があることを見出した。ACC領域は認知機能、情動処理、痛覚、意思決定に関与することが報告されている(7、32、33、34、35、36、37、38)。過去の報告ではACC領域が母親の不在の感知や輸送反応の抑制などに関連していることが報告されている(7)。これらの結果を合わせると、ACC領域の神経細胞の活性化が母親選好性を負に制御している可能性が考えられる。

BNST領域においても母親との接触によりMP群と比較してSP群でc-Fos陽性細胞数が増加していた。この結果から母親選好性が低い仔マウスは母親との接触でBNST領域の神経細胞の活性が引き起こされると考えられる。さらに母親との接触によりBNST領域におけるc-Fos陽性細胞数と母親との接触時間は負の相関を示し、新規雌との接触時間とは正の相関を示すことを見出した。過去の報告ではBNST領域がモチベーション、性行動、脅威、認知、ストレス、痛みなどの制御をしていることが示唆されている(39、40、41、42、43、44)。さらにBNST領域の活性化が社会的嫌悪や警戒を制御することが示唆されている(45、46)。これらの結果を合わせると、BNST領域の神

経細胞の活性化が母親選好性を負に制御している可能性が考えられる。従って、ACC領域とBNST領域はともに仔マウスにおいて母親選好性を負に制御している可能性が考えられる。ACC領域とBNST領域は相互に神経投射がみられる(40、45)。本研究ではACC領域とBNST領域の活性化が互いに制御しあっているか、または別の現象として生じているかどうかは検証できていない。今後、母親/新規雌に対する選好性とACC領域またはBNST領域との関連についてさらに検討する必要がある。

本研究ではPVN領域、BLA領域およびCA2領域におけるc-Fos陽性細胞数について、母親との接触なし/ありにおいて3群間に違いがみられなかった。従って、本研究の結果からPVN領域、BLA領域そしてCA2領域は母親/新規雌に対する選好性に直接的には作用していないと考えられる。一方で、Lahamらの研究によるとPND14の仔マウスは母親を提示するとCA2の神経細胞の活性が増加するのに対して、成体では母親よりも新規雌によりCA2の神経細胞の活性が増加することが報告されている(10)。従って、CA2領域については本研究結果と先行研究の結果と矛盾している。この知見の不一致は行動テストを行った時期の違いのためと考察される。Lahamらの研究では母親選好性が観察されるPND14において母親と接触する際にCA2領域における神経細胞の活性が報告されている(10)。対して、本研究ではPND16における母親との接触によるCA2領域における神経細胞の活性を観察し、本研究の結果からこの期間における母親選好性がみられないことを明らかにした。時期による母親選好性の違いが母親接触によるCA2領域の活性の違いを引き起こした可能性がある。今後は母親接触におけるCA2領域と母親選好性についてさらなる検証が必要である。

前述のようにACC領域において、SP群では母親との接触により神経細胞の活性化が認められ、ACC領域の神経細胞の活性化が母親選好性を負に制御している可能性が考えられた。本研究ではACC領域が母親選好性を制御する機序に迫るため、母親との接

触によって活性化した神経細胞の細胞種の同定を試みた。その結果、ACC領域のc-Fos陽性細胞では、GAD67の免疫陽性像は観察されなかったが、in situ hybridizationによるvGLUT1 mRNAのシグナル陽性像が認められた。GAD67はGABA作動性神経細胞のマーカーとして知られており、vGLUT1はグルタミン酸作動性神経のマーカーとして知られている。すなわち本研究の結果から、ACC領域のグルタミン酸作動性神経が、母親との接触条件下で活性化することが示唆された。ACC領域におけるグルタミン酸作動性神経の役割については痛覚や記憶を制御することが報告されている（47、48）。母親選好性の制御におけるACC領域のグルタミン酸作動性神経の役割の詳細は明らかではないが、ACC領域のグルタミン酸作動性神経を含む神経ネットワークが母親選好性の制御に関与している可能性が考えられる。

本研究では母親との接触条件下でSP群のACC領域においてグルタミン酸作動性神経細胞が活性化されることに着目し、ACC領域が母親選好性を制御する分子機構に迫るため、MP群、NP、SP群における遺伝子発現を解析した。その結果、母親選好性あるいは新規雌選好性と相関する遺伝子を見出した。S100a9遺伝子の発現量は母親への接触時間と負の相関がみられ、反対に新規雌への接触時間とは統計的に有意な正の相関がみられた。このことから、母親との接触により、ACC領域でS100a9遺伝子発現が亢進し、SP群のような母親に選好性を示さない表現型が出現する可能性が考えられた。S100A9は、S100ファミリータンパク質の一種の、カルシウム結合タンパク質であり、S100タンパク質は、低分子量（9~14 kDa）の細胞内カルシウム結合タンパク質として、細胞骨格の調節、細胞の移動と接着、宿主の抗酸化防御を含む重要な細胞経路を制御している（49）。S100a9遺伝子を抑制またはノックダウンすると、物体・空間記憶の改善がみられ、S100a9が記憶の制御に関与することが示唆されている（50、51）。これまでにACC領域でのS100a9遺伝子の機能は報告がなく、また本研究でも

ACC 領域における *S100a9* 遺伝子の機能を解明することはできなかったが、ACC 領域は認知機能の制御に関与していることの報告を合わせて考えると、ACC 領域における *S100a9* 遺伝子の発現亢進が、母親に対する認知機能を制御した結果、母親選好性に変化を生じさせた可能性が考えられる。

本研究では、新規雌への接触時間と *Ptgds* 遺伝子発現量に正の相関があることを明らかにした。*Ptgds* 遺伝子はプロスタグランジン-D シンターゼをコードしており、プロスタグランジン D2 (PGD2) の生成を触媒する。ACC 領域における PGD2 の機能は不明であるが、PGD2 あるいは PGD2 の受容体である CRTH2 は抑うつ行動、社会相互作用、報酬系などの行動との関連があることが報告されている (52、53、54)。母親との接触により、SP 群での *Ptgds* 遺伝子発現が亢進することにより、PGD2 が産生され、CRTH2 が活性化されると考えられるが、この経路がどのように母親選好性の制御に関与しているかは本研究では検討できなかった。今後、*Ptgds* 遺伝子発現変動と母親選好性の関連についてさらなる検討が必要である。

本研究ではさらに *Malat1* 遺伝子発現量と母親への接触時間に正の相関を見出した。すなわち *Malat1* が母親選好性を亢進させている可能性が考えられる。*Malat1* は長鎖ノンコーディング RNA (lncRNA) として知られ、転写制御などに関与する (55)。しかし、*Malat1* ノックアウトマウスでは、明瞭な表現型が認められず、その生理機能は不明な点が多い (56、57)。マウスでは海馬神経のシナプス成熟に関わることを示されているが (58)、ACC 領域における *Malat1* の機能は明らかではない。今後さらに ACC 領域における *Malat1* 発現動態を解析し、*Malat1* と母親選好性との関連について検討する必要がある。

本研究において、バソプレシンの血中濃度と母親に対する接触時間との負の相関を見出し、新規雌に対する接触時間との正の相関傾向を見出した。この結果から、バソ

プレシンの血中濃度が高いと母親選好性が低下し、新規雌選好性が亢進することが示唆される。バソプレッシンはストレス暴露により血中濃度が上昇することが報告されている (59、60、61)。ヒトにおいて血中バソプレシン濃度と脳脊髄液内の濃度は正の相関を示すことから (62)、バソプレシンの血中濃度の上昇は脳内のバソプレシン濃度の上昇と考えられる。これまでに、脳室内にバソプレシンを投与すると仔マウスでは母親と関連付けさせたにおいに対する探索時間が減少することが示されている (18)。本研究の結果と考え合わせると、バソプレシンは母親選好性を負に制御していると考えられる。一方、本研究ではバソプレシン産生細胞が局在する PVN 領域では母親接触における3群間での c-Fos 陽性細胞の密度には差がみられなかった。母親選好性とバソプレシンとの関連については、PVN の母親選好性への関与を含めてさらに検討する必要がある。

本研究では母親選好性の形成機構を明らかにする目的で、母親選好性の形成にストレスが影響を及ぼすかを検討した。本研究の検討では、幼児虐待の動物モデルの一つである母子分離ストレス負荷群は、コントロール群と比べて母親及び新規雌に対する接触時間に差はみられなかった。従って、本研究で実施した PND14までの母子分離ストレス負荷では PND16時点における母親選好性に影響を及ぼさないと考えられた。過去の報告では、母子分離ストレスにより社会相互作用の抑制などが報告されている

(63、64)。仔ラットでは PND1-3時点に繰り返し母親から隔離すると母親のにおいがついた床敷きに対する選好性が消失するのに対して、PND9-11時点では消失がみられなかったことを報告されている (65)。このことから、ストレスを仔に与える時期により社会行動の抑制を引き起こす可能性が考えられる。母子分離モデルは、どの程度の期間分離を行いか、また1日のうちにどれくらいの時間分離するかによって、ストレス度合いが変化すると考えられている (64、66)。従って、本研究で用いた母子分

離モデルでは影響が見られなかった可能性もあり、母子分離ストレスの強弱を含めて、ストレスと母親選好性について今後さらなる研究が必要である。

同様にストレスと母親選好性形成の関係を検討するため、**CRF** アンタゴニストの投与による母親選好性の変動を検討した。しかし、投与群において母親及び新規雌に対する接触時間の変動は見られなかった。この結果から **CRF** が母親選好性の制御に関与していないと考えられる。一方、これまでに **CRF** により仔マウスの輸送反応が制御される (7) といった報告があり、**CRF** が母親選好性に関与していないかは慎重に検討する必要があり、今後の課題である。

第三章 母親選好性と成体期行動との関連

3-1. 緒言

ヒトでは幼若期に養育者である親から虐待やネグレクトを受けると、発達後の鬱、不安障害、心的外傷後ストレス障害などの精神疾患のリスクが亢進することが知られている (67)。げっ歯類でも幼若期のストレス暴露が長期に渡り行動へ影響することが報告されている。例えば、仔ラットに対して繰り返し母親を剥離すると、成体期において空間認知学習の習得に障害がみられる (68)。マウスでも幼若期に母親分離などのストレスを暴露すると、記憶障害 (69)、不安関連行動や攻撃行動が抑制される (83、82)。さらに母仔分離によるストレスに暴露された仔マウスが成熟し母親になると、仔舐め行動や毛繕い行動を行う割合が減少する (72)。幼若期のストレス暴露は発達後の行動とともに、脳神経への影響を引き起こす。幼若期のストレス暴露は発達後の海馬領域における神経新生や神経細胞数の減少を引き起こすことが示されている (73、72)。さらに幼若期のストレス暴露は成獣での ACC 領域を含む前頭前野のオリゴデンドロサイト前駆細胞の減少も引き起こす (74)。このように、幼若期における母子分離等のストレスは、発達後の脳神経系の異常を伴う行動異常を誘発する。

本研究では、第一章において C57BL/6J 系仔マウスの母親選好性について検討し、第二章において母親選好性を制御する脳領域やホルモン分泌、遺伝子発現について検討を行った。第一章での検討から、C57BL/6J 系仔マウスの母親選好性は PND16以降、個体差をもって推移し、次第に母親選好性が減弱していくと考えられる。本研究においては、同様に飼育している環境において先述のような母親選好性の個体差が生じていることから、特殊な環境要因により発達期の母親選好性の個体差、すなわち母親選好性の強弱、が生じているのではなく、一見同様の環境の中にあってもなお、発達期には個体ごとの母親選好性の差異が生じたと考えられる。上述のように、幼若期の母

子分離やストレス暴露などが成熟後の行動や脳神経系に影響を与えていることが知られているが、通常環境において生じる母親選好性の個体差が成熟後の行動とどのように関連するかを検討した報告はない。従って、本研究では第三章として、幼若期の母親選好性が成体期の行動に影響を与えているかを明らかにする目的で、発達期の母親選好性の差異と成熟後の行動特性との関連を検討した。

3-2. 材料および方法

3-2-1. 動物の飼育

前述のように、PND16で C57BL/6J マウスの仔（雄：46匹、雌：28匹）に対して母親選好性テストを行った。その後、PND21または22に離乳を行った。離乳後、雄は単独飼育を行った（被検体雄）。雌は PND16での母親選好性テストの結果に基づき、前述の MP 群、NP 群および SP 群に分類し、各群の個体数が偏らないように集団飼育（2-4匹）を行った（被検体雌）。刺激動物として5週齢の C57BL/6JJmsSlc 系統（雄：12匹、雌：12匹）と BALB/cCrSlc 系統（雄：12匹、雌：12匹）を購入した（三協ラボサービス）。床替えは7日に一度行い、水は常に十分量飲水できる状態を保ち、1週間に1回交換を行った。行動テスト1週間前に被検体雌（PND56-57）、刺激動物の雌および母親に対して、イソフルランにて深麻酔し、卵巣の摘出を行った。

3-2-2. 行動テスト

被検体が PND63-75の期間に3日間連続で後述する行動テストを行った。テスト1日目は高架式十字迷路とオープンフィールドを行い、2日目以降は物体認知、社会認知、母親選好性テストの3つの行動テストのうち1つを1日1回行った。

3-2-2-1. 高架式十字迷路

30×6cm の4本のアーム（オープンアーム；壁がない2本のアーム、クローズドアーム；高さ20cm の壁で囲われている2本のアーム）で構成された実験装置（SHINFACTORY）を床から50cm の高さに設置した（Fig. 27）。マウスを装置の中心に置き、実験装置上部に設置したビデオカメラを用いて3分間の行動を記録した。試験終了ごとに、70%エタノールを用いて実験装置およびワイヤーケージの汚物等を拭き

取った。行動解析ソフトを用いて各アームに対する滞在時間を計測した。

3-2-2-2. オープンフィールド

幅50cm、横50cm、高さ50cmの実験装置（アズワン）を用いた（Fig. 28）。マウスを装置の中心に置き、実験装置上部に設置したビデオカメラを用いて3分間の行動を記録した。試験終了ごとに、70%エタノールを用いて実験装置の汚物等を拭き取った。実験装置の壁から10cm離れた20cm×20cmの正方形を中央領域とし、その他の領域を周辺領域とし、各領域に対する滞在時間を行動解析ソフトを用いて計測した。

3-2-2-3. 物体認知テスト

実験装置（幅65cm、横40cm、高さ20cm）を使用した（Fig. 29A）。2種類の試験物体ガラス製の錐体（Fig. 29B）、ステンレス製の円錐（Fig. 29C）を2個ずつ用意した。物体認知テストでは、トレーニング期間とその後の再提示期間を設定した。トレーニング期間では、実験装置の両末端領域（幅20cm、横40cm）の中心に同一物体を導入し、実験装置の中心にマウスを置き、実験装置上部に設置したビデオカメラを用いて10分間行動の記録を行った。物体に対してマウスが鼻先を接触していた時間をその物体に対する探索時間として、行動解析ソフトを用いて物体に対する探索時間を計測した。トレーニングテスト終了後、マウスを新規ケージに移し1時間を過ごさせた。その後、再提示期間として、トレーニング期間で探索時間が長かった物体（既知物体）を残存させ、探索時間が少なかった物体を別の物体（新規物体）に交換し、再び10分間の行動記録を行った。試験終了ごとに、70%エタノールを用いて実験装置および試験物体を拭き取った。既知物体および新規物体それぞれに対して、再提示期間の探索時間からトレーニング期間の探索時間を差し引いて探索時間の差分を求めた。

3-2-2-4. 社会認知テスト

行動テスト8日前から被検体に対して、1日5分間、計5回、母親選好性テストと同様のワイヤーケージを実験装置（幅65cm、横40cm、高さ20cm）の各末端領域に導入した環境に馴化を行った。テスト8日前から刺激動物または母親に対して、1日5分間、計5回、ワイヤーケージに導入し、実験装置の各末端領域に置き、実験装置に馴化した。

2匹の刺激動物（C57BL/6JJmsSlc 系統）をそれぞれ導入したワイヤーケージを実験装置の両末端領域の中心に置いた。被検体を実験装置の中心に置き、5分間行動観察を行った。その後、ホームケージと同様の新規ケージに移し5分間過ごさせた。この試行を1試行として連続4試行を行った。ただし、1-3試行は刺激動物として同一の2個体を使用し、3試行目では2匹の刺激動物のうち、探索時間が少なかった1個体をBALB/cCrSlc 系統（新規個体）に取り換えて、他方の個体は既知個体として同様に提示した。観察は実験装置上部に設置したビデオカメラを用いて記録を行った。各ワイヤーケージに対し鼻先を接触していた時間を行動解析ソフトを用いて計測した。1試行終了ごとに、70%エタノールを用いて実験装置およびワイヤーケージの汚物等を拭き取った。

3-2-3. 統計学的解析

結果は平均値±標準誤差もしくは一個体ごとの値で表した。データの統計はGraphPad Prism8を用いて対応のある *t* 検定、one-way ANOVA、two-way ANOVA あるいはピアソンの積率相関係数を用いて検討を行い、 $p<0.05$ の場合を統計的有意とした。

3-3. 結果

3-3-1. 高架式十字迷路

雄のオープンアームおよびクローズドアームにおける滞在時間を PND16で実施した母親選好性の結果に基づいて分類した MP 群、NP 群および SP 群間で比較した。MP 群ではクローズドアームの滞在時間がオープンアームの滞在時間に比べ有意に長かったが ($F(2, 43) = 3.4$; $p = 0.015$, Open vs Close)、NP 群および SP 群では、オープンアームおよびクローズドアームの滞在時間に有意な差は認められなかった。また、MP 群に比べ SP 群のクローズドアームの滞在時間が有意に減少した ($p = 0.042$, MP vs SP, Fig. 30A)。3群を通じて、クローズドアームまたはオープンアームの滞在時間と PND16に行った母親選好性テストの結果の相関性を検討したところ、オープンアーム滞在時間と母親接触率に相関はみられなかった (Fig. 30B)。一方、クローズドアームの滞在時間と母親接触率は統計的に有意な正の相関を示した ($r^2 = 0.18$, $p = 0.0035$, Fig. 30C)。

同様に、雌のオープンアームおよびクローズドアームにおける滞在時間を PND16で実施した母親選好性の結果に基づいて分類した3群間で比較した。各群内におけるオープンアームおよびクローズドアームの滞在時間に有意な差はみられなかった。各群間においてオープンアームおよびクローズドアームの滞在時間に有意な差はなかった。

(Fig. 31A)。またオープンアームおよびクローズドアームの滞在時間と PND16の母親接触率について相関はみられなかった (Fig. 31B, C)。

3-3-2. オープンフィールドテスト

中央領域と周辺領域の滞在時間を PND16で実施した母親選好性の結果に基づいて分類した3群間で比較した。雄では3群ともに周辺領域よりも中心領域の滞在時間が有意

に短かった ($F(1, 21) = 3036$; MP ; $p < 0.0001$, NP ; $p < 0.0001$, SP ; $p < 0.0001$, Fig. 32A)。一方、中央領域および周辺領域の滞在時間に各群間での差はみられなかった。周辺領域および中央領域の滞在時間と母親接触率の相関を検討したところ、いずれも相関はみられなかった (Fig. 32B, C)。

雌でもすべての群で周辺領域よりも中央領域の滞在時間が有意に短かった ($F(1, 25) = 20.66$; MP ; $p < 0.0001$, NP ; $p < 0.0001$, SP ; $p < 0.0001$, Fig. 33A)。しかし、中央領域および周辺領域の滞在時間に各群間での差はみられなかった。周辺領域および中央領域の滞在時間と母親接触率の相関を検討したところ、いずれも相関はみられなかった (Fig. 33B, C)。

3-3-3. 物体認知テスト

雄では MP 群で既知物体に比べ新規物体に対する探索時間が有意に長かった ($F(1, 36) = 17.3$; $p = 0.0009$)。 NP 群と SP 群では既知物体と新規物体に対する探索時間に統計的に有意な差は見られなかった (Fig. 34A)。 $PND16$ で実施した母親選好性の結果から得られた母親接触率と既知物体に対する探索時間には相関は見られなかった (Fig. 35B) が、母親接触率と新規物体に対する探索時間とは統計的に有意な正の相関がみられた ($r^2 = 0.18$, $P = 0.013$, Fig. 34C)。

雌ではすべての群で既知および新規物体に対する探索時間には統計的な差はみられなかった (Fig. 35A)。 $PND16$ で実施した母親選好性の結果から得られた母親接触率と既知物体および新規物体に対する探索時間には相関は見られなかった (Fig. 35B, C)。

3-3-4. 社会認知テスト

雄ではすべての群で、既知個体よりも新規個体に対する探索時間が有意に長かった

(F (1, 21) =43.72 ; MP ; $p=0.0002$ 、NP; $p=0.039$ 、SP; $p=0.0003$ 、Fig. 36A)。

PND16で実施した母親選好性の結果から得られた母親接触率と既知個体および新規個体に対する探索時間には相関は見られなかった (Fig. 36B、C)。

雌では MP 群、NP 群において既知個体よりも新規個体に対する探索時間が有意に長い (F (1, 25) =20.66 ; MP ; $p=0.027$ 、NP; $p=0.038$) ことが観察されたが、SP 群では新規個体に対する既知個体および新規個体の探索時間に差が認められなかった

(SP; $p=0.070$ 、Fig. 37A)。PND16で実施した母親選好性の結果から得られた母親接触率と既知個体および新規個体に対する探索時間には相関は見られなかった (Fig. 37B、C)。

3-4. 考察

マウスでは母親より受けた養育やストレスが成熟後の痛覚反応の抑制、不安関連行動の減少、記憶の抑制などに影響を及ぼすことが報告されている (69、71、72、75、76)。本研究では PND16の母親選好性テストの結果をもとに母親接触率の差異により仔マウスを3群に分け、成熟後の不安関連行動、物体認知、社会認知の行動と母親接触率に関連があるか検討を行った。

高架式十字迷路試験は、マウスが有する新規環境探索傾向と、明るく開けた場所を忌避する嫌悪特性間の生得的な葛藤に基づく課題であり、不安関連行動を測定する試験として汎用されている。一般的に、マウスを用いて検討を行うと、クローズドアームへの滞在時間が長く、オープンアームの滞在時間が短いことが知られている (87)。本研究により、雄では母親接触率の高い MP 群において、クローズドアームの滞在時間がオープンアームの滞在時間に比べ有意に長いことが観察された。一方、NP 群および SP 群では、上記有意差は観察されなかった。上記結果は、MP 群、すなわち PND16の時点で母親接触率が80%以上だった個体では、一般的に観察される程度の不安傾向を示すのに対し、母親選好性が80%未満だった個体では、不安傾向が減弱していることを示唆する。本研究では、クローズドアームの滞在時間が母親接触率と正の相関を示すことも見出した。すなわち、幼若期に母親選好性が高い個体は、成熟後に不安傾向が高いことが示唆される。これらの結果から、幼若期の母親選好性が発達後の不安傾向に影響を及ぼしている可能性が考えられる。第二章で述べたように、ACC 領域の神経細胞の活性化が母親選好性に関連している可能性がある。これまでに、不安関連行動が ACC の神経活動の減少と関連し (78)、不安障害の患者では fMRI における ACC の鈍化が報告されている (79)。本研究の PND19での検討から、MP 群では、NP 群と SP 群と比較して ACC 領域の神経活動が低いことが示唆された。これらの結果から、

発達後にも母親選好性の差異による ACC 領域の神経活動の差が継続されており、そのため幼若期の母親選好性が発達後の不安関連行動に影響を及ぼしている可能性が考えられる。しかし、本研究では、幼若期の ACC 領域の活性化の差異が発達後まで継続しているかの検討は行えなかった。今後、ACC 領域の母親選好性および不安関連行動への関与を幼若期から成体期まで検討し、母親選好性と不安関連行動の関連をさらに検討する必要がある。一方、雌ではいずれの群においても、クローズドアームの滞在時間とオープンアームの滞在時間に有意な差は認められなかった。上述のように、高架式十字迷路では、一般的にクローズドアームへの滞在時間が長く、オープンアームの滞在時間が短いことが知られている。雌を用いた検討においては、発情周期が不安関連行動に影響を及ぼすことが散見される。本研究では、発情周期の影響を排除するために、行動試験前に卵巣除去を行っている。従って、本結果への発情周期の影響はないと考えられるが、MP 群においても雄で観察されたような、クローズドアームの滞在時間がオープンアームの滞在時間に比べ長い表現型は観察されなかった。同様に、オープンアームあるいはクローズドアームの滞在時間と PND16 時点での母親接触率との相関は見いだせなかった。従って、本研究において雌における不安関連行動が検出できているかを含め、雌の母親選好性と不安関連行動の関連については、さらなる検討が必要である。

オープンフィールドテストは1934年に Hall により考案され、高架式十字迷路試験と同様に新規環境下における探索傾向と開けた場所に対する嫌悪特性間の葛藤に基づく課題であり、自発運動活性及び不安関連行動を測定する試験として汎用されている。オープンフィールドテストではマウスを用いて検討を行うと、装置の壁に接近行動を示し、中央領域における滞在時間が少なくなることが知られている (80)。本研究の検討では、雄と雌において MP 群、NP 群および SP 群の3群とも中央領域よりも周辺領

域の滞在時間が有意に長かった。この結果は雄の **NP** 群および **SP** 群において不安傾向が減弱していることを示唆した高架式十字迷路の結果を支持していない。過去の報告でもストレス暴露されたマウスは発達後では高架式十字迷路でのオープンアームの探索時間が増加するのに対して、オープンフィールドテストでは中央領域における滞在時間には差がみられていない (71) ことや、抗不安薬であるトリアゾロベンゾジアゼピンを投与しても、オープンフィールドテストにおける不安関連行動には反応が低いことが報告されており (81)、これらの知見と本研究結果を合わせると、オープンフィールドテストは高架式十字迷路に比べ、不安傾向の減弱に対する感度が低い可能性がある。不安傾向を測定する行動試験はほかにもいくつか知られており、引き続き幼若期の母親選好性と成熟後の不安関連行動については多面的に検討していく必要がある。

