

令和 3 年 6 月 24 日現在

機関番号：82611

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K14490

研究課題名（和文）統合失調症モデル動物における現実認識能力の障害とその脳内機構

研究課題名（英文）Validation of representation-mediated taste aversion as an index of reality testing ability of an animal model of schizophrenia.

研究代表者

古家 宏樹 (Furuie, Hiroki)

国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・精神保健研究所 精神薬理研究部・室長

研究者番号：90639105

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、内的表象と嫌悪の事象との連合学習である表象媒介性味覚嫌悪条件づけの動物の現実認識能力評価法としての妥当性を検証した。我々は、統合失調症モデルである新生仔期NMDA受容体遮断ラットにおいて、表象媒介性味覚嫌悪条件づけが成立しやすいことを明らかにした。このラットは、統合失調症の幅広い症状を模した行動表現系を示すだけでなく、患者の脳において観察されるものと同様の脳形態異常を示した。このように、新生仔期NMDA受容体遮断ラットは優れた表面妥当性および構成概念妥当性を有している。これらのことから、表象媒介性味覚嫌悪条件づけは動物における幻覚様体験の有用な査定法であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

幻覚は統合失調症の中核症状のひとつであり、患者のQOLに大きな影響を及ぼしている。これまで動物で幻覚様体験の有無を調べることは困難とされ、幻覚の神経メカニズムには不明な点が多かった。本研究は、優れた表面妥当性・構成概念妥当性を有する統合失調症モデルにおいて表象媒介性味覚嫌悪条件づけが成立しやすいことから、同パラダイムは、動物における幻覚様体験の有用な査定法であることを示唆する。表象媒介性味覚嫌悪条件づけを用いた基礎研究により、幻覚の生物学的基盤の理解が大きく進展し、幻覚を示す精神神経疾患の神経メカニズムの解明および有効な治療法開発に役立つことが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we validated representation-mediated taste aversion, an associative learning between an internal representation and an aversive event, as an index of reality testing ability in animals. We found that rats neonatally treated with MK-801, an NMDA receptor antagonist, easily acquired representation-mediated taste aversion compared to the control group. These rats also exhibited various behavioral phenotypes, including hypersensitivity to an NMDA receptor antagonist and deficits in spatial working memory, social recognition and sensory gating. In addition, neonatal NMDA receptor blockade caused brain morphological changes related to schizophrenia. Thus, we confirmed that rats that received neonatal NMDA receptor blockade had good face and construct validity for schizophrenia. These results suggest that representation-mediated taste aversion is a useful index to assess hallucination-like experience in animal models of schizophrenia.

研究分野：実験心理学

キーワード：幻覚 統合失調症 新生仔期NMDA受容体遮断 表象媒介性味覚嫌悪条件づけ ラット

## 1. 研究開始当初の背景

幻覚は統合失調症における中核症状の一つであり、患者のQOLに大きな影響を及ぼしている。幻覚の体験時にはそのモダリティに対応した感覚物質や、眼窩前頭皮質、前部帯状皮質、海馬、視床などの脳領域が活性化することが判っている (Shergill et al., 2000)。しかし、幻覚体験が生じる神経メカニズムについては不明な点が多く、基礎的な研究が必要とされている。

これまで、動物において幻覚体験の有無を評価することは困難であると考えられてきた。しかし最近、表象媒介性味覚嫌悪条件づけパラダイムの利用によって、動物の現実認識能力を評価できるとする報告がなされた (McDannald & Schoenbaum, 2009)。幻覚の基礎には、内的表象と現実の出来事とを区別できないという現実認識能力の障害があると仮定される。表象媒介性味覚嫌悪条件づけパラダイムでは、まず動物に特定の匂い刺激 A と味覚刺激 B の対提示を繰り返す (予備条件づけ)。続いて、匂い刺激 A を提示した直後に内臓不快感をもたらす塩化リチウムを動物に投与する。その後の味覚選好テストにおいて味覚刺激 B に対する忌避がみられる場合、動物は匂い刺激 A に喚起された味覚刺激 B の内的表象を現実の出来事と区別できなかったと考えられる。そのため、表象媒介性味覚嫌悪条件づけの成立は現実認識能力の障害を示唆する。しかし、表象媒介性味覚嫌悪条件づけの背景に統合失調症の幻覚と共通の神経メカニズムがあるのかは不明であり、また同パラダイムの幻覚様評価法としての妥当性については議論の余地がある。

