

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K11798

研究課題名(和文) 注意欠損多動症モデル動物を用いた糖質制限食による異常行動改善効果の機序解明

研究課題名(英文) A study on effects of ketogenic diet on abnormal behaviors in a model animal of attention deficit hyperactivity disorder

研究代表者

緒形 雅則 (OGATA, Masanori)

北里大学・医療衛生学部・准教授

研究者番号：20194425

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：幼若期にドーパミン神経系を傷害した注意欠損多動症(ADHD)モデルを作製し、そのモデル動物が示す異常行動に対する糖質制限食の改善効果並びに薬剤との併用効果について検討した。糖質制限食としては、高脂質のもの(HF)と高蛋白質のもの(HP)の2種類を用いた。当モデル動物は新規環境下で多動を、慣れた環境下で運動量の低下を示した。また不安関連行動の減少も観られた。HF摂取群では、慣れた環境下での運動量減少のみが有意に改善された。一方、HP摂取群では、前記に加え新規環境下での多動も有意に改善された。ADHD治療薬のアトモキセチンは多動を改善したが、糖質制限食との併用による効果増大は示さなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、これまでに報告されていなかった基礎的研究による注意欠損多動症に対する糖質制限食の効果を明示した。一方で糖質制限食は、注意欠損多動症で認められる全ての症状を改善するものでなく、また糖質制限食の成分が異なることにより効果も変わることが明確となった。さらに臨床で治療薬として用いられているノルアドレナリン再吸収阻害剤と効果が異なることから、糖質制限食の改善効果は当神経系以外の関与が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We studied effects of low-carbohydrate diet on abnormal behaviors in an attention deficit hyperactivity disorder (ADHD) model rat subjected to neonatal dopamine depletion. The rats were fed normal diet (ND), low-carbohydrate diets including high-fat (HF) or including high-protein (HP). The effects of low-carbohydrate diet combined with atomoxetine were also examined.

The model rats with ND showed increases in locomotor activity and anxiolytic behaviors in unfamiliar environments. The model rats with ND also showed a decrease in locomotor activity in a familiar environment. The model rats with HF diet exhibited a significant increase in motor activity at the familiar environment. Additionally, the model rats with HP exhibited a significant decrease in motor activity at unfamiliar environment. Although atomoxetine used as treatment of ADHD decreased in the hyperactivity at unfamiliar environment, there was no significant combination effect of atomoxetine and the low-carbohydrate diet.

研究分野：神経科学

キーワード：注意欠損多動症 糖質制限食 ドーパミン神経系傷害 行動解析

## 1. 研究開始当初の背景

食事によって摂取された栄養素は身体機能の維持に必須であり、その過不足は生活習慣病の原因となる。よって適切な栄養素をバランスよく摂取することは健康の基本である。一方、食事内容に制限をかけることにより病気の症状改善や治療に繋げようとする食事療法は、薬物療法、運動療法、外科的治療法と並び重要な治療法の一つであり、医療の発展はもちろん、栄養学の発展にも繋がる。現在、厚生労働省は、主食(炭水化物)を基本に、副菜、主菜、乳製品、果物をバランスよく1日あたり約2000kcal(主食では600~800kcal)の食事を摂るように推奨しているが、ダイエットを目的として糖質制限を行う人々も近年増加しており、これまでのカロリーベースで行われている栄養指導とは一線を画す動きもある。