物体認知テストはマウスが既知物体と新規物体を識別し、既知物体に比べ新規物体に対してより選択的に探索する特性を利用した試験として知られている (82)。本研究により雄では幼若期の母親接触率が高い **MP** 群において既知物体よりも新規物体に対する探索時間が有意に長いことが観察された。対して、**NP** 群と **SP** 群では新規、既知物体に対する探索時間の差は観察できなかった。上記の結果は幼若期の母親接触率が高い個体では物体認知は正常を示すのに対し、母親接触率が80%未満の個体は物体認知機能が低下していることを示唆する。本研究では、新規物体に対する探索時間が母親接触率と正の相関を示すことも見出した。これらの結果から幼若期の母親選好性が低い個体は、成熟後の物体認知機能が低い可能性がある。これまでに幼若期にストレスを暴露された仔は成熟後の認知機能が抑制されることが報告されている (68、72、83)。また第二章で述べたように、**ACC** 領域の神経細胞の活性化は母親選好性を抑制する可能性がある。げっ歯類や霊長類において新規物体に比べ既知物体に接触すると **ACC** 領域の神経細胞の活性が増加することが報告されている (84、85、86)。電気生

理学的手法からもラットが既知の物体あるいは空間に暴露されると ACC 領域の神経細胞が発火することが報告されている (87)。本研究の検討から、幼若期の母親との接触は ACC 領域の活性化を誘導し、S100 β 遺伝子の発現の亢進を引き起こし、母親選好性を抑制することが示唆される。アルツハイマー病モデルマウスで S100 β 遺伝子ノックダウンすることにより認知機能の改善がみられ (51)、敗血症モデルマウスに S100 β の阻害剤を投与すると学習障害が改善されることが報告されている (51)。これらの知見を合わせると、母親選好性が低い NP 群と SP 群は ACC 領域における S100 β 遺伝子の発現量が高く、物体認知機能に影響を及ぼしている可能性が考えられる。しかし、本研究では発達後の ACC 領域における S100 β 遺伝子発現の検討は行えていない。今後は母親選好性と幼若期から成体期における ACC 領域における S100 β 遺伝子の発現量が認知機能に及ぼす影響についてさらに検討する必要がある。

一方で、雌ではいずれの群において新規、既知に対する探索時間に有意な差は認められなかった。一般的には、物体認知テストでは既知物体よりも新規物体に対する探索時間が増加することが知られている。また物体認知では、雄よりも雌の方が新規物体と既知物体を識別できることが知られている (88)。認知記憶の向上には海馬におけるエストロゲンが関連することから (89、90)、エストロゲン量が多い雌の方が雄よりも物体認知機能が高くなると考えられる。過去の報告では、卵巣除去により認知機能が抑制され、エストロゲンを投与すると認知機能が亢進することが報告されている (91、92)。これらを考えると、本研究結果において、雌の MP 群においても新規物体と既知物体との探索時間に差がみられなかった原因として、卵巣除去の影響が考えられる。本研究で用いた方法によって、雌の物体認知機能が検出できなかった可能性を含め、雌の母親選好性と物体認知機能との関連についてはさらなる検討が必要である。

社会認知テストは物体認知テストと同様にマウスが既知個体よりも新規個体に対し

て選択的に探査行動を行う行動特性を利用した試験として知られている (93)。本研究により、雄では MP 群、NP 群および SP 群ともに既知個体に比べて新規個体に対する探索時間が有意に長いことが観察された。従って、PND16時点における母親選好性は成体期における社会認知機能とは関連しないと考えられる。一方で、雌では MP 群と NP 群では既知個体と比較して新規個体に対する探索時間が有意に長いのにに対して、SP 群では新規個体に対する探索時間と既知個体に対する探索時間に統計的に有意な差は観察されなかった。このことは SP 群において、発達後の認知機能が低下していることを示唆する。第二章で述べたように、BNST 領域の神経細胞の活性化が母親選好性を抑制する可能性がある。BNST 領域の神経細胞の活性化は、社会的相互作用を抑制することが知られている (30、94)。従って、雌では母親選好性と関連する BNST 領域の神経活動の違いが発達後も維持され、個体認知機能に影響を及ぼしている可能性が考えられる。しかし、本研究では BNST 領域の活性化の差異が発達まで継続しているかの検討は行えなかった。今後、BNST 領域の母親選好性および社会認知機能への関与を幼若期から成体期まで検討し、母親選好性と社会認知機能の関連をさらに検討する必要がある。

第四章 総括

哺乳類の仔において母親との関係が生存するために重要であり、様々な動物種で母親と他個体を識別し、選好性を示すことが知られている。本研究では母親選好性における生理的機序を解明することを目的として、**C57BL/6j** 系統マウスを用いて母親選好性とその形成の生理的機序および成熟後の行動特性について多面的な解析を試みた。

本研究の検討から、**PND16**の仔マウスには母親及び新規雌に対する選好性に個体ごとの違いがあることが明らかになった。さらに母親選好性の強弱を制御する分子としてバソプレシンの可能性を見出し、**ACC** 領域および **BNST** 領域の活性化および **ACC** 領域における **S100a9**、**Malat1**、**Ptgds** 遺伝子発現量が母親選好性を制御している可能性を見出した。本研究から幼若期の母親選好性は成熟後の雄では不安傾向や物体認知機能に、雌では社会認知機能と関連がつけられる可能性も見出された。

本研究の成果は、個体間認知の一つの表現型として、未解明の部分の多い母親選好性の形成機構の一端に迫るものである。

謝辞

本研究の遂行および作成にあたり、数々のご指導を賜りました、埼玉大学大学院連携教員/国立成育医療研究センター薬剤治療研究部の中村和昭先生に厚く御礼申し上げます。本論文をご高覧頂き、貴重なご助言を受けたまりました埼玉大学大学院理工学区研究科生命科学コース調節生理学研究室塚原伸治教授、細胞制御学研究室坂田一郎教授、発生生物学研究室川村哲規准教授に深く感謝いたします。本論文を作製するにあたり、貴重なご助言を頂きました帝京科学大学近藤保彦先生に感謝いたします。本研究を遂行するにあたり国立成育医療研究センターの薬剤治療研究部の田中理恵子先生、相澤和子さん、鈴木朋子さん、羽野まゆみさん、堀江佳代さん、寺山恵子さん、水野悦子さんには公私にわたり様々な面でご協力頂き本校を提出することができました。心から感謝いたします。本実験を遂行するにあたり、多くの動物たちの協力を頂きました。深く感謝するとともに心よりご冥福をお祈りいたします。最後に研究生活を支えてくれた夫、母、ざびちゃん、雷ちゃん、ラテ、オレに感謝いたします。

引用文献

- (1) J. Bowlby, *Attachment and Loss*, Basic Books, New York, 1969.
- (2) K. Chisholm, A Three Year Follow-up of Attachment and Indiscriminate Friendliness in Children Adopted from Romanian Orphanages, *Child Dev.* 69 (1998) 1092–1106. <https://doi.org/10.1111/j.1467-8624.1998.tb06162.x>.
- (3) C.H. Zeanah, M.M. Gleason, *Reactive Attachment Disorder : a review for DSM-V*
REACTIVE ATTACHMENT DISORDER : A REVIEW FOR DSM-V Department of
Psychiatry and Behavioral Sciences Tulane University School of Medicine
Correspondence :, (2014) .
- (4) Harlow Harry Frederick, Suomi Stephen J, *Nature of love: Simplified.*, *Am Psychol.* 25 (1970) 161–168.
- (5) Harlow Harry Frederick, *The nature of love*, *Am Psychol.* 13 (1958) 673–685.
- (6) A.P.S. Goursaud, J. Bachevalier, *Social attachment in juvenile monkeys with neonatal lesion of the hippocampus, amygdala and orbital frontal cortex*, *Behav Brain Res.* 176 (2007) 75–93. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2006.09.020>.
- (7) S. Yoshida, R. Ohnishi, Y. Tsuneoka, Y. Yamamoto-Mimura, R. Muramatsu, T.

- Kato, H. Funato, K.O. Kuroda, Corticotropin-releasing factor receptor 1 in the anterior cingulate cortex mediates maternal absence-induced attenuation of transport response in mouse pups, *Front Cell Neurosci.* 12 (2018) .
<https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00204>.
- (8) C.H. Kinsley, R.S. Bridges, Morphine treatment and reproductive condition alter olfactory preferences for pup and adult male odors in female rats, *Dev Psychobiol.* 23 (1990) 331–347. <https://doi.org/10.1002/dev.420230405>.
- (9) K. Mogi, A. Takakuda, C. Tsukamoto, R. Ooyama, S. Okabe, N. Koshida, M. Nagasawa, T. Kikusui, Mutual mother-infant recognition in mice: The role of pup ultrasonic vocalizations, *Behav Brain Res.* 325 (2017) 138–146.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.08.044>.
- (10) B.J. Laham, E.J. Diethorn, E. Gould, Newborn mice form lasting CA2-dependent memories of their mothers, *Cell Rep.* 34 (2021) 108668.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108668>.
- (11) R.M. Sullivan, P.J. Holman, Transitions in sensitive period attachment learning in infancy: The role of corticosterone, *Neurosci Biobehav Rev.* 34 (2010) 835–

844. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2009.11.010>.

- (12) C. Cinque, S. Pondiki, D. Oddi, M.G. Di Certo, S. Marinelli, A. Troisi, A. Moles, F.R. D'Amato, Modeling socially anhedonic syndromes: Genetic and pharmacological manipulation of opioid neurotransmission in mice, *Transl Psychiatry*. 2 (2012) 1–8. <https://doi.org/10.1038/tp.2012.83>.
- (13) D.W. Logan, L.J. Brunet, W.R. Webb, T. Cutforth, J. Ngai, L. Stowers, Learned recognition of maternal signature odors mediates the first suckling episode in mice, *Curr Biol*. 22 (2012) 1998–2007. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.08.041>.
- (14) M. Klaey-Tassone, B. Schaal, K. Durand, B. Patris, The role of papillary skin glands in guiding mouse pups to the nipple, *Dev Psychobiol*. (2020) 226–236. <https://doi.org/10.1002/dev.22004>.
- (15) N. Inoue, H. Nishizumi, R. Ooyama, K. Mogi, K. Nishimori, T. Kikusui, H. Sakano, The olfactory critical period is determined by activity-dependent *sema7a/plxnc1* signaling within glomeruli, *Elife*. 10 (2021) 1–22. <https://doi.org/10.7554/eLife.65078>.
- (16) C.M. Armstrong, L.M. DeVito, T.A. Cleland, One-trial associative odor learning

- in neonatal mice, *Chem Senses*. 31 (2006) 343–349.
<https://doi.org/10.1093/chemse/bjj038>.
- (17) S. Moriceau, T.L. Roth, R.M. Sullivan, Rodent model of infant attachment learning and stress, *Dev Psychobiol*. 52 (2010) 651–660.
<https://doi.org/10.1002/dev.20482>.
- (18) E.A.D. Hammock, C.S. Law, P. Levitt, Vasopressin eliminates the expression of familiar odor bias in neonatal female mice through V1aR, *Horm Behav*. 63 (2013) 352–360. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2012.12.006>.
- (19) M. Noriuchi, Y. Kikuchi, A. Senoo, The Functional Neuroanatomy of Maternal Love: Mother’s Response to Infant’s Attachment Behaviors, *Biol Psychiatry*. 63 (2008) 415–423. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2007.05.018>.
- (20) A.P.S. Goursaud, K. Wallen, J. Bachevalier, Mother recognition and preference after neonatal amygdala lesions in rhesus macaques (*Macaca mulatta*) raised in a semi-naturalistic environment, *Dev Psychobiol*. 56 (2014) 1723–1734.
<https://doi.org/10.1002/dev.21233>.
- (21) K.M. Kendrick, A.P.C. Da Costa, K.D. Broad, S. Ohkura, R. Guevara, F. Lévy,

- E.B. Keverne, Neural control of maternal behaviour and olfactory recognition of offspring, *Brain Res Bull.* 44 (1997) 383–395. [https://doi.org/10.1016/S0361-9230\(97\)00218-9](https://doi.org/10.1016/S0361-9230(97)00218-9).
- (22) W.J. Carr, E. Marasco, M.R. Landauer, Responses by rat pups to their own nest versus a strange conspecific nest, *Physiol Behav.* 23 (1979) 1149–1151.
- (23) H.J. Polan, M.A. Hofer, Olfactory preference for mother over home nest shavings by newborn rats, *Dev Psychobiol.* 33 (1998) 5–20. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2302\(199807\)33:1<5::AID-DEV2>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2302(199807)33:1<5::AID-DEV2>3.0.CO;2-P).
- (24) M.F. Breen, A.I. Leshner, Maternal pheromone: A demonstration of its existence in the mouse (*Mus musculus*), *Physiol Behav.* 18 (1977) 527–529. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(77\)90269-4](https://doi.org/10.1016/0031-9384(77)90269-4).
- (25) M. Rojas-Carvajal, J.C. Brenes, A. Sequeira-Cordero, Age-dependent differences on neurochemistry and behavior in rats raised with low and high levels of maternal care, *Behav Brain Res.* 372 (2019) 112054. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.112054>.

- (26) J. Jhang, H. Lee, M.S. Kang, H.S. Lee, H. Park, J.H. Han, Anterior cingulate cortex and its input to the basolateral amygdala control innate fear response, *Nat Commun.* 9 (2018) 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05090-y>.
- (27) Z. Fatahi, A. Ghorbani, M. Ismail Zibaii, A. Haghparast, Neural synchronization between the anterior cingulate and orbitofrontal cortices during effort-based decision making, *Neurobiol Learn Mem.* 175 (2020) 107320. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2020.107320>.
- (28) D.L. Walker, D.J. Toufexis, M. Davis, Role of the bed nucleus of the stria terminalis versus the amygdala in fear, stress, and anxiety, *Eur J Pharmacol.* 463 (2003) 199–216. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(03\)01282-2](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(03)01282-2).
- (29) M. Lanzillo, M. Gervais, S. Croizier, Ontogeny of the Projections From the Dorsomedial Division of the Anterior Bed Nucleus of the Stria Terminalis to Hypothalamic Nuclei, *Front Neurosci.* 15 (2021) 1–9. <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.748186>.
- (30) N. Duque-Wilckens, L.Y. Torres, S. Yokoyama, V.A. Minie, A.M. Tran, S.P. Petkova, R. Hao, S. Ramos-Maciel, R.A. Rios, K. Jackson, F.J. Flores-Ramirez,

- I. Garcia-Carachure, P.A. Pesavento, S.D. Iniguez, V. Grinevich, B.C. Trainor, Extrahypothalamic oxytocin neurons drive stress-induced social vigilance and avoidance, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 117 (2020) 26406–26413. <https://doi.org/10.1073/pnas.2011890117>.
- (31) C. Tsuji, T. Fujisaku, T. Tsuji, Oxytocin ameliorates maternal separation-induced ultrasonic vocalisation calls in mouse pups prenatally exposed to valproic acid, *J Neuroendocrinol.* 32 (2020) 1–9. <https://doi.org/10.1111/jne.12850>.
- (32) T.V.P. Bliss, G.L. Collingridge, B.K. Kaang, M. Zhuo, Synaptic plasticity in the anterior cingulate cortex in acute and chronic pain, *Nat Rev Neurosci.* 17 (2016) 485–496. <https://doi.org/10.1038/nrn.2016.68>.
- (33) N. Fullana, J. Gasull-Camós, M. Tarrés-Gatius, A. Castañé, A. Bortolozzi, F. Artigas, Astrocyte control of glutamatergic activity: Downstream effects on serotonergic function and emotional behavior, *Neuropharmacology.* 166 (2020) 107914. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.107914>.
- (34) Y. Jiang, M.L. Platt, Oxytocin and vasopressin flatten dominance hierarchy and enhance behavioral synchrony in part via anterior cingulate cortex, *Sci Rep.* 8

- (2018) 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25607-1>.
- (35) S. Keum, H.S. Shin, Neural Basis of Observational Fear Learning: A Potential Model of Affective Empathy, *Neuron*. 104 (2019) 78–86. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.09.013>.
- (36) A. Khani, M. Kermani, S. Hesam, A. Haghparast, E.G. Argandoña, G. Rainer, Activation of cannabinoid system in anterior cingulate cortex and orbitofrontal cortex modulates cost-benefit decision making, *Psychopharmacology (Berl)* . 232 (2015) 2097–2112. <https://doi.org/10.1007/s00213-014-3841-6>.
- (37) A.S. Klein, N. Gogolla, How mice feel each other’s pain or fear, *Science*. 371 (2021) 122–123. <https://doi.org/10.1126/science.abf5940>.
- (38) T. Sakaguchi, S. Iwasaki, M. Okada, K. Okamoto, Y. Ikegaya, Ethanol facilitates socially evoked memory recall in mice by recruiting pain-sensitive anterior cingulate cortical neurons, *Nat Commun*. 9 (2018) . <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05894-y>.
- (39) S. Awasthi, H. Pan, J.E. LeDoux, M. Cloitre, M. Altemus, B. McEwen, D. Silbersweig, E. Stern, The bed nucleus of the stria terminalis and functionally

- linked neurocircuitry modulate emotion processing and HPA axis dysfunction in posttraumatic stress disorder, *NeuroImage Clin.* 28 (2020) 102442. <https://doi.org/10.1016/j.nicl.2020.102442>.
- (40) C. Belzung, M. Turiault, G. Griebel, Optogenetics to study the circuits of fear- and depression-like behaviors: A critical analysis, *Pharmacol Biochem Behav.* 122 (2014) 144–157. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2014.04.002>.
- (41) A. Bystritsky, N.M. Spivak, B.H. Dang, S.A. Becerra, M.G. Distler, S.E. Jordan, T.P. Kuhn, Brain circuitry underlying the ABC model of anxiety, *J Psychiatr Res.* 138 (2021) 3–14. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2021.03.030>.
- (42) S.E. Daniel, D.G. Rainnie, Stress Modulation of Opposing Circuits in the Bed Nucleus of the Stria Terminalis, *Neuropsychopharmacology.* 41 (2016) 103–125. <https://doi.org/10.1038/npp.2015.178>.
- (43) K.M. Dumais, A.G. Alonso, M.A. Immormino, R. Bredewold, A.H. Veenema, Involvement of the oxytocin system in the bed nucleus of the stria terminalis in the sex-specific regulation of social recognition, *Psychoneuroendocrinology.* 64 (2016) 79–88. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2015.11.007>.

- (44) L.S. Morris, C. Sprenger, K. Koda, D.M. de la Mora, T. Yamada, H. Mano, Y. Kashiwagi, Y. Yoshioka, Y. Morioka, B. Seymour, Anterior cingulate cortex connectivity is associated with suppression of behaviour in a rat model of chronic pain, *Brain Neurosci Adv.* 2 (2018) 239821281877964. <https://doi.org/10.1177/2398212818779646>.
- (45) L.R. Glover, K.M. McFadden, M. Bjorni, S.R. Smith, N.G. Rovero, S. Oreizi-Esfahani, T. Yoshida, A.F. Postle, M. Nonaka, L.R. Halladay, A. Holmes, A prefrontal-bed nucleus of the stria terminalis circuit limits fear to uncertain threat, *Elife.* 9 (2020) 1–53. <https://doi.org/10.7554/eLife.60812>.
- (46) N. Duque-Wilckens, M.Q. Steinman, M. Busnelli, B. Chini, S. Yokoyama, M. Pham, S.A. Laredo, R. Hao, A.M. Perkeybile, V.A. Minie, P.B. Tan, K.L. Bales, B.C. Trainor, Oxytocin Receptors in the Anteromedial Bed Nucleus of the Stria Terminalis Promote Stress-Induced Social Avoidance in Female California Mice, *Biol Psychiatry.* 83 (2018) 203–213. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2017.08.024>.
- (47) K. Koga, S. Li, M. Zhuo, Metabotropic Glutamate Receptor Dependent Cortical

Plasticity in Chronic Pain, *Curr Neuropharmacol.* 14 (2015) 427–434.

<https://doi.org/10.2174/1570159x13666150425002304>.

(48) B.C. Shyu, B.A. Vogt, Short-term synaptic plasticity in the nociceptive thalamic-

anterior cingulate pathway, *Mol Pain.* 5 (2009) 1–20.

<https://doi.org/10.1186/1744-8069-5-51>.

(49) J. Markowitz, W.E. Carson, Review of S100A9 biology and its role in cancer,

Biochim Biophys Acta - Rev Cancer. 1835 (2013) 100–109.

<https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2012.10.003>.

(50) T.Y. Ha, K.A. Chang, J.A. Kim, H.S. Kim, S. Kim, Y.H. Chong, Y.H. Suh, S100a9

knockdown decreases the memory impairment and the neuropathology in Tg2576

mice, AD animal model, *PLoS One.* 5 (2010) .

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008840>.

(51) Y.L. Liao, X.Y. Zhou, M.H. Ji, L.C. Qiu, X.H. Chen, C.S. Gong, Y. Lin, Y.H. Guo,

J.J. Yang, S100A9 Upregulation Contributes to Learning and Memory

Impairments by Promoting Microglia M1 Polarization in Sepsis Survivor Mice,

Inflammation. 44 (2021) 307–320. <https://doi.org/10.1007/s10753-020-01334->

6.

- (52) C. Chu, H. Wei, W. Zhu, Y. Shen, Q. Xu, Decreased prostaglandin d2 levels in major depressive disorder are associated with depression-like behaviors, *Int J Neuropsychopharmacol.* 20 (2017) 731–739.
<https://doi.org/10.1093/ijnp/pyx044>.
- (53) R. Haba, N. Shintani, Y. Onaka, T. Kanoh, H. Wang, R. Takenaga, A. Hayata, H. Hirai, K. ya Nagata, M. Nakamura, A. Kasai, R. Hashimoto, K. Nagayasu, T. Nakazawa, H. Hashimoto, A. Baba, Central CRTH2, a second prostaglandin D2 receptor, mediates emotional impairment in the lipopolysaccharide and tumor-induced sickness behavior model, *J Neurosci.* 34 (2014) 2514–2523.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1407-13.2014>.
- (54) Y. Onaka, N. Shintani, T. Nakazawa, R. Haba, Y. Ago, H. Wang, T. Kanoh, A. Hayata-Takano, H. Hirai, K. ya Nagata, M. Nakamura, R. Hashimoto, T. Matsuda, J.A. Waschek, A. Kasai, K. Nagayasu, A. Baba, H. Hashimoto, CRTH2, a prostaglandin D2 receptor, mediates depression-related behavior in mice, *Behav Brain Res.* 284 (2015) 131–137. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.02.013>.

- (55) G. Arun, D. Aggarwal, D.L. Spector, MALAT1 long non-coding RNA: Functional implications, *Non-Coding RNA*. 6 (2020) 1–17.
<https://doi.org/10.3390/NCRNA6020022>.
- (56) M. Eißmann, T. Gutschner, M. Hämmerle, S. Günther, M. Caudron-Herger, M. Groß, P. Schirmacher, K. Rippe, T. Braun, M. Zörnig, S. Diederichs, Loss of the abundant nuclear non-coding RNA MALAT1 is compatible with life and development, *RNA Biol*. 9 (2012) 1076–1087.
<https://doi.org/10.4161/rna.21089>.
- (57) B. Zhang, G. Arun, Y.S. Mao, Z. Lazar, G. Hung, G. Bhattacharjee, X. Xiao, C.J. Booth, J. Wu, C. Zhang, D.L. Spector, The lncRNA malat1 is dispensable for mouse development but its transcription plays a cis-regulatory role in the adult, *Cell Rep*. 2 (2012) 111–123. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.06.003>.
- (58) D. Bernard, K. V. Prasanth, V. Tripathi, S. Colasse, T. Nakamura, Z. Xuan, M.Q. Zhang, F. Sedel, L. Jourdain, F. Couplier, A. Triller, D.L. Spector, A. Bessis, A long nuclear-retained non-coding RNA regulates synaptogenesis by modulating gene expression, *EMBO J*. 29 (2010) 3082–3093.

<https://doi.org/10.1038/emboj.2010.199>.

- (59) N.M. Brydges, J. Hall, C. Best, L. Rule, H. Watkin, A.J. Drake, C. Lewis, K.L.

Thomas, J. Hall, Childhood stress impairs social function through AVP-dependent

mechanisms, *Transl Psychiatry*. 9 (2019) . [https://doi.org/10.1038/s41398-019-](https://doi.org/10.1038/s41398-019-0678-0)

0678-0.

- (60) B.H. Harvey, W. Regenass, W. Dreyer, M. Möller, Social isolation rearing-

induced anxiety and response to agomelatine in male and female rats: Role of

corticosterone, oxytocin, and vasopressin, *J Psychopharmacol*. 33 (2019) 640–

646. <https://doi.org/10.1177/0269881119826783>.

- (61) J. Yang, Y.J. Pan, Z.K. Yin, G.F. Hai, L. Lu, Y. Zhao, D.X. Wang, H. Wang, G.

Wang, Effect of arginine vasopressin on the behavioral activity in the behavior

despair depression rat model, *Neuropeptides*. 46 (2012) 141–149.

<https://doi.org/10.1016/j.npep.2012.03.003>.

- (62) D.S. Carson, J.P. Garner, S.A. Hyde, R.A. Libove, S.W. Berquist, K.B.

