

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：34521

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25380994

研究課題名(和文) 大脳皮質および海馬の発生学的細胞構築異常と小児の行動異常に関する神経行動学的研究

研究課題名(英文) A neurobehavioral study of ADHD/LD model rats with abnormal neurogenesis in cerebral cortex and/or hippocampus induced by prenatal methylazoxymethanol (MAM) treatment.

研究代表者

杉岡 幸三 (SUGIOKA, KOZO)

姫路獨協大学・医療保健学部・客員教授

研究者番号：90112127

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、ラット胎生後期の異なる時期に低用量のメチルアゾキシメタノール(MAM)を投与して作出したADHDおよびLDモデルラットについて、新生児期から成体期に渡り、反射、活動性、注意、学習に関する多面的行動分析を行うとともに、脳の発生学的異常との関係を分析した。ADHDおよびLDモデルラットは、反射遅延、多動性、注意欠陥および学習障害を示したが、その現れ方はMAM投与時期および行動分析課題によって異なるとともに、顕著な雌雄差が観察された。また脳の組織学的分析により、これらの行動異常は、MAM投与時期特異的な海馬、大脳皮質表層部および小脳の発生学的細胞構築異常と深く関連している可能性を示唆した。

研究成果の概要(英文)：We developmentally examined the ADHD/LD model rats induced by prenatal methylazoxymethanol (MAM) injection using multiple behavioral tasks (reflex, activity, attention, learning and memory) and histological analysis of the brain from neonatal to adult periods. Behavioral disorders obtained were partially similar to those of human ADHD/LD, and were task-specific, sex-specific, and stage-specific of MAM injection. Our data suggested that these behavioral disorders were related to neuro-genetic cytoarchitectural abnormalities of neocortex, hippocampus and/or cerebellum.

研究分野：発達神経行動科学

 キーワード：注意欠陥多動性障害 学習障害 メチルアゾキシメタノール 多面的行動分析 大脳皮質 海馬 小脳
 神経発生学的形態異常

1. 研究開始当初の背景

注意欠陥多動性障害 (ADHD) や学習障害 (LD) 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、これらの行動異常の発症は脳のドパミン系の異常と関連付けられていたが、最近では、そのような単一的原因ではなく、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。様々な脳部位がこれらの行動異常の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大脳皮質 (特に前頭前野) および海馬である。これらの脳部位はこれらの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、過去の研究ではこれらの児に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 (網羅的) 行動分析が行われていなかった。また、大脳皮質や海馬の組織学的・形態学的また細胞組織化学的分析も詳細に行われていなかった。本研究は、これらの点に着目して、ADHD および LD 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、大脳皮質や海馬、さらには小脳の発生学的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、学習および記憶、注意また活動性などの機能に深く関与する海馬および大脳皮質の機能不全に焦点を絞り、ラットを材料として、胎生後期の異なる時期に、発生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、海馬もしくは大脳皮質の発生学的形態異常を有する ADHD および LD 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発達時期に、反射・活動性・注意・学習および記憶に関する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海馬および大脳皮質の発生学的形態異常との関係性を探ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 胎生期 MAM 投与による ADHD および LD モデル動物の作成

Jcl:Wistarラットの妊娠15日 (M15群)、17日 (M17群) もしくは19日齢 (M19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 20 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 (雌雄それぞれ5匹) 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

反射・感覚系の発達の分析: 生後2日齢から6日齢まで正向反射テストを、7日齢から12日齢まで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。

多動性の分析: 離乳日 (21日齢) に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・排糞数および排尿の有無 (情動性) を測定した。さらに若齢期以降に、実験的飼育環境事態において、30分間の馴致後の30分間の明期およびそれに続く30分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り、多動性および注意欠陥の有無を分析した。