新生仔期にグルタミン酸 N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体拮抗薬を投与された動物は、成体期に統合失調症と類似した神経科学的・行動学的異常を示す (古家, 2016)。そのため、新生仔期 NMDA 受容体遮断動物は有力な統合失調症モデルと目されている。我々は、新生仔期に NMDA 受容体拮抗薬 MK-801 を慢性投与されたラットが、統合失調症の患者と同様、スコポラミンなどの幻覚剤に対して高い感受性を示すことを報告している (Furuie et al., 2013)。このことから、新生仔期 NMDA 受容体遮断動物は、統合失調症においてみられる幻覚に類似する現実認識能力の障害を持つことが推測された。

## 2. 研究の目的

内的表象と嫌悪刺激との連合学習により成立する表象媒介性味覚嫌悪条件づけは、内的表象と現実の刺激とを弁別する能力を評価する有用な手法と考えられ、動物における現実認識能力の評価法として注目される。しかし、表象媒介性味覚嫌悪条件づけの幻覚様体験評価法としての妥当性については十分な検証がなされていない。本研究課題では、動物の幻覚様体験評価法としての同パラダイムの妥当性を検証した。

通常の動物において、匂い刺激と味覚刺激の対提示の回数が増えると表象媒介性味覚嫌悪条件づけが成立しにくくなるとされる。そこでまず、naïve ラットにおいて、匂い刺激と味覚刺激の対提示回数を操作し、表象媒介性味覚嫌悪条件づけが成立しやすい条件と成立しにくい条件を特定した。続いて、通常動物で表象媒介性味覚嫌悪条件づけが成立しにくい条件において、新生仔期 NMDA 受容体遮断ラットで同条件づけが成立するかどうかを検討した。また、新生仔期 NMDA 受容体遮断ラットが、その他の統合失調症様行動異常を示すかどうかについても確認した。さらに、新生仔期 NMDA 受容体遮断ラットが、統合失調症と類似する神経解剖学的特徴を有することを確認するために、同ラットの脳を採取し、形態学的解析を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) Naïve ラットで表象媒介性味覚嫌悪条件づけが成立しない条件の検討

本研究では、被験体として Wistar-Imamichi 系雄性ラットを使用した。

まず、naïve ラットにおいて表象媒介性味覚嫌悪条件づけが成立する予備条件づけの回数と成立しなくなる回数を特定した。予備条件づけに先立ち、ラットの水飲み訓練を 4 日間行った。訓練開始 24 時間前から飲水制限し、訓練 1、2、3、4 日目の午前中にそれぞれ 60、45、30、15 分間、午後 0、15、30、45 分間、水道水の入った水ボトルを提示し自由に水を摂取させた。提示前後のボトル重量を量り、飲水量を算出した。水飲み訓練の終了翌日より予備条件づけを開始した。予備条件づけでは、匂い刺激と味覚刺激を 1 日に 15 分間対提示した。匂い刺激には 6% レモンエッセンス水溶液と 2% コーヒーエッセンス水溶液を使用した。水ボトルのキャップに匂い溶液を浸み込ませたフィルターペーパーを張り付けることでラットに匂い刺激を提示した。味覚刺激として、5% スクロース水溶液と 15% マルトデキストリン水溶液を使用した。予備条件づけは 1 日 1 回 15 分間、6 日あるいは 12 日間行った。奇数日には 1 つの匂い刺激 O1 (例、レモン) と 1 つの味覚刺激 T1 (例、スクロース) を対提示し、偶数日には別の匂い刺激 O2 (コーヒー) と味覚刺激 T2 (マルトデキストリン) を対提示した。予備条件づけの終了翌日から 4 日間、条件づけを行った。条件づけ 1 日目および 3 日目には、O1 と水を 15 分間ラットに対提示し、その直後に 0.3M の塩化リチウム 10 ml/kg を腹腔内投与した。2 日目および 4 日目には、O2 と水を対提示し、直後に生理食塩水 (SAL) を投与した。1 日の回復期間を置いたのち、各味覚溶液に対する選好テストを行った。選好テストは 1 瓶法で行われ、テスト 1 日目には 1 つの味覚溶

