

機関番号：33403

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20530670

研究課題名 (和文) 動物モデルによる多動・学習障害のメカニズムを探る生理心理学的研究

研究課題名 (英文) A study of the physiological psychology to investigate the brain mechanisms of the hyperactive and learning disorders using Tsukuba emotional strain rats as an animal model of these disorders.

研究代表者

吉田 和典 (YOSHIDA KAZUNORI)

仁愛大学・人間学部・教授

研究者番号：50143938

研究成果の概要 (和文)：本研究は、Tsukuba 情動系ラットの中で特に低情動系 (L 系) ラットの多動性に注目し、これらのラットの一般活動性や様々な学習習得過程を詳細に観察することにより、L 系ラットの多動・学習障害動物モデルとしての妥当性を検討すると同時に、これらの障害発生メカニズムを明らかにすることを目的とした。その結果、L 系ラットは作業記憶を必要とする 8 方向放射状迷路を用いた空間学習課題において明瞭な空間学習障害を示すことが明らかとなった。また、L 系ラットの多動性に伴い特異な概日リズムが観察され、L 系ラットの多動・学習障害モデルの妥当性が確認された。そこで、空間記憶にとって重要な海馬を中心とした形態学的検索を行った結果、海馬全体に対する吻側部背側海馬の容積比が L 系ラットで有意に減少しており、特に、歯状回容積比が他のラットと比べて有意に減少していることが判明した。さらに、L 系ラットの空間学習成績と歯状回容積比との間に負の相関傾向が認められた。従って、空間学習障害の背景に、背側海馬歯状回の形態学的変容が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：The present study was intended to clarify the brain mechanism of the hyperactivity and learning disorder, as well as to determine the appropriateness of Tsukuba low emotional strain (L strain) rats as an animal model of the hyperactive and learning disorder, by observing the general activity and various learning acquisition processes of these rats in detail. As a result, it revealed an interesting fact that the L strain rats showed a clear spatial learning disorder in the spatial learning problem with an 8-arm radial maze needing a working memory. In addition, peculiar circadian rhythm was observed in the L strain rats, and the validity of the hyperactive and learning disorder model of the L strain rats was confirmed. The morphological study mainly performed on the hippocampus which was important to spatial memory made very obvious that the volume ratio of the rostral part of the dorsal hippocampus for the whole hippocampus significantly decreased in the L strain rats, and that the volume ratio of the dentate gyrus for the dorsal hippocampus in these strain rats was quite lower compared with that in the other rats. Moreover, the findings displayed the negative correlation between the number of trials achieved in the spatial learning and the volume ratio of the dentate gyrus in the L strain rats. Therefore, the morphological transformation of the hippocampal dentate gyrus was suggested in terms of the spatial learning disorder.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	400,000	120,000	520,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：生理心理学

科研費の分科・細目：心理学・実験心理学

キーワード：生理・多動・学習障害モデル

1. 研究開始当初の背景

注意欠陥多動性障害（ADHD）は、幼児期や学童期に見られる不注意、多動性及び衝動性を主症状とし、学習障害（LD）などの認知機能障害を伴う軽度発達障害として位置づけられる精神疾患である。最近、これらの多動障害や学習障害などのさまざまな発達障害を有する幼児や児童が教育現場で大きな問題となっており、教育的側面や医学的側面からの広範囲な研究が行われている。特に、これらの障害の発生メカニズムの正確な把握や治療につながる基礎的研究がここ数年盛んに行われている。その中で、これらの障害のモデル動物が様々な手法を用いて作成されている。例えば、妊娠中のラットにサリドマイドを暴露した自閉症モデルラット（成田ら、2004）や、幼若時のラットに環境化学物質（フェノール類など）や神経毒の6-OHDAを脳内に注入した多動障害モデルラット（石堂、2003、Masuoら、2004）、あるいは、遺伝子改変による統合失調症モデルラット（曾良、2001）などが挙げられる。これらのモデル動物はすべて薬物や遺伝子改変など外的操作を行った人為的モデルであり、ヒトでの自然発症的疾患には程遠いものと考えられる。しかも多動性にのみ注目しており、学習障害などの認知的側面に関しても障害モデルとして確立されていないのが現状である。一方、1972年に当時の東京教育大学（現筑波大学）の心理学