糖尿病でのケトアシドーシスの例から、血中のケトン体は低濃度が良いとされていたが、糖尿病等の代謝性疾患をもたない場合は、血中ケトン体の濃度上昇による急性の毒性はないことが分かってきた。糖質を制限したケトン食療法は、一部の疾病で効果が認められており、英国に続き、日本でも2016年度の診療報酬改定で、てんかん食としてケトン食が認められた。ケトン食の抗てんかん作用機序としては、抑制性神経伝達の増強、興奮性伝達の抑制、酸化ストレスに対する神経保護効果等が報告されている(Zhang et al. *Cur Neuropharmacol* 2018)。一方、ケトン食の有効性は、アルツハイマー病、パーキンソン病、レット症候群等の神経性疾患でも報告されている(Durebex et al., *Fron Mol Neurosci*, 2018)。最近の臨床研究では、ドーパミン(DA)神経系の変性脱落を主因とするパーキンソン病において、ケトン食療法は運動症状と非運動症状の両方を改善し、特に非運動症状に対する効果が顕著であることが示されている(Phillips et al., *Mov Disorder* 2018)。また、基礎研究でもパーキンソン病モデル動物の異常運動をケトン食が改善することが示されている(Shaafi et al., *Iran J Neurol* 2016)。

注意欠損多動症(ADHD)は、多動性、衝動性、不注意等の行動異常を示す神経疾患であり、以前は学童期の疾患とされていたが、現在では成人まで続く慢性的な疾患と考えられている。そしてその原因として、DA神経系やノルアドレナリン(NA)神経系の伝達障害が示され、治療薬として両神経系作用薬が使用されているが、その長期使用や高用量の使用に患者の不安も大きい。

幼若期にDA神経を欠損させ、成熟するまで育てたラットは多動等の行動異常を示し、ADHDモデル動物として利用されている。前述の様に、アルツハイマー病、パーキンソン病等の神経性疾患でケトン食の効果が報告されているが、ADHDモデル動物を用いてケトン食の効果を検討した研究は、その行動特性が十分に理解されていないためか、今までに前例がない。研究代表者は長年、本モデル動物を用いその行動解析を続けてきた。その結果、幼若期の脳内に薬剤を局所注入する難易度の高い技術を安定させ、多動のみでなく、不安関連行動、ストレス応答性、痛覚・痒覚関連行動等の行動特性を明確にし、本モデル動物の応用利用を可能にした。さらに、これまでのADHD研究は学童期相当の動物で行われているが、本研究が成熟後の時期をターゲットとしていること、多動以外の異常行動にも着目していること、ADHD治療薬とケトン食との併用効果を検討することなど、その独自性は高い。

## 2. 研究の目的

本研究では、ADHDモデル動物が成熟後に示す多動、異常不安行動に対する長期糖質制限食摂取による効果を行動的解析により明示する。さらに糖質制限食とADHD治療薬の併用効果も明確にし、慢性化を示すADHD症状に対する糖質制限食摂取の有効性、有用性、安全性を基礎的研究により示すことによって、当疾患患者並びにその家族の負担、不安の減少に繋げる。

## 3. 研究の方法

低体温麻酔下にて、生後5日目の雄ラットの両側の側脳室にカテコールアミン神経毒である**6-hydroxydopamine (6-OHDA)**を注入し、幼若期にDA神経系を傷害したADHDモデル動物を作製した。ノルアドレナリン神経系を保護する目的で、**6-OHDA**注入30分前に塩酸デジブラミンを腹腔内に投与した。また同腹の仔ラットを用いアスコルビン酸を含む生理食塩水を注入した対照群も作製した。生後25日目に母子分離を行い、その後5週間、通常の餌と糖質制限食の餌に分けて飼育を行った。通常の餌には日本クレア製**CE-2**を、糖質制限食の餌には**TestDiet**製の高脂質糖質制限食(**HF**)と高蛋白質糖質制限食(**HP**)の2種類を用い、異常行動改善効果の相違を検討した。

### (1) 行動実験による糖質制限食の異常行動改善効果の検討

新規環境下における行動様式をオープンフィールド(**OF**)試験で、高さに対する不安行動を高架式十字迷路(**EPM**)試験で、慣れた環境下における運動量を飼育ケージ内24時間運動量(**24h**)試験で解析した。行動実験は生後9週目以降に行い、行動実験前には3日間以上のハンドリングを試行し、実験者の動物への接触による動物行動への影響を軽減させるように努めた。**OF**試験は30分間の自由行動を、**EPM**試験は5分間の自由行動を観察、記録し、行動解析ソフト(**ANY-maze, Stoelting**)を用いて解析をした。