液を、2日目にはもう一方の味覚溶液を15分間提示し、各味覚溶液の摂取量を測定した。

## (2) 新生仔期 MK-801 投与ラットにおける表象媒介性味覚嫌悪条件づけ

上記実験から、匂い刺激と味覚刺激の対提示回数が3回である場合には表象媒介性味覚嫌悪条件づけが成立するが、対提示回数が6回である場合には成立しなくなることが確認された。続いて、通常ラットで表象媒介性味覚嫌悪条件づけが成立しない条件で、新生仔期 NMDA 受容体遮断ラットにおいて表象媒介性味覚嫌悪条件づけが成立するのかどうかを検討した。生後7-20日の14日間、ラットに NMDA 受容体拮抗薬 MK-801 (0.4mg/kg) あるいは SAL を1日2回、8時間以上の間隔をあけて皮下投与した。ラットが成体に達したのち、上記手続きで表象媒介性味覚嫌悪条件づけ訓練と各味覚溶液に対する選好テストを行った。

## (3) 新生仔期 MK-801 投与ラットにおける統合失調症様行動表現系の解析

新生仔期 MK-801 投与ラットが、統合失調症モデルとしての表面妥当性を満たすことを確認するため、薬物誘発性過活動試験、社会的再認記憶試験、Y字型迷路試験、プレパルス抑制試験を行った。統合失調症患者は、NMDA 受容体拮抗薬の精神症状誘発作用に対する過感受性を示す。新生仔期 MK-801 投与ラットが NMDA 受容体拮抗薬に対して過敏であるかを検証するため、MK-801 (0, 0.05, 0.1, 0.2 mg/kg) を急性投与し、120分間の移動活動量を測定した。一方、社会行動の異常は統合失調症における陰性症状の一つとされる。新生仔期 MK-801 投与ラットの社会性を評価するため、社会的再認課題を行った。オープンフィールドの一方の壁際に若齢の雄ラット (stranger 1) の入れたカゴを、対面の壁際に空のカゴを置き、被験体に探索させた。その後、先ほど空だったカゴに新奇な若齢雄ラット (stranger 2) を入れ、被験体に再び探索させた。続いて新生仔期 MK-801 投与の認知機能におよぼす影響を評価するため、Y字型迷路試験にて空間的作業記憶を測定した。統合失調症の症状のひとつに認知機能障害が挙げられる。試験ではラットをY字型迷路に入れ、8分間自由に探索させた。ラットが進入したアームを記録し、自発的交替反応率を算出した。驚愕反応を引き起こすような高強度の聴覚刺激 (パルス) を提示する直前に、驚愕反応を生じさせない強度の聴覚刺激 (プレパルス) 刺激を提示すると、パルス単独提示時と比較してパルスに対する驚愕反応が減弱する。この現象はプレパルス抑制と呼ばれ、感覚ゲーティングの指標とされる。統合失調症ではプレパルス抑制が低下することが知られている。新生仔期 MK-801 投与ラットにおいてプレパルス抑制を評価するため、パルス単独提示時とパルスに100 msec 先行してプレパルスを提示した時の驚愕反応を測定した。パルスとして100、110、120 dB のホワイトノイズ (40 msec)、プレパルスとして82 dB のホワイトノイズ (20msec) を提示した。

## (4) 新生仔期 MK-801 投与ラットの脳形態解析

新生仔期 NMDA 受容体遮断による統合失調症様行動異常と神経解剖学的異常との関連を調べるために、新生仔期 MK-801 投与ラットの脳を採取し形態学的解析を行った。新生仔期に NMDA 受容体拮抗薬あるいは SAL を投与されたラットの脳を4%パラホルムアルデヒドで灌流固定し、背側海馬を含む30 $\mu$ mの切片を作成した。作成した切片を0.1%クレジルバイオレット溶液で染色し、顕微鏡下で撮影した画像を用いてCA1領域の厚みを計測した。

## 4. 研究成果

### (1) Naïve ラットで表象媒介性味覚嫌悪条件づけが成立しない条件の検討

naïve ラットで表象媒介性味覚嫌悪条件づけが成立しやすい条件とそうでない条件を検討した結果、予備条件づけが3回の場合、選好テストにおいてT1の摂取量が予備条件づけ時より減少した(図1)。一方、予備条件づけが6回の場合、選好テストにおけるT1の摂取量の減少は生じなかった(図1)。このことから、通常、naïve ラットでは6回の予備条件づけにより表象媒介性味覚嫌悪条件づけが成立しなくなることが確認された。

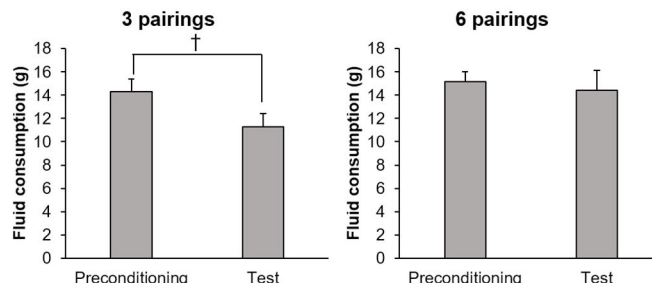


図1 予備条件づけの回数が表象媒介性味覚嫌悪条件づけに及ぼす効果。平均 $\pm$ SEM。† $<.10$ .

### (2) 新生仔期 MK-801 投与ラットにおける表象媒介性味覚嫌悪条件づけ

新生仔期に MK-801 あるいは SAL を投与されたラットにおいて、6 回の予備条件づけにて表象媒介性味覚条件づけ訓練を行った。結果、SAL 群では選好テストにおける T1 の摂取量低下が生じなかったが、MK-801 群では予備条件づけ時と比べて T1 の摂取量が減少しており (図 2)、表象媒介性味覚嫌悪条件づけの成立が確認された。このことから、新生仔期 MK-801 投与によって、匂い刺激により喚起された味覚表象を現実の出来事と区別できなかったことが示唆される。

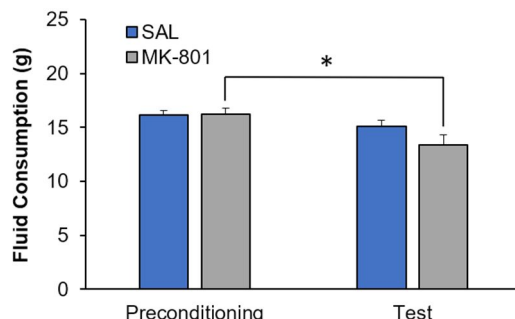


図 2 新生仔期 MK-801 投与が表象媒介性味覚嫌悪条件づけに及ぼす効果. 平均+SEM. \* $<.05$ .

### (3) 新生仔期 MK-801 投与ラットにおける統合失調症様行動表現系の解析

薬物誘発性過活動試験では、MK-801 0.2mg/kg の急性投与時の新生仔期 MK-801 投与群の移動活動量は SAL 群より有意に高かった (図 3A)。このことから、新生仔期 MK-801 投与ラットは、統合失調症患者と同様に NMDA 受容体拮抗薬に対する感受性が亢進していることが示された。Y 字型迷路試験において、MK-801 群の自発的交替反応率は SAL 群と比較して有意に低下しており、空間的作業記憶が障害されていることが示された (図 3B)。社会的再認課題において、SAL 群では stranger 2 に対する選好率がチャンスレベルと比較して有意に高かった (図 3C)。一方、MK-801 群では stranger 2 に対する選好率はチャンスレベルと同等であり、社会的認知機能が障害されていることが示唆された。プレパルス抑制試験において、新生仔期 MK-801 投与ラットはパルス強度に関わらずプレパルス提示による驚愕反応の抑制率が SAL 群より有意に低く (図 3D)、統合失調症と同様に感覚ゲーティングが障害されていることが示唆された。

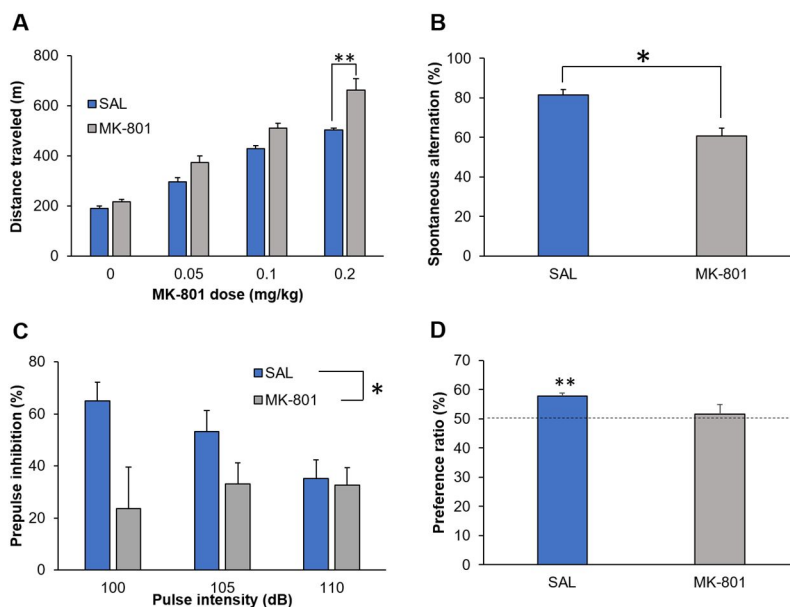


図 3 新生仔期 MK-801 投与の行動学的影響. (A) MK-801 急性投与による移動活動量の変化. (B) Y 字型迷路試験における自発的交替反応率. (C) プレパルス抑制. (D) 社会的再認課題における新奇他個体に対する選好率. 平均+SEM. \* $<.05$ , \*\* $<.01$ .

### (4) 新生仔期 MK-801 投与ラットの脳形態解析

背側海馬の形態学的解析の結果、新生仔期に NMDA 受容体 NR2A サブユニット特異的拮抗薬 PEAQX を投与されたラットにおいて、SAL 群と比較して CA1 領域の厚みが有意に薄かった (図 4)。

以上のように、新生仔期 MK-801 投与ラットでは、通常のラットとは異なり、表象媒介性味覚嫌悪条件づけが成立しやすいことが示され、このラットで現実認識能力に障害がある可能性が示された。新生仔期 MK-801 投与ラットは、統合失調症の陽性症状、陰性症状、認知機能障害、感覚ゲーティング障害を模した行動表現型を示したことから、同疾患のモデルとして高い表面妥当性を有しているといえる。また、新生仔期の NR2A 含有 NMDA 受容体の機能障害は統合失調症で観察される神経解剖学的異常を引き起こした。新生仔期 PEAQX 投与は MK-801 と同様の行動異常を引き起こすことを我々は以前報告している。統合失調症の病態あるいは発症リスク形成に NR2A 含有 NMDA 受容体の関与が示唆されている (Alsabban et al., 2020)。このように、新生仔期 NMDA 受容体遮断ラットは統合失調症モデルとしての構成概念妥当性も満たしている。統合失調症と行動学的にも神経学的にも類似した特徴を示す動物モデルにおいて表象媒介性味覚嫌悪条件づけが成立しやすいこと、また統合失調症においてもパプロフ型条件づけを利用して幻覚様体験を惹起できる (Powers et al., 2017) ことから、表象媒介性味覚嫌悪条件づけの背景には統合失調症における幻覚と共通した神経メカニズムがある可能性がある。表象媒介性味覚嫌悪条件づけパラダイムは、動物における幻覚様体験の有用な査定法といえ、本パラダイムを用いた基礎研究により、幻覚の神経メカニズムの理解が大きく進展することが期待される。

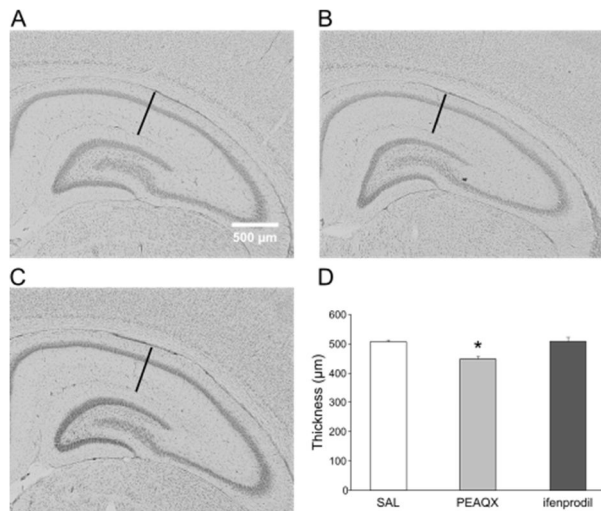


図 4 新生仔期 NMDA 受容体拮抗薬投与が背側海馬の形態に及ぼす影響. (A) 新生仔期 SAL 投与群, (B) PEAQX 投与群, (C) ifenprodil 投与群の背側海馬. (D) 各薬物処置群の背側海馬 CA1 領域の厚み. 平均 +SEM. \* $<.05$ , \*\* $<.01$ .

#### <引用文献>

- Shergill et al. (2000) Mapping auditory hallucinations in schizophrenia using functional magnetic resonance imaging. *Arch Gen Psychiatry*. 57(11):1033-8.
- McDannald and Schoenbaum. (2009) Toward a model of impaired reality testing in rats. *Schizophrenia Bulletin*. 35(4):664-667.
- 古家. 齧歯類における新生仔期 NMDA 受容体遮断の行動学的影響に関する研究の概観. 茨城県立医療大学紀要. 21 巻 1-10 頁.
- Furuie et al. (2013) MK-801-induced and scopolamine-induced hyperactivity in rats neonatally treated chronically with MK-801. *Behavioural Pharmacology*. 24(8):678-683.
- Alsabban et al. (2020) Kinesin Kif3b mutation reduces NMDAR subunit NR2A trafficking and causes schizophrenia-like phenotypes in mice. *EMBO Journal*. 39:e101090
- Powers et al. (2017) Pavlovian conditioning-induced hallucinations result from overweighting of perceptual priors. *Science*. 357(6351):596-600.