聴覚性驚愕反射を指標としたプレパルス抑制 (PPI) の分析: 成体期に、SRLab Startle Systemを用い、40msec、115dBの音刺激をランダム間隔で100試行提示することによって聴覚性驚愕反射の大きさを定量的に測定するとともに、その間、50試行のプレパルス試行を挿入することによって、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。

学習および記憶の分析: 成体期に、凍結行動自動測定システムを用い、動物を実験箱に5分間放置する馴致試行を行い、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 (CS) は 20秒・2.8KHzの純音、無条件刺激 (UCS) は 2秒・0.8mAの電撃、刺激間隔 (ITI) は 18秒) を行い、24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30秒毎に自動測定することによって恐怖文脈記憶の程度を分析した。さらに同じ成体期に、シャトル箱回避学習事態で (2.8 KHzの純音をCS、180Vacもしくは160VacをUCS、ISIは10秒)、回避反応に随伴してCSが停止する標準条件およびCS停止が回避反応に随伴しない延滞条件 (5秒間のCS延滞) の2条件下での学習成績がどのように異なるかについて分析した。

(3) 脳の組織学的および免疫組織化学的分析

所定の行動分析終了後、脳を摘出して脳重を測定した後、セロイジン包埋した脳の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、海馬および大脳新皮質に焦点を絞って、これらの脳部位の細胞および層構築異常の有無を形態学的に観察するとともに、免疫組織化学的手法を用いて、カルピンジンによる免疫染色を行い、皮質 (特に第 1 層) の細胞および層構築異常、また海馬錐体細胞層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検索した。

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、M17 群で雌雄とも顕著な正向反射の遅延(長い潜時)が観察された(図1)。(2)21日齢に行ったOF事

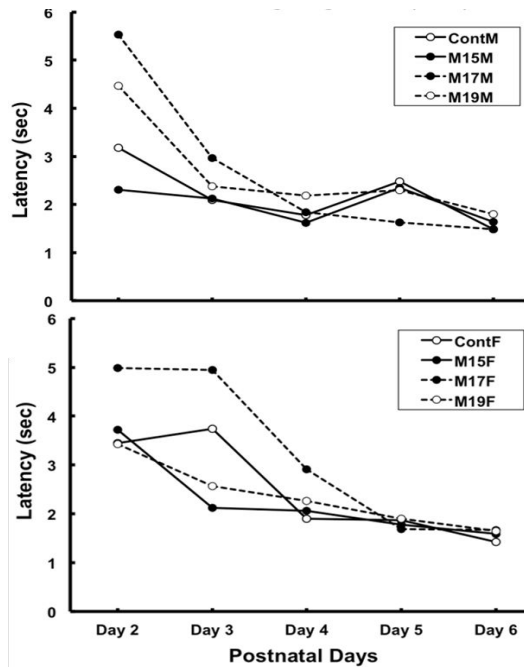


図1 各群の正向反射潜時(上:雄、下:雌)

態での活動性の分析では、雌雄とも、群間に顕著な差異は観察されなかった。(3)実験的飼育環境事態では、各群ともに雌ラットの自発運動量が顕著に高かった。M19 群の雄ラットに寡動傾向が観察されるとともに、M17 および M19 群の雄ラットで環境刺激変化(明から暗)に対する行動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)成体期の PPI の分析では、M17