## (2) ADHD 治療薬、β 受容体遮断薬の糖質制限食との併用効果の検討

ADHD 治療薬であるアトモキセチン投与は、その効果発現特性から浸透圧ポンプ(Alzet pump model 2002)を用いた。イソフルラン麻酔下にて、アトモキセチン含有のポンプを皮下に留置した。投与量は通常量の **1.2mg/kg/day** 又はその半量の **0.6mg/kg/day** として、**14 日間**の持続投与を行った。行動実験は、投与 **12 日目**から **14 日目**に行った。β 受容体阻害剤としてプロプラノロールを用いた。プロプラノロールは腹腔内投与とし、行動実験開始 **1 時間前**に投与した。投与量は通常量の **10mg/kg** 又はその半量の **5mg/kg** とした。

## (3) 組織学的解析

イソフルランによる深麻酔下にて灌流操作を行い、その後、凍結切片を作製し、免疫組織化学染色を行った。免疫組織化学染色には、チロシン水酸化酵素(TH)に対する抗体 (Millipore, MAB318, 1:3000, 4、一晩)を用いた。染色済みの標本に対して、光学顕微鏡、撮影用カメラ、画像解析ソフトを用いてチロシン水酸化酵素陽性細胞数の定量的解析を行った。

## (4) 統計解析

行動学的解析、組織学的解析から得られた数値は、平均 ± 標準誤差で示した。群間の比較には一元配置分散分析と Tukey の多重比較を用いた。統計解析には **GraphPad Prism 8.0** を用い、有意水準は **5% 未満**とした。

## 4. 研究成果

### (1) 幼若期 DA 神経系傷害ラットの ADHD 様症状の確認

当モデル動物は、**OF** 試験では多動を示し、不安領域へ入る回数も多く認められた。また一方で探索行動をしている時間は有意に少なかった。**EPM** 試験でも、不安領域滞在時間と高所からののぞき込み時間に有意な増加が認められた。また慣れた環境下(**24h** 試験)では明期、暗期ともに行動量は低下していた。

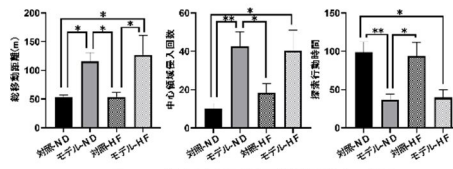


図1 OF試験における高脂質糖質制限食の効果

### (2) 高脂質糖質制限食(HF)の異常行動改善効果

HF の長期摂取では、**OF** 試験で認められた異常行動に対する改善効果は認められなかった(図 1)。図 2 に示すように、**EPM** 試験では **ND** 摂取例で対照動物とモデル動物間で認められていた不安領域滞在時間の有意な相違が、**HF** 摂取群間では認められていない ( $p=0.9893$ )。高所からののぞき込み時間に関しては、**HF** 摂取例で 2 群間の相違は認められなかったが ( $p=0.2408$ )、通常食摂取の対照動物と **HF** 摂取モデル動物との間には有意な差が認められた ( $p=0.0196$ )。図 3 に示すように、**24h** 試験ではモデル動物で認められた運動量の減少が有意に改善され、**HF** 摂取例における対照群とモデル群間の相違は認められなかった (**24 時間**,  $p=0.6484$ : 暗期,  $p=0.7653$ : 明期,  $p=0.4145$ )。さらに通常食摂取のモデル動物と **HF** 摂取のモデル動物間でも **24h** 試験では有意な運動量の増加が認められた (**24 時間**,  $p=0.0110$ : 暗期,  $p=0.0176$  明期,  $p=0.0497$ )。

