

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：23903
 研究種目：基盤研究(C) (一般)
 研究期間：2014～2016
 課題番号：26430020
 研究課題名(和文) 注意欠陥多動性障害モデルにおける発育期の豊かな環境による情動行動形成機構の解明

研究課題名(英文) Mechanism of emotional formation by enriched environment in early life of ADHD model animal

研究代表者
 飛田 秀樹 (HIDA, HIDEKI)
 名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：00305525

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：注意欠陥多動性障害モデルラットを用い、発育期のうま味(グルタミン酸Na：MSG)経口摂取による情動行動の変化を検討した。発育期のMSG摂取により攻撃性が減少した。その要因として、血圧変化、脳組織障害性、腸脳連関について解析を進め、以下の結果を得た。1) MSG摂取による血圧変化は認められない、2) Argyrophil III染色の神経障害変化は認められない、3) 脳血液関門モデル培養系でMSGによる細胞障害性は確認されない、4) 横隔膜下迷走神経遮断により攻撃性が減少した。以上の結果から、上部消化管うま味受容体からの迷走神経を介した脳への刺激入力によって攻撃性が変化することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Using spontaneously hypertensive rat, the change of emotional behavior by monosodium glutamate (MSG) intake during the period of development was investigated. MSG ingestion resulted in a significant reduction in aggressive behavior. To know the mechanism in less aggression, several experiments were performed as follows. Blood pressure was comparable to the controls. Argyrophil III staining to detect neuronal damage revealed no evidence of injury in the aggression-related brain areas. Assessment of plasma amino acids revealed a transient increase of the ingestion after fasting. However, lactate dehydrogenase assay in blood–brain barrier in vitro model showed that cell toxicity was not induced by indirect MSG application even at 700 microM. The vagotomy at sub-diaphragm level indicated that aggressive behavior is mediated by vagus nerve. Data suggest that MSG ingestion during the period of development could reduce aggressive behavior, mediated by gut-brain interaction.

研究分野：脳神経生理学

キーワード：情動 発育期 うま味 グルタミン酸ナトリウム 腸脳連関 脳血液関門培養モデル 胃迷走神経

1. 研究開始当初の背景

豊かな環境飼育(EE)は、階段、トンネル、輪車等の運動遊具を含む広いケージの中で、運動遊具の配置および餌や水の配置の変換、6-8匹の動物個体数にて飼育する環境と定義されている。EEによる脳への作用として、1)シナプス可塑性と空間認知機能の亢進、2)脳障害後の運動機能改善、などが報告されている。特に、ハンチントン病の遺伝発症型モデル動物(遺伝要因)においてEE飼育した動物(環境要因)では、発症の遅延と進行の抑制が報告された。(Eur J Neurosci 26, 101-12, 2007)。

個体レベルの外部環境の変化が、如何に遺伝子/分子レベルで変化を与え、また障害された機能への影響、さらに行動発現に影響をもたらすのか、は大きな研究者の関心となっている。

一方、注意欠陥/多動性障害(ADHD)は学童の5-10%にみられ、男児に多い発達障害である。脳内ドパミン(DA)神経系の異常が病因として上げられ遺伝要因が大きく関与している(Hum Genet 126, 51-90, 2009)。しかし、劣悪環境や周産期障害等の環境要因の関与も知られている。ADHDモデル動物として、発育期に多動性と衝動性の行動学的特徴を示す自然発症型高血圧ラット(SHR)が世界的に用いられている。

発育期の外部環境(環境要因)が脳の発育と情動形成に与える影響を科学的に詳細に解析することが重要であり、我々は“発育期の外部刺激の多い飼育(EE)がどのように情動行動の形成に影響を与えるのか?”を、SHRを用い行動および脳内分子の両側面から解析を進めてきた。

これまでに、発育期(P25~P60)のEEにより、雄SHRにおいて多動性の減少と社会性の亢進が認められ、内側前頭野(PFC)および扁桃体(AMY)におけるDA関連遺伝子の増加を認めている。すなわち、1)オープンフィールドにおける不安誘発時の移動距離の減少、2)新奇動物に対する攻撃行動の減少、3)PFCおよびAMYにおけるcocaine-and amphetamine-regulated transcript (CART)遺伝子発現の増加、等を確認している。