教室で直線走路によるWistar系ラットの行動解析が行われ、明所での行動量の多い低情動系ラットと行動量の少ない高情動系ラットに選択的に分離、系統維持されてきたTsukuba情動系ラットが作成された。現在これらのラットは情動性に関する近交系ラットとし学術的に承認されている。しかしながら、これまでこれらのラットに関する多動障害や学習障害に焦点を絞った研究はほとんど行われていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、上述のように、数十年にわたり選択交配され自然発症的に作製されたTsukuba情動系ラットの中で特に低情動系ラットの多動性に注目し、これらのラットの一般活動性や様々な学習習得過程を詳細に観察することにより、Tsukuba低情動系ラットの多動・学習障害動物モデルとしての妥当性を検討すると同時に、これらの障害発生メカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(2008年度)

本年度は、Tsukuba低情動系ラットの種々の学習行動を、Tsukuba高情動系ラットや雑種のWistar系ラットの成績と比較検討し、学習障害の動態を明らかにする計画であった。まず、現有する8方向放射状迷路と、今年度設備として計上したモーリス水迷路を用いて、空間認

知能力を調べた。8方向放射状迷路学習は、作動記憶と参照記憶を要する空間学習である。手続きは、最大10分間ないしは8つの餌のあるアームを選択するか、16選択するまでを1日1試行行った。学習基準は、餌のあるアームへ8連続正選択するか12選択以内で7連続正選択が3試行(3日間)連続とし、最大30試行(30日間)とした。また、モーリス水迷路学習は主に参照記憶を必要とする空間学習である。手続きは、1試行90秒間、直径150cmの円形プール内を泳がせ、水面下のプラットホームまでの逃避訓練(場所学習訓練)を1日4試行で4日間行った。5日目に逃避用プラットホームを取り除くプローベテストを1試行60秒間行った。これらの一連の行動を自動的に解析し、各試行毎のゴール(プラットホーム)までの泳いだ軌跡や逃避潜時及びプローベテスト時の本来あったゴール付近の通過数や滞留時間を求めた。これらの装置を用いることによって、Tsukuba低情動系ラットの弁別能力や作動記憶及び参照記憶を要する空間認知能力を詳細に検討した。

(2009年度)

本年度は、Tsukuba 低情動系ラットの一般活動性を詳細に観察し、Tsukuba 高情動系ラット及び雑種の Wistar 系ラットの行動量と比較検討することによって、多動性障害の動態を明らかにした。まず、一般活動性を測定するために、80×80cm の正方形で高さ 30cm の自製オープンフィールド装置を用いた。オープンフィールドの中央にラットを置き、5分間の通過区画数(Ambulation)、立ち上がり行動(Rearing)、洗顔行動(Face Washing)、毛づくろい行動(Grooming)、におい嗅ぎ行動(Sniffing)、脱糞(Defecation)、脱尿(Urination)の回数を記録するとともに、ビデオ録画した。これらの記録から走行軌跡を描き、走行距離や平均走行速度を求めた。さらに、今年度購入する回転式運動量測定装置(KN-78)を用いて、1日の総行動量を測定した。この装置は、ラットが自由に回転籠を回すことによってカウンター方式で行動量が

測定できるものである。夜行性のラットの場合、暗期に行動量が多いこと予測され、また、雌ラットの場合は性周期(4~5日周期)と行動量との関連が示唆されているため、複数台の運動量測定装置を同時に用いてラットの明期(午前8時~午後8時)と暗期(午後8時~午前8時)の行動量を30日間連続測定し、雌雄の Tsukuba 両情動系ラット及び雌雄の雑種 Wistar 系ラットの行動リズムを比較解析した。

(2010年度)