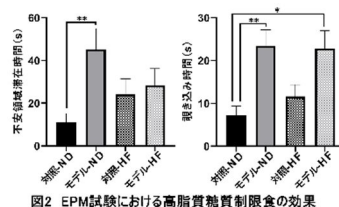


図2 EPM試験における高脂質糖質制限食の効果

### (3) 高蛋白質糖質制限食(HP)の異常行動改善効果

図 4 に示すように、**OF** 試験では **ND** 摂取例で対照群とモデル動物群の間に観られた多動と不安領域侵入回数の有意な差が、**HP** 摂取例の 2 群間では観察されなかった(移動距離,  $p=0.7811$ : 不安領域侵入回数,  $p=0.9198$ )。さらにモデル動物の **HP** 摂取群では、その通常食摂取群と比べ、移動距離が有意に減少していた ( $p=0.0121$ )。一方、探索行動の異常に対しては、**HP** 摂取による有意な改善効果は認められなかった。図 5 に示すように、**EPM** 試験では、**ND** 摂取例で観られた対照群とモデル動物群間の不安関連行動の有意な相違は、**HP** 摂取例の 2 群間では認められなかった(不安関連領域滞在時間,  $p=0.6713$ : 覗き込み時間,  $p=0.7052$ )。図 6 に示すように、**24h** 試験では、通常食摂取例で認められたモデル動物の **24 時間**運動量と暗期における運動量の有意な減少が、**HP** 摂取例では認められなかった(**24 時間**運動量,  $p=0.3882$ : 暗期運動

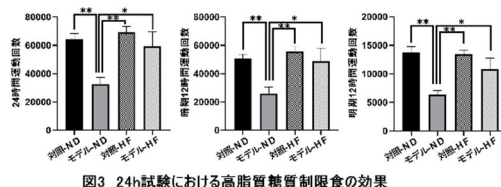


図3 24h試験における高脂質糖質制限食の効果

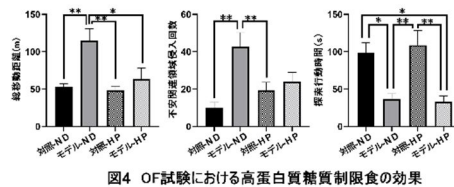


図4 OF試験における高蛋白質糖質制限食の効果

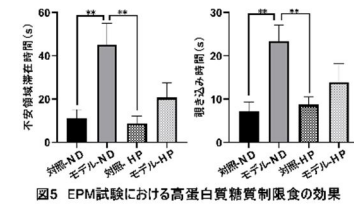


図5 EPM試験における高蛋白質糖質制限食の効果

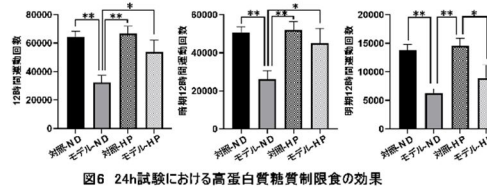


図6 24h試験における高蛋白質糖質制限食の効果

量,  $p=0.7549$ )。またモデル動物の運動量は 24 時間( $p=0.0423$ )、暗期( $0.0477$ )ともに、通常食摂取群と比較し HP 摂取群では有意に増加していた。一方で、明期に認められた通常食摂取のモデル動物の運動量減少に対しては、HP 摂取の有効性は認められなかった。

#### (4) 高蛋白糖質制限食と薬剤の併用効果

##### アトモキセチン(ATX)の効果

図 7 に示すように、OF 試験で認められた通常食摂取のモデル動物にみられた移動距離の増加が、通常量 ATX 投与で有意に改善された( $p=0.0071$ )。一方、1/2 量 ATX 投与では有意な改善効果は認められなかった( $p=0.6392$ )。また HP 摂取群に ATX 通常量を投与した場合、多動に対する改善効果は観られたが、効果の増大は観察されなかった。EPM 試験と 24h 試験では、ATX 通常量投与による異常行動改善効果は認められなかった。