Hornbeak, L.P. Jackson, R.D. Sumiyoshi, C.L. Howerton, S.L. Hannah, S. Partap,

J.M. Phillips, A.Y. Hardan, K.J. Parker, Arginine vasopressin is a blood-based

- biomarker of social functioning in children with autism, *PLoS One*. 10 (2015) 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132224>.
- (63) R. Emmons, T. Sadok, N.G. Rovero, M.A. Belnap, H.J.M. Henderson, A.J. Quan, N.J. Del Toro, L.R. Halladay, Chemogenetic manipulation of the bed nucleus of the stria terminalis counteracts social behavioral deficits induced by early life stress in C57BL/6J mice, *J Neurosci Res*. 99 (2021) 90–109. <https://doi.org/10.1002/jnr.24644>.
- (64) T.A. Kosten, J.J. Kim, H.J. Lee, Early life manipulations alter learning and memory in rats, *Neurosci Biobehav Rev*. 36 (2012) 1985–2006. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2012.07.003>.
- (65) A. Dolor Finkler, G.V. Espinoza Pardo, A. Bolten Lucion, Repeated cross-fostering affects maternal behavior and olfactory preferences in rat pups, *Dev Psychobiol*. 62 (2020) 283–296. <https://doi.org/10.1002/dev.21907>.
- (66) I. Toth, I.D. Neumann, Animal models of social avoidance and social fear, *Cell Tissue Res*. 354 (2013) 107–118. <https://doi.org/10.1007/s00441-013-1636-4>.
- (67) M.H. Teicher, J.A. Samson, Childhood maltreatment and psychopathology: A

case for ecophenotypic variants as clinically and neurobiologically distinct subtypes, *Am J Psychiatry*. 170 (2013) 1114–1133.
<https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2013.12070957>.

- (68) J.M. Cordier, J.P. Aguggia, V. Danelon, F.R. Mir, M.A. Rivarola, D. Mascó, Postweaning Enriched Environment Enhances Cognitive Function and Brain-Derived Neurotrophic Factor Signaling in the Hippocampus in Maternally Separated Rats, *Neuroscience*. 453 (2021) 138–147.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2020.09.058>.

- (69) S.G. Tractenberg, M.L. Levandowski, L.A. de Azeredo, R. Orso, L.G. Roithmann, E.S. Hoffmann, H. Brenhouse, R. Grassi-Oliveira, An overview of maternal separation effects on behavioural outcomes in mice: Evidence from a four-stage methodological systematic review, *Neurosci Biobehav Rev*. 68 (2016) 489–503.
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.06.021>.

- (70) M.C. Tsuda, N. Yamaguchi, S. Ogawa, Early life stress disrupts peripubertal development of aggression in male mice, *Neuroreport*. 22 (2011) 259–263.
<https://doi.org/10.1097/WNR.0b013e328344495a>.

- (71) H.M. Savignac, T.G. Dinan, J.F. Cryan, Resistance to early-life stress in mice: Effects of genetic background and stress duration, *Front Behav Neurosci.* 5 (2011) 1–12. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2011.00013>.
- (72) V. V. Reshetnikov, A. V. Kovner, A.A. Lepeshko, K.S. Pavlov, L.N. Grinkevich, N.P. Bondar, Stress early in life leads to cognitive impairments, reduced numbers of CA3 neurons and altered maternal behavior in adult female mice, *Genes, Brain Behav.* 19 (2020) 1–14. <https://doi.org/10.1111/gbb.12541>.
- (73) H.J. Hulshof, A. Novati, A. Sgoifo, P.G.M. Luiten, J.A. Den Boer, P. Meerlo, Maternal separation decreases adult hippocampal cell proliferation and impairs cognitive performance but has little effect on stress sensitivity and anxiety in adult Wistar rats, *Behav Brain Res.* 216 (2011) 552–560. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.08.038>.
- (74) A. Teissier, C. Le Magueresse, J. Olusakin, B.L.S. Andrade da Costa, A.M. De Stasi, A. Bacci, Y. Imamura Kawasawa, V.A. Vaidya, P. Gaspar, Early-life stress impairs postnatal oligodendrogenesis and adult emotional behaviour through activity-dependent mechanisms, *Mol Psychiatry.* 25 (2020) 1159–1174.

<https://doi.org/10.1038/s41380-019-0493-2>.

- (75) T. Sakamoto, Y. Ishio, Y. Ishida, K. Mogi, T. Kikusui, Low maternal licking/grooming stimulation increases pain sensitivity in male mouse offspring, *Exp Anim.* 70 (2021) 13–21. <https://doi.org/10.1538/EXPANIM.20-0030>.
- (76) R. Doreste-Mendez, E.J. Ríos-Ruiz, L.L. Rivera-López, A. Gutierrez, A. Torres-Reveron, Effects of Environmental Enrichment in Maternally Separated Rats: Age and Sex-Specific Outcomes, *Front Behav Neurosci.* 13 (2019) 1–13. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2019.00198>.
- (77) N. Crawley, Jacqueline, 堅吉高瀬, 修一監訳柳井, トランスジェニック・ノックアウトマウスの行動解析, 西村書店, 東京, 2012.
- (78) H. Klumpp, S.S. Ho, S.F. Taylor, K.L. Phan, J.L. Abelson, I. Liberzon, Trait anxiety modulates anterior cingulate activation to threat interference, *Depress Anxiety.* 28 (2011) 194–201. <https://doi.org/10.1002/da.20802>.
- (79) Z.W. Zhai, S.W. Yip, C.M. Lacadie, R. Sinha, L.C. Mayes, M.N. Potenza, Childhood trauma moderates inhibitory control and anterior cingulate cortex activation during stress, *Neuroimage.* 185 (2019) 111–118.

<https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2018.10.049>.

- (80) L.B. Tucker, J.T. McCabe, Measuring Anxiety-Like Behaviors in Rodent Models of Traumatic Brain Injury, *Front Behav Neurosci.* 15 (2021) 1–16.

<https://doi.org/10.3389/fnbeh.2021.682935>.

- (81) Himanshu, Dharmila, D. Sarkar, Nutan, A review of behavioral tests to evaluate different types of anxiety and anti-anxiety effects, *Clin Psychopharmacol Neurosci.*

18 (2020) 341–351. <https://doi.org/10.9758/CPN.2020.18.3.341>.

- (82) O.Y. Chao, M.A. de Souza Silva, Y.M. Yang, J.P. Huston, The medial prefrontal cortex - hippocampus circuit that integrates information of object, place and time to construct episodic memory in rodents: Behavioral, anatomical and neurochemical properties, *Neurosci Biobehav Rev.* 113 (2020) 373–407.

<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2020.04.007>.

- (83) D.A. Tata, I. Markostamou, A. Ioannidis, M. Gkioka, C. Simeonidou, G. Anogianakis, E. Spandou, Effects of maternal separation on behavior and brain damage in adult rats exposed to neonatal hypoxia-ischemia, *Behav Brain Res.*

280 (2015) 51–61. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.11.033>.

- (84) G. Rainer, E.K. Miller, Effects of Visual Experience on the Representation of Objects in the Prefrontal Cortex improvements in object recognition has remained elusive, however. These effects have not been shown to increase the amount of object information conveyed by At interme, *Neuron*. 27 (2000) 179–189.
- (85) O.X. Zhu, M.W. Brown, J.P. Aggleton, Neuronal signalling of information important to visual recognition memory in rat rhinal and neighbouring cortices, *Eur J Neurosci*. 7 (1995) 753–65.
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1460-9568.1995.tb00679.x?sid=nlm%3Apubmed>.
- (86) J.-Z. Xiang, M.W. Brown, Neuronal Responses Related to Long-Term Recognition Memory Processes in Prefrontal Cortex, *Neuron*. 42 (2004) 817–829.
- (87) A.P. Weible, D.C. Rowland, C.K. Monaghan, N.T. Wolfgang, C.G. Kentros, Neural correlates of long-term object memory in the mouse anterior cingulate cortex, *J Neurosci*. 32 (2012) 5598–5608.
<https://doi.org/10.1523/jneurosci.5265-11.2012>.

- (88) T.J. Bettis, L.F. Jacobs, Sex-specific strategies in spatial orientation in C57BL/6J mice, *Behav Processes*. 82 (2009) 249–255.
<https://doi.org/10.1016/j.beproc.2009.07.004>.
- (89) Y. Hojo, S. Kawato, Neurosteroids in adult hippocampus of male and female rodents: Biosynthesis and actions of sex steroids, *Front Endocrinol (Lausanne)* . 9 (2018) 1–8. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00183>.
- (90) J.J. Tuscher, A.M. Fortress, J. Kim, K.M. Frick, Regulation of object recognition and object placement by ovarian sex steroid hormones, *Behav Brain Res*. 285 (2015) 140–157. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.08.001>.
- (91) J.E. Gresack, K.M. Frick, Post-training estrogen enhances spatial and object memory consolidation in female mice, *Pharmacol Biochem Behav*. 84 (2006) 112–119. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2006.04.013>.
- (92) E. Vaucher, I. Reymond, R. Najaffe, S. Kar, R. Quirion, M.M. Miller, K.B.J. Franklin, Estrogen effects on object memory and cholinergic receptors in young and old female mice, *Neurobiol Aging*. 23 (2002) 87–95.
[https://doi.org/10.1016/S0197-4580\(01\)00250-0](https://doi.org/10.1016/S0197-4580(01)00250-0).

(93) N. Leser, S. Wagner, The effects of acute social isolation on long-term social recognition memory, *Neurobiol Learn Mem.* 124 (2015) 97–103.
<https://doi.org/10.1016/j.nlm.2015.07.002>.

(94) B.C. Trainor, E.Y. Takahashi, K.L. Campi, S.A. Florez, G.D. Greenberg, A. Laman-Maharg, S.A. Laredo, V.N. Orr, A.L. Silva, M.Q. Steinman, Sex differences in stress-induced social withdrawal: Independence from adult gonadal hormones and inhibition of female phenotype by corncob bedding, *Horm Behav.* 63 (2013) 543–550. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2013.01.011>.



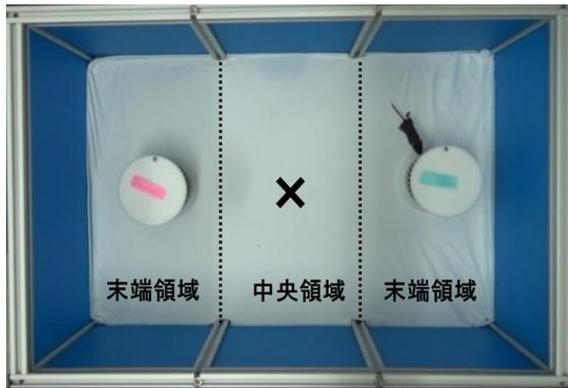
A**B**

Fig. 1. 母親選好性テスト

末端領域（20cm×40cm）と中央領域（20cm×40cm）からなる実験装置（A）。ワイヤーケージ内の母親または新規雌への仔マウスの接触（B）。

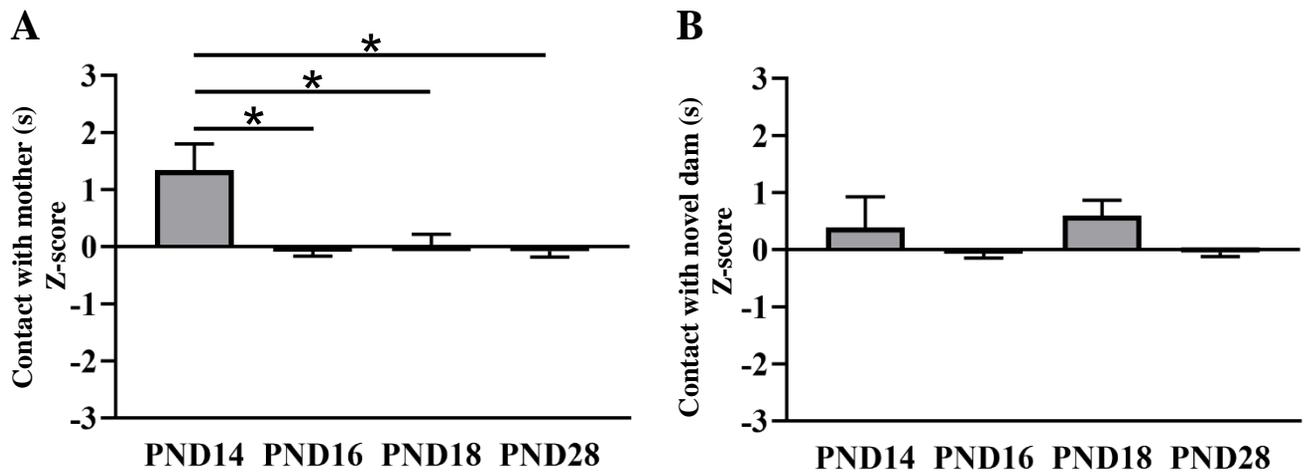


Fig. 2. 各発達段階における母親/新規雌への接触時間のZ-スコア

発達段階ごとに母親に対する接触時間をz-スコアとして比較した (A)。発達段階ごとに新規雌に対する接触時間をz-スコアとして比較した (B)。各群のz-スコアは平均±標準誤差で示した。*; $p < 0.05$ vs PND14

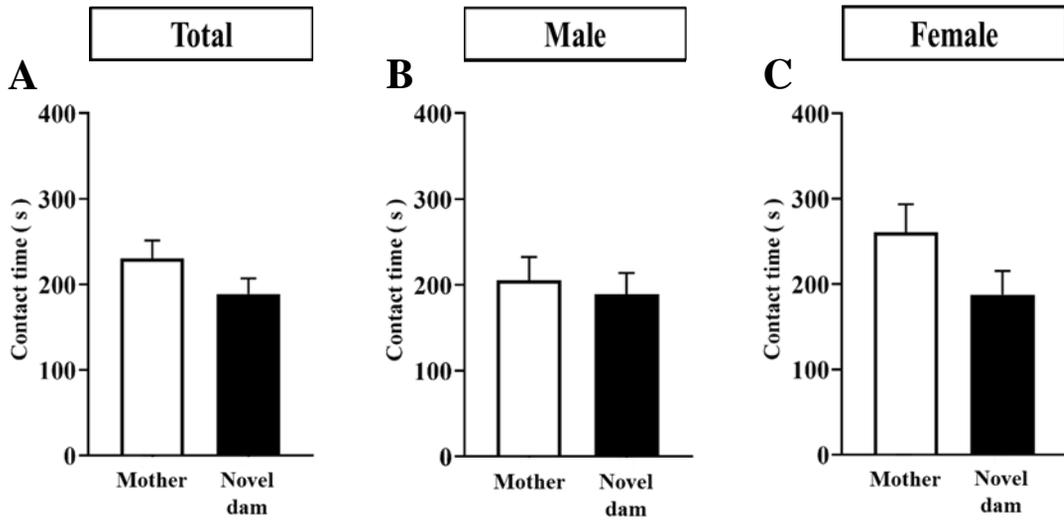


Fig. 3. PND16時点における母親選好性

母親と新規雌への接触時間 (A)。雄における母親と新規雌に対する接触時間 (B)。雌における母親と新規雌に対する接触時間 (C)。各群の滞在時間は平均±標準誤差で示した。

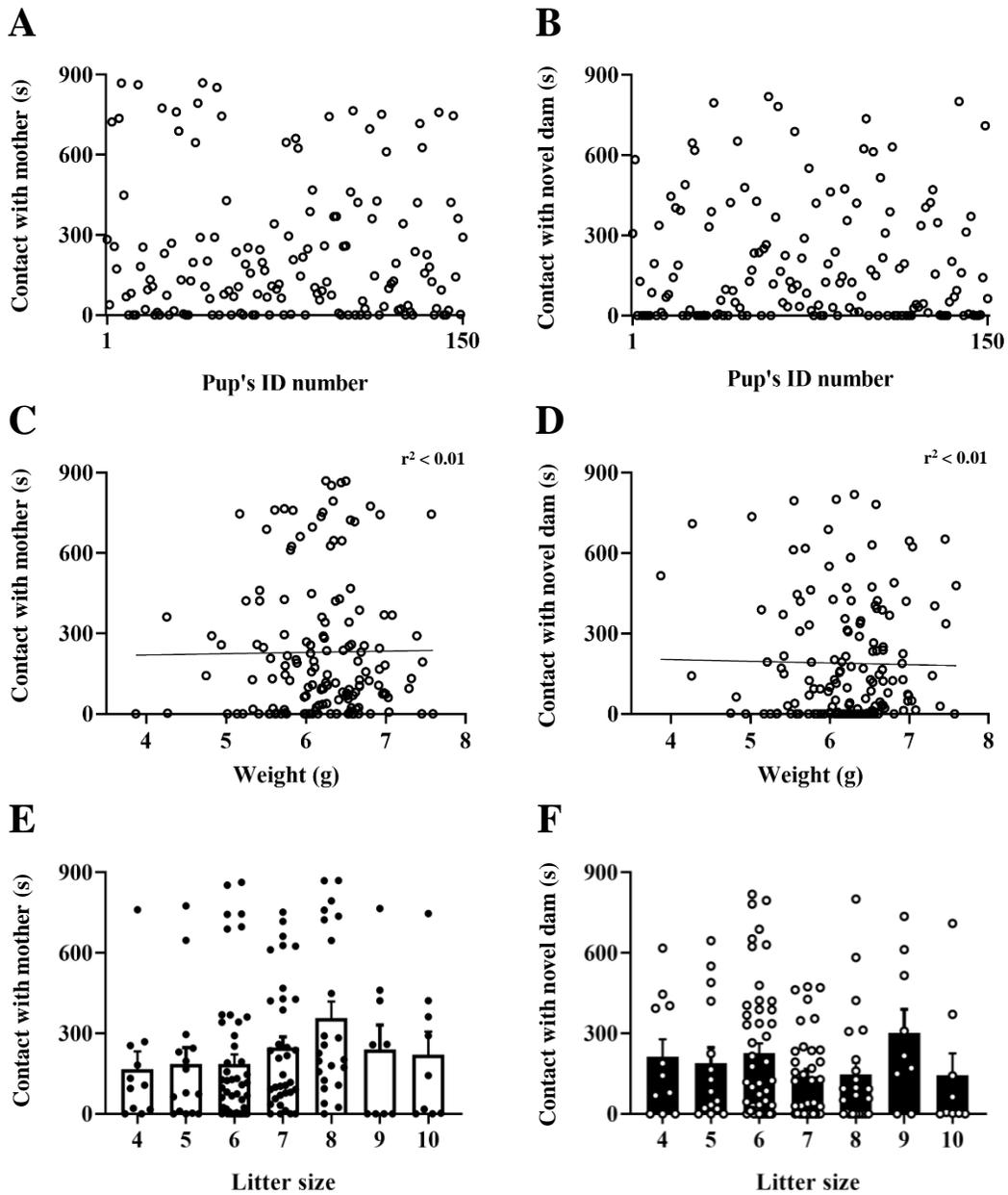


Fig. 4. PND16での各個体の母親/新規雌への接触時間と体重および兄弟数と母親/新規雌への接触時間との関係

PND16での個体ごとの母親接触時間 (A) と新規雌接触時間 (B)。体重と母親接触時間との相関 (C)。体重と新規雌接触時間との相関 (D)。兄弟数と母親接触時間 (E)。兄弟数と新規雌接触時間 (F)。各群の接触時間は平均±標準誤差で示した

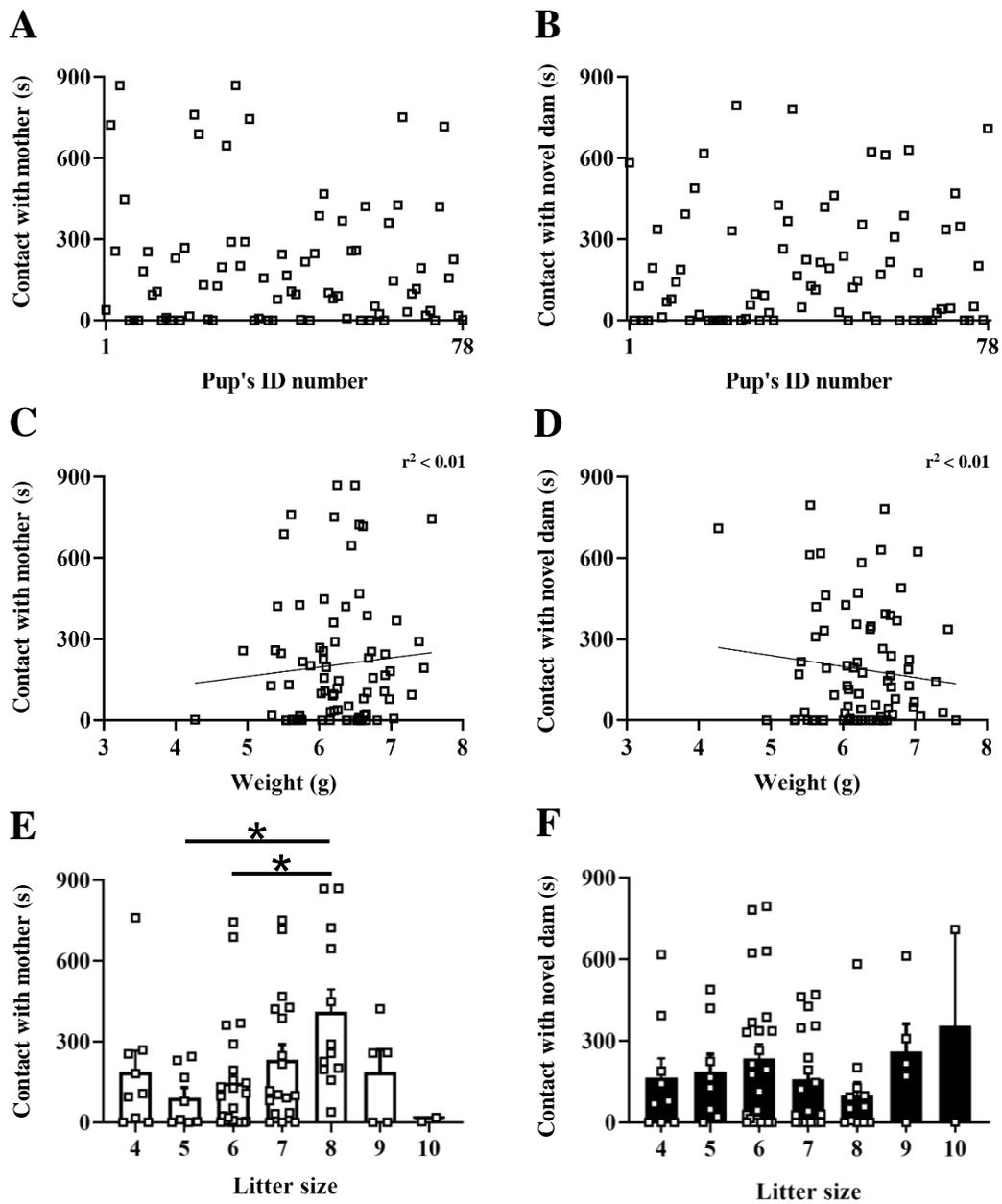


Fig. 5. PND16での雄の個体、体重、兄弟数における母親および新規雌への接触時間

PND16での雄の個体ごとの母親接触時間 (A) と新規雌接触時間 (B)。体重と母親接触時間との相関 (C)。体重と新規雌接触時間との相関 (D)。兄弟数と母親接触時間 (E)。兄弟数と新規雌接触時間 (F)。各群の接触時間は平均±標準誤差で示した。各群の接触時間は平均±標準誤差で示した。*: $p < 0.05$ vs Litter size 8

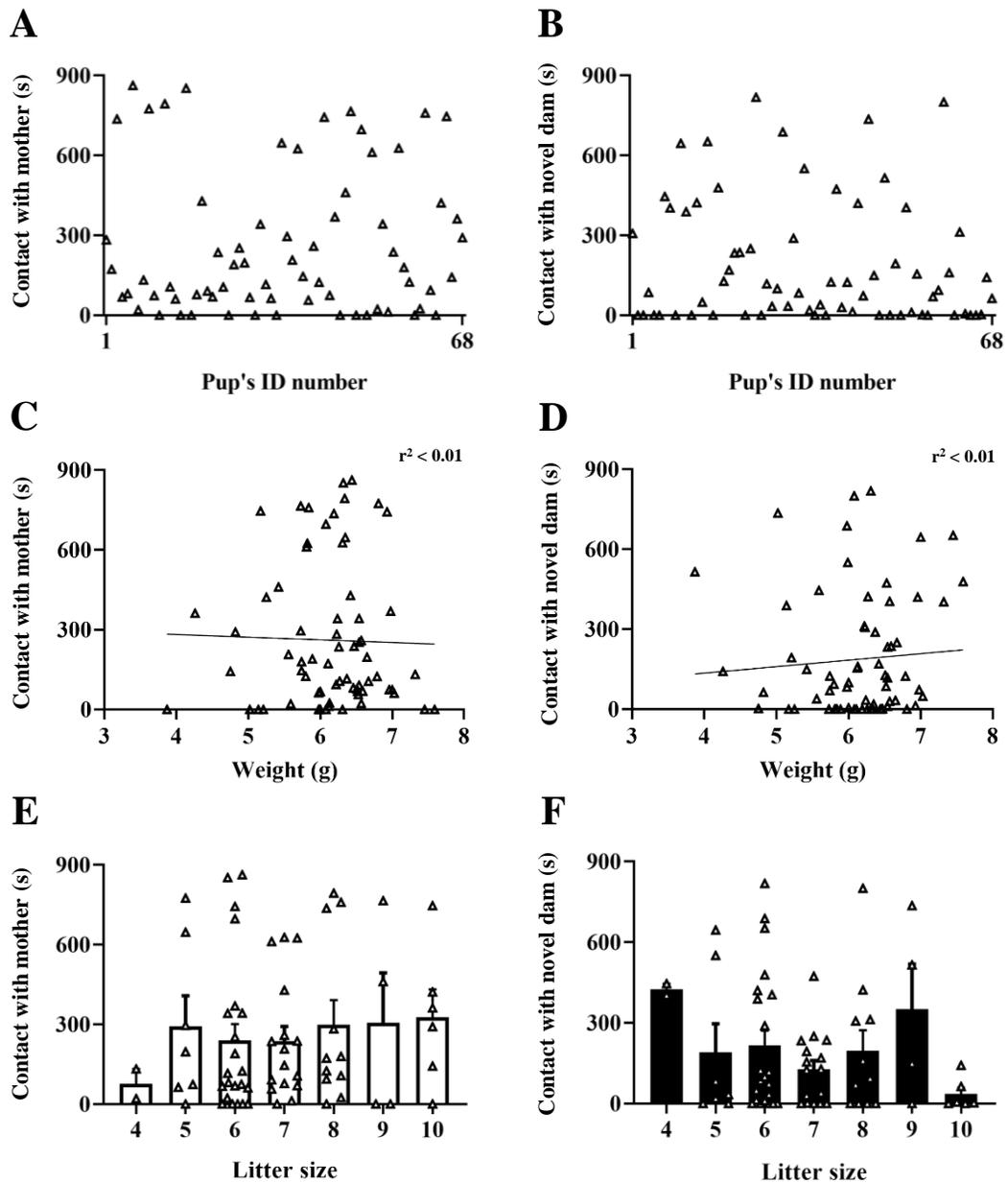


Fig. 6. PND16での雌の個体、体重、兄弟数における母親および新規雌への接触時間

PND16での雌の個体ごとの母親接触時間 (A) と新規雌接触時間 (B)。体重と母親接触時間との相関 (C)。体重と新規雌接触時間との相関 (D)。兄弟数と母親接触時間 (E)。兄弟数と新規雌接触時間 (F)。各群の接触時間は平均±標準誤差で示した。各群の接触時間は平均±標準誤差で示した。