本年度は、2008年度及び2009年度に実施した学習実験や行動実験結果から、多動・学習障害を呈したラットの脳内メカニズムを明らかにするために、用いたすべてのラットの脳内の形態学的検索を行った。前々年度の学習実験及び前年度の行動実験終了後、ネブタール深麻酔下で、0.1%硫化ナトリウム溶液とホルマリン溶液で脳を灌流定し、20%シュクロース溶液に浸し、冷蔵保存しておいた脳組織を用いた。クリオスタットを用いて、50 μ mの連続凍結薄切片を作製し、ニッスル染色とビオチン化デキストランアミン(BDA)免疫染色を別々に行った。ニッスル染色はNeutral Redを用い、染色された脳内ニューロンの形状やニューロン数などから、脳内の神経核組織の形態を明らかにするためである。また、BDA免疫染色法は、脳内にBDAを注入し、順行性に標識された神経終末や逆行性に標識されたニューロン分布を調べ、Tsukuba 情動系ラットの脳内の神経ネットワークを明らかにするためであった。

4. 研究成果

(2008年度)

本年度は、Tsukuba 情動系ラットの中で、特に、Tsukuba 低情動系(L系)ラットの空間認知能力を検討する目的で、2種類の空間学習課題を実施した。まず、作業記憶と参照記憶を必要とする8方向放射状迷路を用いた課題において、L系ラットの明瞭な空間学習障害の証拠が得られた。すなわち、図1に示

したように、L系ラットは、Tsukuba 高情動系 (H系) ラットに比べて、学習成立までの試行数が有意に延長し、また、各試行での8選択ないしは最大16選択するまでの所要時間が、第1試行と第2試行を除いた他の試行で常に長く、全選択数や誤選択数も多い傾向が認められた。この段階では、L系ラットの空間学習障害は作業記憶と参照記憶のどちらの障害であるかについては不明であった。

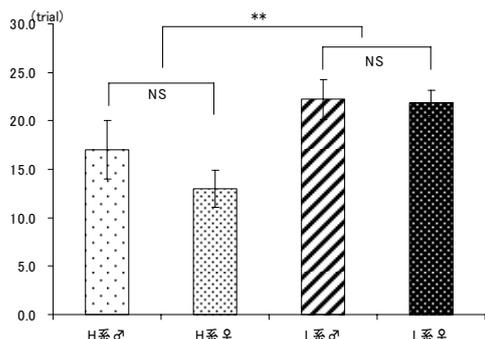


図1 学習成立までの平均試行数(±SE)
縦軸は8方向放射状迷路による空間学習基準達成までの平均試行数を示している。♂、♀はそれぞれ雄ラット、雌ラットのデータである。NS: Non-significant, **: p<.01 (Mann-WhitneyのUテスト)

そこで、次に、参照記憶のみを必要とするモーリス水迷路による課題を行った。その結果、場所学習訓練時、L系ラットのプラットホームまでの逃避潜時は、統制群として用いた雑種のWistar系(W系)ラットと同様の経過をたどり、両群間で有意差は認められなかった。また、プローベテスト時においては、本来プラットホームのあったZoneでの滞留時間がW系ラットより長い傾向が認められ、L系ラットのほうがプラットホームの場所をより正確に学習している可能性が考えられた。以上のことから、L系ラットで観察された8方向放射状迷路による空間学習障害は、主に、作業記憶の障害であることが明らかとなった。

(2009年度)

本年度は、L系ラットの多動性について再確認するために、オープンフィールド内での一般活動性を解析すると同時に、暗期も含め

た1日の自発的な輪回し行動から概日リズムを長期間(30日間)観察し、H系及び統制群である雑種のWistar(W系)ラットと比較しながら、L系ラットの行動特性の全貌を明らかにすることを目的とした。まず、オープンフィールド内での一般活動性の解析結果から、図2に示したように、L系ラットの多動性が