##### プロプラノロール(PP)の効果

図 8 に示すように、HP 摂取群に対する PP 通常量投与は、OF 試験で認められたモデル動物の移動距離の増加を有意に改善した( $p=0.0167$ )。しかしその併用処置には、HP 摂取単独効果との比較で有意な差はなかった。また 1/2 量 PP 投与では、HP 摂取と併用してもその効果は確認できなかった。EPM 試験、24h 試験における PP 投与効果は、一部で改善傾向は認められるが、統計学的に有意な効果は観察されなかった。

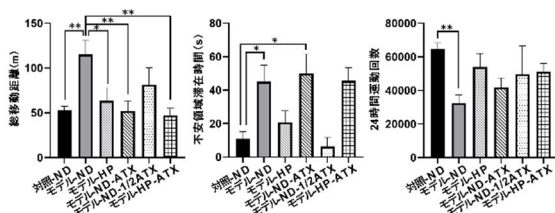


図7 アトモキセチンと高蛋白糖質制限食の併用効果

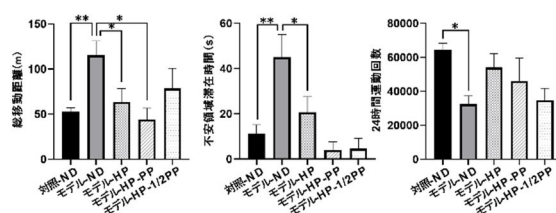


図8 プロプラノロールと高蛋白糖質制限食の併用効果

#### (5) チロシン水酸化酵素 (TH) 抗体による免疫組織学的解析

図 9 に示すようにノルアドレナリン神経系の細胞が集まっている青斑核では、TH 陽性細胞が明確に認められ、対照群とモデル動物間で明らかな相違はなく、ノルアドレナリン神経系が傷害されていないことが確認できた。一方、ドーパミン神経系の細胞が集まっている腹側被蓋野と黒質では、モデル動物において TH 陽性細胞の明らかな減少が認められた。定量的解析でも、ドーパミン神経系である腹側被蓋野と黒質における TH 陽性細胞の有意な減少が確認された。

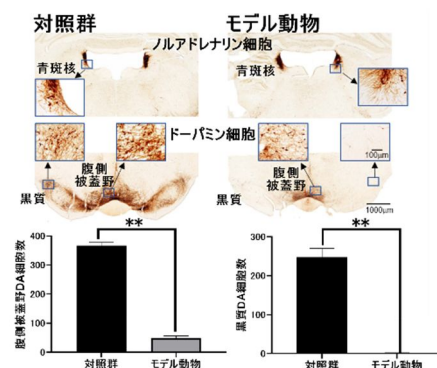


図9 TH抗体による免疫組織学的解析

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Masanori Ogata, Kei Eto, Hitoshi Ishibashi
2. 発表標題 Ameliorative effects of high-protein ketogenic diet on abnormal behaviors in rats with neonatal dopamine depletion
3. 学会等名 日本生理学会第100回記念大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Masanori Ogata, Kei Eto, Hitoshi Ishibashi
2. 発表標題 Effects of ketogenic diet on abnormal behaviors in a rat model of attention deficit hyperactivity disorder
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 緒形雅則、西川沙希、多胡絵美理、阿部郁美、石橋仁
2. 発表標題 幼若期ドーパミン神経系傷害は成熟後の慣れた環境下での運動量減少を引き起こす
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会 / 第98回日本生理学会大会合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Masanori Ogata, Daisuke Uta, Hisanao Akita, Hitoshi Ishibashi
2. 発表標題 Characterization of responses to pain and itch stimuli in adult rats with neonatal dopamine depletion
3. 学会等名 49th annual meeting of Society for Neuroscience (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	石橋 仁  (ISHIBASHI Hitoshi)  (50311874)	北里大学・医療衛生学部・教授    (32607)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------