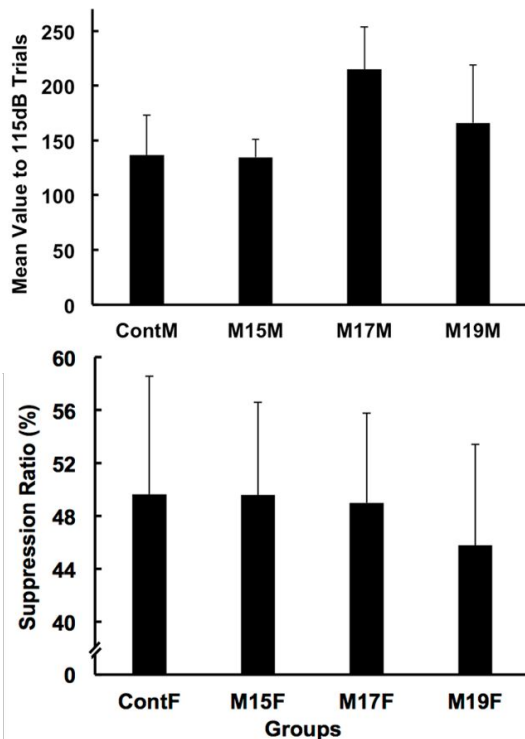


図2 PPI 事態(上:驚愕反応量、下:抑制率)

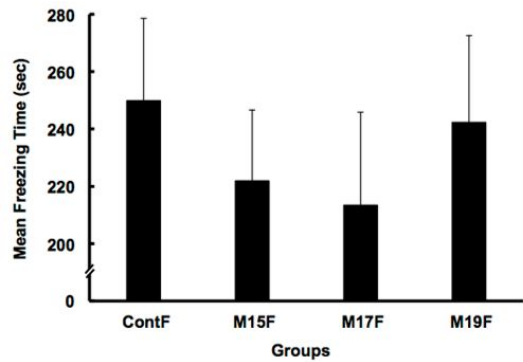


図3 恐怖条件付け後の各群の凍結行動持続時間(雌ラット)(恐怖文脈記憶実験)

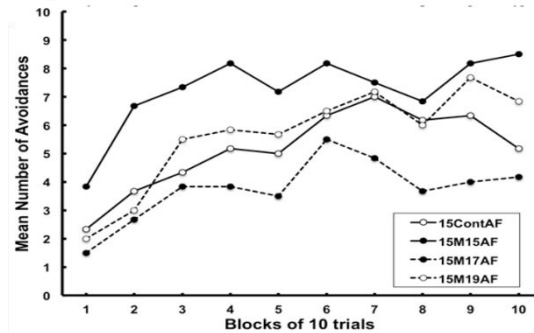
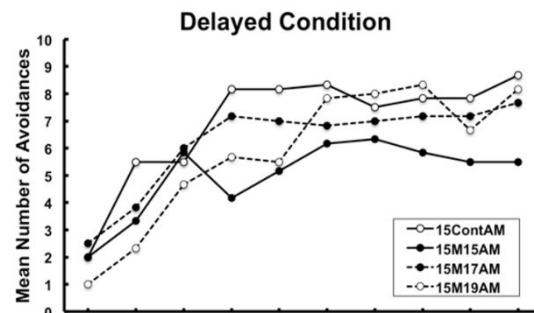
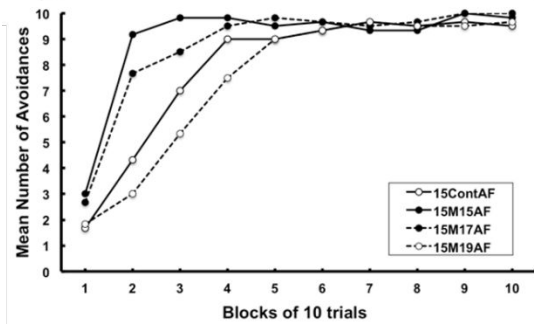
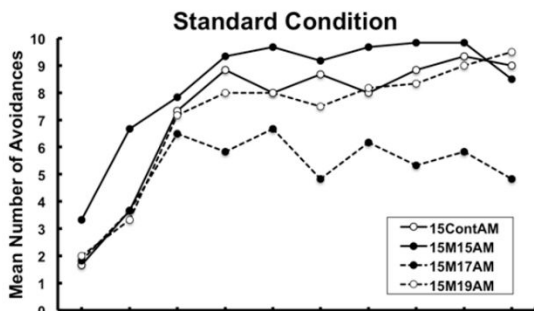