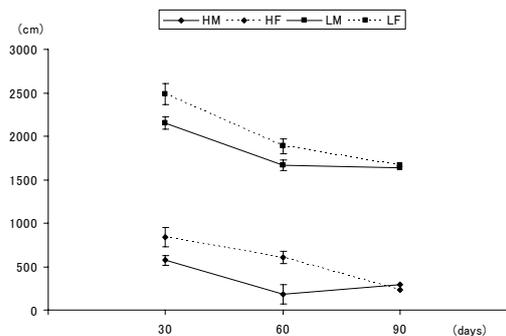


図2 オープンフィールドでの平均走行距離(±SE)
横軸は日齢、HM、HFはそれぞれH系雄、雌ラット、LM、LFはそれぞれL系雄、雌ラットを示している

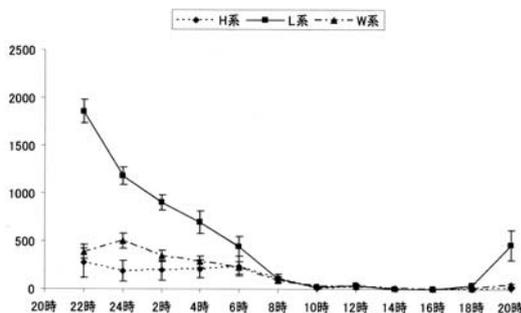


図3 時間帯毎の平均日内活動(±SE)
各時間帯での値は2時間の平均活動量(回転数)を表している。例えば、22時は20時-22時までの平均活動量を示している

再確認された。しかし、その多動性のピークは幼若期(30日齢)頃にあり、その後減少することが明らかとなった。また、輪回し行動による長期にわたる概日リズムの観察結果から、図3に示したように、L系ラットは、明期においても、H系ラットや統制群のW系ラットと比べて明らかに活動量が多く、さらに、L系ラットは暗期に入る約2時間前から活動し始め、暗期直後に活動が集中する特異

な概日リズムが観察された。以上のことから、L系ラットの多動性と特異な概日リズムの背景に、概日リズムを統制する視交叉上核（SCN）の機能的及び形態学的変容の可能性が考えられた。

（2010年度）

本年度は、Tsukuba 情動系ラットの中で、特に、Tsukuba 低情動系（L系）ラットの空間学習障害と脳内、特に海馬内の形態学的変容過程との関連を調べ、さらに、飼育環境条件により、空間学習や海馬の神経構造にどのような影響が見られるかを検討した。その結果、図4に示したように、まず、豊環境飼育条件でのTsukuba 低情動系ラット（RL群）の空間学習成立までの試行数が、標準環境で飼育されたTsukuba 低情動系ラット（SL群）

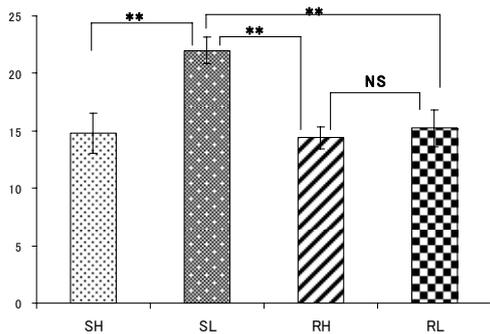


図4 各群の空間学習完成までの試行数（±SE）
縦軸は学習基準に達するまでの平均試行数を示している。SH, SL:それぞれ標準環境飼育H系ラット群, L系ラット群, RH, RL:それぞれ豊環境飼育H系ラット群, L系ラット群のデータである。NS: Non-significant, **: $p < .01$ (Mann-WhitneyのUテスト)

と比較して有意に減少し、飼育環境条件により明瞭な学習改善効果が認められた。そこで、これらのラットの海馬の形態学的検索を行った結果、海馬全体に対する吻側部背側海馬の容積比がSL群で有意に減少していることが認められ、特に、SL群の歯状回容積比が他の群と比べて有意に減少していることが明らかとなった。さらに、図5にも示したよう