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

|   |                       |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Nakatake Yuko, Furuie Hiroki, Yamada Misa, Kuniishi Hiroshi, Ukezono Masatoshi, Yoshizawa Kazumi, Yamada Mitsuhiro    | 4. 巻<br>158           |
| 2. 論文標題<br>The effects of emotional stress are not identical to those of physical stress in mouse model of social defeat stress | 5. 発行年<br>2020年       |
| 3. 雑誌名<br>Neuroscience Research   | 6. 最初と最後の頁<br>56 ~ 63 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.neures.2019.10.008  | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-             |

|   |                      |
|---|----------------------|
| 1. 著者名<br>Furuie Hiroki, Yamada Kazuo, Ichitani Yukio   | 4. 巻<br>1721         |
| 2. 論文標題<br>Differential effects of N-methyl-D-aspartate receptor blockade during the second and third postnatal weeks on spatial working and reference memory in adult rats | 5. 発行年<br>2019年      |
| 3. 雑誌名<br>Brain Research  | 6. 最初と最後の頁<br>146339 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1016/j.brainres.2019.146339  | 査読の有無<br>有           |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-            |

|   |                     |
|---|---------------------|
| 1. 著者名<br>Nakatake Yuko, Furuie Hiroki, Ukezono Masatoshi, Yamada Misa, Yoshizawa Kazumi, Yamada Mitsuhiro  | 4. 巻<br>10          |
| 2. 論文標題<br>Indirect exposure to socially defeated conspecifics using recorded video activates the HPA axis and reduces reward sensitivity in mice | 5. 発行年<br>2020年     |
| 3. 雑誌名<br>Scientific Reports  | 6. 最初と最後の頁<br>16881 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1038/s41598-020-73988-z  | 査読の有無<br>有          |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）   | 国際共著<br>-           |

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>古家宏樹、請園正敏、山田光彦                                    |
| 2. 発表標題<br>新生仔期MK-801慢性投与によるNMDA受容体遮断はラットの摂餌行動における社会的促進を障害する |
| 3. 学会等名<br>第29回日本臨床精神神経薬理学会・第49回日本神経精神薬理学会合同年会               |
| 4. 発表年<br>2019年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>石井香織、中武優子、山田美佐、古家宏樹、吉澤一巳、山田光彦          |
| 2. 発表標題<br>社会的敗北ストレス負荷マウスを用いたリルゾールの抗ストレス効果についての検討 |
| 3. 学会等名<br>第29回日本臨床精神神経薬理学会・第49回日本神経精神薬理学会        |
| 4. 発表年<br>2019年                                   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Nakatake Y, Yamada M, Furuie H, Yoshizawa K, Yamada M  |
| 2. 発表標題<br>A ROCK inhibitor, fasudil, suppressed behavioral changes induced by physical stress, but not by emotional stress in mice social defeat stress model. |
| 3. 学会等名<br>The 6th Congress of AsCNP (国際学会)   |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>古家宏樹、山田光彦  |
| 2. 発表標題<br>新生仔期MK-801慢性投与ラットにおけるプレパルス抑制の障害                    |
| 3. 学会等名<br>第50回日本神経精神薬理学会・第42回日本生物学的精神医学会・第4回日本精神薬学会・学術集会合同年会 |
| 4. 発表年<br>2020年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>中武優子、古家宏樹、請園正敏、山田美佐、吉澤一巳、山田光彦 |
| 2. 発表標題<br>社会的敗北場面の動画を用いた新規ストレスモデルマウスの開発 |
| 3. 学会等名<br>第94回日本薬理学会年会                  |
| 4. 発表年<br>2021年                          |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>小林桃子、古家宏樹、三輪秀樹、山田美佐、山田光彦                                       |
| 2. 発表標題<br>WD repeat domain 3 遺伝子ヘテロ欠損マウス海馬におけるNMDA受容体 (NR2A, NR2B) の発現低下 |
| 3. 学会等名<br>第94回日本薬理学会年会   |
| 4. 発表年<br>2021年   |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|