2. 研究の目的

当初、EEにより脳内(PFC, AMY)で発現増加するCARTに注目し、発育期のいつの時期(臨界期)から、EEの各刺激要素のどの要因によって、脳内のどの神経ネットワークをどのようなメカニズム(発現制御)により変化させ、情動行動(多動性、社会性)の発現形成に関連しているのかを明らかにすることを目指した。

しかし、EEが様々な要素を含み上記実験目的の解明には複雑であるため、当初の予

定を一部変更し、以下のテーマについて取り組んだ。すなわち、より単一の外部環境刺激として味覚基本味のひとつ“うま味”を発育期に経口摂取させる実験系を用い、以下の実験を実施した。

1、発育期の外部環境刺激としてうま味(グルタミン酸ナトリウム:MSG)を経口投与させ、情動行動(不安様行動、攻撃行動)への影響を検討した。

2、MSG経口摂取による情動行動の変化の臨界期を明らかにする。

3、MSG経口摂取による攻撃性低下のメカニズムを解明する。

3. 研究の方法

(1) 動物実験

25日齢オスの自然発症型高血圧ラット(SHR/Hos:45-50g)は星野試験動物飼育所(茨城県坂東市)から購入し、社会性試験に用いた8週齢Wistar ST(280-300g)は日本SLC(静岡県浜松市)から購入した。動物の飼育は、12時間毎の明暗サイクル(明期:8-20、暗期:20-8)、 23 ± 2 の室温下、餌(MF1:オリエンタル酵母、東京)および水を自由に摂取可能な条件下で行った。すべての動物実験は名古屋市立大学動物実験委員会の承認を得て、動物実験規程及び指針を遵守して実施した。

(2) 飼育条件

離乳直後の生後25日齢のオスSHRを、生後60日齢までの発育期の5週間、一匹で飼育した。餌および滅菌水、60mM MSG水溶液または60mM塩化ナトリウム(NaCl)水溶液を経口から自由摂取させ、火曜日と金曜日の1週間に2回交換、また床敷を金曜日に交換した。体重、飲水量、摂食量は、週3回(火曜日、金曜日、日曜日)に測定した。生後8週齢に達した成熟後に、以下の情動行動実験を行った(図1)。

(3) 行動評価

オープンフィールド試験(0-test)およびソーシャル試験(S-test)を午後3時から午後7時の間に実施した。S-testでは新奇動物として8週齢のWistarラットを用いた。

オープンフィールド試験(0-test)

円形空間のオープンフィールド(直径60x高さ50cm)の中心部にラットを置き、新奇環境下での不安様行動を10分間観察した。真上に設置したビデオカメラに行動を

記録し、行動解析ソフト(Smart ver2.0)により解析した。10 分間の総移動距離(cm)を多動性の指標とした。また、直径 30 cm の中心領域への侵入回数を不安様行動の指標とした。

ソーシャル試験(S-test)

黒色の試験箱(横 20 x 縦 60 x 高さ 50 cm)の中に動物を 1 匹の状態に 5 分間入れ、テスト環境に 3 日間順応させた。SHR および頸部に着色した新奇 Wistar ラットを試験箱の両端に同時に入れ、5 分間の行動を箱の真上に設置したビデオカメラに記録した。観察対象の SHR が新奇動物の匂いを嗅ぐ行動(sniffing)の時間、新奇動物の上に乗る(riding)回数、新奇動物の上に乗って攻撃する行動(aggression)回数をビデオから計測し、社会性行動の指標とした。

(4) 血圧測定

P40 および P64 の動物を特性ラットネットに入れラットポケットを用いて保温し、数分後の安定化したのち非観血血圧測定法(softron 社: BP-98A-L)により尾動脈から平均血圧を測定した。

(5) 遊離アミノ酸測定

MSG(0 mM, 60 mM, 180 mM)水溶液および餌を自由摂食させた成熟動物、16 時間絶食後に 180 mM MSG水溶液を摂食させた成熟動物から、深麻酔下に経心的に血液を採取し、遠心により血清を得た。血清中の遊離アミノ酸測定は、クロロギ酸プロピルによりプレカラム誘導体化した後、高速液体クロマトグラフ-質量分析装置により、日本動物特殊診断(株)に委託し定量した。

(6) Argyophil III 染色

Argyophil III 染色は、細胞障害後の好銀性の亢進を検出し、神経細胞障害を超早期に感度良く検出できる方法である。絶食後の MSG 摂取の 3 時間後に経心的に灌流固定し、これまでの報告と同様に染色を実施した(Misumi et al, Cell Transplantation 25(7), 2016)。

(7) 脳血液関門(BBB)培養系モデル

ファルマコセル(株)から BBB 培養モデルを購入し、プロトコールに従って細胞培養し、血管内皮細胞、アストロサイト、神経細胞からなる BBB 培養系モデルを確立した。電気抵抗値が 150 Ω cm² 以上のウェルを用いて行った。MSG 水溶液の自由摂食時および絶食後 MSG 水溶液摂食時に相当する血清中遊離 Glu 測定に相当する 100 μ M および

700 μ M の濃度を用いた。Glu のインサートウェル内投与による神経細胞の細胞死は、LDH 細胞死アッセイ法を用いて実施した。

(8) 迷走神経神経切断

あらかじめ 24 時間前から絶食とした生後 25 日齢の SHR を用い、横隔膜下で両側の迷走神経を切除した(Uematsu et al, Eur J. Neurosci. 31, 1136-43, 2010)。術後は 1 週間に 2 回、体重変化、飲水量および餌摂取量を測定し、成熟後に情動行動を観察した。

4. 研究成果

(1) 発育期うま味摂取による行動変化 オープンフィールド試験

多動性の指標である総移動距離、不安様行動の指標である中央部分への進入回数を調べた。

発育期の MSG 経口摂取により、大きな変化は認められなかった。(図 2)

ソーシャル試験

試験箱に 3 日間馴化したのち、新奇 Wistar ラットに対面させ、匂い嗅ぎ行動(sniffing)、上乗り行動などの攻撃性行動を評価した。

発育期に 60 mM MSG 溶液を経口摂取した場合に sniffing 時間が短縮した。1 分以降の時間の短縮が著しかった。(データ省略) また、riding および biting などの攻撃性行動が著しく低下することが明らかになった。(図 3)

(2) 血圧変化

発育期の MSG 経口摂取による攻撃性減少のメカニズムについて、血圧の関与について調べた。

離乳後の 5 週間投与中の P40、および成熟後の P63 において、水投与群、MSG (60mM) 投与群、NaCl (60mM) 投与群の間に血圧変化は認められなかった。(図 4)

(3) 血中遊離アミノ酸測定

MSG 摂取による血中グルタミン酸の変動を、血中遊離アミノ酸測定から検討した。

餌摂取が自由に可能な通常飼育時には、血中アミノ酸の変動は認められず、遊離グルタミン酸濃度は 80 μ M 程度である。

一方、絶食後の 180 mM MSG 水溶液摂取 30 分後には、一時的に血中遊離アミノ酸が変動し、遊離グルタミン酸は 700 μ M 程度に上昇していた。(図 5)

(4) Argyophil III 染色

絶食後の MSG 摂取による一過性血中グルタミン酸上昇による脳組織ダメージの有無

を検討するため、神経細胞障害の最初期変化を検出することが可能な Argypophil III 染色を実施した。

攻撃性に関する脳部位、内側前頭野、扁桃体内側核、扁桃体中心核、視床下部背内側核、中脳水道灰白質、その他部位の室傍核、延髄弧束核など、脳内に明らかな好銀性を示す Argypophil III 陽性細胞は検出されなかった。(図6)

(5) BBB 培養系モデル

一過性グルタミン酸上昇による神経細胞への障害の可能性を invitro で検討するため、BBB 培養モデル系を用いた。

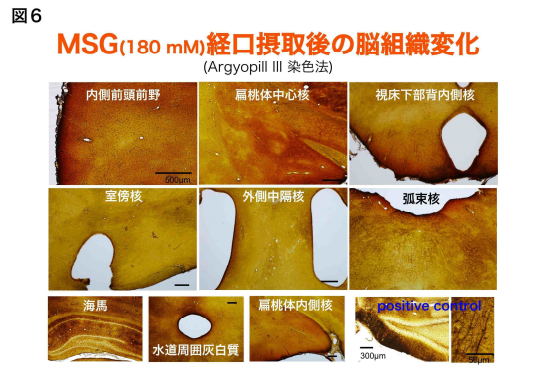
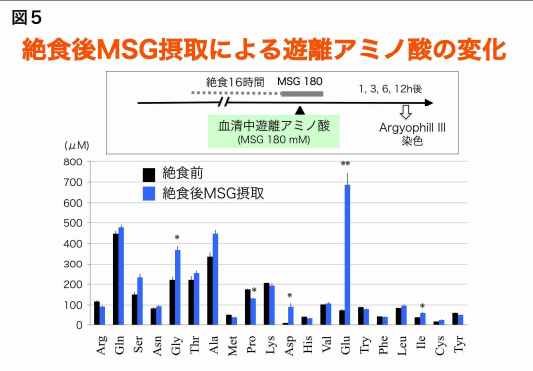
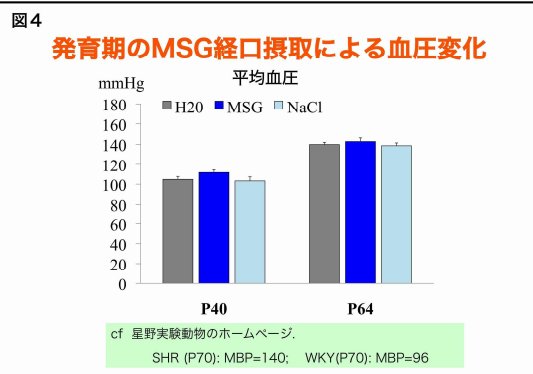
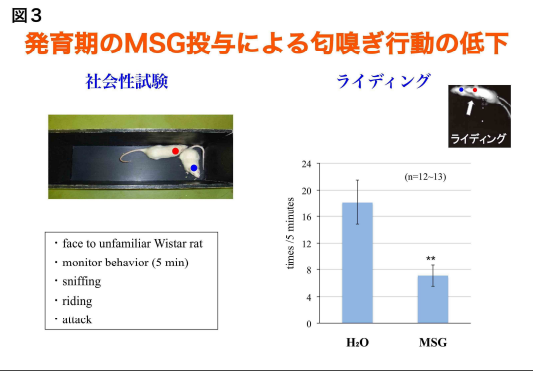
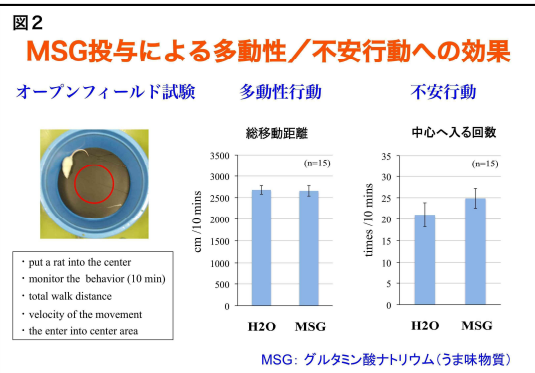
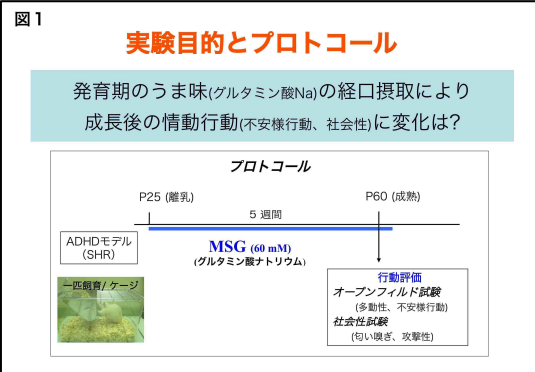
MSG100 μM および MSG700 μM を培養ニューロンへ投与すると細胞死が認められるのに対し、BBB 培養系モデルでは細胞障害は認められなかった。(図7)

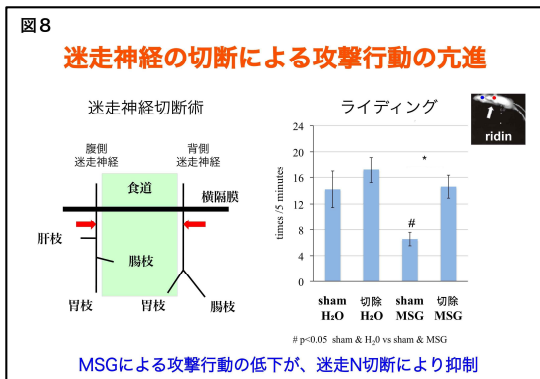
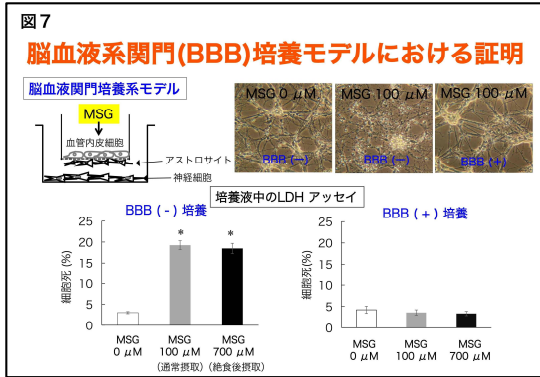
すなわち、血中グルタミン酸が一過性に 700 μM 程度上昇しても、脳内の神経細胞への細胞障害を与えないことが確認された。

(6) 横隔膜下迷走神経切断(TVx)

上部消化管のうま味受容体の存在が報告されている。上部消化管受容体から迷走神経を介した脳へ刺激入力による情動行動の変化の可能性を、横隔膜下迷走神経切断術を用いて検討した。

生後25日に迷走神経を切断し、5週間MSGを摂取させたのち情動行動を評価した。その結果、MSGによる攻撃性減少の作用はTVxにより消失した。(図8)





5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

- Ueda, Y, Masuda T, Ishida A, Misumi S, Shimizu, Y, Jung C-G, Hida H.
Enhanced electrical responsiveness in the cerebral cortex with oral melatonin administration after a small hemorrhage near the internal capsule in rats
J Neurosci Res, 92(11): 1499-508, 2014. doi:10.1002/jnr.23434 査読あり
- Nagaya Y, Aoyama M, Tamura T, Kakita H, Kato S, Hida H, Saito S, Asai K.
Inflammatory cytokine tumor necrosis factor (TNF) suppresses neuroprotective erythropoietin (EPO) expression in astrocytes
Eur J Neurosci, 40(11): 3020-6, 2014 doi:10.1111/ejn.12747 査読あり
- Ishida A, Misumi S, Ueda Y, Shimizu S, Jung C-G, Tamakoshi K, Ishida I, Hida H.
Early constraint-induced movement therapy promotes functional recovery and neuronal plasticity in a subcortical hemorrhage model

rat

- Behav Brain Res** 284: 158-66, 2015 doi:10.1016/j.bbr.2015.02.022. 査読あり
- Ishida A, Isa K, Umeda T, Kobayashi K, Kobayashi K, Hida H, Isa T.
Causal link between the cortico-rubral pathway and functional recovery through forced impaired limb use in rats with stroke
J Neurosci, 36(2): 455-467, 2016 doi:10.1523/JNEUROSCI.2399-15.2016 査読あり
- Misumi S, Ueda Y, Nishigaki R, Suzuki M, Ishida A, Jung CG, Hida H.
Dysfunction in motor coordination in neonatal white matter injury model without apparent neuron loss: a rat model for cell-based therapy using oligodendrocyte progenitors
Cell Transplantation, 25(7) 1381-93, 2016 doi:10.3727/096368915X68989 査読あり
- Hida H.
The importance of vagus nerve afferent in the formation of emotions in attention-deficit hyperactivity disorder model rat
Brain Nerve 66(6), 633-9, 2016 (Japanese) doi:10.11477/mf.1416200454 査読なし 査読あり

〔学会発表〕(計 12 件)

- Hidei Hida, Yoshihio Yokoyama, Yuko Shimizu, Yoshitomo Ueda, Sachiyo Msum, Akimasa Ishida, Cha-Gyun Jung.
Altered social behavior by monosodium glutamate is mediated by vagus nerve afferent in attention-deficit/hyperactivity disorder model rat.
日本神経科学会 2014 年 09 月 11~13 日、パシフィコ横浜、横浜市
Yoshihiro Yokoyama, Ryosuke Marumoto, Yuko Shimizu, Yoshitomo Ueda, Sachiyo Misumi, Akimasa Ishida, Cha-Gyun Jung Hideki Hida.
Oral intake of monosodium glutamate during the period of development effects on social behavior mediated by gut-brain communication in ADHD model rat.
北米神経科学会 2014 2014 年 11 月 15 ~19 日、ワシントン DC、米国
Yuko Shimizu, Yoshihiro Yokoyama, Sachiyo Msumi, Akimasa Ishida, Cha-Gyun Jung, Hideki Hida.
Cocain- and amphetamine-regulated transcript in the central nucleus of amygdala is enhanced by environmental

enrichment in ADHD model rat.
北米神経科学会 2014 2014年11月15
～19日、ワシントンDC、米国
Sachiyo Misumi, Ryosuke Marumoto,
Yoshihiro Yokoyama, Yuko Shimizu,
Hideki Hida.
Early life is critical for the effect of MSG
on social behavior.
日本生理学会 2015年3月21～23日、
神戸コンベンションセンター、神戸市
Hideki Hida, Yoshitomo Yokoyama,
Sachiyo Misumi.
Oral intake of umami during the period of
development changed emotional behavior
in attention-deficit/hyperactivity disorder
model rat: enhanced social behavior by
gut-brain communication (シンポジウ
ム)
日本薬理学会 2015年3月18～22日、
名古屋国際会議場、名古屋市
Hideki Hida, Sachiyo Misumi, Ryosuke
Marumoto, Yoshihiro Yokoyama, Yuko
Shimizu, Akimasa Ishida, Cha-Gyun
Jung.
Early period of development is critical
period for the effect of MSG on social
behavior in an ADHD model rat.
日本神経科学会 2015年7月28～30日、
神戸国際会議場、神戸市
Sachiyo Misumi, Ryosuke Marumoto,
Yoshihiro Yokoyama, Yuko Shimizu,
Ruriko Nishigaki, Haruka Nagai, Hideki
Hida.
Early period of development is critical for
the effect of monosodium glutamate on
decreased aggression behavior in ADHD
model rat.
北米神経科学会 2015 2015年10月17
～21日、シカゴ市、米国
Yuko Shimizu, Yoshihiro Yokoyama,
Sachiyo Misumi, Akimasa Ishida,
Cha-Gyun Jung, Hideki Hida.
Cocaine- and amphetamine regulated
transcript in critical nucleus of amygdala
regulates anxiety-like behavior in
attention deficit/hyperactivity disorder
model rat
日本生理学会 2016年3月22～24日、
札幌国際会議場、札幌市
Haruka Nagai, Ruriko Nishigaki, Yuko
Shimizu, Ryosuke Marumoto, Sachiyo
Misumi, Hideki Hida.
No relationship between decreased
aggressive behavior by monosodium
L-glutamate and osmotic pressure
regulatory pathways in spontaneously
hypertensive rats.
日本生理学会 2016年3月22～24日、
札幌国際会議場、札幌市
Hideki Hida, Yoshihiro Yokoyama,

Ruriko Nishigaki, Haruka Nagai, Sachiyo
Misumi.
The monosodium glutamate to growing
ADHD model rat decreased the
aggressiveness mediated by vagus nerve
(シンポジウム)
ISORT 2016 2016年6月5～8日、パシ
フィコ横浜、横浜市
Hideki Hida, Yoshihiro Yokoyama,
Ryosuke Marumoto, Sachiyo Misumi,
Ruriko Nishigaki, Haruka Nagai,
Yoshitomo Ueda, Akimasa Ishida,
Cha-Gyun Jung
Decreased aggression by monosodium
glutamate during the period of
development is mediated by vagus nerve
in an attention-deficit hyperactivity
disorder model rat (シンポジウム)
日本生理学会 2017年3月28～30日、
アクティシティ浜松、浜松市
Hideki Hida
Oral intake of umami in early life effects
on emotional behavior mediated by
gut-brain interaction (シンポジウム)
日本神経化学会 2017年9月7～9日、
仙台国際会議場、仙台市 [発表確定]

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

www.med.nagoya-cu.ac.jp/brain-physiol.dir/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

飛田 秀樹 (HIDA HIDEKI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号： 00305525

(2) 連携研究者

三角 吉代 (MISUMI SACHIYO)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号： 70529148

石田 章真 (ISHIDA AKIMASA)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号： 20632607