

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：34521

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22610024

研究課題名（和文）多面的行動分析による ADHD モデルラットに関する発生学のおよび神経行動学的研究

研究課題名（英文）Developmental and neurobehavioral analyses of AD/HD model rats using multiple behavioral assessment

研究代表者

杉岡 幸三 (SUGIOKA KOZO)

姫路獨協大学・医療保健学部・教授

研究者番号：90112127

研究成果の概要（和文）：

本研究は、胎生後期にメチルアゾキシメタノール(MAM)を投与して作出した ADHD モデルラットについて新生児期から成体期まで多面的神経行動学的分析を行ったところ、ADHD モデル動物が示した行動学的結果のいくつかはヒトの ADHD 児で観察される注意欠陥また学習障害と類似すること、新生児期であっても行動学的異常の検出は可能であること、またこれらの行動学的異常が脳の大脳皮質表層部および海馬の発生学的層構築異常および異所性細胞集塊また神経線維連絡の異常と関係している可能性を指摘した。

研究成果の概要（英文）：

We developmentally examined the ADHD model rat induced by prenatal methylazoxymethanol injection using multiple behavioral and histological analyses from neonatal to adult periods. Behavioral disorders obtained were partially similar to those of human ADHD. Our data suggested that these ADHD-like behavioral disorders were related to cytoarchitectural abnormalities of the frontal cortex and the hippocampal formation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
2012 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：発達神経行動科学

科研費の分科・細目：時限・子ども学（子ども環境学）

キーワード：注意欠陥多動性障害・多面的行動分析・大脳皮質・海馬・発生学的形態異常

1. 研究開始当初の背景

注意欠陥多動性障害(ADHD)は小児期から青年期以降までわたる行動異常であり、その本態がまだ解明されていない解決すべき重要な課題のひとつである。過去においては、ADHD 発症はドーパミン系の異常と関連付けられていたが、最近では、ADHD はそのような単一的な原因ではなく、脳の発達障害、特に胎

生期における脳の発達障害が主たる原因である可能性が指摘されている。様々な脳部位が ADHD 発症の責任脳部位候補者として報告されているが、最近特に着目を浴びているのは前頭前野および海馬である。これらの部位は ADHD 児で観察される様々な行動異常や認知障害だけでなく統合失調症のような多くの精神疾患とも関連する重要な領域である、

と報告されている。しかしながら、過去の研究では行動学的分析が体系的ではなく、観察される多動性や注意欠陥また認知障害について、実験心理学的手法に基づいた多面的行動分析が行われていなかった。また、前頭前野や海馬の組織学的・形態学的また細胞組織学的分析が詳細に行われていなかった。本研究は、その点に着目して、ADHDモデル動物について多面的行動分析を行うとともに、それらの行動表出が、前頭前野や海馬の発生学的形態異常（特に細胞構築異常）とどのように関係するかについて分析しようとした。

2. 研究の目的

本研究は、学習、注意また活動性などの機能に深く関与する海馬および前頭前野の機能不全に焦点を絞り、ラットを材料として、胎生後期に、発生および分化過程にある幼弱神経細胞に対して特異的に神経毒性を有するメチルアゾキシメタノール(MAM)を投与することによって、海馬もしくは前頭前野の発生学的形態異常を有するADHDモデル動物を作成し、これらの動物に対して、新生児期から成体期に至る様々な時期に、種々の実験パラメータを用いた多面的行動分析を行うとともに脳の細胞組織学的分析を行い、得られた行動学的結果と脳の組織学的所見との関係性を探ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 神経毒胎生期投与によるADHDモデル動物の作成

Jcl:Wistarラットの妊娠15日齢(M15群)もしくは17日齢(M17群)に、生理食塩水に溶解したメチルアゾキシメタノール(MAM)を、25 mg/kg腹腔内投与した。対照群には、同日に同量の生理食塩水のみを投与した。出生児を生後2日目に1腹10匹程度に間引きし、その後、下記の神経行動学的分析を行った。

(2) 行動学的分析

①反射・感覚系の発達の分析：生後3日もしくは5日齢から12日齢まで毎日、正向反射テストおよび背地走性テストを行い、動物の前庭系の協調運動の異常の有無を観察した。何れも同日に3回のテストを動物間でローテーションして行い、反射が成立するまでの潜時を測定した。

