

## 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：24402

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23530959

研究課題名(和文)統合失調症モデル動物である新生仔期NMDA拮抗薬投与ラットはストレスに対し脆弱か

研究課題名(英文)Are rats with neonatal repeated treatment of an NMDA antagonist, an animal model for schizophrenia, vulnerable to stress?

研究代表者

川辺 光一(KAWABE, Kouichi)

大阪市立大学・文学研究科・准教授

研究者番号：30336797

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：統合失調症の発症メカニズムに関する仮説として、two-hit仮説が知られる。この仮説では、遺伝的要因・発達初期の要因に起因する脳の脆弱性が基礎にあり、これにストレスなどの何らかの後天的要因が負荷されることによって統合失調症が発症すると仮定している。そこで本研究では、統合失調症動物モデルの一つである新生仔期NMDA拮抗薬(MK-801)反復投与ラットのストレス脆弱性を調べることを目的とした。新生仔期MK-801反復投与を行ったラットの成育後に20日間(週5日×4週間)にわたる強制水泳ストレスを与え、その後に各種行動テストを行ったが、このラットがストレス脆弱性を有するという証拠は得られなかった。

研究成果の概要(英文)：The two-hit hypothesis is known as a hypothesis of onset mechanism of schizophrenia. It assumes that the onset of schizophrenia is originally attributed to vulnerability of a brain which stems from genetic or early developmental factors, and that exposure to later acquired factors such as stress triggers the onset. The present study examined whether rats with neonatal repeated treatment of an NMDA antagonist (MK-801), one of the animal models for schizophrenia, have stress-vulnerability. Rats with repeated neonatal MK-801 treatment were subjected to 20-day (5 days/week x 4 weeks) forced-swim stress in adulthood. After that, behavioral tests were carried out. The results do not show that these animals have stress-vulnerability.

研究分野：社会科学

科研費の分科・細目：心理学・実験心理学

キーワード：統合失調症 動物モデル ストレス脆弱性 認知・行動障害 NMDA受容体 グルタミン酸受容体 ラット

## 1. 研究開始当初の背景

グルタミン酸は脳内の主要な興奮性伝達物質であり、グルタミン酸受容体のサブタイプの一つである NMDA (*N*-methyl-D-aspartate) 受容体が長期増強や神経系の成熟などの神経細胞の可塑性、学習・記憶(e.g., Kawabe, Ichitani & Iwasaki, 1998; Kawabe, Yoshihara, Ichitani & Iwasaki, 1998)などの現象に関わっていることが知られている。一方でグルタミン酸系神経の機能低下が統合失調症の原因の一つである可能性も示唆されている(Javitt & Zukin, 1991; Jentsch & Roth, 1999)。

我々はこれまでに、NMDA 受容体拮抗薬の新生仔期反復投与が作業記憶の障害、一般活動量や一般行動の変化といった統合失調症の症状に類似する様々な行動変化を引き起こすことを見だし、この処置を行ったラットが統合失調症の発達障害仮説とグルタミン酸仮説を満たす動物モデルであることを提唱している(Kawabe, Iwasaki & Ichitani, 2007; Kawabe & Miyamoto, 2008)。特に作業記憶の障害が統合失調症の中心症状であるという仮説(Goldman-Rakic, 1994)に基づくと、新生仔期 NMDA 受容体拮抗薬反復投与ラットは統合失調症の動物モデルとして有用であると考えられる。

また、慢性的ストレスやストレスホルモンであるグルココルチコイドの慢性投与によって、海馬の錐体細胞において細胞数の減少や萎縮、樹状突起の減少などの組織学的な変化が生じること(e.g., Sapolsky et al., 1984, 1985; Watanabe et al., 1992; Woolley et al., 1990)などから、ストレスが脳に対して悪影響を引き起こすことが明らかにされている。

同時に、ストレスは種々の精神疾患の原因にもなりうると考えられている。統合失調症におけるこのような仮説の一つに two-hit 仮説がある。この仮説では、遺伝的要因・発達初期の要因(first-hit)に起因する脳の脆弱性が発症の基礎にあり、これにストレスなどの何らかの後天的要因が負荷されること(second-hit)によって統合失調症が発症すると仮定している。したがって、脆弱性が高い個体ほど統合失調症の発症に及ぶストレス負荷の閾値が低く、発症の確率が高いことが予想される。

