



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士 (医学)
報告番号	甲第1530号
学位記番号	第1101号
氏名	清水 由布子
授与年月日	平成 28年 3月 25日
学位論文の題名	<p>A model rat of ADHD exhibits more anxiety in enriched environment than control animal (豊かな環境飼育下で ADHD モデルラットはコントロールラットより不安が大きい)</p> <p>Nagoya Medical Journal, in press</p>
論文審査担当者	<p>主査： 明智 龍男 副査： 松川 則之, 飛田 秀樹</p>

論文内容の要旨

【背景と目的】

注意欠陥多動性障害(ADHD)は学齢期の約5~10%にみられ、不注意、多動性、衝動性を主症状とする神経発達障害である。病因としてドパミン(DA)関連遺伝子などの遺伝因子の関与が大きいことが知られているが、発育期の劣悪な飼育環境や周産期障害など環境因子が関与することも報告されている。環境要因がどのようなメカニズムにより ADHD に影響するのかについては不明な点が多い。発育期に多動性を示す自然発症型高血圧ラット(spontaneously hypertensive rat: SHR)は ADHD モデルとしてこれまでによく用いられてきた。しかし、SHR において情動行動とくに不安様行動を評価した報告はほとんどない。一方、環境要因が脳に与える影響については、豊かな環境飼育(EE)による影響がこれまでに良く調べられている。

本研究は、SHR およびその対照ラットである Wistar-Kyoto rat (WKY)を用い、発育期の EE によって成熟後の不安様行動および社会性行動が変化するかについて検討した。

【方法】

- 1) 飼育環境 生後 23-25 日齢の SHR とその対照ラットとして WKY を用いた。離乳直後の生後 25 日齢から成熟期までの 5 週間、豊かな環境(EE)または通常環境(SE)で飼育した。
- 2) オープンフィールドテスト(OFT) 円形空間の中心部にラットを置き、10 分間の行動をビデオカメラで記録し、行動解析ソフトにより解析した。10 分間の総移動距離、各 1 分毎の移動速度を多動性の指標とした。また、中心領域への侵入回数を不安の指標とした。
- 3) シリンダーテスト(CYT) 透明なプラスチック製の小円筒の中での、5 分間の行動を記録した。上下方向の運動 (rearing)、匂い嗅ぎ行動 (sniffing)、歩行 (locomotion)、安静時毛繕い (grooming)、不動行動(staying)などを評価した。
- 4) ソーシャルインターアクションテスト(SIT) 3 日間の試験環境適応の後、試験箱の両端に観察動物および新奇ラットを同時に入れ 5 分間の行動を記録し、sniffing の回数を評価した。
- 5) リアルタイム PCR 深麻酔下で脳を摘出し、内側前頭皮質(mPFC)、扁桃体(Amy)を採取した。TRIzol によって RNA を抽出し、cDNA を作製したのち、ABI PRISM 7000 Sequence Detection System を用い、40 サイクル (95°C15 秒、60°C1 分)で反応させた。各遺伝子の発現量は GAPDH mRNA の量を基準とし、CT^(2- $\Delta\Delta$ CT)法によって計算した。

【結果】

発育期に EE で 5 週間飼育した結果、OFT では、SHR、WKY とともに SE 群に比べ EE 群で総移動距離と歩行速度の顕著な減少を示した。CYT では、安静時の指標である staying 時間の増加、不安の指標である rearing 回数の減少が見られた。また、EE における rearing 回数は、WKY に比べ SHR で多かった。SIT では、EE によって新奇ラットに対する社会的探索行動の指標である sniffing 回数が減少することが分かった。また、EE における sniffing 回数は、WKY に比べ SHR の方が有意に多かった。この事によって、EE による不安の減少効果が示された。また、EE 飼育下にあっても WKY より SHR の方が不安が強いことが示された。

不安様行動と脳内 DA 神経系の関係を調べるため、mPFC および Amy における DA 関連因子である cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART)の発現変化を調べたところ、EE 群において mPFC および Amy で有意に増加していることが認められた。

【考察】

発達期の外部環境の変化(EE)により、不安様行動が減少した。さらに、EE 飼育時には WKY に比べ SHR の不安様行動が強いことが示された。これは、SHR においては EE の不安様行動の減少作用が WKY に比べ弱いためであると考えられる。WKY は他の系統に比べ鬱や不安への脆弱性が報告されていることから、WKY より樹立された SHR は不安に対する感受性がより高い ADHD モデルであることが推測される。

また、情動行動に関係が深い mPFC や Amy において、CART 遺伝子の発現の増加が EE 飼育時の SHR でのみ確認された。CART の脳内投与による行動制御が報告されており、SHR でのみ発現増加する CART が SHR の高い不安様行動と関係する可能性が考えられる。

論文審査の結果の要旨

【論文の目的】 注意欠陥多動性障害 (ADHD) は、不注意、多動性、衝動性を主症状とする神経発達障害である。ドパミン関連遺伝子などの遺伝因子の関与が大きい、発育期の環境要因の関与も知られている。発育期の環境要因が ADHD 脳に与える影響のメカニズムおよび ADHD と不安との併発頻度が高いメカニズムについては不明な点が多い。これまでに、環境要因の脳への影響については“豊かな環境飼育 (EE)” による脳への影響が調べられてきた。本研究は、ADHD モデルの自然発症型高血圧ラット (SHR) およびその対照ラットである Wistar-Kyoto rat (WKY) を用い、発育期の EE によって成熟後の不安様行動および社会性行動の情動行動が変化するか、さらにはメカニズムについて検討した。【方法】 生後 23-25 日齢の SHR とその対照ラットとして WKY を、離乳直後の生後 25 日齢から成熟期までの 5 週間、EE または通常環境 (SE) で飼育した。不安様行動は、オープンフィールドテスト (OFT) およびシリンダーテスト (CYT) により評価した。また社会性行動は、ソーシャルインターアクションテスト (SIT) により評価した。また、不安様行動と脳内ドパミン神経系との関係を調べるため、cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) に注目し、real-time PCR により CART 発現変化を内側前頭葉 (mPFC) および扁桃体 (Amy) で調べた。【結果】 発育期の 5 週間を EE 飼育した結果、OFT では SHR および WKY とともに EE 群で総移動距離と歩行速度の顕著な減少を示した。また CYT では不安指標の rearing 回数の減少も見られた。最初 1 分間の rearing 回数が WKY に比べ SHR で多く、不安が強い状態であることが明らかになった。一方、SIT では新奇動物への探索行動の sniffing 回数が発育期の EE により減少し、EE 下での sniffing 回数は SHR の方が有意に多いことが示された。さらに CART 発現は EE 群において mPFC および Amy で有意に増加していることが認められた。【考察】 発達期の EE によって不安様行動は減少するが、SHR では抗不安作用が WKY に比べ弱いことが示唆された。また SHR は不安を併発する ADHD モデルとし考えられることが示された。情動行動に関係する mPFC や Amy において CART 遺伝子発現は EE 飼育時の SHR でのみ増加することが示され、SHR において不安様行動が強いことに関係する因子の一つに CART が想定された。

【審査内容】 審査委員会における 20 分程度のスライド発表ののち、主査の明智龍男教授から、ADHD と不安の関係に注目した理由、CART 発現増加と個々の不安行動との相関関係について等の論文に関する 10 項目の質問、第一副査の松川則之教授から、不安行動で一般的に用いられるテストは何か、SHR のみで CART が動いた理由についてなど 12 項目の質問、第二副査の飛田秀樹教授) から、動物的機能や脳内ドパミン神経系について等の専門分野を中心とする 4 項目の質問がなされた。申請者からこれら質問に対しほぼ満足する内容の回答が得られた。

審査委員会は、学位申請者が学位論文について十分理解しているとともに、脳神経生理学に関する専門的な知識を有していると判断した。よって、本委員会は、博士 (医学) の学位を授与するのに相応しいと判断した。

論文審査担当者 主査 明智 龍男 副査 松川 則之、 飛田 秀樹