②多動性の分析：離乳日(21日齢)から1週間毎に3回、3分間のオープンフィールドテスト(OF)を行い、移動区画数(活動性)・立ち上がり行動数・排糞数(情動性)を測定した。さらに40日齢以降に、実験的飼育環境事態において、1時間の明期およびそれに続く1時間の暗期での動物のすべての自発的行動を赤外線センサーにより測定・定量化し、一般活動性および視覚的環境変化に伴う活動性の変容を観察することによって、活動性および注意

欠陥の有無を分析した。

③聴覚性驚愕反射を指標としたプレパルス抑制の分析：50日齢以降の若齢期に、SRLab startle systemを用い、40msec、115dBの純音をランダム間隔で100試行提示し、その間、50試行のプレパルス試行を挿入し、プレパルス提示による聴覚性驚愕反射の抑制の程度を定量的に分析して注意欠陥の有無を観察した。

④学習および記憶の分析：成体期に動物を実験箱に5分間放置する馴致試行を2日間行い、翌日、同じ実験箱で、5分間セッション中に3試行の恐怖条件付け(条件刺激：2.8KHzの純音、無条件刺激：0.8mAの電撃)を行い、その1時間後に、動物を再び実験箱に入れ、5分間セッション中の凍結行動の長さを自動測定することによって文脈記憶の程度を分析した。

(3) 脳の組織学的および細胞組織学的分析

所定の行動分析終了後、脳を摘出して脳重を測定した後、①連続脳切片を作成し、髄鞘およびニッスル顆粒の二重染色を施し、海馬および前頭前野の層構築異常の有無を形態学的に観察するとともに、②免疫組織化学的手法を用いて、カルビンジンによる免疫染色を行い、前頭前野第II層の細胞構築および海馬で観察される異所性細胞および海馬内線維である苔状線維の走行について分析した。

4. 研究成果

行動学的には以下の結果が得られた。

(1) 新生児期での反射の分析では、M15群で背地走性の、M17群で正向反射の遅延傾向が観察された(図1および2)。(2) OF事態の活動性の分析では、離乳期でM17群の雄ラットが、また若齢前期ではM15群およびM17群

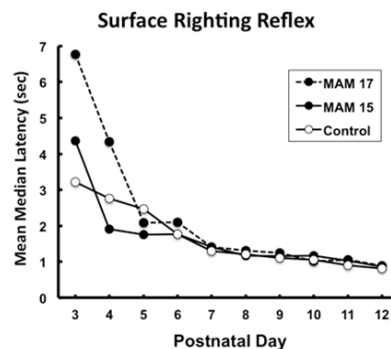


図1. 各群の正向反射の潜時

は雌雄ともに寡動傾向を示した(図3)。(3) 実験的飼育環境事態では、M17群の雄ラットで刺激環境変化に対する行動発現の変容が顕著でなかったが、全体としては群間に顕著な差異は認められなかった。(4) 若齢後期のプレパルス抑制の分析では、M15群は雌雄ともに抑制率は他の2群よりも低く、注意欠陥傾向を示した(図4)。(5) 成体期での文脈

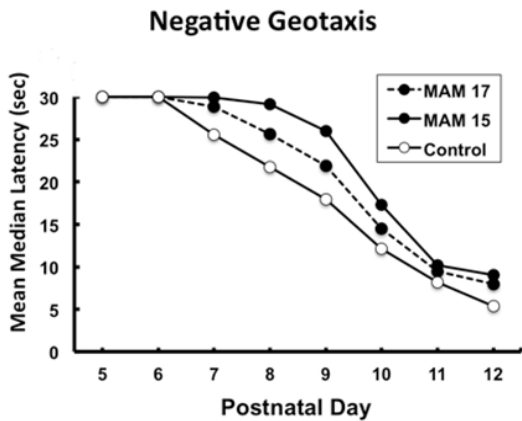


図 2. 各群の正向反射の潜時

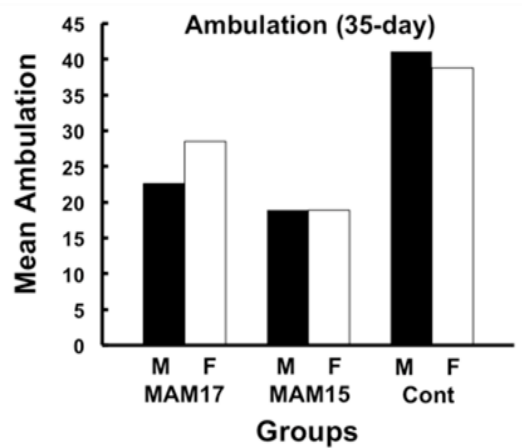


図 3. 35 日齢での各群のオープンフィールド事態での移動区画数 (M: 雄、F: 雌)