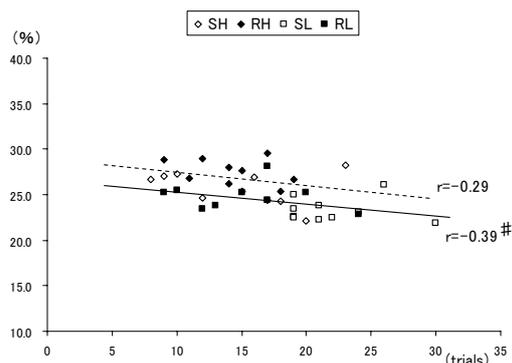


図5 空間学習成績と背側海馬歯状回容積比との相関
横軸は学習基準に達するまでの試行数 (trials), 縦軸は背側海馬容積に対する海馬歯状回容積の割合 (%) を示している。点線と実線はそれぞれH系とL系ラット群の回帰直線と相関係数を示している。#: $p < .10$ (t test)

に、L系群（RL群とSL群）の空間学習基準達成までの試行数と歯状回容積比との間に負の相関傾向が認められた。以上のことから、SL群で見られた空間学習障害やRL群での学習改善効果の背景には海馬歯状回を中心と神経ネットワークが重要な役割を果たしていることが示唆された。

5. 研究の総括と今後の課題

本研究結果をまとめると、L系ラットは作業記憶を必要とする8方向放射状迷路を用いた空間学習課題において明瞭な空間学習障害を示すことが明らかとなった。また、L系ラットの多動性に伴い特異な概日リズムが観察され、L系ラットの多動・学習障害モデルの妥当性が確認された。そこで、空間記憶にとって重要な海馬を中心とした形態学的検索を行った結果、海馬全体に対する吻側部背側海馬の容積比がL系ラットで有意に減少しており、特に、歯状回容積比が他のラットと比べて有意に減少していることが判明した。さらに、L系ラットの空間学習成績と歯状回容積比との間に負の相関傾向が認められた。従って、L系ラットの空間学習障害の背景に、背側海馬歯状回の顆粒細胞の動態が重要な役割を果たしていることが示唆された。しかしながら、今回は、L系ラットの海馬歯状回を含めた海馬内のより詳細な神経

入出力系の特徴を明らかにするまでは至らなかった。また、概日リズムや運動制御に関連する視交差上核や黒質を中心とした神経ネットワークについても、L系ラットの変容特徴を明らかにするまでは至らなかった。

そこで今後は、L系ラットの海馬を中心とした大脳皮質や脳幹部位との神経ネットワークを詳細に調べる必要がある。また、概日リズムや運動制御に関連する部位も含めて、L系ラットの多動・学習障害の背景となる脳内神経ネットワークを広範囲に検討することが必要であると考えられる。

6. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

吉田和典, Morris型水迷路によるTsukuba高・低情動系ラットの空間学習過程, 人間学研究, 7, p87-94, 2008

吉田和典, Tsukuba情動系ラットの概日リズムの特徴—輪回し行動による検討—, 仁愛大学研究紀要, 8, p53-59, 2009

吉田和典, Tsukuba情動系ラットの空間学習成績と海馬内の神経構造との関連—飼育環境条件による影響について—, 仁愛大学研究紀要, 9, p35-41, 2010

[学会発表] (計4件)

吉田和典, Tsukuba情動系ラットの海馬機能について, 第26回日本生理心理学会大会, 2008

木村誠, 吉田和典, Tsukuba低情動系ラットにおける行動抑制の検討—DRLスケジュールを用いて—, 第69回日本動物心理学会大会, 2009

吉田和典, モーリス水迷路を用いたTsukuba情動系ラットの空間学習過程, 第27回日本生理心理学会大会, 2009

吉田和典, Tsukuba情動系ラットの輪回し行動によるサーカディアンリズムの特徴, 第28回日本生理心理学会大会, 2010

[図書] (計0件)

[産業財産権]
○出願状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

7. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 和典 (YOSHIDA KAZUNORI)
仁愛大学・人間学部・教授
研究者番号: 50143938

(2) 研究分担者 ()

研究者番号:

(3) 連携研究者 ()

研究者番号: