

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：31305

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700433

研究課題名(和文)断続的なレム断眠ストレスに起因した注意欠陥/多動性障害動物モデルの確立と病態解明

研究課題名(英文) Establishment of attention-deficit/hyperactivity disorder animal model by intermittent REM sleep deprivation

研究代表者

八百板 富紀枝 (YAOITA, FUKIE)

東北薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：00382672

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円、(間接経費) 660,000円

研究成果の概要(和文)：現代社会の問題点の1つに睡眠時間の短縮がある。一方、注意欠陥/多動性障害(ADHD)は、不注意、多動および衝動性を主症状とする精神疾患である。そのADHD患者において、レム睡眠および総睡眠時間の短縮が明らかにされている。そこで本研究では、マウスへの断続的レム断眠ストレスの負荷がADHD様症状を発現するかを探り、ADHD病態動物モデルの確立を目的に検討を行った。その結果、断続的レム断眠ストレスを負荷することにより、不注意様、多動様および衝動性様症状が引き起こされることが判明した。更に、不注意様症状の発現ならびに治療薬であるメチルフェニデートの改善作用に、海馬一酸化窒素系が関与することを示唆した。

研究成果の概要(英文)：Attention deficit/hyperactivity disorder (ADHD) is a childhood psychiatric disorder characterized by the presence of symptoms in three domains: inattention, impulsivity, and motor overactivity. On the other hand, there are evidences to suggest children in the ADHD group had shorter duration of REM sleep and total sleep duration than control. We have previously shown that abnormal behaviors elicited by intermittent sleep deprivation (SD) treatment may fulfill a hyperactive feature of ADHD model animals. In this study, we investigated the influences of the SD treatment on the Y-maze test and the elevated plus maze test, indicating an effect on inattentive and impulsive features of ADHD model animals, respectively. We found that both tests were influenced by SD treatment. Moreover, the impaired behaviors were significantly attenuated by methylphenidate, which is used clinically to treat ADHD symptoms. Therefore, the SD mice can be useful model for elucidation of the mechanism of ADHD.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：実験動物学

キーワード：ADHD 衝動性 不注意 高架式十字迷路 Y字迷路

1. 研究開始当初の背景

現代社会における多様な生活形態に起因する問題点の1つに、睡眠時間の短縮が挙げられる。

一方、注意欠陥/多動性障害(ADHD)は、不注意、多動および衝動性を主症状とする精神疾患であるが、興味深いことに、健常者との比較において ADHD 患者は、レム睡眠時間および総睡眠時間が有意に短縮していることが明らかにされている。

これまでに著者は、ヒトの生活様式を考慮して、マウスにレム断眠 20 時間毎に 4 時間の休憩を与えるといった断続的なレム断眠ストレスを負荷し、その影響について検討を行ってきた。その結果、マウス前頭皮質におけるモノアミン作動性神経系の変化が ADHD の病態背景と類似することならびに断続的なレム断眠ストレスを負荷したときに引き起こされる異常行動の一つであるジャンプ行動が、ADHD 治療薬の投与によって改善されることを明らかにした。また、この異常行動が ADHD の病態である多動様症状を反映していることから、病態動物モデルとして有用である可能性を報告してきた。しかし、多動様症状以外の病態、すなわち、不注意様症状および衝動性様症状に対する検討は行っていない。

以上のことを踏まえて本研究では、マウスへの断続的なレム断眠ストレス負荷を基盤とした ADHD 病態動物モデルの妥当性をさらに高めることを目的に、不注意様症状や衝動性様症状の発現メカニズムについて詳細な検討を行った。これらを明らかにすることにより、未だ不明な点の多い ADHD 病態の解明、本疾患の特異的治療法ならびに治療薬の開発に貢献できると考えられる。

2. 研究の目的

不注意様症状および衝動性様症状の評価には Y 字迷路試験および高架式十字迷路試験を用いた。これは、他の ADHD 病態動物モデルの評価に使用されていたものであり、今回は、マウスに断続的なレム断眠ストレスを負荷したとき、これらの症状が発現するか否かについて検討を行った。

また、これらの行動変化に対して、ADHD の治療薬であるメチルフェニデートおよびアトモキセチンが改善効果を示すか否かについても検討を行った。

一方、一酸化窒素(NO)合成酵素(NOS)阻害薬の投与により Y 字迷路試験が障害されると共に、海馬における NO 代謝物(NO_x)濃度が低下していることが報告されている。そこで、マウスに断続的なレム断眠ストレスを負荷したときに Y 字迷路試験の障害が認められたことから、海馬の NO 系に注目し、その発現機序についての検討も行った。