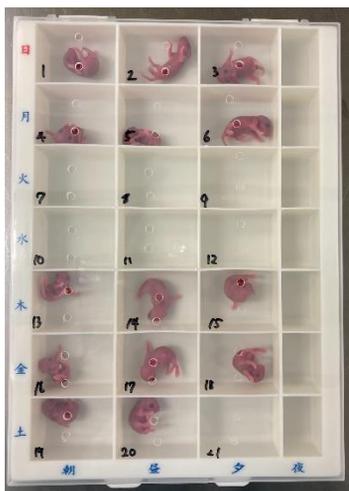
A**B**

Fig. 7. 母仔分離実験

母子分離に用いたプラスチック製の区画分けされたケース (A)。1区画に1匹の仔マウスを置き、1日3時間、計14日間、母親からの隔離を行った。母子分離中はヒーター上にて体温を維持 (B)。

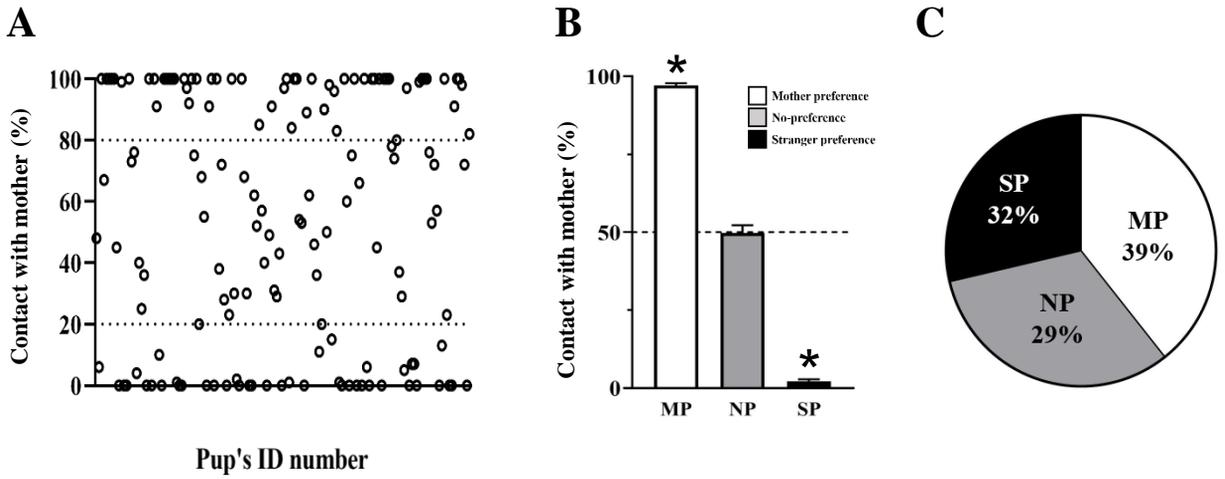


Fig. 8. 母親への接触率

個体ごとの母親接触率 (A)。母親接触率が80%以上をMP群、80%未満20%以上をNP群、20%未満をSP群とした各群の母親接触率。*; $p < 0.05$ vs 50%チャンスレベル (B)。各群の占める割合 (C)。接触率は平均±標準誤差で示した。

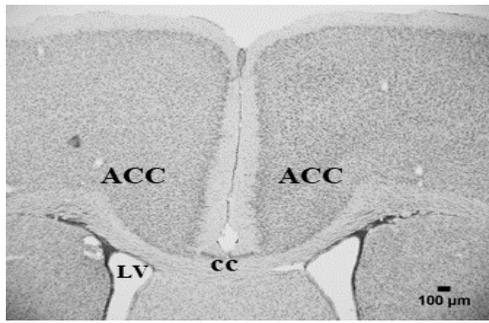
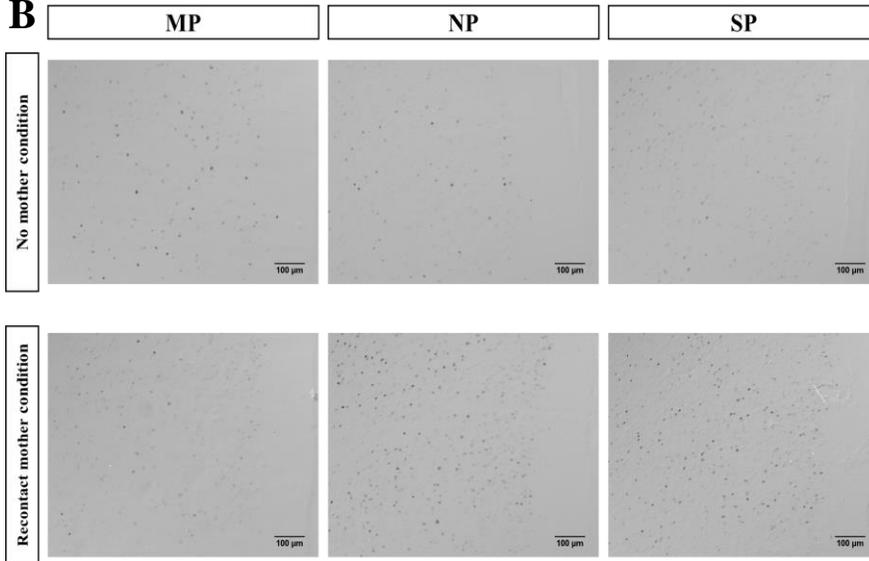
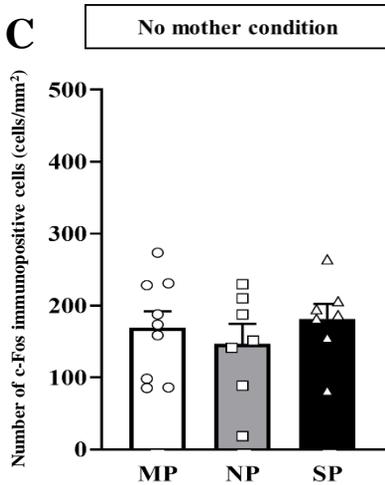
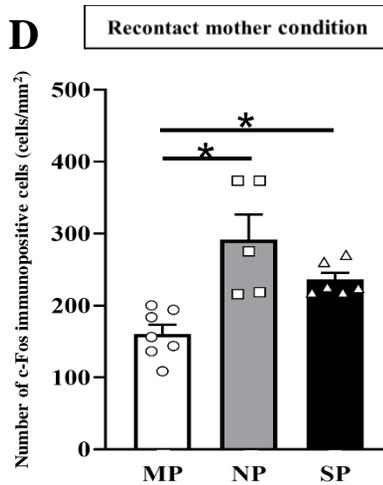
A**B****C****D**

Fig. 9. 母親接触時におけるACCの活性化

ACC領域 (A)。ACC領域のc-Fos陽性細胞 (B)。母親提示なし (MP=9匹、NP群=7匹、SP群=7匹) (C)。母親提示あり (MP=7匹、NP群=5匹、SP群=6匹) (D)。各群のc-Fos陽性細胞の密度は平均±標準誤差で示した。*; $p < 0.05$ vs MP、LV: 側脳室、aca: 前交連、BNST: 分界条床核、スケールバー: 100μm

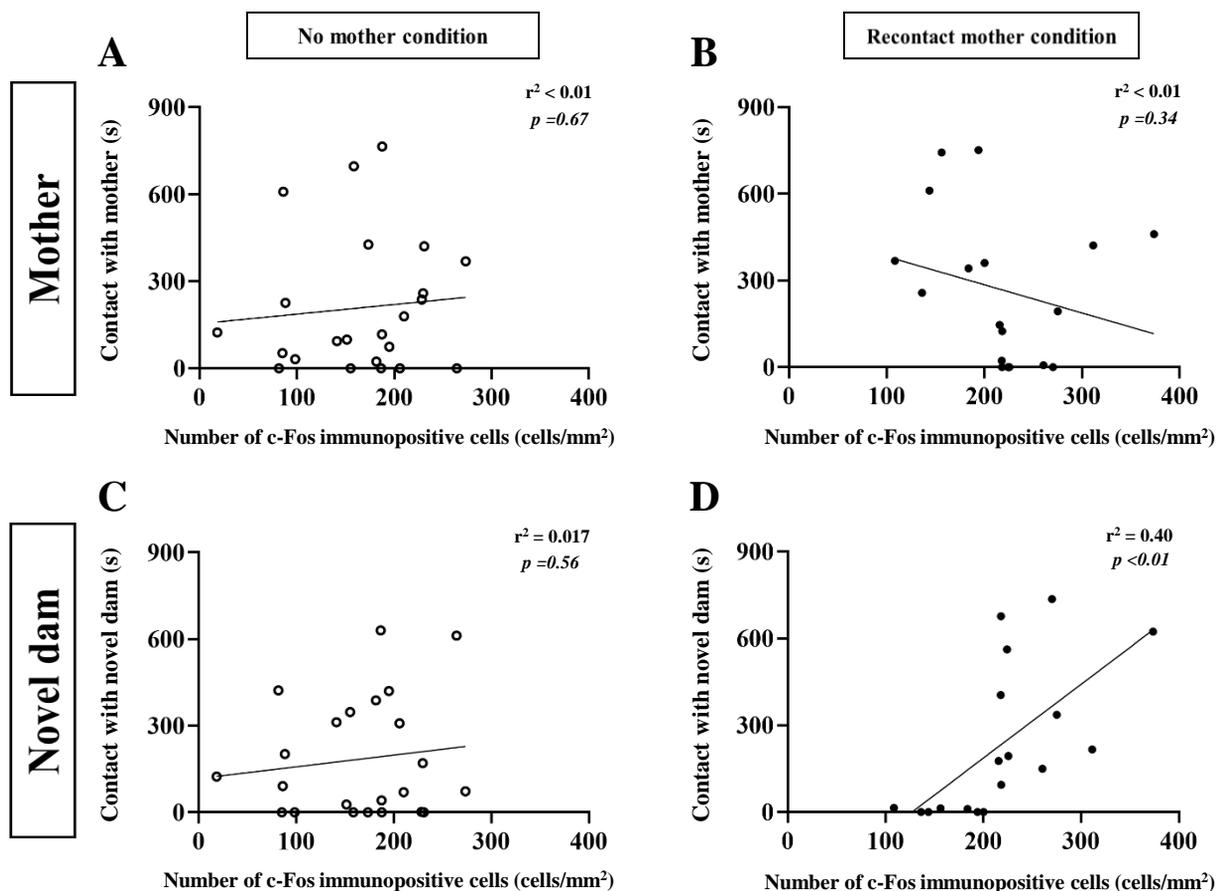


Fig. 10. 母親接触時におけるACCの活性化と母親および新規雌との接触時間

母親提示なしの条件下でのACC領域のc-Fos陽性細胞の密度と母親接触時間 (A)。母親提示ありの条件下でのACC領域のc-Fos陽性細胞の密度と母親接触時間 (B)。母親提示なしの条件下でのACC領域のc-Fos陽性細胞の密度と新規雌接触時間 (C)。母親提示ありの条件下でのACC領域のc-Fos陽性細胞の密度と新規雌接触時間 (D)。

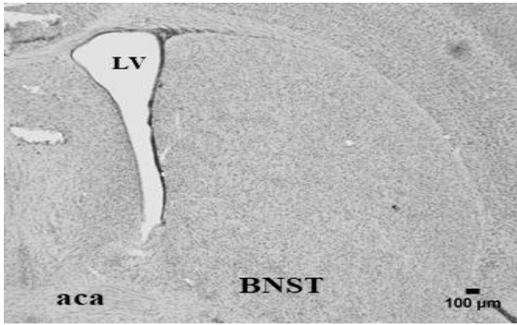
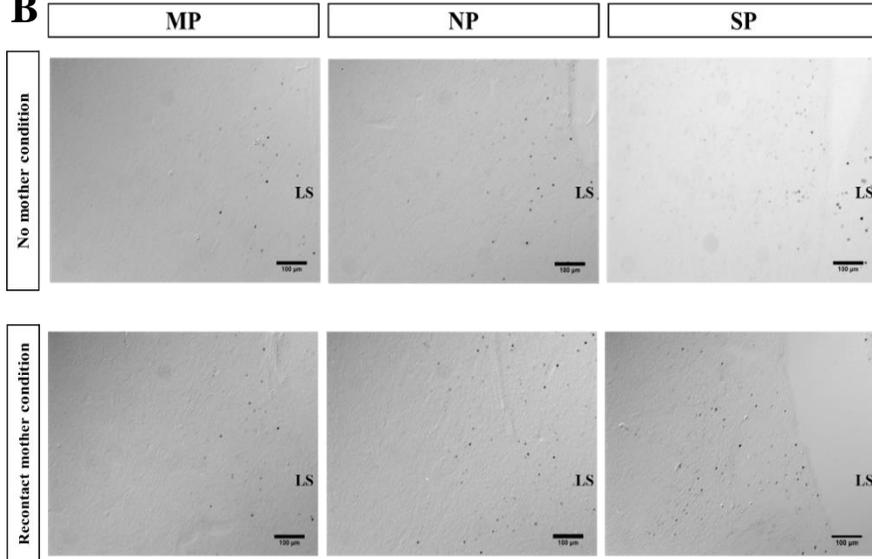
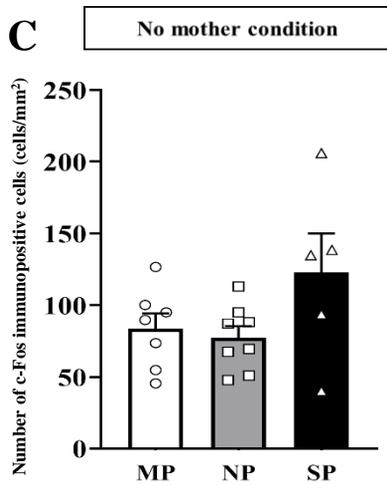
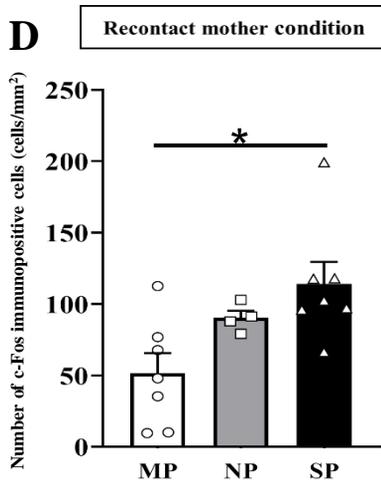
A**B****C****D**

Fig. 11. 母親接触時におけるBNSTの活性化

BNST領域 (A)。BNST領域のc-Fos陽性細胞 (B)。母親提示なし (MP=7匹、NP群=8匹、SP群=5匹) (C)。母親提示あり (MP=7匹、NP群=4匹、SP群=7匹) (D)。各群のc-Fos陽性細胞の密度は平均±標準誤差で示した。各群のc-Fos陽性細胞の密度は平均±標準誤差で示した。*; $p < 0.05$ vs MP、LV: 側脳室、aca: 前交連、BNST: 分界条床核、スケールバー: 100μm

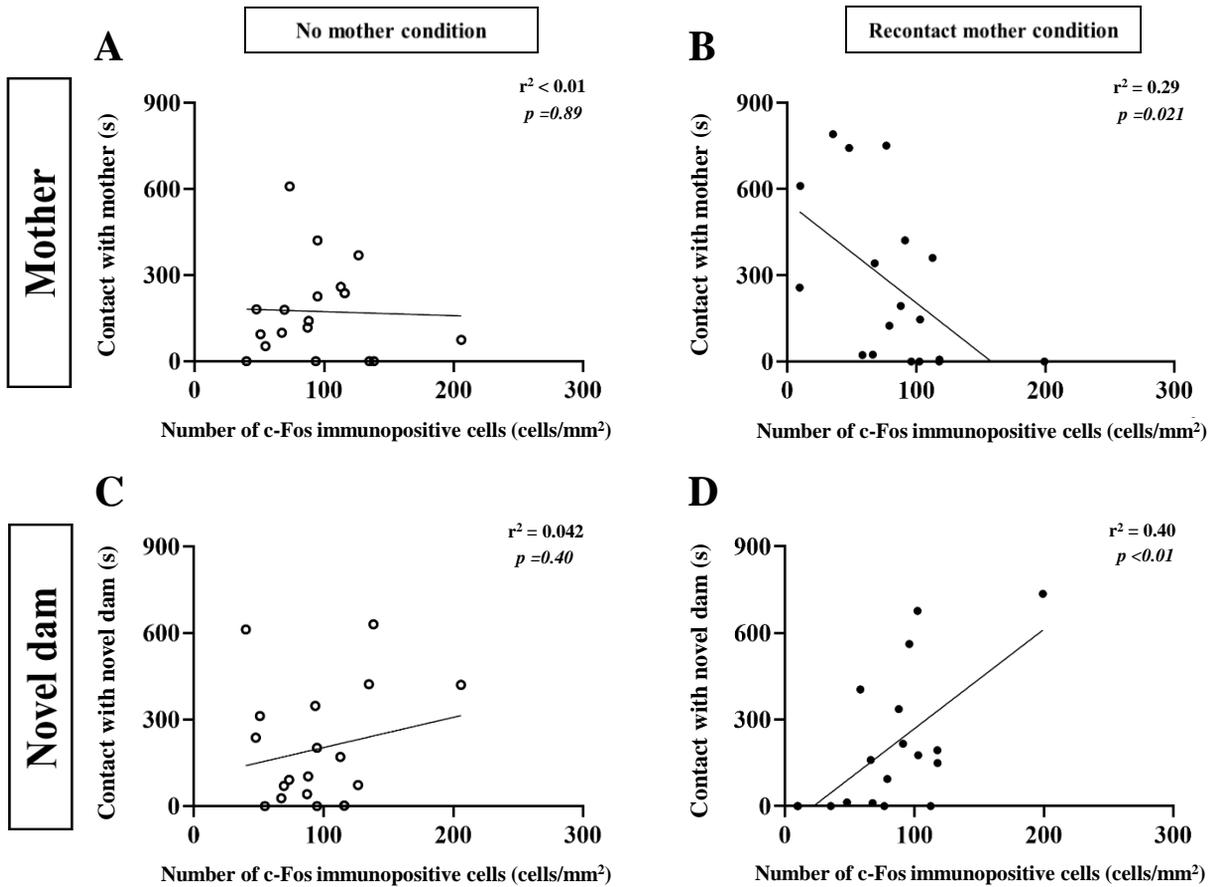


Fig. 12. 母親接触時におけるBNSTの活性化と母親および新規雌との接触時間

母親提示なしの条件下でのBNST領域のc-Fos陽性細胞の密度と母親接触時間 (A)。母親提示ありの条件下でのBNST領域のc-Fos陽性細胞の密度と母親接触時間 (B)。母親提示なしの条件下でのBNST領域のc-Fos陽性細胞の密度と新規雌接触時間 (C)。母親提示ありの条件下でのBNST領域のc-Fos陽性細胞の密度と新規雌接触時間 (D)。

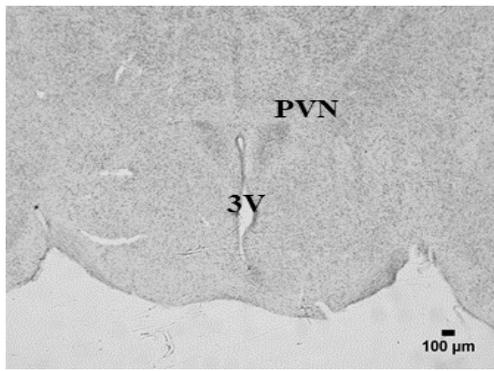
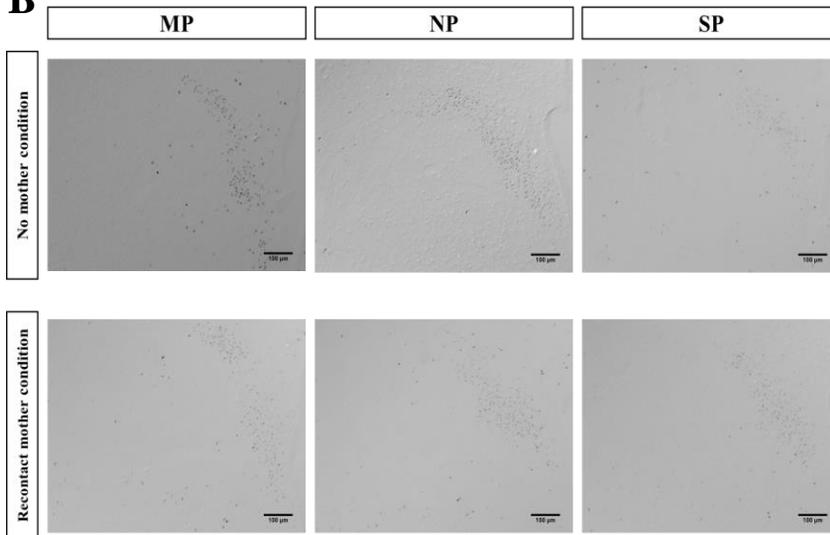
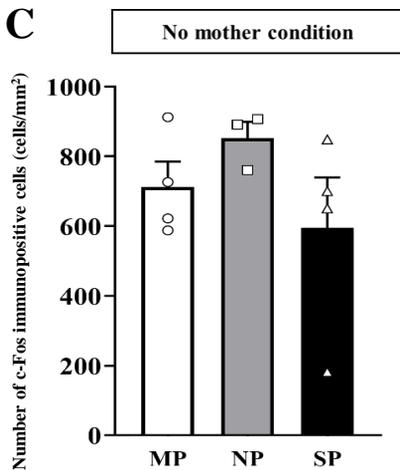
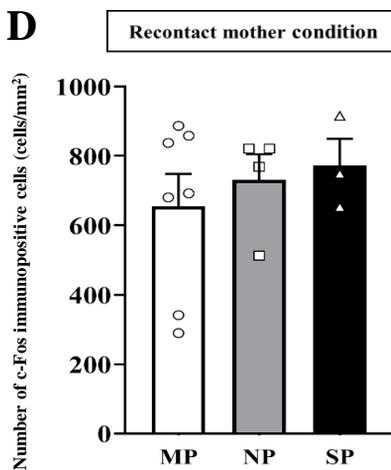
A**B****C****D**

Fig. 13. 母親接触時におけるPVNの活性化

PVN領域 (A)。PVN領域のc-Fos陽性細胞 (B)。母親提示なし (MP=4匹、NP群=3匹、SP群=4匹) (C)。母親提示あり (MP=7匹、NP群=4匹、SP群=3匹) (D)。各群のc-Fos陽性細胞の密度は平均±標準誤差で示した。各群のc-Fos陽性細胞の密度は平均±標準誤差で示した。3V: 第3脳室、PVN: 室傍核、スケールバー:100μm

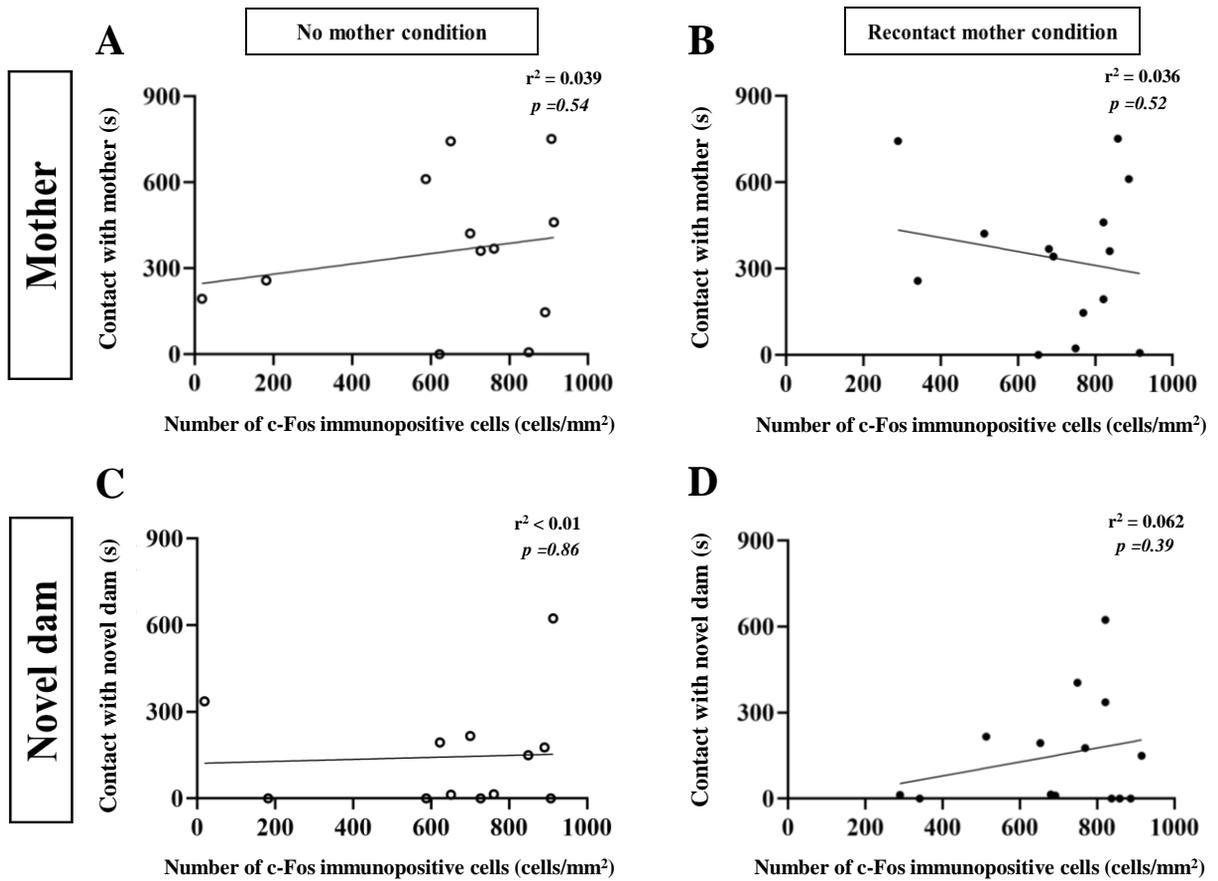


Fig. 14. 母親接触時におけるPVNの活性化と母親および新規雌との接触時間

母親提示なしの条件下でのPVN領域のc-Fos陽性細胞の密度と母親接触時間 (A)。母親提示ありの条件下でのPVN領域のc-Fos陽性細胞の密度と母親接触時間 (B)。母親提示なしの条件下でのPVN領域のc-Fos陽性細胞の密度と新規雌接触時間 (C)。母親提示ありの条件下でのPVN領域のc-Fos陽性細胞の密度と新規雌接触時間 (D)。

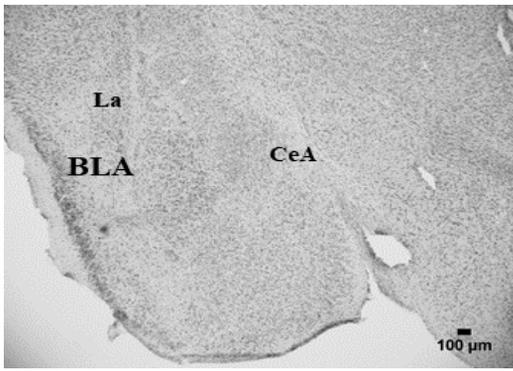
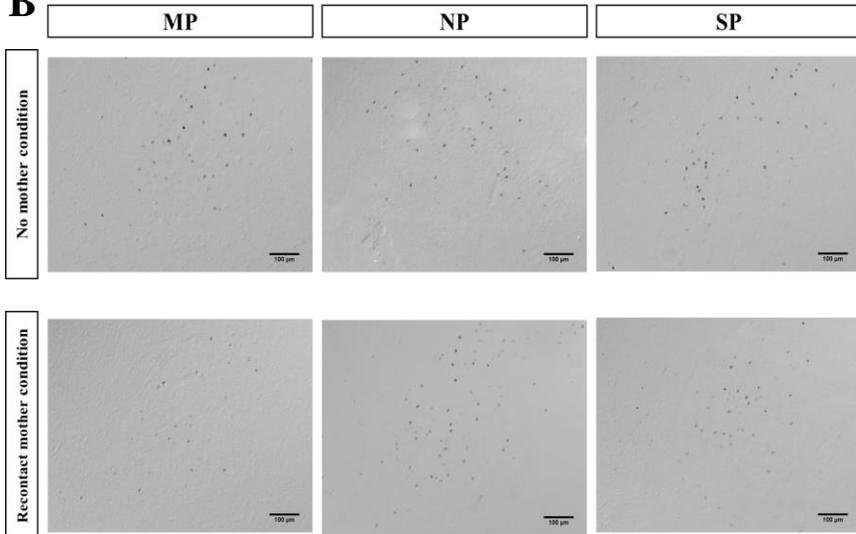
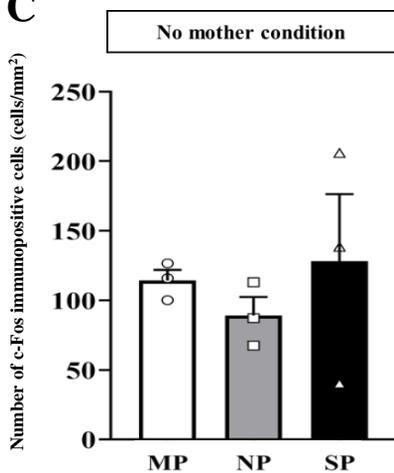
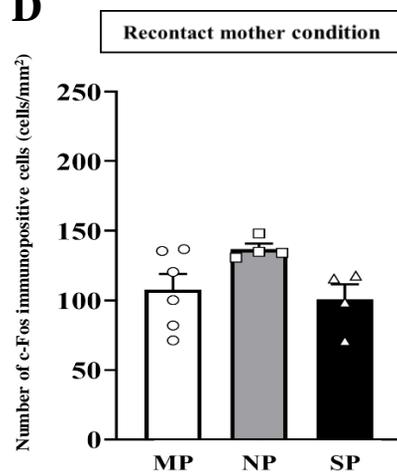
A**B****C****D**

Fig. 15. 母親接触時におけるBLAの活性化

BLA領域 (A)。BLA領域のc-Fos陽性細胞 (B)。母親提示なし (MP=3匹、NP群=3匹、SP群=3匹) (C)。母親提示あり (MP=6匹、NP群=4匹、SP群=4匹) (D)。各群のc-Fos陽性細胞の密度は平均±標準誤差で示した。各群のc-Fos陽性細胞の密度は平均±標準誤差で示した。BLA: 扁桃体基底核、La: 扁桃体外側基底核、CeA:扁桃体中心核、スケールバー:100μm

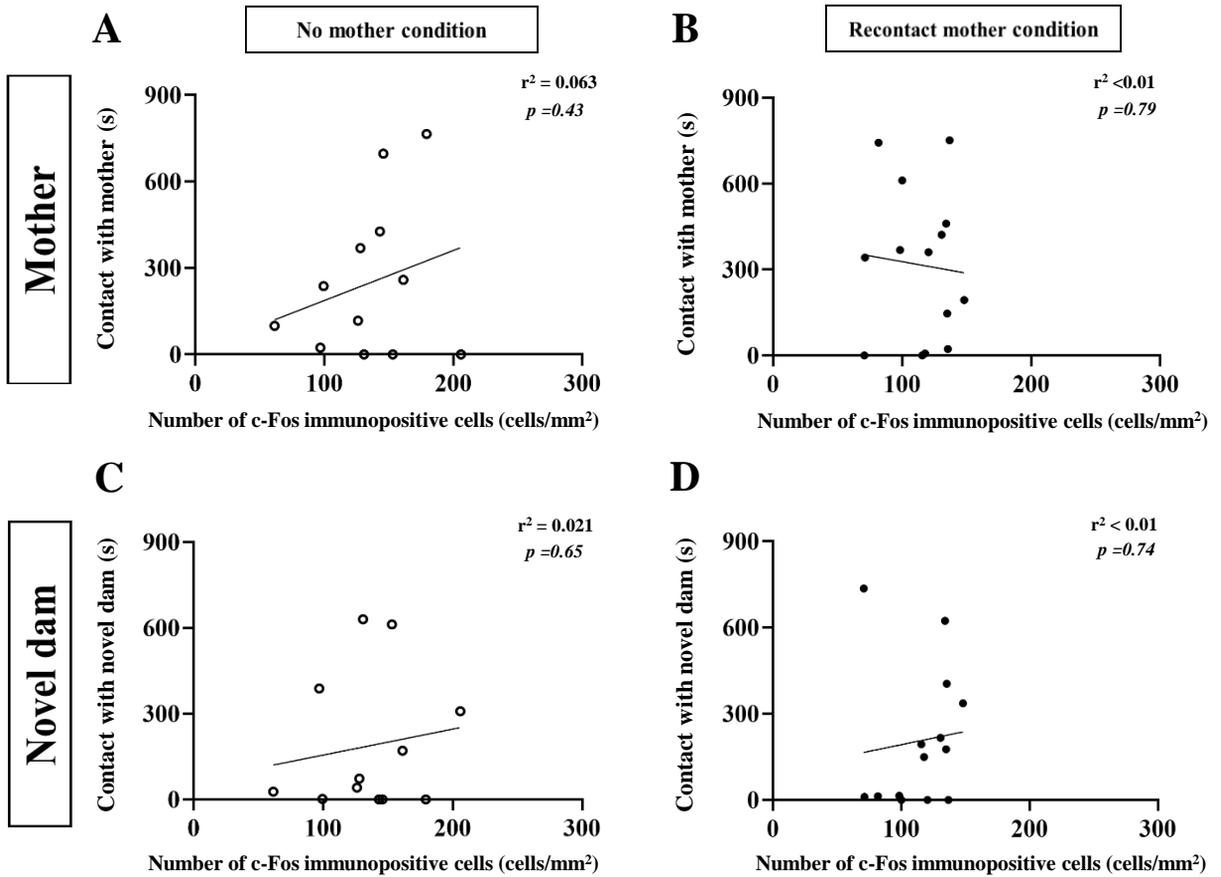
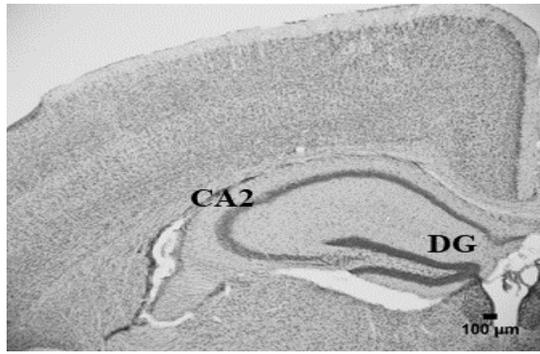
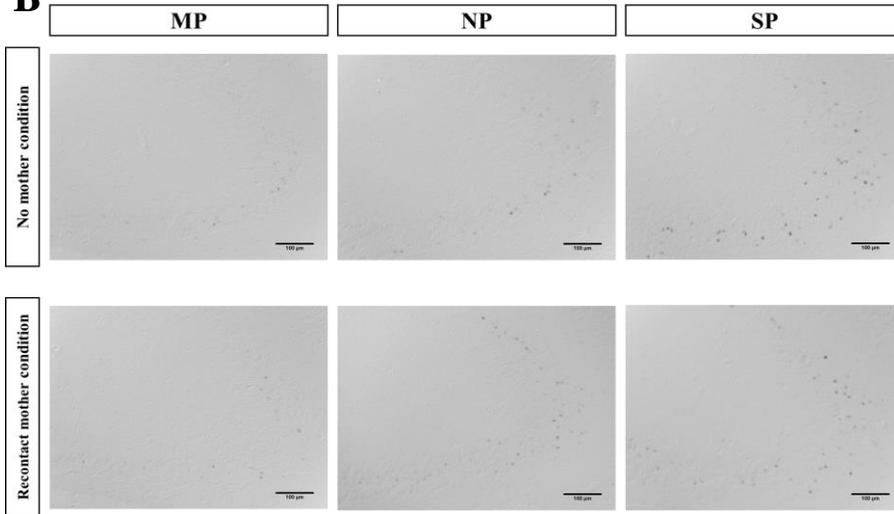
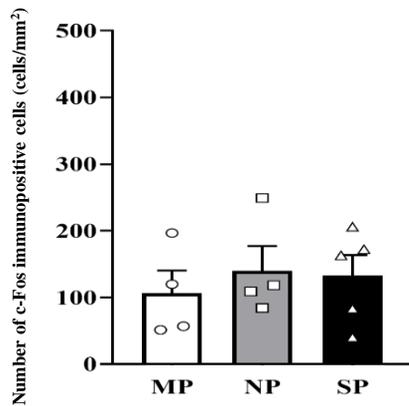


Fig. 16. 母親接触時におけるBLAの活性化と母親および新規雌との接触時間

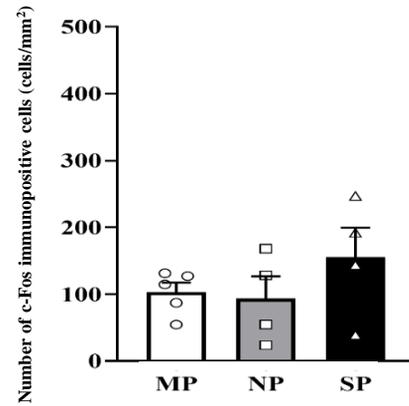
母親提示なしの条件下でのBLA領域のc-Fos陽性細胞の密度と母親接触時間 (A)。母親提示ありの条件下でのBLA領域のc-Fos陽性細胞の密度と母親接触時間 (B)。母親提示なしの条件下でのBLA領域のc-Fos陽性細胞の密度と新規雌接触時間 (C)。母親提示ありの条件下でのBLA領域のc-Fos陽性細胞の密度と新規雌接触時間 (D)。

A**B****C**

No mother condition

**D**

Recontact mother condition

**Fig. 17.** 母親接触時におけるCA2の活性化

CA2領域 (A)。CA2領域のc-Fos陽性細胞 (B)。母親提示なし (MP=3匹、NP群=3匹、SP群=3匹) (C)。母親提示あり (MP=6匹、NP群=4匹、SP群=4匹) (D)。各群のc-Fos陽性細胞の密度は平均±標準誤差で示した。DG: 歯状回、スケールバー:100μm

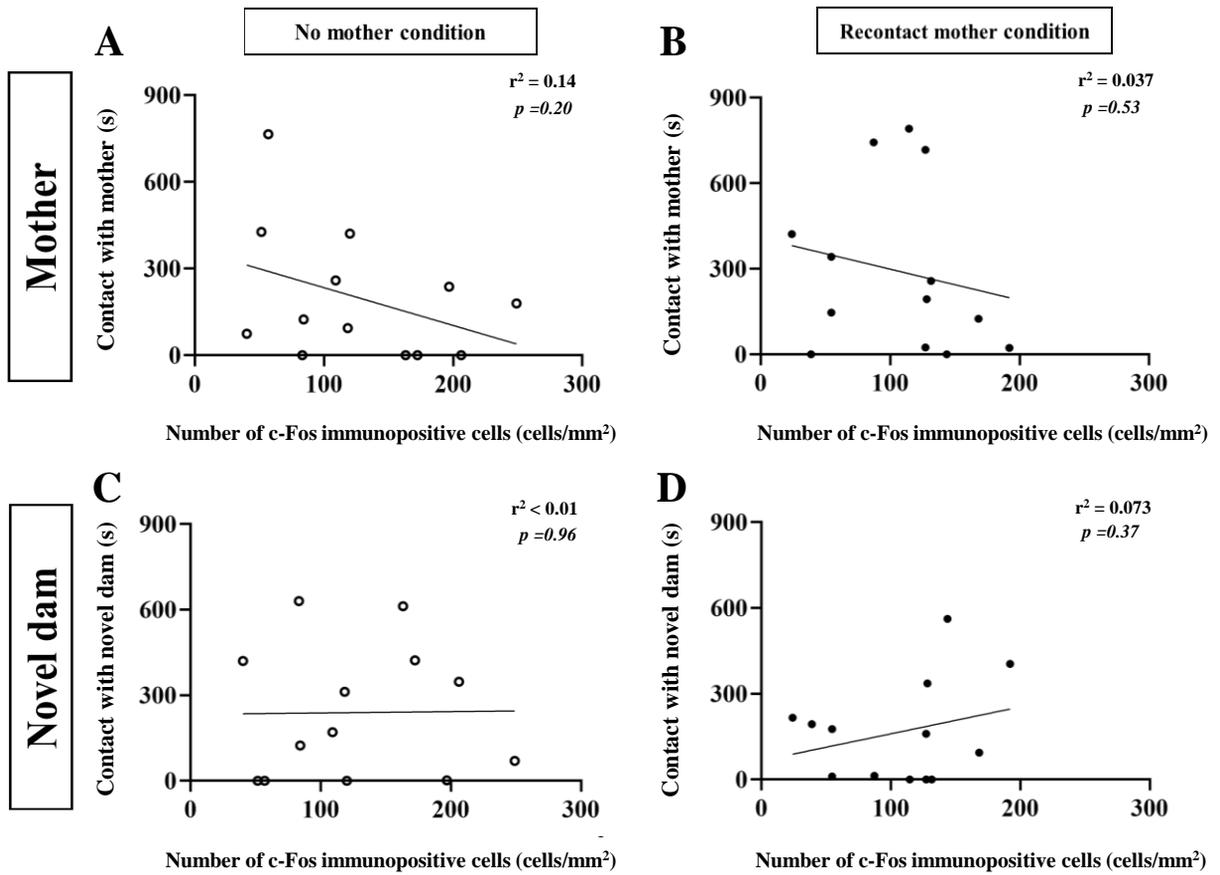


Fig. 18. 母親接触時におけるCA2の活性化と母親および新規雌との接触時間

母親提示なしの条件下でのCA2領域のc-Fos陽性細胞の密度と母親接触時間 (A)。母親提示ありの条件下でのCA2領域のc-Fos陽性細胞の密度と母親接触時間 (B)。母親提示なしの条件下でのCA2領域のc-Fos陽性細胞の密度と新規雌接触時間 (C)。母親提示ありの条件下でのCA2領域のc-Fos陽性細胞の密度と新規雌接触時間 (D)。

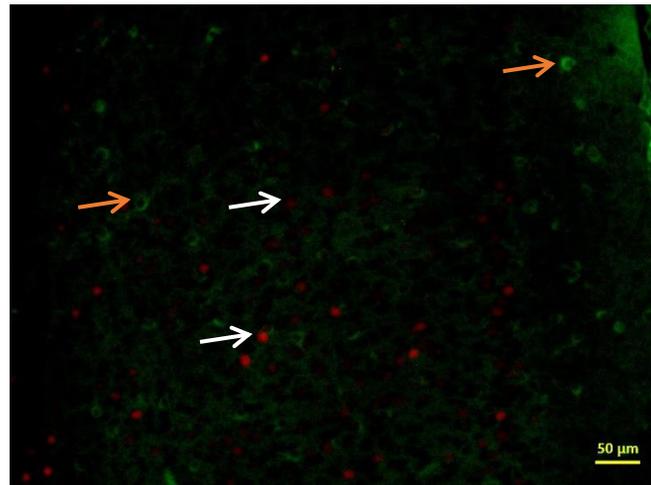
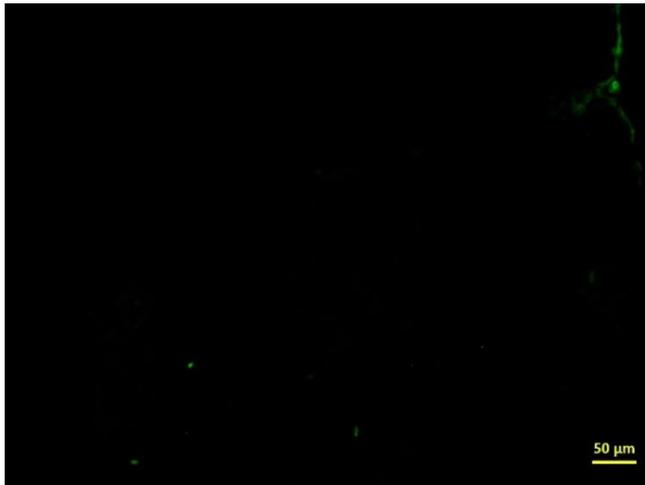


Fig. 19. ACCにおける抗c-Fos抗体と抗GAD67抗体による免疫二重染色

ACCにおけるネガティブコントロール（左）。ACCにおける抗c-Fos抗体（赤）と抗GAD67抗体（緑）の二重染色（右）。白の矢印; c-Fos陽性細胞、オレンジの矢印; GAD67陽性細胞、スケールバー:50μm

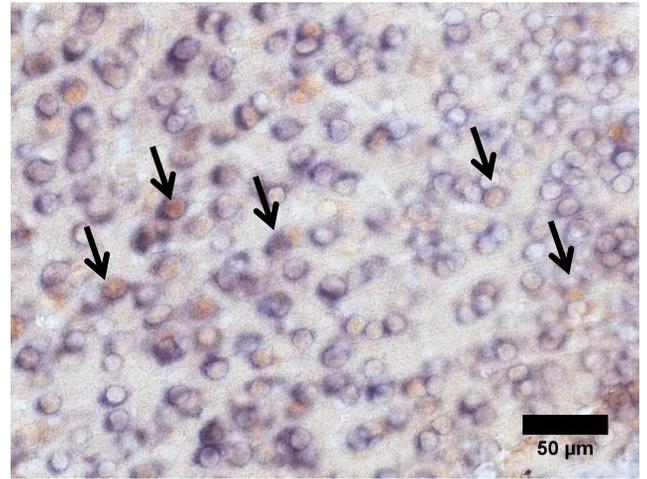
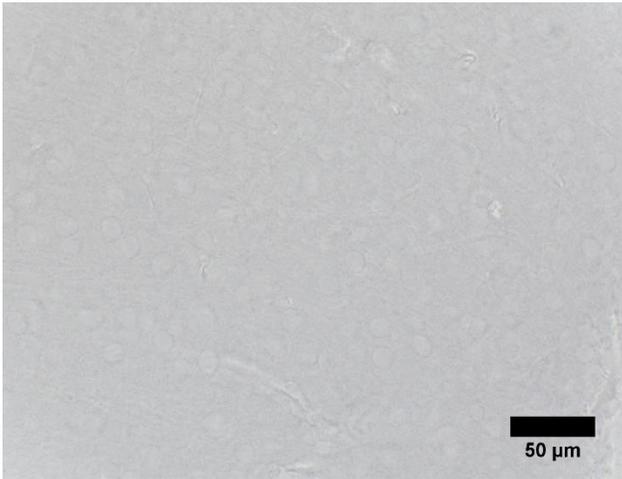
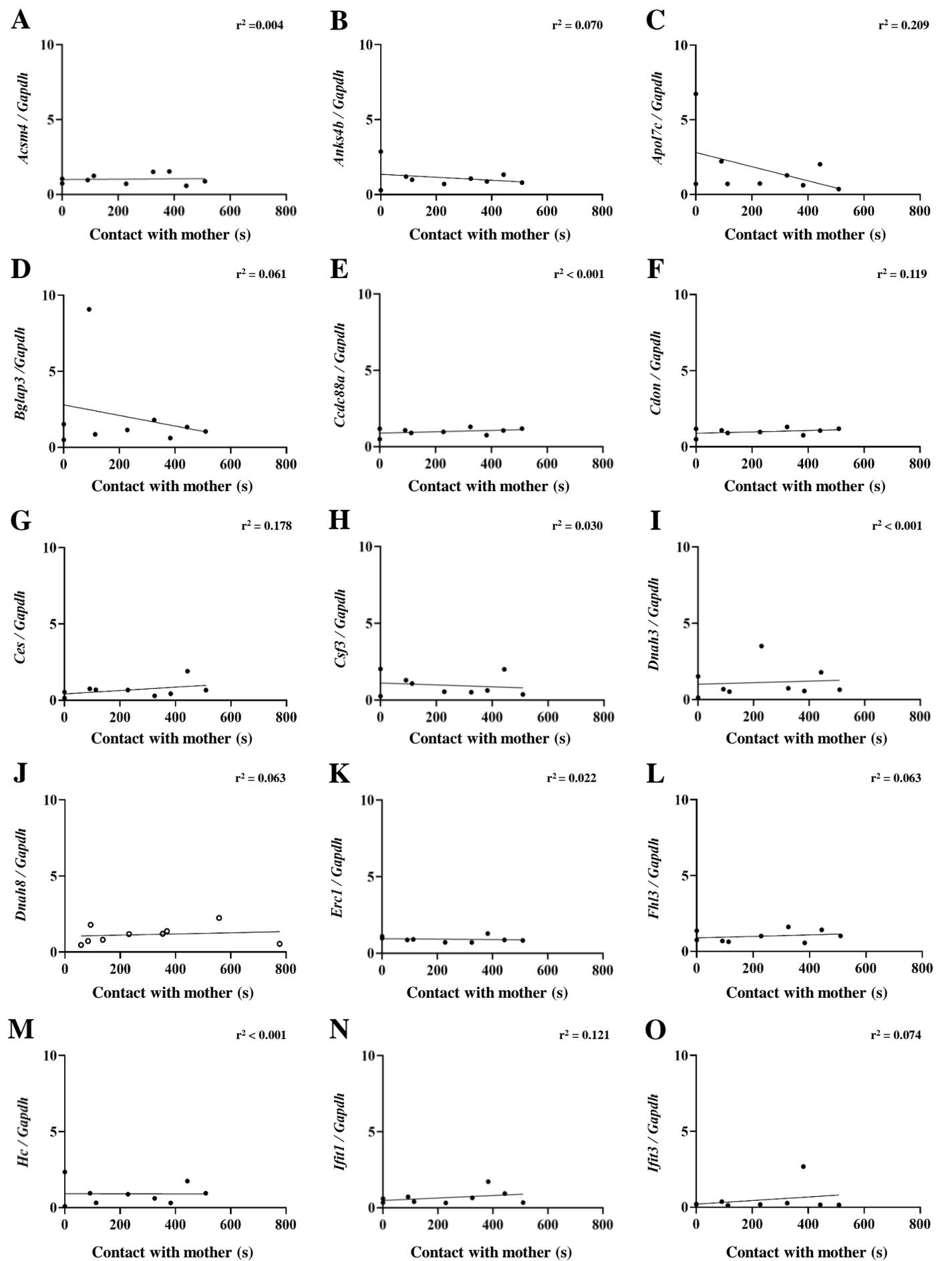


Fig. 20. ACCにおけるvGLUT1と抗c-Fos抗体による二重染色

ACCにおけるネガティブコントロール（左）。ACCにおけるvGLUT1（青）と抗c-Fos（茶色）の二重染色。黒の矢印；vGlut1と抗c-Fos抗体の共局在、スケールバー:50μm



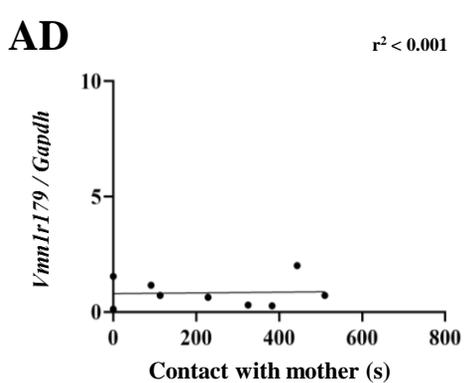
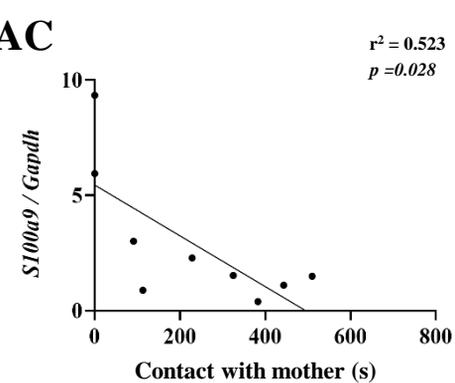
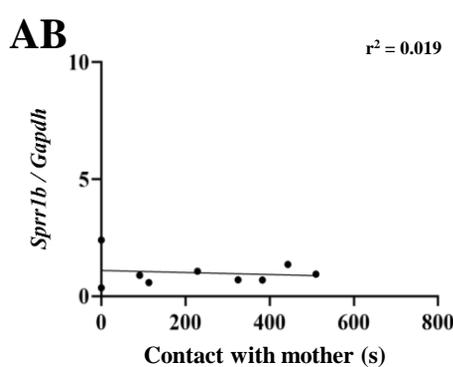
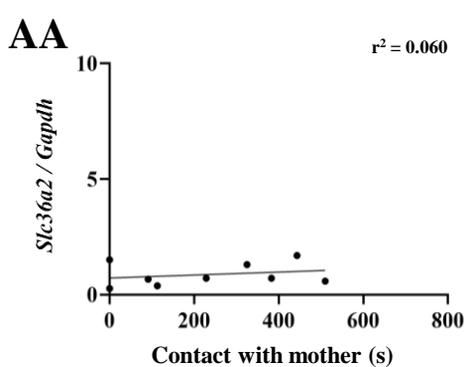
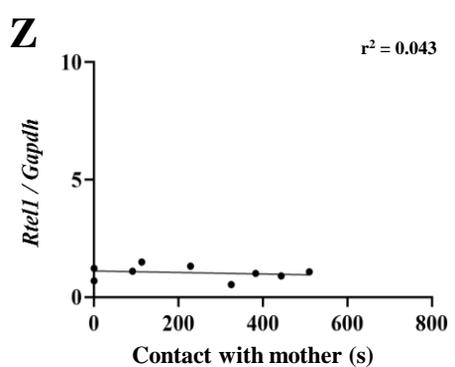
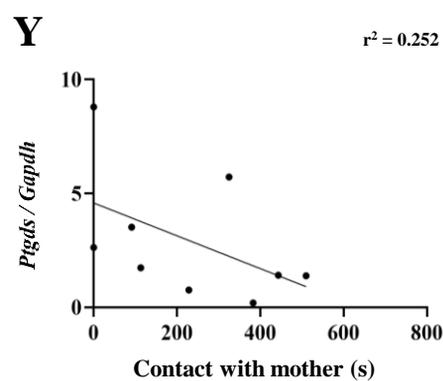
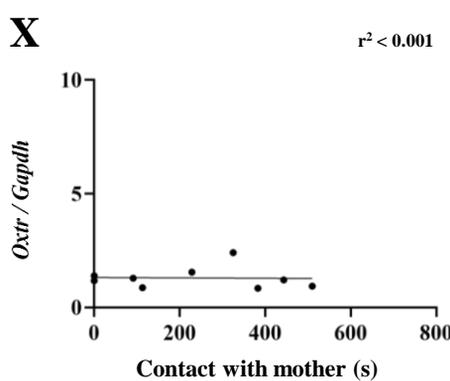
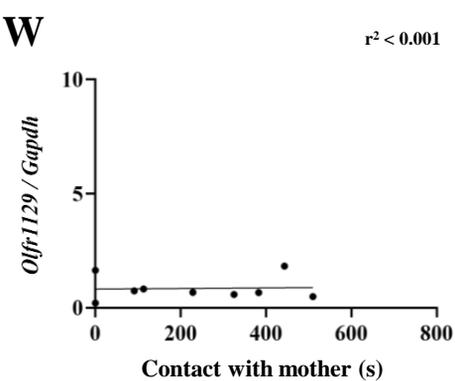
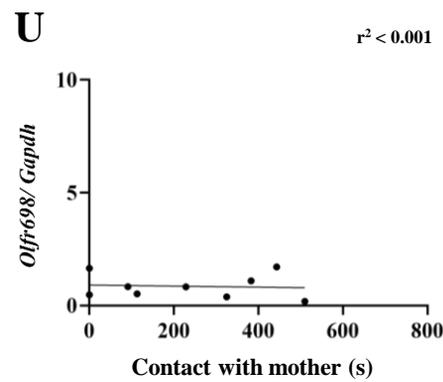
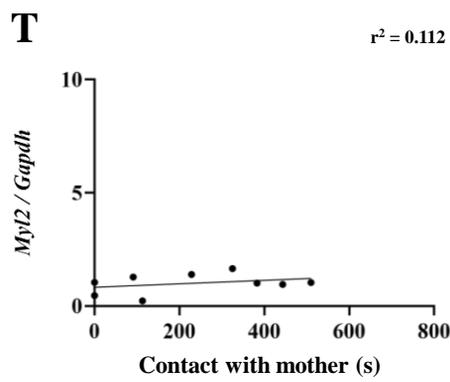
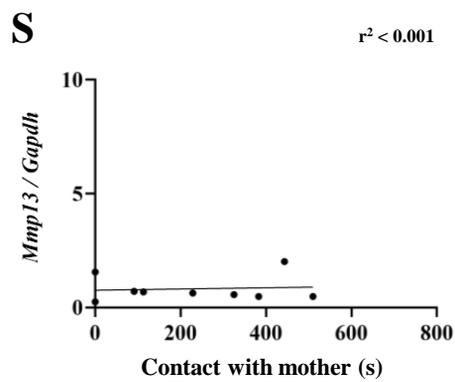
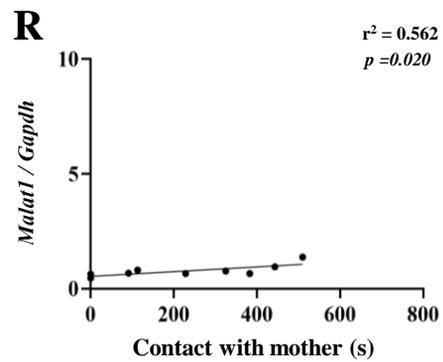
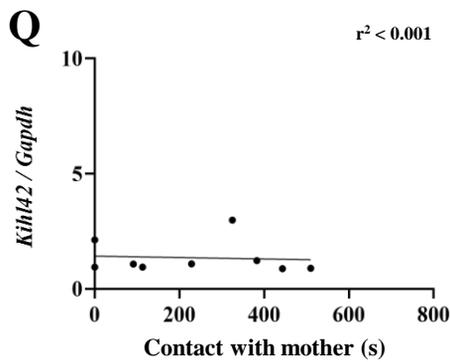
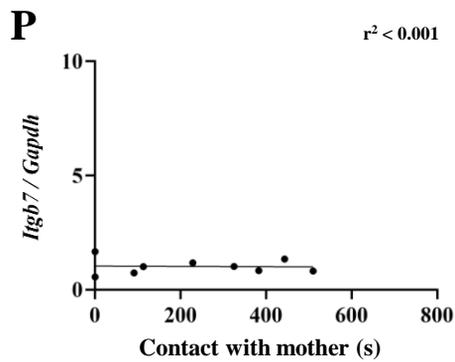
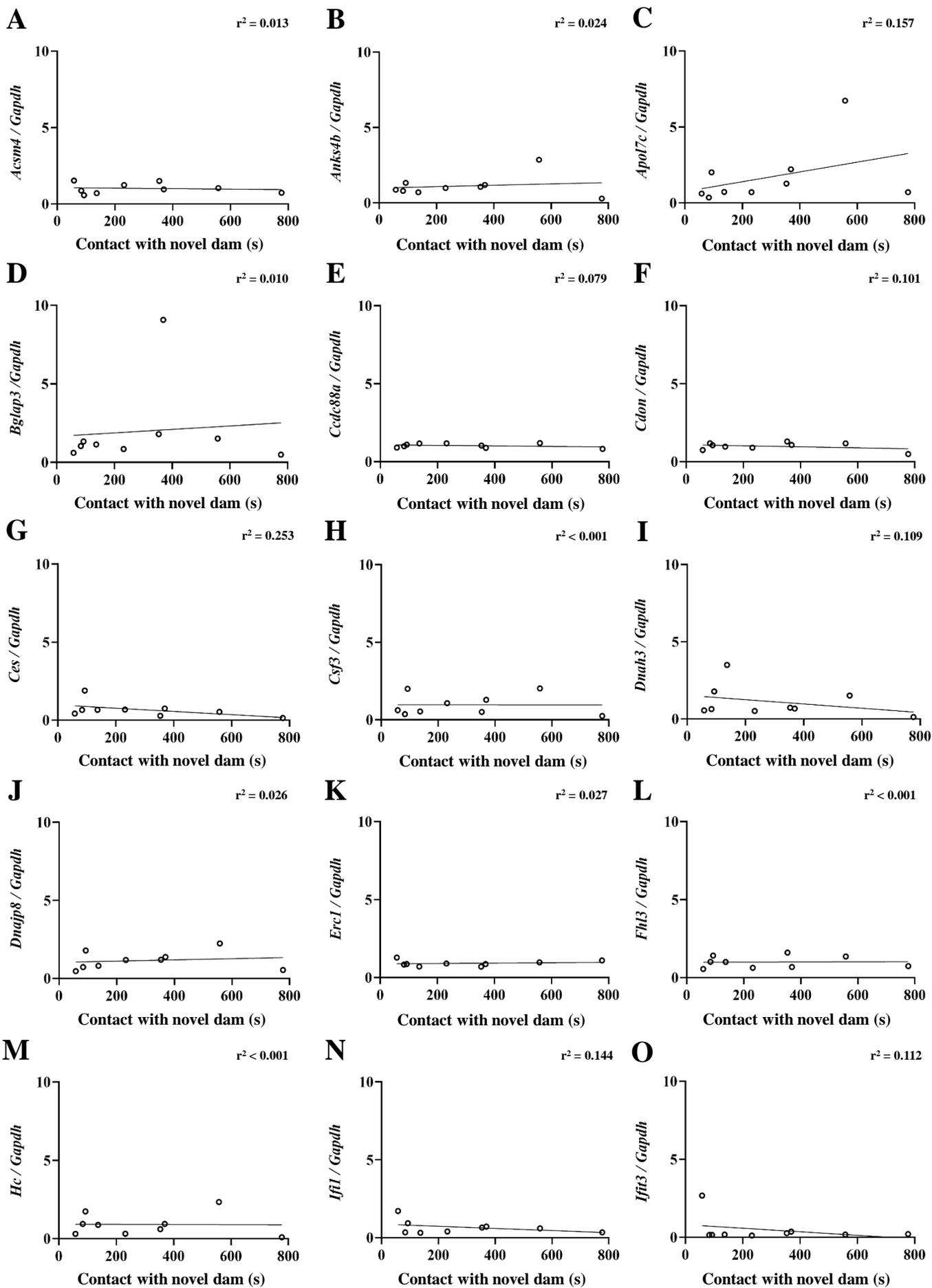


Fig. 21. RT-PCRによる遺伝子発現量と母親との接触時間

RT-PCRによるAcsn4 (A)、Anks4b (B)、Apol7c (C)、Bglap3 (D)、Ccadc88a (E)、Cdon (F)、Ces (G)、Csf3 (H)、Dnah3 (I)、Dnah8 (J)、Erc1 (K)、Fhl3 (L)、Hc (M)、Ifit1 (N)、Ifit3 (O)、Itgb7 (P)、Klhl42 (Q)、Malat1 (R)、Mmp13 (S)、Myl2 (T)、Olfr698 (U)、Olfr1129 (W)、Oxtr (X)、Ptgds (Y)、Rtel1 (Z)、S100a9 (AA)、Slc36a2 (AB)、Sprr1b (AC)、Vmn1r179 (AD) 遺伝子発現量とPND16に行った母親選好性テストにおける母親に対する接触時間。



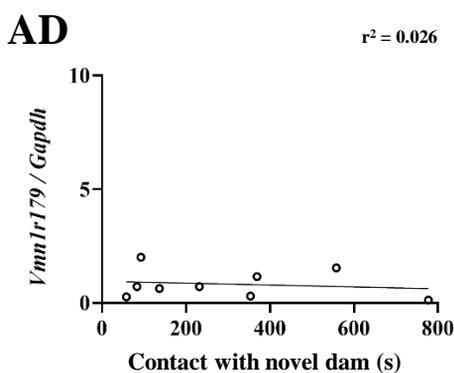
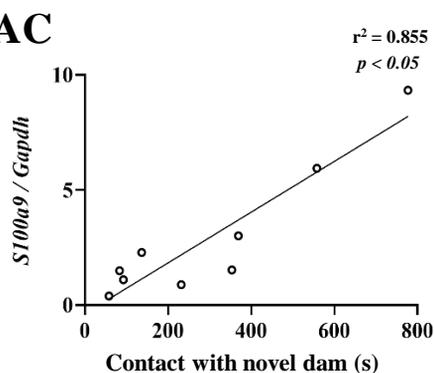
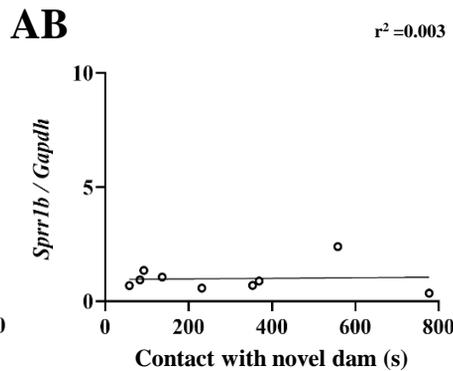
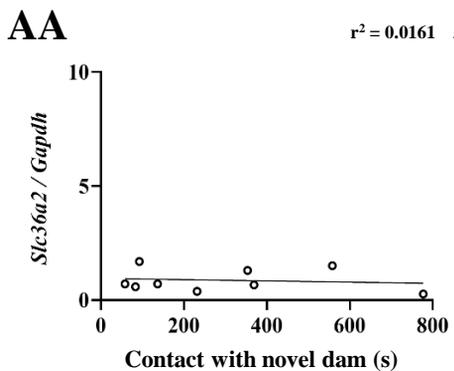
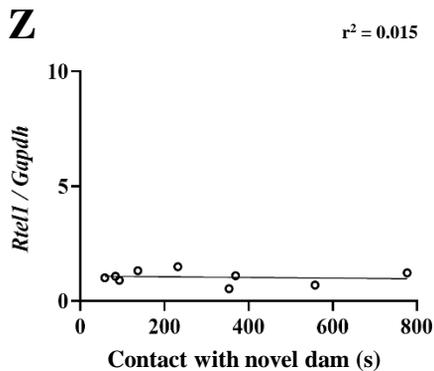
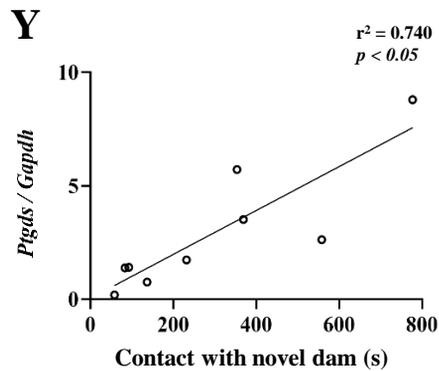
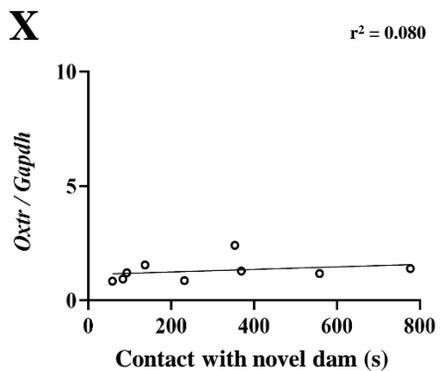
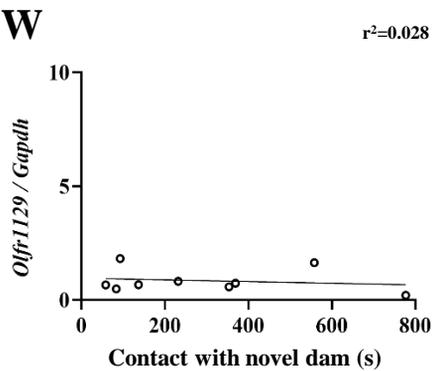
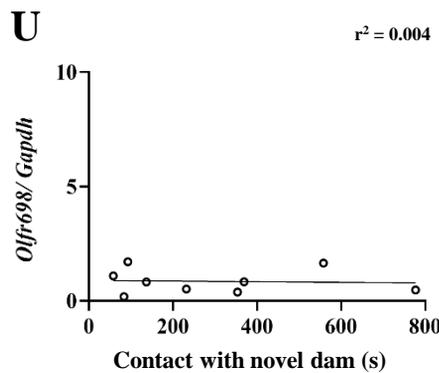
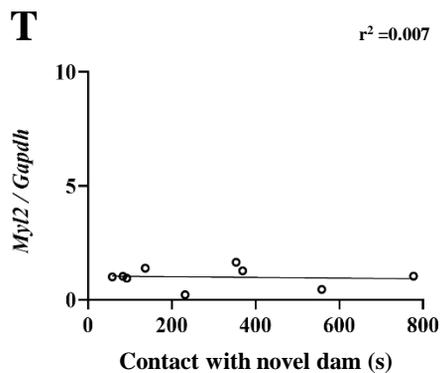
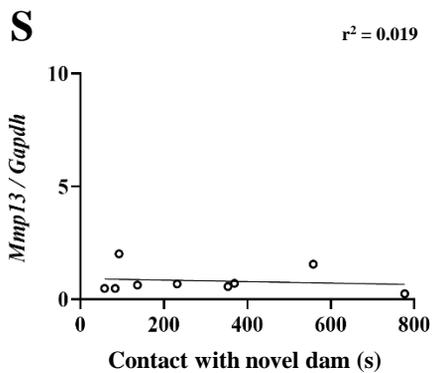
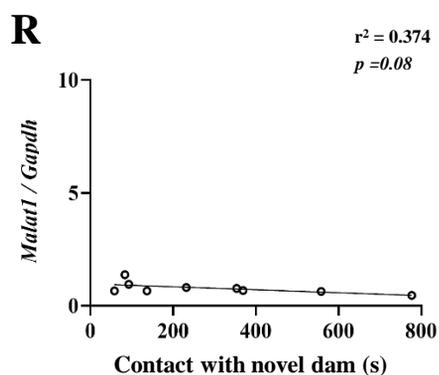
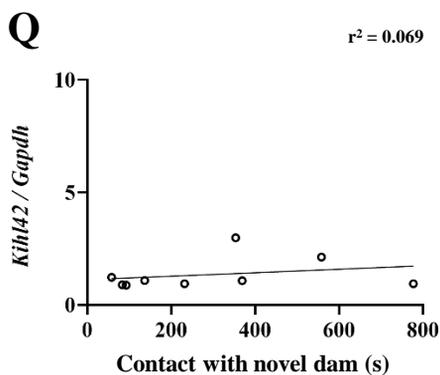
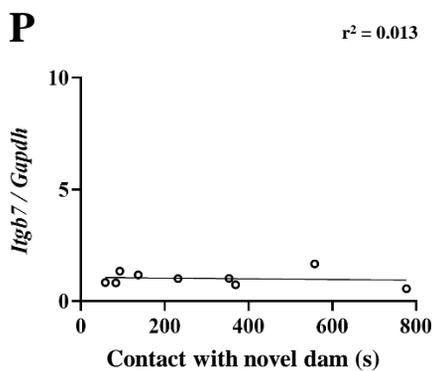


Fig. 22. RT-PCRによる遺伝子発現量と新規雌との接触時間

RT-PCRによるAcsn4 (A)、Anks4b (B)、Apol7c (C)、Bglap3 (D)、Ccadc88a (E)、Cdon (F)、Ces (G)、Csf3 (H)、Dnah3 (I)、Dnah8 (J)、Erc1 (K)、Fhl3 (L)、Hc (M)、Ifit1 (N)、Ifit3 (O)、Itgb7 (P)、Klhl42 (Q)、Malat1 (R)、Mmp13 (S)、Myl2 (T)、Olfr698 (U)、Olfr1129 (W)、Oxtr (X)、Ptgds (Y)、Rtel1 (Z)、S100a9 (AA)、Slc36a2 (AB)、Sprr1b (AC)、Vmn1r179 (AD) 遺伝子発現量とPND16に行った母親選好性テストにおける新規雌に対する接触時間。