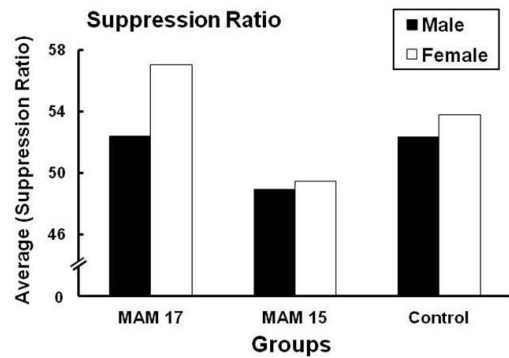


図 4. PPI 事態での各群の抑制率

記憶の分析では、M15 群は雌雄ともに凍結行動の時間は他の 2 群よりも短く、文脈記憶の障害傾向を示した (図 5)。

脳重に関して M15 群では顕著な、M17 群では軽度の脳重の低下を示すとともに、脳の組織学的分析では以下の結果が得られた。(1)M15 群では皮質分子層の表層に異所性の細胞集塊 (図 6) および層構築異常が観察されるとともに、海馬錐体細胞層の断裂および異所性の細胞集塊が観察された (図 7 および 8)。また海馬苔状線維が 2 層性に分布している像が観察された (図 9)。

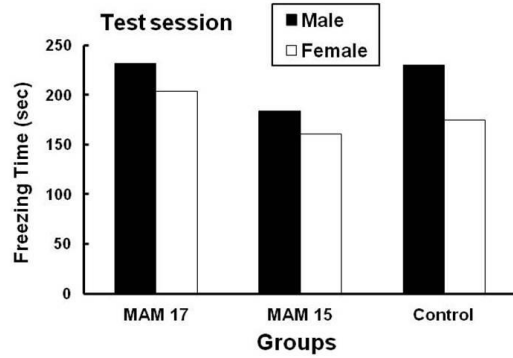


図 5. 恐怖条件付け後の各群の凍結行動の長さ (M: 雄、F: 雌)

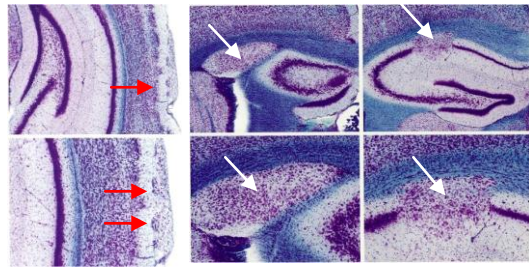


図 6 および 7. M15 群の皮質および海馬

(2) M17 群では皮質第 II 層の発達不全 (図 10)、海馬歯状回の顆粒細胞層内側部に顕著な変性細胞の集塊 (図 11) および M15 群と同様な海馬苔状線維の 2 層性が観察された。