3. 研究の方法

(1) 断続的なレム断眠ストレスの負荷

4 週令の ddY 系雄性マウスを用い、プラットフォーム法にて 20 時間の断眠ストレス負荷毎に 4 時間の休憩を与えて断続的なレム断眠ストレスを負荷した。なお、ストレスを負荷しないものを Normal 群とした。

(2) 不注意症状の評価

他の ADHD 病態動物モデルの評価に使用されている Y 字迷路試験を実施した。迷路内を探索するとき、3 つのアームを認識し注意深く順々に効率良く選択できない場合、交替行動が障害されていると評価され、その障害が不注意様症状の指標とされている。一方この方法は、海馬依存性の短期記憶の評価にも使用されている。なお、迷路内における総アーム侵入回数からマウスの運動量を評価することができる。この行動測定は、断続的なレム断眠ストレス負荷 3 日目の解除から 30 分後に行い、総アーム侵入回数および交替行動数を 8 分間記録し、交替行動の割合を交替行動(%)として算出した。

(3) 衝動性様症状の評価

他の ADHD 病態動物モデルの評価に使用されている高架式十字迷路試験を実施した。この方法では、総アーム侵入回数からマウスの運動量が評価され、また、壁の無い危険と思われるオープンアームに滞在する時間の割合が多いほど、衝動性様症状と評価される。一方、その割合の増減は、不安状態を反映することから、不安関連行動の評価にも使用されている。この測定は、断続的なレム断眠ストレス負荷 3 日目の解除から 30 分後に、迷路内のマウスの行動をビデオカメラで 5 分撮影したのち、行動解析ソフト ANY-maze (室町機械) で解析を行った。

(4) 海馬における一酸化窒素(NO)代謝物(NO_x)濃度の測定

NO の生成量を検討する目的で、NO_x(NO₂⁻および NO₃⁻)を、griess 試薬法と高速液体クロマトグラフィーを組み合わせた酸化窒素分析システム(ENO-20、エイコム)を使用し測定を行った。測定には、断続的なレム断眠ストレス負荷 3 日目の解除から 30 分後に断頭し、摘出した海馬をサンプルとした。

4. 研究成果

(1) 断続的なレム断眠ストレス負荷による衝動性様症状、不注意様症状および多動性様症状の発現

衝動性様症状の発現について探るため、マウスに 3 日間の断続的なレム断眠ストレスを負荷し、高架式十字迷路試験を行った。その結果、Normal 群と比較し、ストレス群では、総アーム侵入回数の有意な増加およびオー

ブンアームにおける滞在時間 (%) の有意な延長が認められた (図 1)。

次に、不注意様症状の発現を探るため、マウスに3日間の断続的レム断眠ストレスを負荷し、Y字迷路試験を行った。その結果、Normal 群と比較し、ストレス群では、総アーム侵入回数の有意な増加および交替行動 (%) の有意な低下が認められた (図 2)。

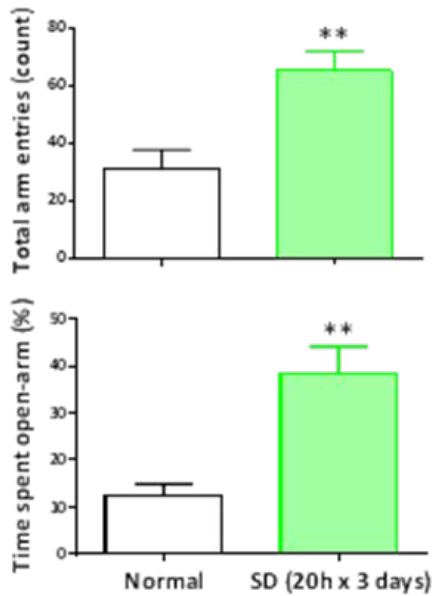


図 1 高架式十字迷路試験における断続的レム断眠ストレス負荷の影響。グラフは、上が総アーム侵入回数および下がオープンアーム滞在時間 (%) を示している。

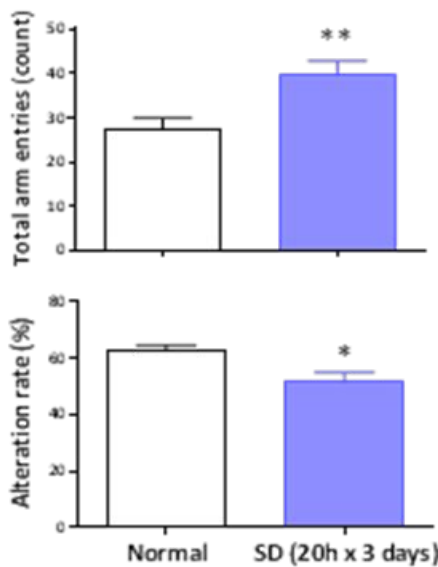


図 2 Y字迷路試験における断続的レム断眠ストレス負荷の影響。グラフは、上が総アーム侵入回数および下が交替行動 (%) を示している。

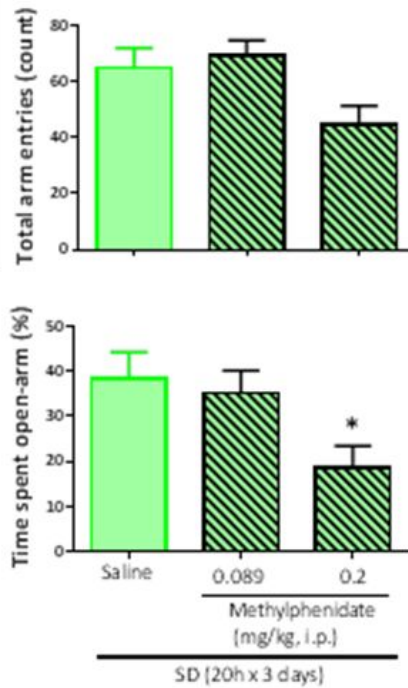


図 3 断続的レム断眠ストレス負荷後の高架式十字迷路試験におけるメチルフェニデートの効果。グラフは、上が総アーム侵入回数および下がオープンアーム滞在時間 (%) を示している。

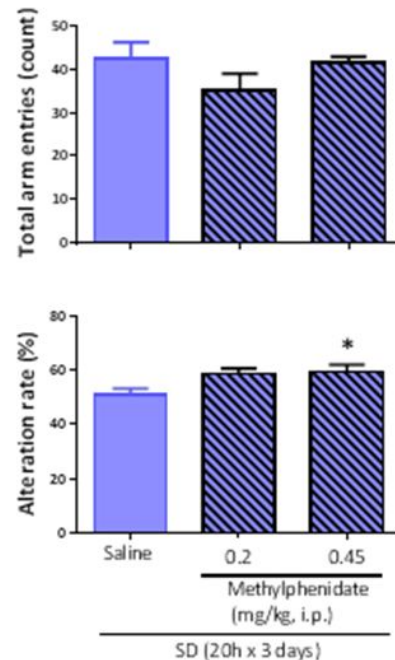


図 4 断続的レム断眠ストレス負荷後の Y字迷路試験におけるメチルフェニデートの効果。グラフは、上が総アーム侵入回数および下が交替行動 (%) を示している。

更に、断続的レム断眠ストレス負荷誘発性の高架式十字迷路内総アーム侵入回数の増

加、オープンアーム滞在時間(%)の延長、Y字迷路内総アーム侵入回数の増加および交替行動(%)の低下に対するADHD治療薬の改善効果について検討を行った。その結果、メチルフェニデートは、オープンアーム滞在時間(%)および交替行動(%)に対して有意な改善効果を示した(図3及び図4)。なお、高架式十字迷路内総アーム侵入回数に対してメチルフェニデートの改善傾向が認められたが、有意ではなかった。また、アトモキセチンの効果について検討を行ったところ、この薬物には改善効果は認められなかった。

従って、断続的レム断眠ストレス負荷により多動様症状、衝動性様症状および不注意様症状が発現することが明らかになると共に、ADHDの表面的妥当性を反映する可能性を示唆する結果を得た。

一方、メチルフェニデートは主にドパミン輸送体およびノルアドレナリン輸送体を阻害し、アトモキセチンはノルアドレナリン輸送体を選択的に阻害する。従って、不注意様および衝動性様の症状発現にはドパミン作動性神経系などの変化が関与し、ノルアドレナリン作動性神経系は関与しない可能性が判明した。

(2) 不注意様症状の発現およびメチルフェニデートの改善効果における海馬NO系の関与

これまでに得られた結果から、マウスに断続的レム断眠ストレスを負荷することにより、Y字迷路試験における交替行動(%)が低下することが明らかとなった。また、マウス海馬におけるNOx濃度の低下は、Y字迷路試験における交替行動(%)の低下に関与することが報告されている。そこで、断続的レム断眠ストレスを負荷したマウスの海馬におけるNOx濃度について検討を行った。その結果、NOx濃度の低下が認められ、その中でも特にNO₂の低下に対するメチルフェニデートの改善効果が認められた。

一方、本研究ではメチルフェニデートの不注意様症状に対する改善効果を明らかにしていることから、この改善効果にはNO産生の促進が関与すると考え、NOS阻害薬を用いた検討を行った。このNOSにはアイソフォームが存在し、恒常的に生体内に存在している神経型(nNOS)、血管内皮型(eNOS)、ならびに誘導型(iNOS)の3種類に分類されている。そこで、それぞれに選択的な阻害薬を用いて、断続的レム断眠ストレス負荷誘発性の不注意様症状に対するメチルフェニデートの改善効果が拮抗されるか否かについて、行動薬理的な検討を行った。その結果、選択的iNOS阻害薬の1400Wおよび選択的eNOS阻害薬のL-N-(5)-(1-iminoethyl)-L-ornithineの投与により、メチルフェニデートの改善効果が拮抗された。一方、選択的nNOS阻害薬のN(omega)-propyl-L-arginineの投与による拮抗は認められなかった。

従って、断続的レム断眠ストレス負荷誘発性不注意様症状の発現には、海馬NOx濃度の低下が関与することならびにメチルフェニデートの不注意様症状に対する改善効果には、iNOSおよびeNOSの活性化が関与することが示唆された。

以上、本研究においては、マウスへの断続的レム断眠ストレス負荷を基盤としたADHD病態動物モデルの妥当性をさらに高めることを目的に、本疾患の主症状である不注意様症状、多動様症状および衝動性様症状の発現メカニズムの解明に焦点をあてて検討を行った。本研究により得られた成果は、さらなるADHD病態の解明や本疾患の新規治療法ならびに治療薬の開発に寄与するものと期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

Fukie Nijjima-Yaoita, Masahiro Tsuchiya, Hiroko Saito, Yuka Nagasawa, Shigeo Murai, Yuichiro Arai, Osamu Nakagawasai, Wataru Nemoto, Takeshi Tadano, Koichi Tan-No, Influence of a long-term powdered diet on the social interaction test and dopaminergic systems in mice, *Neurochemistry International*, 63, 309-315 (2013), 査読あり

Hiroyuki Yoneda, Fukie Nijjima-Yaoita, Masahiro Tsuchiya, Hiroyuki Kumamoto, Makoto Watanabe, Hiroshi Ohtsu, Kazuhiko Yanai, Takeshi Tadano, Keiichi Sasaki, Shunji Sugawara, Yasuo Endo Roles played by histamine in strenuous or prolonged masseter muscle activity in mice, *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 40, 848-855 (2013), 査読あり

[学会発表](計5件)

八百板富紀枝、断続的断眠ストレスによる過敏性腸症候群動物モデルの作製、2014年3月20日、仙台

八百板富紀枝、下道麻夏、荒井香、齊藤貴之、根本互、中川西修、只野武、丹野孝一、断続的断眠ストレス負荷誘発性腸管輸送能亢進状態における2アドレナリン受容体の関与、第64回日本薬理学会北部会、2013年9月13日、旭川
千葉航、土谷昌広、八百板富紀枝、米田博行、渡邊誠、佐々木啓一、坪井明人、服部佳功、粉末食飼育はマウスの糖代謝機構を障害し、行動異常を誘発する、日本老年歯科医学会第24回学術大会、2013

年6月4日、大阪
八百板富紀枝、荒井香、下道麻夏、齊藤貴之、土谷昌広、斉藤弘子、村井繁夫、荒井裕一朗、根本互、中川西修、只野武、丹野孝一、粉末食飼育マウスにおけるSocial interactionの障害について、平成25年度東北薬科大学創薬研究センターシンポジウム、2013年5月25日、仙台
八百板富紀枝、永澤佑佳、齊藤貴之、荒井香、下道麻夏、土谷昌広、根本互、中川西修、荒井裕一朗、只野武、丹野孝一、メチルフェニデートの自発的交替行動障害改善効果における一酸化窒素合成酵素の関与、第86回日本薬理学会年会、2013年3月23日、福岡

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tohoku-pharm.ac.jp/laboratory/yakuri/>

6．研究組織

(1)研究代表者

八百板富紀枝 (YAOITA, FUKIE)

東北薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：00382672