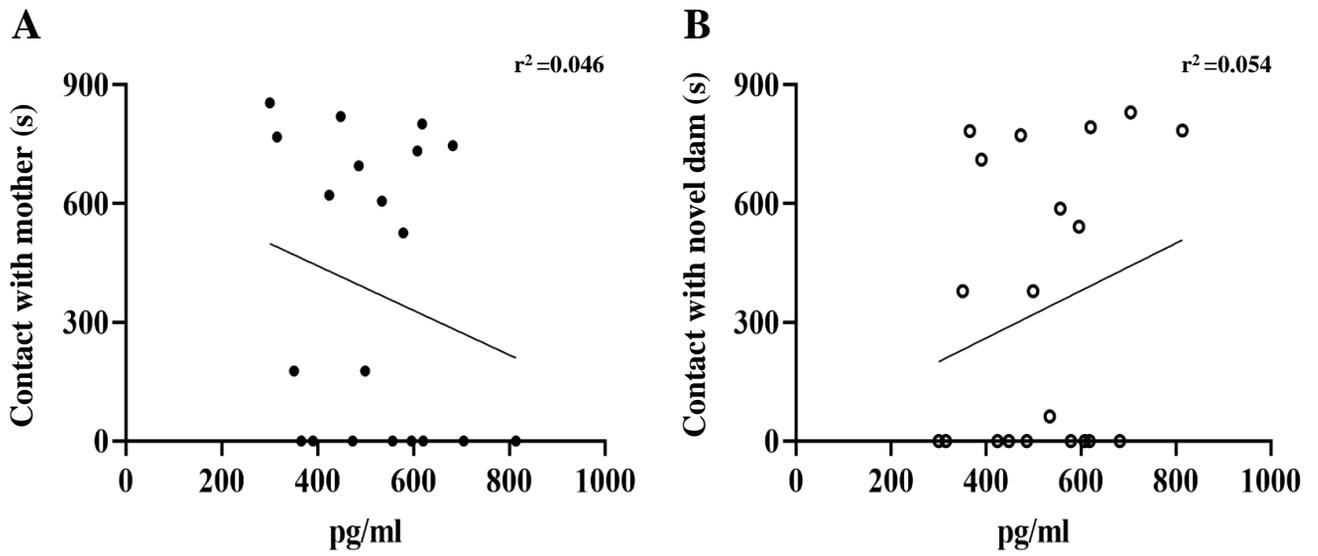


Fig. 23. PND16のオキシトシン血中濃度と母親/新規雌との接触時間

血中オキシトシン濃度と母親接触時間 (A)。血中オキシトシン濃度と新規雌への接触時間 (B)。

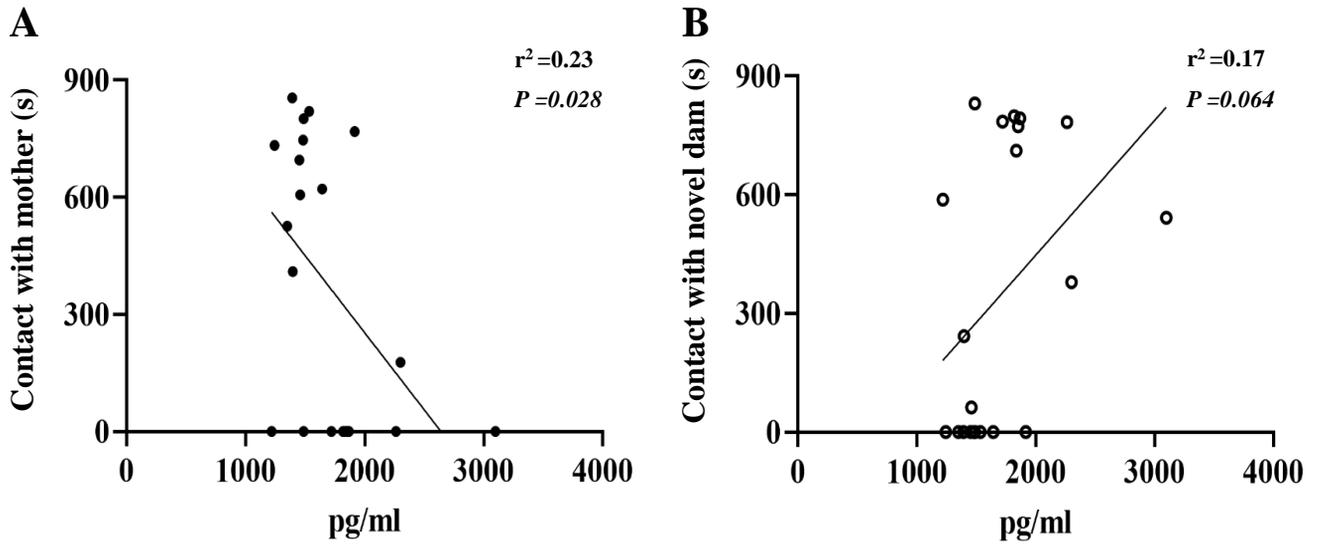


Fig. 24. PND16のバソプレシン血中濃度と母親および新規雌との接触時間

血中バソプレシン濃度と母親接触時間 (A)。血中バソプレシン濃度と新規雌への接触時間 (B)。

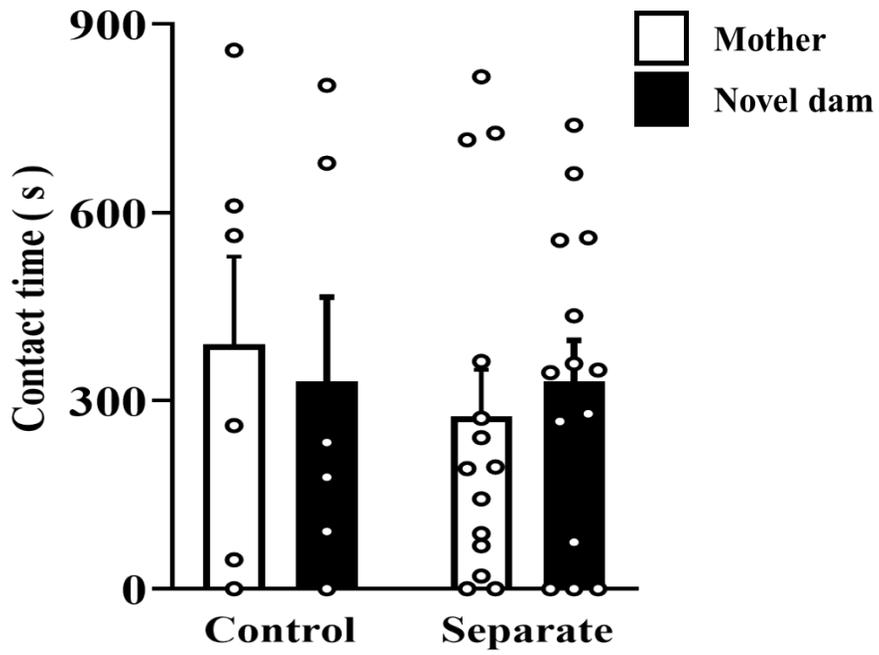


Fig. 25. 母仔分離によるPND16での母親選好性への影響

コントロール（Control）群と母子分離（Separate）群の母親および新規雌への接触時間。各群の接触時間は平均±標準誤差で示した。

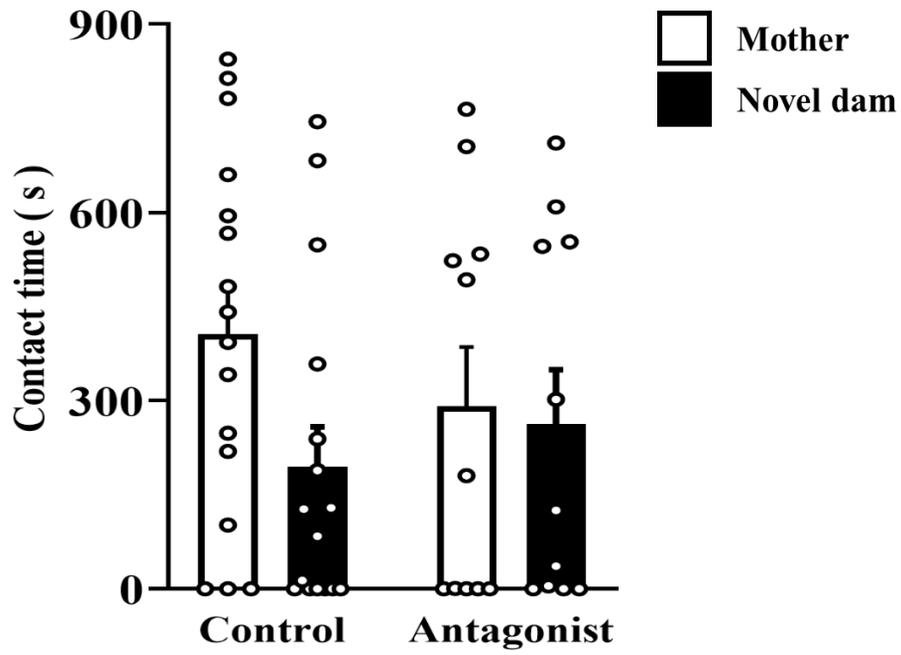


Fig. 26. CRFアンタゴニストの投与によるPND16での母親選好性テストの影響

コントロール（Control）群とCRFアンタゴニスト投与（Antagonist）群の母親および新規雌への接触時間。各群の接触時間は平均±標準誤差で示した。



Fig. 27. 高架式十字迷路

30×6cmの4本のアーム（オープンアーム；壁がない2本のアーム、クローズドアーム；高さ20cmの壁で囲われている2本のアーム）で構成された実験装置。



Fig. 28. オープンフィールドテスト

幅50cm、横50cm、高さ50cmからなる実験装置。

A**B****C**

Fig. 29. 物体認知テスト

2つの末端領域（20cm×40cm）と中央領域（20cm×40cm）からなる実験装置（A）。ガラス製の錐体の物体（5cm×22.5cm）（B）。ステンレス製の円錐の物体（4.5cm×13.5cm）（C）。

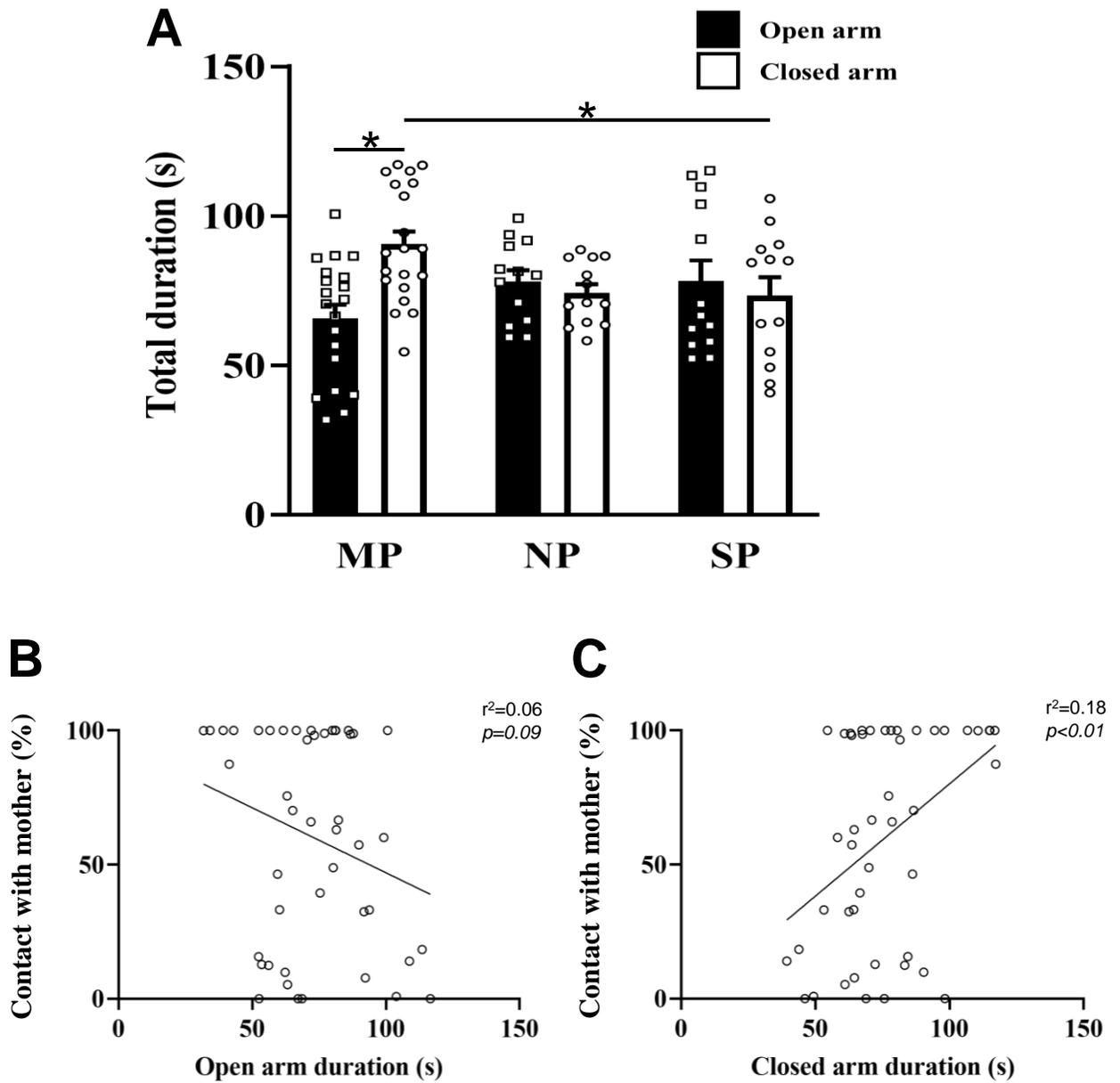


Fig. 30. 雄の高架式十字迷路

MP群、NP群とSP群のオープンアーム (open arm) (A) およびクローズドアーム (closed arm) (B) の滞在時間。PND16での母親接触率とopen arm (C) およびclosed arm (D) 滞在時間。各群の滞在時間は平均±標準誤差で示した。*; $p < 0.05$ open arm vs closed arm、MP vs SP

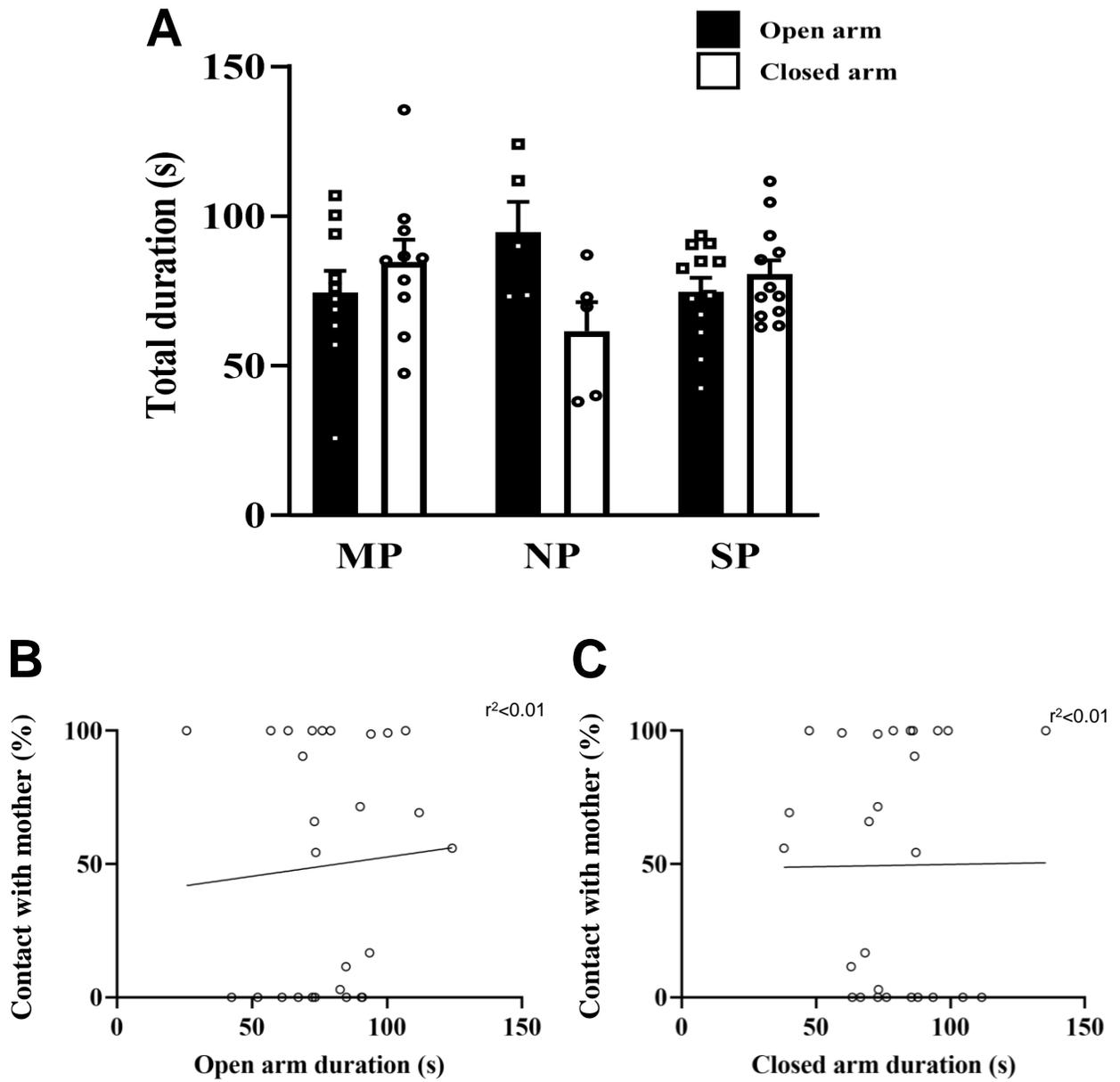


Fig. 31. 雌の高架式十字迷路

MP群、NP群とSP群のopen arm (A) およびclosed arm (B) の滞在時間。PND16での母親接触率とopen arm (C) およびclosed arm (D) 滞在時間。各群の滞在時間は平均±標準誤差で示した。

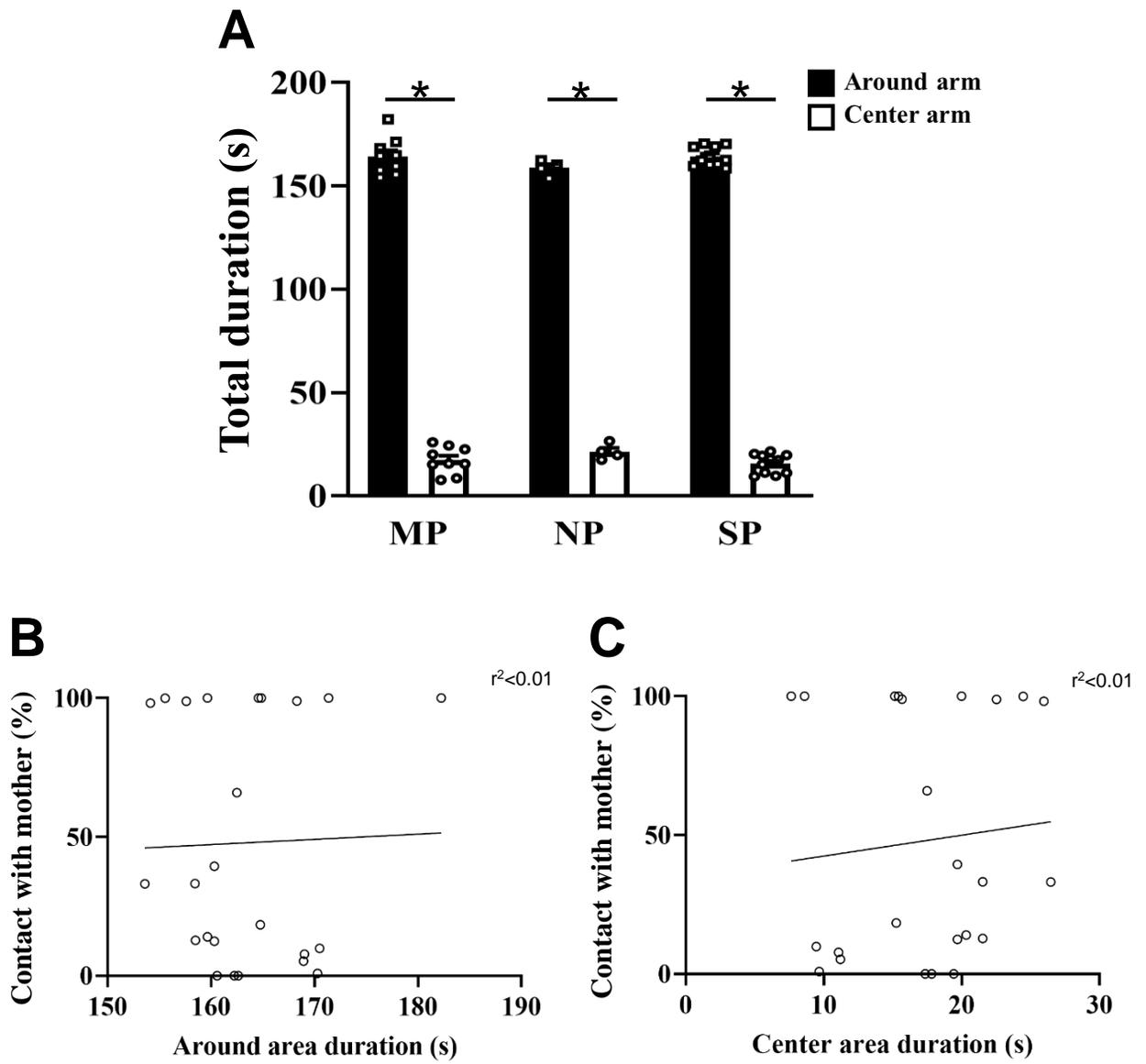


Fig. 32. 雄のオープンフィールドテスト

MP群、NP群とSP群の周辺（around）領域と中央（center）領域の滞在時間（A）。PND16での母親接触率とaround領域（B）およびcenter領域（C）の滞在時間。各群の滞在時間は平均±標準誤差で示した。*； $p < 0.05$ around領域 vs center領域

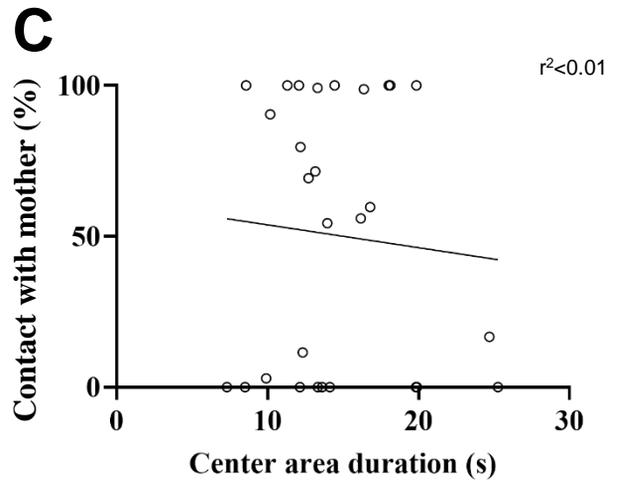
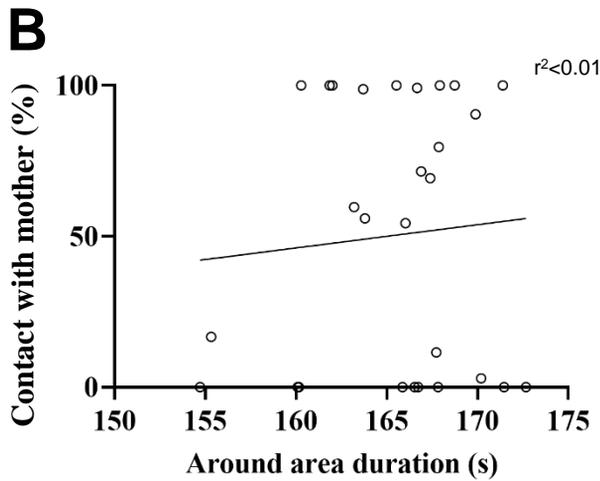
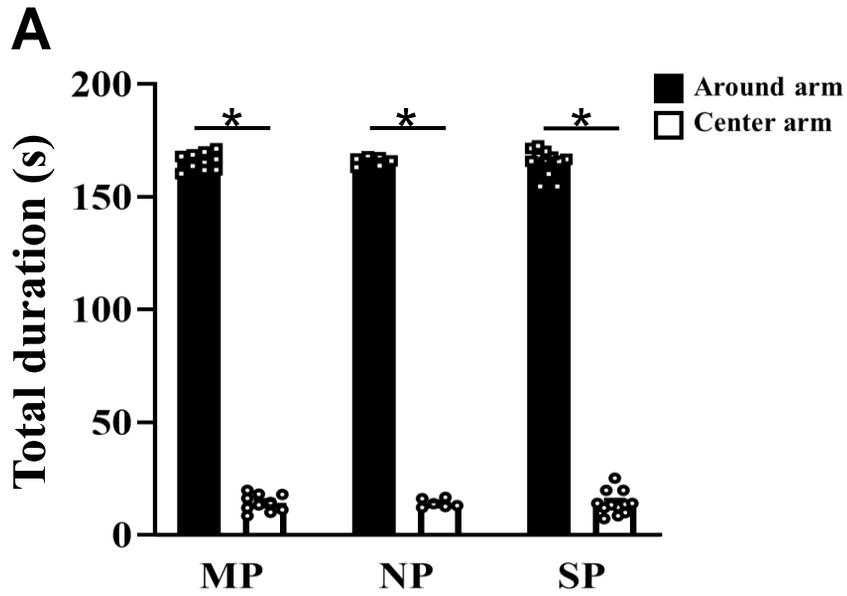


Fig. 33. 雌のオープンフィールドテスト

MP群、NP群とSP群のaround領域とcenter領域の滞在時間（A）。PND16での母親接触率とaround領域（B）およびcenter領域（C）の滞在時間。各群の滞在時間は平均±標準誤差で示した。

*; $p < 0.05$ around領域 vs center領域

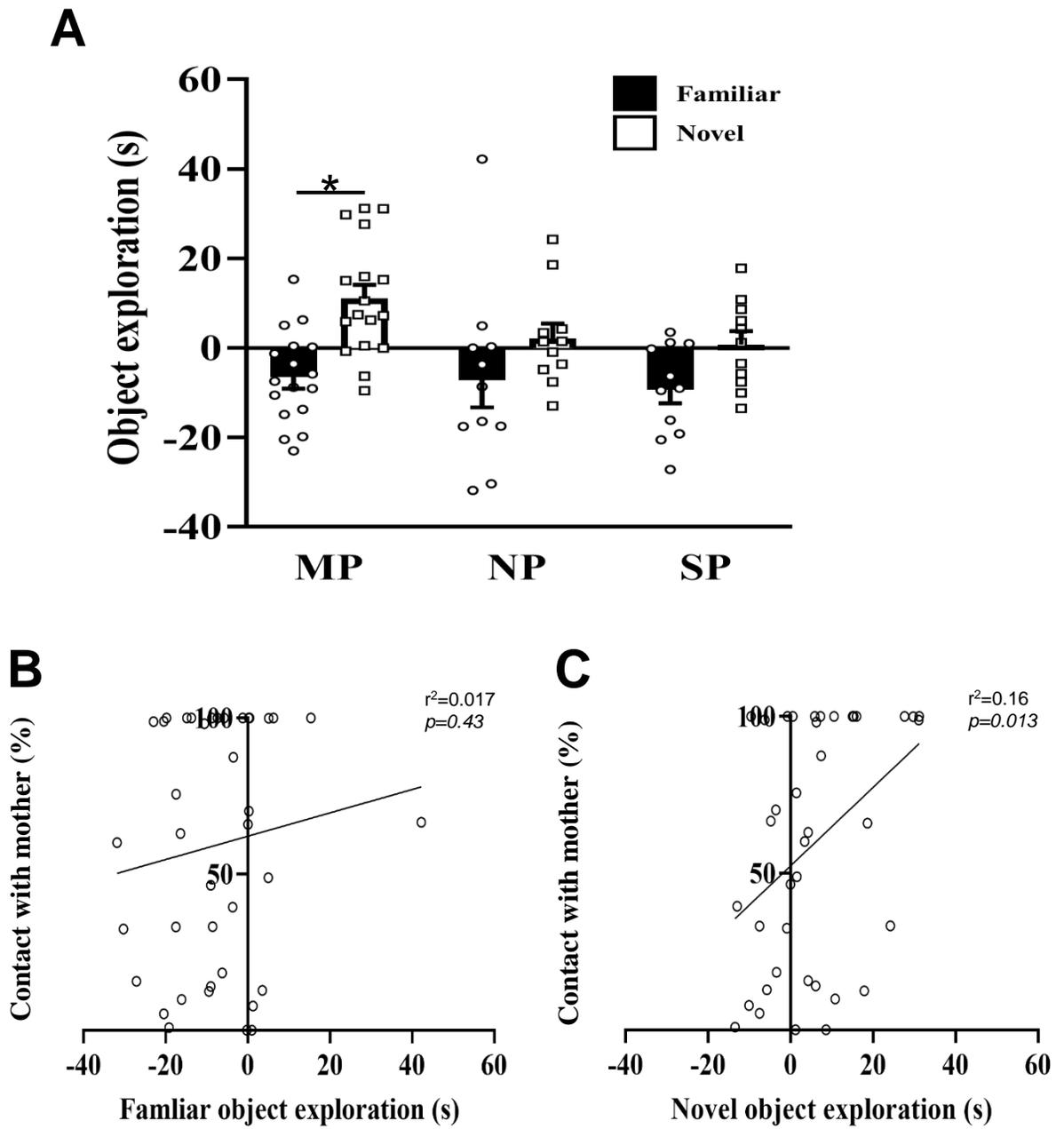


Fig. 34. 雄の物体認知テスト

MP群、NP群とSP群の既知 (novel) 物体、新規 (familiar) 物体に対する探索時間の差分 (A)。

PND16での母親接触率と novel物体 (B) およびfamiliar物体 (C) に対する探索時間。各群の探索時間の差分は平均±標準誤差で示した。*; $p < 0.05$ novel物体 vs familiar物体

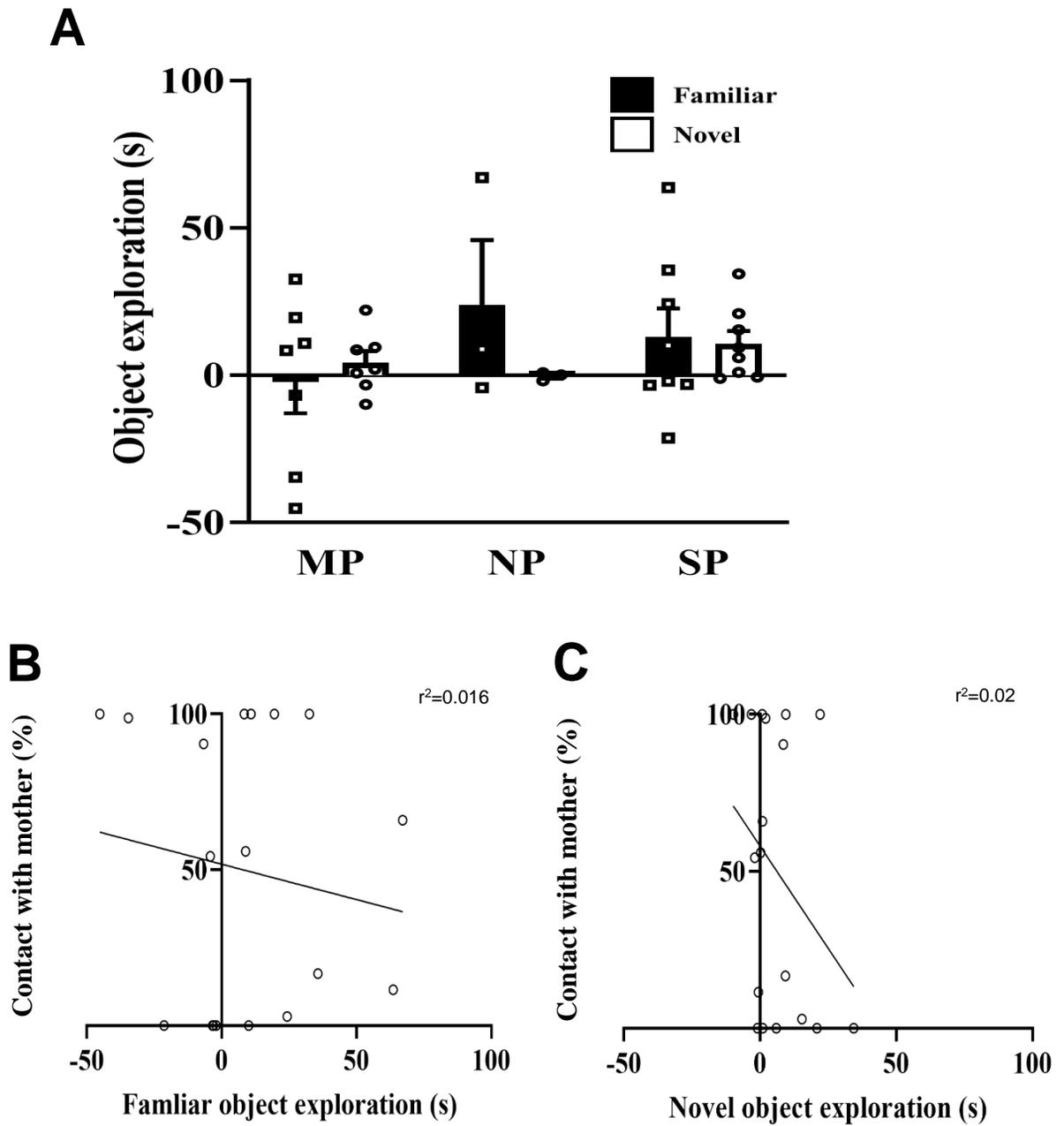


Fig. 35. 雌の物体認知テスト

MP群、NP群とSP群のnovel物体、familiar物体に対する探索時間の差分（A）。PND16での母親接触率とnovel物体（B）およびfamiliar物体（C）に対する探索時間。各群の探索時間の差分は平均±標準誤差で示した。

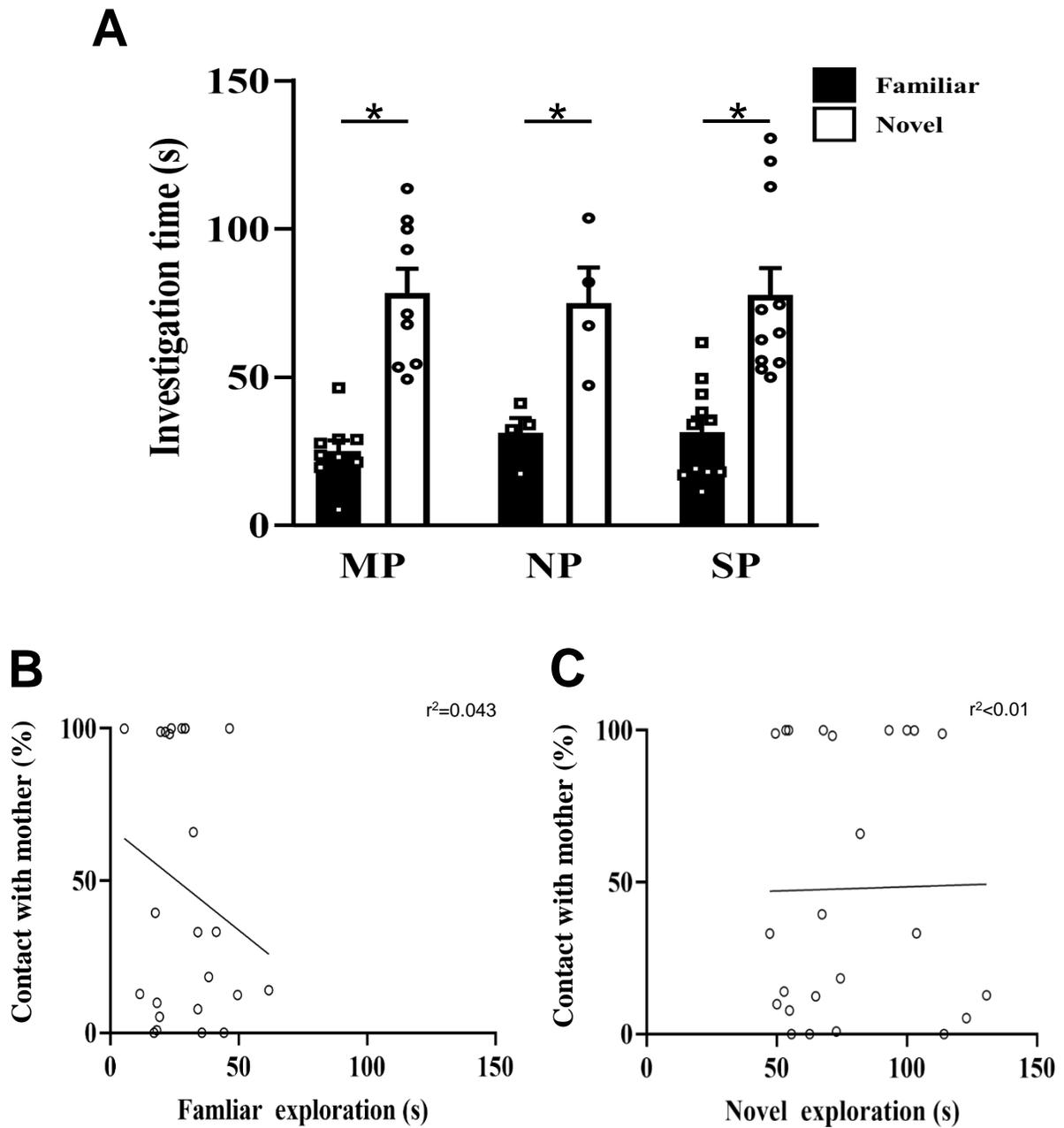


Fig. 36. 雄の社会認知テスト

MP群、NP群とSP群の既知 (novel) 個体、新規 (familiar) 個体に対する探索時間既知 (A)。

PND16での母親接触率と novel 個体 (B) および familiar 個体 (C) に対する探索時間。各群の個体に対する探索時間は平均±標準誤差で示した。*; $p < 0.05$ novel 個体 vs familiar 個体

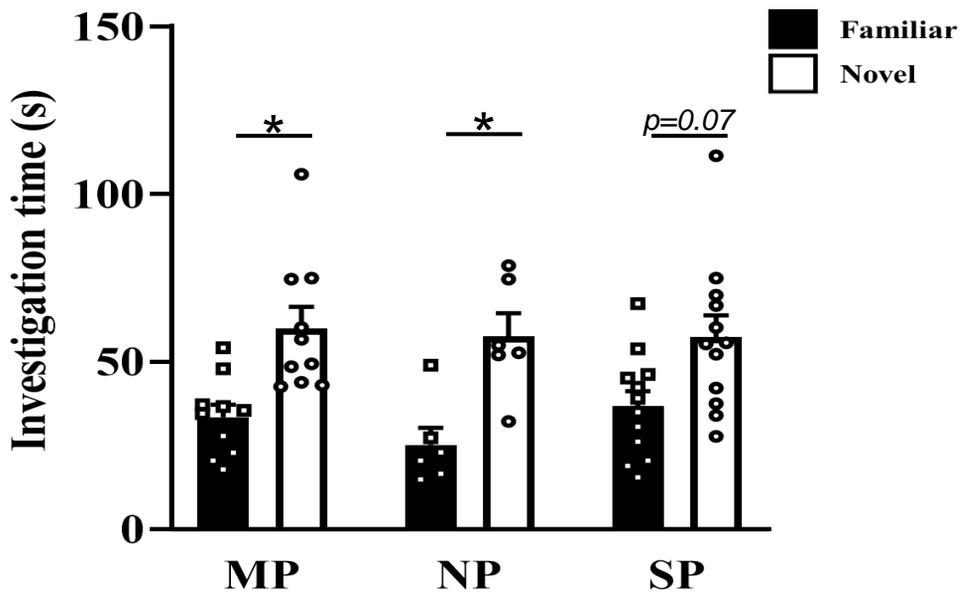
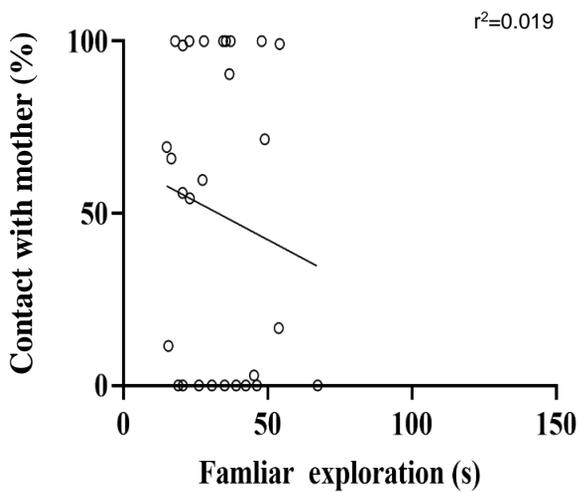
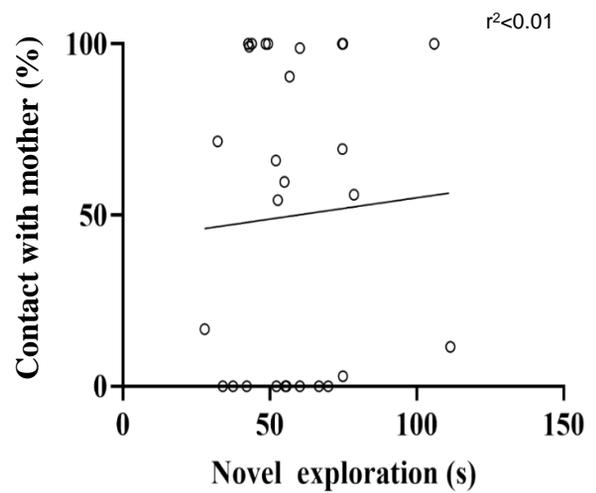
A**B****C**

Fig. 37. 雌の社会認知テスト

MP群、NP群とSP群のnovel個体、familiar個体に対する探索時間既知 (A)。PND16での母親接触率とnovel個体 (B) およびfamiliar個体 (C) に対する探索時間。各群の個体に対する探索時間は平均±標準誤差で示した。*; $p < 0.05$ novel個体 vs familiar個体

表.1. RT-PCRに用いた35プライマー配列

番号	Gene name	Primer	Forward	Reverse
1	<i>Acsn4</i>	acyl-CoA synthetase medium-chain family member 4	TGATTCTGCCCGTATCCCT	CAATGCACTTGGCCTTGGATG
2	<i>Adora2a</i>	adenosine A2a receptor	TCGCCCTCCAGAGACAGTT	TGCAGGCGACTTCGAAACCA
3	<i>Anks4b</i>	ankyrin repeat and sterile alpha motif domain containing 4B	AGGCCTGTGATGGAAGTGTC	TAGACCCGGACGGTTGAGAA
4	<i>Apol7c</i>	apolipoprotein L 7c	TTCTGGTACCTTTTCTCTGTAG	AGGTGTCAGGCAGAGACTTAAT
5	<i>Bach1</i>	BTB and CNC homology 1, basic leucine zipper transcription factor 1	CAGAACAGGGTACTCGCAA	TTGAGCAGCTTCGGAACTC
6	<i>Bglap3</i>	bone gamma-carboxyglutamate protein 3	CTTGACCTGCTTGTGACGA	GGGACGACAGGTCTAAAT
7	<i>Cdc88a</i>	coiled coil domain containing 88A	TCACTCCATGAAGTCAAAGCAGG	ACTGCTACCCTGTAGACCA
8	<i>Cdon</i>	cell adhesion molecule-related/down-regulated by oncogenes	TCCTTAGGTCCAAACCCCGA	GAGCCAGCTTGGGCATGAT
9	<i>Ces2a</i>	carboxylesterase 2A	CCCCAATGTCCAAAGGACTCT	ATCTTGAAGACTTGTAGACCACC
10	<i>Csf3</i>	colony stimulating factor 3 (granulocyte)	GTTGACAGGGTTTCTGTCT	AATCCAGTCAATCCGGGGC
11	<i>Dnah3</i>	dynein, axonemal, heavy chain 3	GACTTTGGCGGGTACCATCA	CTTGGGCTTGGGTTACGAT
12	<i>Dnajb8</i>	DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member B8	AGGTGACCACCAAGCGAATC	TACTGACCCGAGCTGTCCAT
13	<i>Erc1</i>	ELKS/RAB6-interacting/CAST family member 1	TGAATCCAGAAAGGCCAAA	CACTTGCCTTGAGGTGAGACTT
14	<i>Fhl3</i>	four and a half LIM domains 3	GGCCAAGGCTTGTACCAGA	AGGCCCAAAGTCTTGAAT
15	<i>Hc</i>	hemolytic complement	CCCATGGTATTATGCCGCTA	AGGTTTGTCTCTGCCCAAG
16	<i>Hsl17b13</i>	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 13	TTGAGGAAACCCGGACAAA	TGTAATCTCGCCCGGTTG
17	<i>Ifi1</i>	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1	GCTATGTCATTCGCTATGCAGC	GCTTGTAGCAGGCCCTTTTGT
18	<i>Ifi3</i>	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3	ATTTCTGAACTGCTCAGCCAC	TTCCCGTTGACTCACTCA
19	<i>Igb7</i>	integrin beta 7	ACACCCGTGCCATCATACTG	GCTTCCAGTTGAGTTGCTGC
20	<i>Malat1</i>	metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1 (non-coding RNA)	TTTTGAGGGTACTGCCAA	GGTTGTCTGGCTTACCAT
21	<i>Mmp13</i>	matrix metalloproteinase 13	CCCACCCCTAAGCATCCAAA	AGTTTCTCTCGGAGACTGGT
22	<i>Myl2</i>	myosin, light polypeptide 2, regulatory, cardiac, slow	GGGACACATTGCTGCCTA	CATCGTGAGGAACACGGTGA
23	<i>Klhl42</i>	kelch-like 42	GGAATGCTACAATCCCGAGCA	AGAGAACTCAGCCAGAGGGTT
24	<i>Oasl1</i>	2'-5' oligoadenylate synthetase-like 1	ATGCTCCCAAGCTTCTCTCTC	CTGCATGGCTCCTCTTTT
25	<i>Olf698</i>	olfactory receptor 698	GGCAGGAAGAAAGCCCTGT	TTTGGGGCTGTGAAAGGGAC
26	<i>Olf740</i>	olfactory receptor 740	CTTCATTCTCTTGGGCTTCCCTG	TGATCCAGCATACTGCAAGATG
27	<i>Olf1129</i>	olfactory receptor 1129	GCTTGGAGCCACTGAGTGTT	CCAAAGGATAGTCAGAGGGTT
28	<i>Oxtr</i>	oxytocin receptor	CCGCACAGTGAAGATGACCT	AAGCTTTTGGGCGCATTG
29	<i>Rtel1</i>	regulator of telomere elongation helicase 1	TGCTCACTTAGACCTCCTGCAACA	GACACAGTCTAGAGGCTGGAGTT
30	<i>Ptgds</i>	prostaglandin D2 synthase (brain)	GCTCCTTCTGCCAGTTTTCCT	AACCCATCCACAGCATGCGA
31	<i>Sipa1l2</i>	signal-induced proliferation-associated 1 like 2	GAACCTTTCGGCTTTGCCTG	ACAGTCACAGATGTCGCGAG
32	<i>Slc36a2</i>	solute carrier family 36 (proton/amino acid symporter), member 2	ACGGGTCACTCTCTGAGTCTT	GGGTGGAAGCCATCATCGAA
33	<i>Spr1b</i>	small proline-rich protein 1B	GCCCTAATATCAGATCCCACTC	TCAGCTACCAAGTCTCTGGGT
34	<i>S100a9</i>	S100 calcium binding protein A9 (calgranulin B)	TGACTCTTAGCCTTGAAGAGCAAG	ATGGTGGTTATGCTGCGCTC
35	<i>Vmn1r179</i>	vomer nasal 1 receptor 179	AGCCCTCTATGTGTACGCT	GCCACAGTCCAACACCAAAC

表.2. MP群と比較し、NP群において遺伝子の発現上昇がみられた上位20遺伝子

NP/MP: UP		
NO	Gene name	ration
1	hemolytic complement	7.51
2	high mobility group nucleosomal binding domain 1	5.29
3	DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member B8	5.04
4	kelch-like 42	4.83
5	ankyrin repeat and sterile alpha motif domain containing 4B	4.76
6	receptor (calcitonin) activity modifying protein 2	4.69
7	dynein, axonemal, heavy chain 3	4.60
8	cell adhesion molecule-related/down-regulated by oncogenes	4.51
9	myosin, light polypeptide 2, regulatory, cardiac, slow	4.46
10	four and a half LIM domains 3	4.35
11	solute carrier family 36 (proton/amino acid symporter), member 2	4.27
12	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 13	4.20
13	insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 2	4.00
14	chemokine (C-C motif) ligand 20	4.00
15	predicted gene 12758	3.97
16	nephrosis 2, podocin	3.94
17	uroplakin 3B	3.92
18	alanyl-tRNA synthetase	3.89
19	Lilra6	3.73
20	integrin beta 7	3.72

表.3. MP群と比較し、SP群において遺伝子の発現上昇がみられた上位20遺伝子

SP/MP: UP		
NO	Gene name	ration
1	small proline-rich protein 1B	7.53
2	bone gamma-carboxyglutamate protein 3	6.73
3	olfactory receptor 698	5.43
4	matrix metalloproteinase 13	4.79
5	prostaglandin D2 synthase (brain)	4.76
6	S100 calcium binding protein A9 (calgranulin B)	4.74
7	myosin 1H	4.41
8	colony stimulating factor 3 (granulocyte)	4.24
9	regulator of telomere elongation helicase 1	4.22
10	integrin beta 7	4.16
11	cell adhesion molecule-related/down-regulated by oncogenes	4.04
12	zinc finger protein 185	3.86
13	UDP-glucose glycoprotein glucosyltransferase 2	3.84
14	four and a half LIM domains 3	3.80
15	dystrophin, muscular dystrophy	3.64
16	KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) endoplasmic reticulum protein retention receptor 3	3.63
17	lipocalin 5	3.60
18	protease, serine 51	3.59
19	hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta- and steroid delta-isomerase 5	3.58
20	seminal vesicle antigen-like 1	3.58

表.4. MP群と比較し、NP群において遺伝子の発現減少がみられた9遺伝子

NP/MP: DOWN		
NO	Gene name	ration
1	olfactory receptor 1129	0.13
2	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1	0.21
3	ELKS/RAB6-interacting/CAST family member 1	0.34
4	apolipoprotein L 7c	0.37
5	coiled coil domain containing 88A	0.40
6	expressed sequence AI607873	0.41
7	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3	0.44
8	signal-induced proliferation-associated 1 like 2	0.47
9	metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1 (non-coding RNA)	0.47

表.5. MP群と比較し、SP群において遺伝子の発現減少がみられた14遺伝子

SP/MP: DOWN		
NO	Gene name	ration
1	olfactory receptor 1129	0.10
2	expressed sequence AI607873	0.25
3	vomer nasal 1 receptor 179	0.33
4	metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1 (non-coding RNA)	0.34
5	acyl-CoA synthetase medium-chain family member 4	0.34
6	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1	0.37
7	carboxylesterase 2A	0.37
8	coiled coil domain containing 88A	0.37
9	predicted gene, 39695	0.42
10	2'-5' oligoadenylate synthetase-like 1	0.43
11	BTB and CNC homology 1, basic leucine zipper transcription factor 1	0.45
12	olfactory receptor 740	0.47
13	apolipoprotein L 7c	0.48

表.6. NP群と比較し、SP群において遺伝子の発現上昇がみられた上位20遺伝子

SP/NP: UP		
NO	Gene name	ration
1	bone gamma-carboxyglutamate protein 3	6.25
2	small proline-rich protein 1B	3.52
3	colony stimulating factor 3 (granulocyte)	3.08
4	retinal pigment epithelium derived rhodopsin homolog	2.85
5	olfactory receptor 1087	2.67
6	tumor rejection antigen P1A	2.67
7	phosphodiesterase 7B	2.59
8	cytoskeleton associated protein 5	2.50
9	matrix metalloproteinase 9	2.50
10	myosin 1H	2.43
11	olfactory receptor 601	2.38
12	myosin binding protein C, slow-type	2.37
13	zinc finger protein 407	2.30
14	phosphatidylinositol-specific phospholipase C, X domain containing 2	2.30
15	calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV	2.26
16	neuronal PAS domain protein 3	2.25
17	cadherin-like 24	2.25
18	SMAD family member 9	2.24
19	synaptotagmin II	2.22
20	basonuclin 1	2.21

表.7. NP群と比較し、SP群において遺伝子発現減少がみられた上位20遺伝子

SP/NP: DOWN		
NO	Gene name	ration
1	predicted gene 568	0.14
2	vomeronasal 1 receptor 179	0.18
3	carboxylesterase 2A	0.20
4	hemolytic complement	0.24
5	cysteine-rich perinuclear theca 15	0.28
6	ankyrin repeat and sterile alpha motif domain containing 4B	0.29
7	DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member B8	0.30
8	DPY30 domain containing 2	0.31
9	myosin, light polypeptide 2, regulatory, cardiac, slow	0.32
10	chemokine (C-C motif) ligand 20	0.32
11	olfactory receptor 822	0.33
12	olfactory receptor 1370	0.33
13	X-linked lymphocyte-regulated 3C	0.33
14	olfactory receptor 812	0.33
15	deiodinase, iodothyronine, type I	0.34
16	predicted gene 10024	0.34
17	polymerase (DNA directed), epsilon 2 (p59 subunit)	0.34
18	alanyl-tRNA synthetase	0.34
19	predicted gene 12569	0.34
20	olfactory receptor 740	0.35