図4・5 各群の回避反応数(上:標準条件、下:延滞条件、何れも上が雄、下が雌)

群の雄の驚愕反応量は顕著に高いこと、また M19 群の雌の抑制率は他の群よりも低く、注意欠陥傾向を示した(図 2)。(5)成体期での文脈記憶の分析では M17 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 3)。(6)シャトル回避学習事象での分析では、標準条件では M15 群は雌雄とも高い反応率を示したのに対し、M17 群の雄および M19 群の雌の回避反応は障害された。一方、延滞条件では、M15 群の雌は高い反応率を示したのに対し、M15 群の雄および M17 群の雌の回避反応は障害された(図 4 および 5)。

脳重に関して M15 群では顕著な、M17 および M19 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および海馬錐体細胞層の層構築異常および異所性の細胞集塊が観察された(図 6)。(2) M17 群では皮質第 1 層の発達不全および海馬錐体細胞層の細胞の散在性が観察された(図 7)。皮質第 1 層の発達不全はカルピンジン抗体免疫染色によ

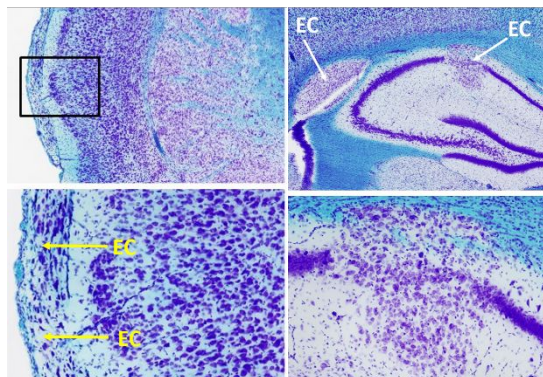


図 6 M15 群の組織学的所見

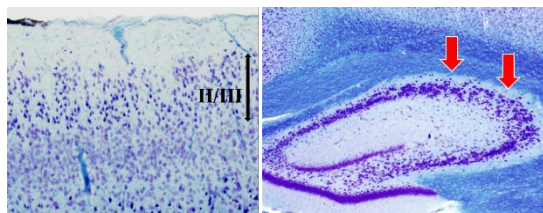


図 7 M17 群の組織学的所見

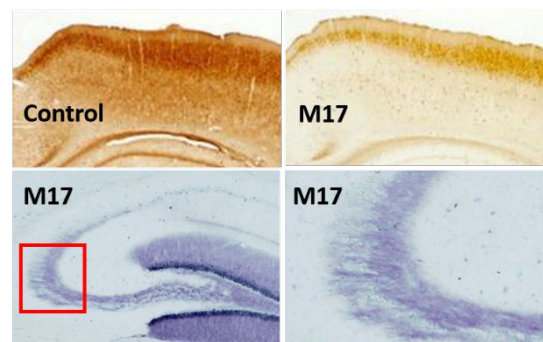


図 8 カルピンジン抗体免疫染色による M17 群の組織学的所見

っても同様に観察され、また海馬 CA3 での苔状線維の 2 層性が観察された(図 8)。(3)M19

群では大脳皮質や海馬の発生学的形態異常はまったく観察されなかったが、小脳前葉の顆粒細胞層が渦巻き状を呈し、葉形成が完全に破壊されていた(図 9)。

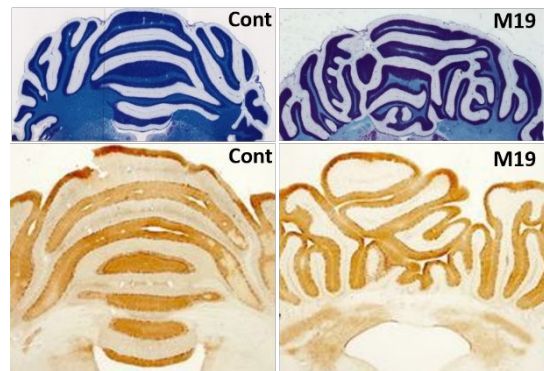


図 9 M19 群の組織学的所見

本研究の結果から、ラット胎生後期の異なる時期に MAM を投与することによって作出した ADHD および LD モデルラットが示した行動学的結果のいくつかは、これらの児で観察される神経学的発達遅延(反射の遅延)、注意欠陥また学習および記憶障害と類似していることを示唆するとともに、これらの行動学的異常が脳の大脳皮質第 1 層の発育不全、また海馬錐体細胞層の発生学的層構築異常および異所性の細胞集塊また小脳前葉の発生学的層構築異常と関係している可能性を指摘するものである。また本研究の結果は、種々の行動異常の現れ方が雌雄特異的、また発達時期特異的さらに与えられる課題特異的に現れる可能性を示唆するものである。これらのことは、小児の行動異常や神経学的異常を検出するためには、雌雄別に、新生児期から生体期にわたる様々な発達段階で、網羅的・多面的行動分析を行う必要性を指摘するものである。

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 3 件)

杉岡幸三、動物実験心理学に対する提言 - 発生学的神経行動科学からの視点 -、行動科学、査読有、2016、54、印刷中
Takase, K., Tsuneoka, Y., Oda, S., Kuroda, M., Funato, H., High-fat diet feeding alters olfactory-, social-, and reward-related behaviors of mice independent of obesity, Obesity (Silver Spring, Md.), 査読有、2016、印刷中

高瀬堅吉・小田哲子・黒田優・船戸弘正、遺伝子改変マウス行動表現型解析の現状とその課題 - MCH/ MHC1R1 ノックアウトマウス行動表現型解析を例として -、行動科学、査読有、2013、51、143-154

[学会発表](計 9 件)

杉岡幸三、胎生期(G15、G17、G19)メチル

アゾキシメタノール(MAM)投与による脳の発生学的形態異常を伴うラットの発達のおよび神経行動学的研究、第39回日本神経科学大会、2016、7/20、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

杉岡幸三、動物実験心理学に対する提言、日本行動科学学会第32回ウィンターカンファレンス(招待講演)、2016、3/13、妙高香風館(新潟県・妙高市)

高瀬堅吉、医学と心理学の学際先端領域におけるキャリア形成の枠組み、日本心理学会第79回大会(招待講演)、2015、9/24、名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)

高瀬堅吉、社会行動障害への多角的アプローチ - 動物からヒト・基礎から臨床 -、日本心理学会第79回大会(招待講演)、2015、9/22、名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)

杉岡幸三、新生児は本当に「Blank Slate」なのだろうか? - 神経行動奇形学から見る小児の行動異常 -、第135回海馬研究会、2015、3/14、同志社大学(京都府・京都市)

杉岡幸三、脳の発生学的形態異常を有するラットの神経行動学的研究、シンポジウム「人間の生涯発達の理解を目指す生理心理学的研究」、日本心理学会第78回大会、2014、9/10、同志社大学(京都府・京都市)

高瀬堅吉、発達障害の理解に向けて 基礎研究の役割とその有用性を考える、日本心理学会第78回大会、2014、9/10、同志社大学(京都府・京都市)

杉岡幸三・高瀬堅吉・薛富義、胎生期MAM投与によるADHDおよび統合失調症モデルラットの新生児期での反射感覚系および離乳後期での活動性の分析、2013、6/21、第36回日本神経科学大会、京都国際会館(京都府・京都市)

Takase, K., Kikuchi, K., Oda, S., Kuroda, M., Funato, H., Statistical inference of neural circuits responsible for behavioral parameters of mice、2013、6/21、第36回日本神経科学大会、京都国際会館(京都府・京都市)

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・客員教授
研究者番号：90112127

(2) 研究分担者

高瀬 堅吉 (TAKASE KENKICHI)
自治医科大学・医学部・教授
研究者番号：80381474