## 2. 研究の目的

Two-hit 仮説に基づくと、新生仔期 NMDA 受容体拮抗薬反復投与ラットを含む多くの統合失調症動物モデルは、薬理的・分子生物学的処置などにより first-hit で認められる生物学的異常を模倣したものと考えることができる。したがって、これらのモデル動物に対し、second-hit となりうるストレスを負荷し、ストレスに対して脆弱かどうかを調べることは非常に意義のあることであるが、このような研究はまだほとんど行われていない。そこで本研究は、統合失調症動物モデル

の一つである新生仔期 NMDA 受容体拮抗薬(MK-801)反復投与ラットのストレス脆弱性を調べることを目的とした。これを調べるための行動指標として、統合失調症患者において顕著に障害される感覚運動ゲーティング(sensorimotor gating)、および作業記憶を測定する行動テスト法を用いた。同時に、統合失調症の陰性症状に相当すると考えられる意欲の低下についても調べた。感覚運動ゲーティングとは感覚情報のうち不要なものを排除し、必要な情報のみを取り入れる機構のことである。作業記憶は、記憶情報を一時的に保持し、その情報に能動的な処理や操作を加えることによって意思決定を導くまでの一連の過程である。

また本研究では、新生仔期 MK-801 反復投与ラットのストレス脆弱性を調べる前に、上述の行動指標を用い、これらのラットの行動特性と、成体ラットにおける慢性的ストレス負荷、およびグルココルチコイドの一種であるコルチコステロン慢性投与の行動・認知機能に及ぼす影響を調べた。

## 3. 研究の方法

### (1) 新生仔期 MK-801 反復投与ラットの行動特性

Wistar 系雄ラットに NMDA 受容体拮抗薬の MK-801(0.2, 0.4 mg/kg)を 7~20 日齢時に 1 日 2 回投与した。統制群には生理食塩水(SAL)を投与した。8 週齢に到達した時点で、プレパルス抑制(prepulse inhibition; PPI)テスト、自発的交替テスト、オープンフィールドテスト、強制水泳テストを行った。

PPI テストは感覚運動ゲーティング機能を測定するために行われた。パルス試行ではパルス刺激(105 dB)のみを与えた。プレパルス試行では、パルス刺激の 40 ms 前にプレパルス刺激(75 dB)を与えた。パルス試行、プレパルス試行ともに 20 試行ずつ行い、いずれの試行においてもパルス刺激終了直後より 100 ms にわたり驚愕反応を測定した。感覚運動ゲーティング能力の指標として PPI 値を以下の式によって算出した。

$$PPI = 1 - \frac{\text{プレパルス試行の驚愕反応の平均値}}{\text{パルス刺激の驚愕反応の平均値}}$$

自発的交替テストは作業記憶能力を測定するために行われた。3 方向迷路の直線走路部と目標箱のうちの 2 つを選択肢とし、ラットを迷路中央に置きこの 3 つの選択肢を 10 分間にわたり連続的に自由に選択させた。直前 2 回の選択の両方と異なる選択肢を選択した場合を自発的交替とみなし、作業記憶能力の指標とされる自発的交替率を以下の式により算出した。

$$\text{自発的交替率} = \frac{\text{自発的交替数}}{(\text{総選択数} - 2)}$$

オープンフィールドテストは一般活動性を調べるために行われた。5 分間にわたり、移動量（オープンフィールド内に設けられた区画の移動数）、立ち上がり反応数を計測した。

強制水泳テストは陰性症状の一つと考えられる意欲の低下を計測するために行われた。ラットを水を張った強制水泳プール内に投入し、15 分間にわたり意欲低下の指標とされる無動時間を測定した。

#### (2) ラットの認知・行動機能に及ぼす強制水泳ストレス慢性負荷の効果

Wistar 系雄成体ラットに慢性ストレスとして 1 日 15 分間の強制水泳ストレスを 10 もしくは 15 日間(週 5 日×2 週間もしくは 3 週間) 負荷した後、認知・行動機能を測定した。行動テストには(1) で用いた PPI テスト、自発的交替テスト、オープンフィールドテストを用いた。

#### (3) ラットの認知・行動機能に及ぼすコルチコステロン反復投与の効果

コルチコステロンは齧歯類において副腎皮質から放出されるグルココルチコイドの一種である。本研究では、コルチコステロン(30, 60 mg/kg/day)を Wistar 系雄成体ラットに 20 日間(週 5 日×4 週間)投与した後、認知・行動機能を測定した。統制群には溶媒(sesame oil)を投与した。行動テストには(1) で用いた PPI テスト、自発的交替テスト、オープンフィールドテスト、強制水泳テストを用いた。

#### (4) 新生仔期 MK-801 反復投与ラットの認知・行動機能に及ぼす強制水泳ストレス慢性負荷の効果

(1) と同様の手続きで MK-801(0.2 mg/kg)を新生仔期に反復投与したラットに、8 週齢より 1 日 15 分間の強制水泳ストレスを 20 日間(週 5 日×4 週間) 負荷した。その翌日より PPI テスト、自発的交替テスト、オープンフィールドテスト、強制水泳テストを行った。

#### (5) ラットの指示性忘却課題の開発・評価

指示性忘却とは記憶項目の前後に忘却指示を与えると、記憶指示を与えた場合よりも記憶の成績が低下する現象である。この現象は忘却が受動的に生じるだけでなく、能動的、意図的にも生じうることの証拠の一つとされている。またこの現象の生起には、作業記憶や実行機能などの前頭前野機能の関与が指摘されている。統合失調症患者においてはこれらの前頭前野機能の障害が指摘されているため、ラットにおいて指示性忘却課題の手続きを確立することが、統合失調症の動物モデルの認知機能の評価、およびこれらの動物の認知機能の障害の神経機構の解明に役立つかもしれない。

本研究では迷路およびオペラント箱を用

いた遅延非見本合わせ反応を利用した指示性忘却課題を実施した。いずれの場合も遅延非見本合わせ反応の習得後に指示性忘却課題の訓練を行った。この訓練では、見本刺激を提示した後の遅延時間中に、記憶指示手がかり(remember-cue; R-cue)もしくは忘却指示手がかり(forget-cue; F-cue)のいずれかを提示した。R-cue を提示した場合(R-cue 試行)、遅延時間の後 2 選択肢間の自由選択を行わせた。このとき、見本刺激と異なる選択肢を選択した場合を正選択とした。F-cue を提示した場合(F-cue 試行)は、迷路課題では遅延時間後に見本刺激とは無関係な選択を行わせ、オペラント箱課題では F-cue 提示後に試行を終了した。これらの手続きは、F-cue 提示後においては見本刺激についての記憶を保持する必要がないことをラットに学習させるためのものである。訓練終了後、指示性忘却テストを行った。このテストでは R-cue 試行は訓練時と全く同じであるが、F-cue 試行の一部を R-cue 試行と同様に遅延時間終了後に 2 選択肢間の自由選択を行わせる試行に置き換えた。この F-cue 試行の成績が R-cue 試行の成績よりも低い場合は、指示性忘却が生じたものと考えられることができる。

#### 4. 研究成果

##### (1) 新生仔期 MK-801 反復投与ラットの行動特性

PPI テストについては、パルス試行の驚愕反応が MK-801 投与によって高められる傾向があり、この値は MK-801 0.2 mg/kg 群が SAL 群より有意に大きかった( $p < .05$ )。また、PPI は MK-801 0.4 mg/kg 群において PPI が小さくなる傾向が認められたが、薬物の主効果は有意ではなかった( $p = .12$ )。

強制水泳テストにおいては MK-801 を投与した 2 群が SAL 群よりも無動時間が短くなる傾向があったが、薬物の主効果は認められなかった。

自発的交替反応、オープンフィールドテストについては薬物の効果は認められなかった。

##### (2) ラットの認知・行動機能に及ぼす強制水泳ストレス慢性負荷の効果

PPI テストにおいては、ストレス負荷群においてパルス試行における驚愕反応が高くなる傾向が認められたが( $p < .05$ )、PPI には変化は認められなかった。

自発的交替反応、オープンフィールドテストにおいてはストレスの効果は認められなかった。

##### (3) ラットの認知・行動機能に及ぼすコルチコステロン反復投与の効果

PPI、自発的交替反応、オープンフィールドテスト、強制水泳テストのいずれの行動指標においてもコルチコステロンの効果は認め

られなかった。

(4) 新生仔期 MK-801 反復投与ラットの認知・行動機能に及ぼす強制水泳ストレス慢性負荷の効果

強制水泳テストにおいては(1)の結果と同様、MK-801 投与によって無動時間が短縮する傾向が認められた( $p < .01$ )。また薬物条件とストレスの交互作用は認められなかったが( $p = .11$ )、MK-801 群は強制水泳ストレス負荷によって起こる無動時間の延長が SAL 群に比べ短くなる傾向があった。PPI、自発的交替反応、オープンフィールドテストにおいては薬物の効果、ストレスの効果は認められなかった。

(5) ラットの指示性忘却課題の開発・評価  
迷路を用いた場合、オペラント箱を用いた場合のいずれにおいても F-cue 試行の成績が R-cue 試行の成績よりも低く、ラットにおいても指示性忘却が発現することが示唆された。

(6) まとめ

本研究は、統合失調症動物モデルの一つである新生仔期 NMDA 受容体拮抗薬(MK-801)反復投与ラットに統合失調症の症状と関連した各種行動テストを行い、このラットがストレス脆弱性を有するかを調べることを目的とした。しかしながら、いずれの行動指標においてもこれらの動物がストレスに対し脆弱であるという証拠を得ることはできなかった。

ストレスの影響が認められなかった原因としていくつかの原因が考えられる。まず、長期にわたりストレスを与えることがストレス刺激に対する慣れや適応を生じさせてしまった可能性である。実際に MK-801 を投与したか否かにかかわらず、強制水泳を繰り返すにつれ無動が起こりやすくなる傾向が見られたが、これはストレスに対する慣れや適応を反映しているのかもしれない。この慣れや適応によってストレスが低減されてしまった可能性があるため、電撃などのストレスを加えた複合的なストレスを与えるなど、慣れの生じにくいストレスを負荷することが必要かもしれない。

また、現在我々が用いている飼育システムは集団飼育ではなく単独飼育によるものである。今回の実験でも離乳直後より単独飼育を開始しているが、長期にわたる単独飼育が社会的ストレスとして働き、結果として強制水泳ストレスの効果を隠蔽してしまったのかもしれない。

一方、新生仔期 MK-801 反復投与ラットは、有意差には至らなかったものの PPI が低くなる傾向が認められた。これはこの動物が統合失調症モデル動物として有用である可能性を示唆するものである。また、MK-801 処置によって強制水泳テストにおける無動時間

が短縮する傾向があったが、これはこの処置によって意欲低下が生じにくくなるというよりも、ストレス場面に対する慣れや適応が生じにくくなるということの意味しているのかもしれない。また、PPI テストにおいて、MK-801 新生仔期反復投与が驚愕反応の増大を引き起こすという結果が得られたが、この結果もこの処置が慣れや適応能力の低下を引き起こすことを示唆しているのかもしれない。新生仔期 NMDA 受容体拮抗薬反復投与動物の行動特性や、ストレス脆弱性についての知見はまだ確立されておらず、今後もさらなる研究が必要とされる。

## 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1件)

川辺光一 (2014) 新生仔期 NMDA 受容体拮抗薬反復投与動物の行動特性 統合失調症動物モデルとして 人文研究 (大阪市立大学大学院文学研究科紀要) 第 65 巻, pp. 47-62, 査読有

〔学会発表〕(計1件)

久保望・川辺光一・佐伯大輔 ラットの位置遅延非見本合わせ課題における指示性忘却—迷路・オペラント箱を用いて— 日本動物心理学会第 72 回大会、2012 年 5 月 12 日、関西学院大学

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

川辺 光一 (KAWABE, Kouichi)

大阪市立大学・文学研究科・准教授

研究者番号：30336797