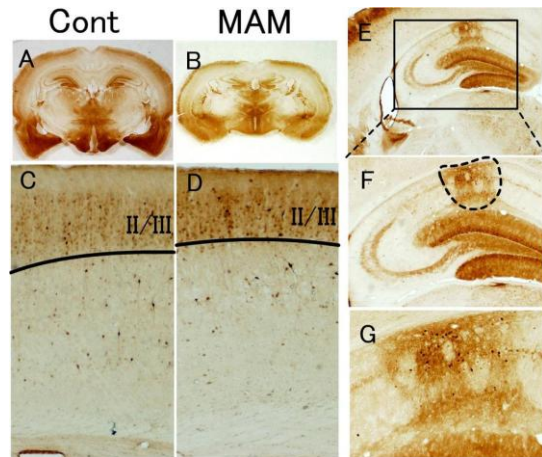


図 8. M15 群の皮質および海馬

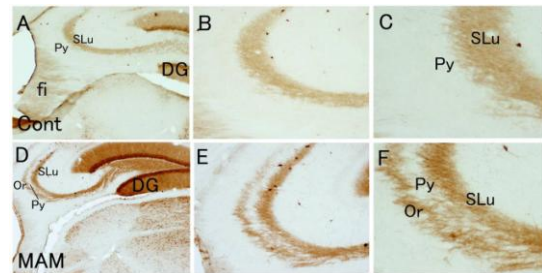


図 9. M15 群の海馬苔状線維の分布

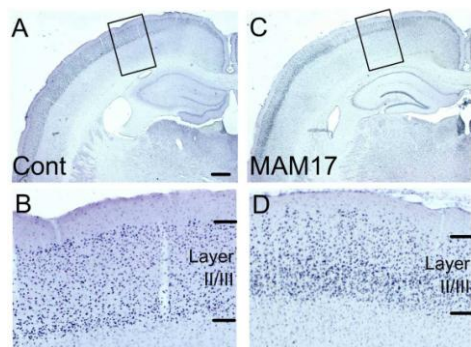


図 10. M17 群の皮質第 II・III 層

以上のことから、本研究の結果は、本研究で作出した ADHD モデル動物が示した行動学的結果のいくつかは ADHD 児で観察される注意欠陥または学習障害と類似すること、新生児期という早期であっても行動学的異常の検出は可能であること、またこれらの行動学的異常が脳の皮質の表層部および海馬の発生学的層構築異常または神経線維連絡の異常と関係している可能性を指摘するものである。特に、過去に報告された多くの神経疾患モデル動物において、新生児期での反射の遅延を検出した研究はない。このようなモデル動物において、できるだけ早期に行動異常を検出することは、その後の早期の療育を可能にする、という意味で非常に重要な所見であると思われる。

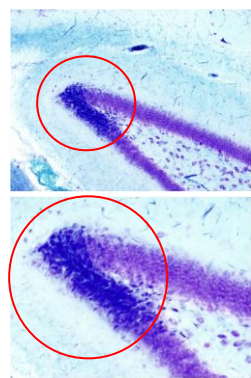


図 11. M17 群の海馬歯状回顆粒細胞層の変性細胞集塊

5. 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 5 件)

- ① Imai, H., Yamamoto, T., Terashima, T., & Sugioka, K., Characterization of heterotopic cell cluster in the hippocampus of the rat after prenatal treatment of methylazoxymethanol acetate (MAM)., *Congenital Anomalies*, 査読有、2012, 52, 87-96
- ② 杉岡幸三・今井英明、受精の瞬間から子育てが始まる一こどもの行動異常とそれをもたらす神経学的基盤に関する実験的研究一、*行動科学*、査読有、2012、50(2)、1-19
- ③ Takase, K., Yamamoto, Y., Yagami, T., Maternal deprivation in the middle of a stress hyporesponsive period decreases hippocampal calcineurin expression and

causes abnormal social and cognitive behaviours in adult male Wistar rats: Relevance to negative symptoms of schizophrenia, *Behav Brain Res*、査読有、2012, 232, 306-315

- ④ 高瀬堅吉、空間学習能力の性差出現に関する海馬を神経支配するコリン作動性ニューロンの機能的性差、*心理学評論*、査読有、2010、53、526-544

[学会発表] (計 6 件)

- ① 杉岡幸三、高瀬堅吉、薛富義、今井英明、胎生期 MAM 投与による脳の発生的形態異常を伴う実験的小頭(脳)症ラットの発達および神経行動学的研究(第 2 報: 刺激先向提示抑制および恐怖条件付け実験)、第 35 回日本神経科学大会、2012、9/18、名古屋国際会議場(名古屋)
- ② 杉岡幸三、胎生期 MAM 投与ラットの聴覚性刺激先向提示抑制および恐怖条件付け後の凍結行動に関する神経行動学的研究、第 52 回日本先天異常学会学術集会、2012、7/8、東京女子医大(東京)
- ③ 杉岡幸三、受精の瞬間から子育てが始まる一こどもの行動異常とそれをもたらす神経学的基盤に関する実験的研究一(教育講演)、日本行動科学学会 2011 年度年次大会、2011、9/14、桜美林大学四谷キャンパス(東京)
- ④ 杉岡幸三、高瀬堅吉、薛富義、胎生期 MAM 投与による脳の発生的形態異常を伴う実験的小頭(脳)症ラットの発達および神経行動学的研究(第 1 報)、第 34 回日本神経科学大会、2011、9/17、パシフィコ横浜(横浜)
- ⑤ 杉岡幸三、胎生期 MAM 投与による実験的小頭(脳)症ラットの反射および活動性に関する神経行動学的研究、第 51 回日本先天異常学会学術集会、2011、7/22、シェーンバッハ・サボー(砂防会館別館)(東京)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉岡 幸三 (SUGIOKA KOZO)
姫路獨協大学・医療保健学部・教授
研究者番号: 90112127

(2) 研究分担者

高瀬 堅吉 (TAKASE KENKICHI)
東邦大学・医学部・助教
研究者番号: 80381474
谷口 泰造 (TANIGUCHI TAIZO)
姫路獨協大学・薬学部・教授
研究者番号: 70346253

(3) 研究連携者

()

研究者番号: