

常が行動に関与するか否かを明らかにすることを目的に行った。

B. 研究方法

対象はbvマウス(月齢3~5)20匹とBALB/c系コントロールマウス(月齢3~4)10匹とした。行動量はニューロサイエンス社DAS systemを用いて測り、対照群の行動量はddy系マウスやICR系マウスも追加計測した。DAS systemはマウスの体から発せられる赤外線センサーがキャッチし、その揺らぎをカウントするものである。対象それぞれの1分あたりの計測回数と夜間の12時間連続記録を行い、積算値を求めた。

聴力検査は分担報告1「遺伝性難聴bvの早期診断法の開発に関する研究」で述べたものと同じく、Distortion Product Otoacoustic Emission (DPOAE)のDP growth法(f_2 周波数8000Hzと6000Hz使用)でのDPレベル、およびクリック音刺激でのABR各波潜時と波閾値を求めた。併せてクリック音刺激でのABR各波潜時と波閾値を年齢別に検討した。

脳内モノアミン(MA)値はEicom社製HPLC-ECD 300を用いて測定した。これは、Macintosh software Power Chrom ver 2.1.3Jでコントロールされ、クロマトグラムを求めてエリア解析を行った。なお、内部標準としてIsoproterenol 200ngを用いてカテコラミン値はng/mg brainとして表記した。さらに、DA受容体agonistであるapomorphine(0.5-1.0 mg/kg weight)投与30分後のMA値も検討した。以下の8脳部位を迅速に摘出し、測定まで -80°C で保存した(limbic forebrain, striatum, prefrontal cortex, cerebellum, midbrain, pons, Left cerebrum, Right cerebrum)。また、一部のマウスはParaformaldehydeで経心臓的に還流固定し、前頭葉と脳幹での病理学的検討(HE染色, ABC法による免疫染色)を行った。

統計学的には解析ソフトStat View for

Windows ver 4.5で有意差検定を行った。

(倫理面への配慮:対象マウスは処置や処分の配慮を注意深く行い、麻酔処置により疼痛を緩和し、苦痛を与えない方法によって検査を行い、臓器を摘出した。)

C. 研究結果

1. 行動量解析:異常行動マウスの共通した行動特徴は持続性回転運動であり、circlingあるいはrotationalと表現されるものであった。方向性は左右ほぼ均等であり、そのスピードは極めて早かった。しかしながら、行動は2次元的な動きが中心で、後脚で体を支えて前脚を合わせるrearingの動きが極めて少なかった。

回転行動が主であるが、8の字様の動きもあった。回転方向性はマウスにより決まっているわけではなく、同じマウスに左右回転が見られた。すばやい回転は10回程度で止まり、一瞬行動停止があるが、すぐに再び回転する。この繰り返りであった。回転は少なくとも自転様と中心をもったものの2種類がみられた。2匹では同方向に回転する場合と逆方向に回転する場合がある。隣接した回転でも、衝突することなく巧みに体をかかわした。

コントロールマウスの存在を気にかけることなく、行動過多が見られ、あたかも相手を物体として認識しているようであった。回転行動を惹起する因子はマウスへの突然の接触刺激や音刺激であった。

夜間12時間行動総量は対照(7702.1 ± 757.6)に比べて回転するグループ $n=10$ (60729.9 ± 3994.9)が有意($p < 0.0001$)に増加しており、非回転群 $n=10$ (9900.7 ± 2169.7)は対照とほぼ同じ値であった(図1-a)。回転行動群は夜間行動時間(9時間)が、コントロール、非回転群(各々5.9時間と5.5時間)と比べて有意に長い特徴もあった(図1-b)。そのグループ、すなわちrotational groupは平均6万前後の行動量

であり、その特徴は1分あたりの行動が180～200と著しく高いことで、回転するスピードが速いことを示していた。

ICR系マウス(n=3), ddY系マウス(n=6)の行動量(行動総量/1分値最高運動量)はそれぞれ7594～14744/68～71と8400～25000/68～90であり、対照としたBALB/c系マウス(n=10; 4300～12000/45～72)とほとんど同じ値を示した。

回転は離乳後から観察され、生後半程度まで行動過多・回転運動が持続し、その後に行動総量が減少する年齢依存性の変化もみられた。これは夜間行動時間とほぼ平行して推移し、回転スピードは1歳をすぎても軽度の減少しか認められなかった(図1-c, d)。また、非回転群が回転行動を呈することはなかった。

2. 聴力検査結果:回転行動群と非回転群に難聴の程度に差はみられなかった。すなわち、ABR閾値は各々平均104.0と92.7dB SPL, OAE閾値は各々平均80と71dB SPLであった。また性差もなかった(図2-a, b)。

3. モノアミン測定結果:有意差検定の結果、striatumとmidbrainのみに差が認められた。すなわち、bvマウスではstriatumにおいてドパミン(DA)値の上昇はなかったが、midbrainにおいてコントロール値よりも低下していた($p < 0.05$)。DA代謝系の指標(DOPAC+HVA/DA)はstriatum, midbrainともに高く、代謝が亢進する傾向が示され、回転行動群のstriatumではDOPAC側にその代謝がシフトしていることと、逆に、HVAへの代謝が抑制されている可能性が示された(図3-a～k, 4-a～k)。

4. 免疫組織化学所見:回転のある、なしにかかわらずbvではstriatumおよびmidbrainの黒質緻密層のtyrosine hydroxylaseの免疫染色性にコントロール

と差がみられなかった(図5)。

5. 薬物負荷試験:apomorphine投与後midbrainではコントロール, bvともDA遊離が抑制される通常の反応がみられた。一方、striatumのDA値、代謝産物はコントロールにおいては不変～抑制の傾向を示したものの、回転行動群では逆にDA値が増加する異常パターンを示し、DA受容体とくに自己受容体機能の障害が疑われた(図6-a～k, 図7-a～k)。

D. 考察

注意欠陥/多動性障害 Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD)は注意の持続困難、衝動性、多動という臨床症状を示す発達障害であり、最近注目されている。ADHDの齧歯類モデルはヒトにおける病態解明や治療薬開発のため主に研究されてきている。

たとえばドパミン(DA)系神経毒6-Hydroxydopamineを新生仔期に脳室内投与され、同時にDesmethylinipramine処置も受けた雄性ラットはDAが選択的かつ永続的に枯渇することで障害側に回転する特徴を持つ。また、DAの再取り込みに関わるdopamine transporter(DAT)遺伝子ノックアウトマウスもstriatumにおける細胞外DAが対照の5倍に達すると報告される。さらに、シナプス前の細胞膜でシナプス小胞との結合に関わるSNAP-25遺伝子欠損マウス(*Coloboma mutant*)はシナプス前におけるカテコラミン代謝の失調がいわれ、高血圧自然発症ラット(SHR)でもDA貯留低下がおこり、男性にADHD様行動が表れることが知られている。

いずれもカテコラミン系の機能異常が行動異常と関わるとされる。その点からもbvの回転行動の背景が興味深いと考えられる。また、ヒトADHDの遺伝的検索から5つあるDA受容体のうち、とくにDRD4やDATの遺伝子多型 polymorphismに

病態との関連性が注目されている。

本研究によって、特異的遺伝性難聴モデル bv の夜間にみられる過剰回転運動は難聴単独による症状ではないことが判明した。bv は線条体におけるドパミン値には異常はなく、中脳レベルで減少していた。さらに、ドパミンアゴニストに対する反応が対照と異なっていた。すなわち、本来であれば、シナプス前のオートレセプタを介して、ドパミン放出が抑制され、シナプス前にドパミンが貯留するためフィードバックで産生系が抑えられドパミン値が変わらないという反応が得られるところ、bv の striatum でドパミン上昇があった点はレセプタ機能がおかしくなっている可能性がある。

つまり、bv は striatum レベルでの脳内モノアミン、とくにドパミン系受容体とりわけ自己受容体機能の失調が回転行動に関わっている可能性が示されたといえよう。免疫染色のみではあるが midbrain レベルでの DA 合成は比較的保持されており、モノアミン合成系機能障害ではないと考えられた。しかし bv マウスの回転行動のある・なしを規定している根本的な要因はなお不明であり、ドパミン系だけでなくセロトニン系の関与もありうると思われる。

今後は bv における前庭系機能障害との関連性も含めて、ドパミン系やセロトニン系受容体の活性や、再取り込み機能、代謝酵素などの関連物質の遺伝子発現を検討し、行動異常の詳細について検討を重ね、各種受容体刺激剤や拮抗剤に対する行動量変化やモノアミン代謝変化についてさらなる検討が必要と思われる。

E. 結論

bv マウスには難聴に加えて、行動量過多及び回転行動を主徴とする特異な群が存在する。その発生機序にモノアミンとくにドパミン系受容体機能障害が関与す

る可能性が示された。本マウスはヒト行動異常病態モデルとしての可能性をさらに追求する必要がある。

研究協力者

昆かおり, 白根聖子, 加我牧子, 小林奈麻子, 太田玲子, 伊藤雅之: 国立精神・神経センター

F. 健康危険情報

とくになし。

G. 研究発表

学会発表

1) 稲垣真澄, 昆かおり, 堀本れい子, 加我牧子, 伊藤雅之: 遺伝性難聴マウス bv の病態進展に関する検討 第 43 回日本小児神経学会総会 岡山 2001.6.8.

2) 佐々木匡子, 昆かおり, 稲垣真澄, 加我牧子: 自閉性障害児における耳音響放射の特徴 第 43 回日本小児神経学会総会 岡山 2001.6.8

3) 佐田佳美, 稲垣真澄, 堀本れい子, 白根聖子, 佐々木匡子, 加我牧子: カテゴリー一致判断課題施行時における N1 の発達的变化: 等電位マップおよび双極子追跡法による検討 第 43 回日本小児神経学会総会 岡山 2001.6.8

4) 白根聖子, 稲垣真澄, 佐田佳美, 加我牧子: 注意欠陥多動障害児における視覚認知機能: 漢字及び図形課題に対する単一波形 P300 の検討 第 43 回日本小児神経学会総会 岡山 2001.6.8

5) Shirane S, Kaga M, Inagaki M, Sata Y: Visual perception in children with attention-deficit/hyperactivity disorder

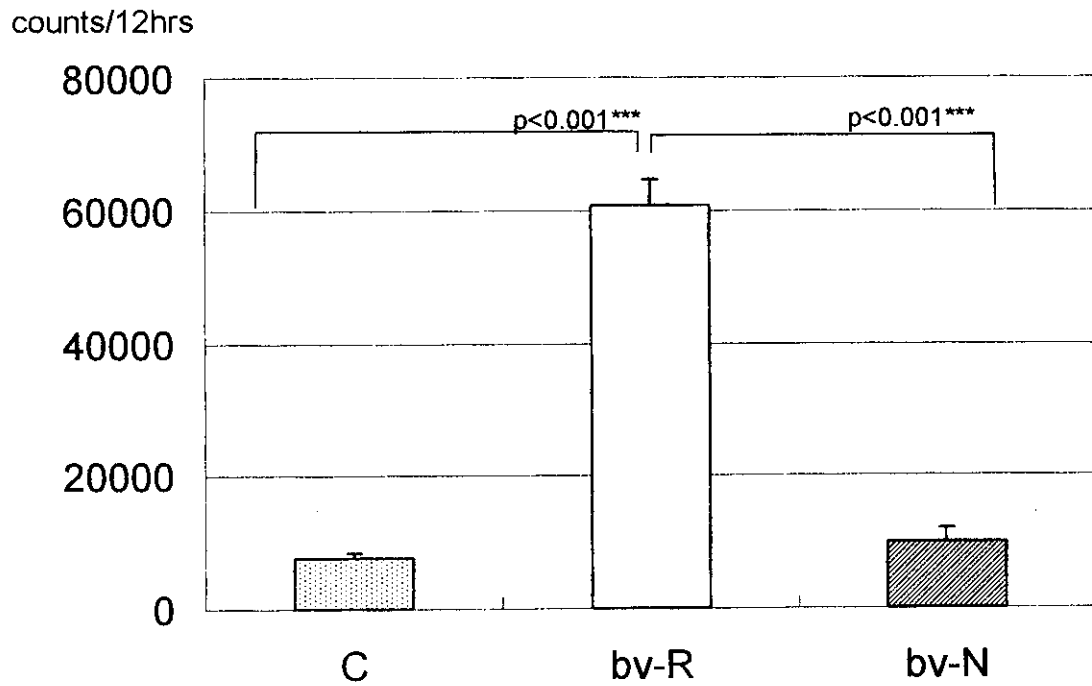
(ADHD): Single sweep analysis of visual P300. Iowa International Clinical Neurophysiology Conference (IICNC), University of Iowa, College of Medicine, Department of Neurology 2001 August 9-11

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

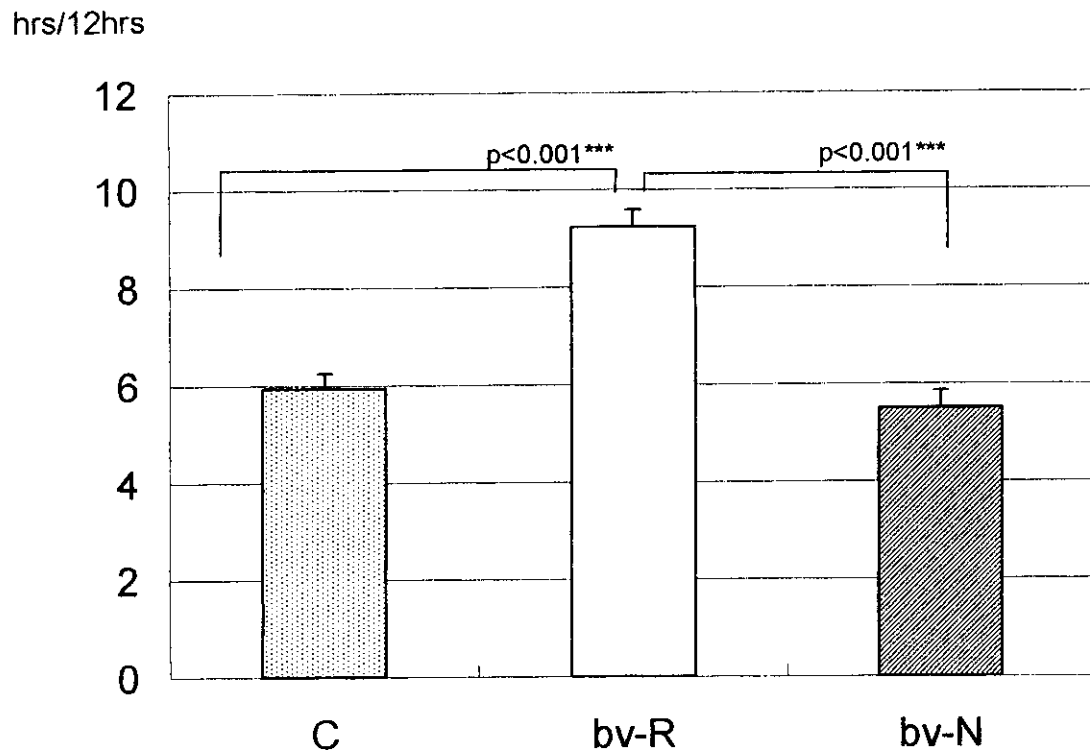
図の説明

1. 行動定量結果: a 12時間行動総量, b 夜間行動時間, c 行動量の年齢変化, d 1分行動最高値の年齢変化(C; 対照, bv-R; 回転群, bv-N; 非回転群)
2. 聴力検査結果: a ABR 閾値, b OAE 閾値
3. Striatum モノアミン計測値: a~k
4. Midbrain モノアミン計測値: a~k
5. Tyrosine hydroxylase 免疫染色性: a striatum, b midbrain
6. Apomorphine 投与時 striatum モノアミン変化: a~k
7. Apomorphine 投与時 midbrain モノアミン変化: a~k

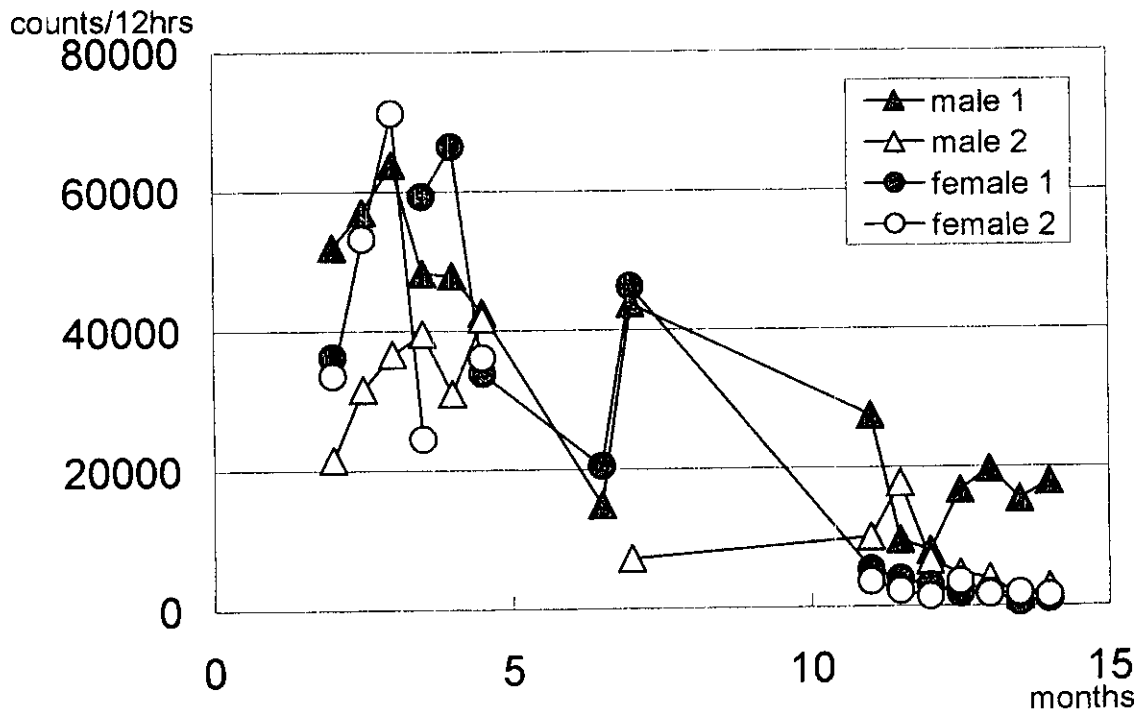
図1 行動定量結果:a. 夜間12時間における行動総量(DAS system による)



b. 夜間行動時間



c. 行動量の年齢変化



d. 1分行動最高値の年齢変化

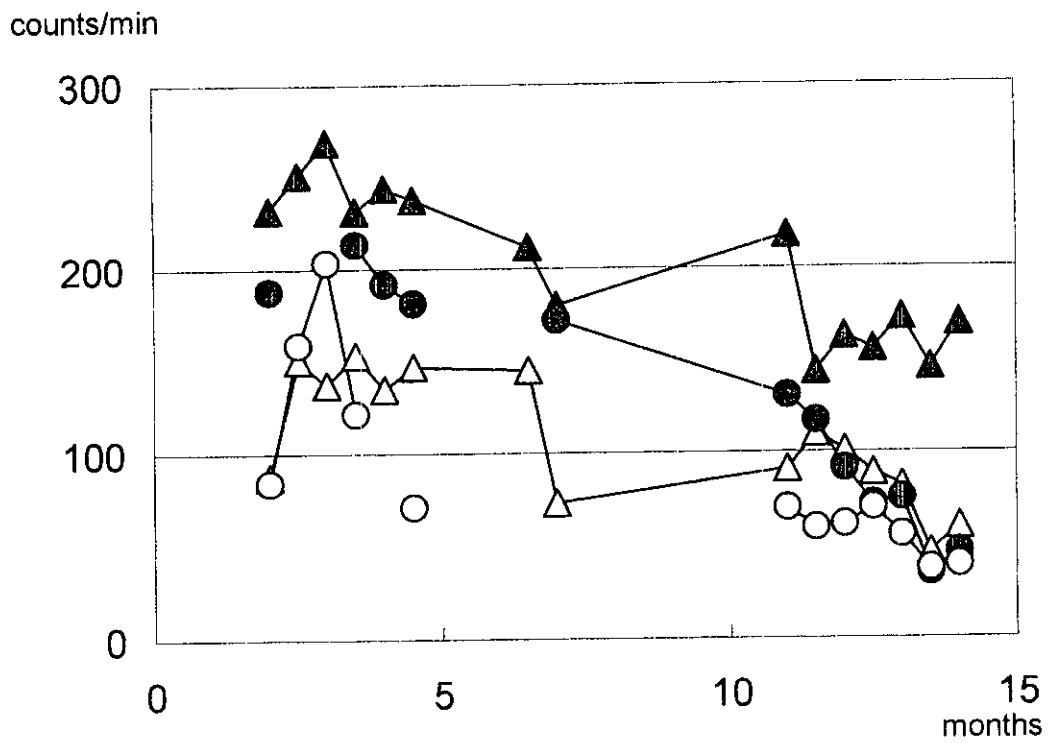
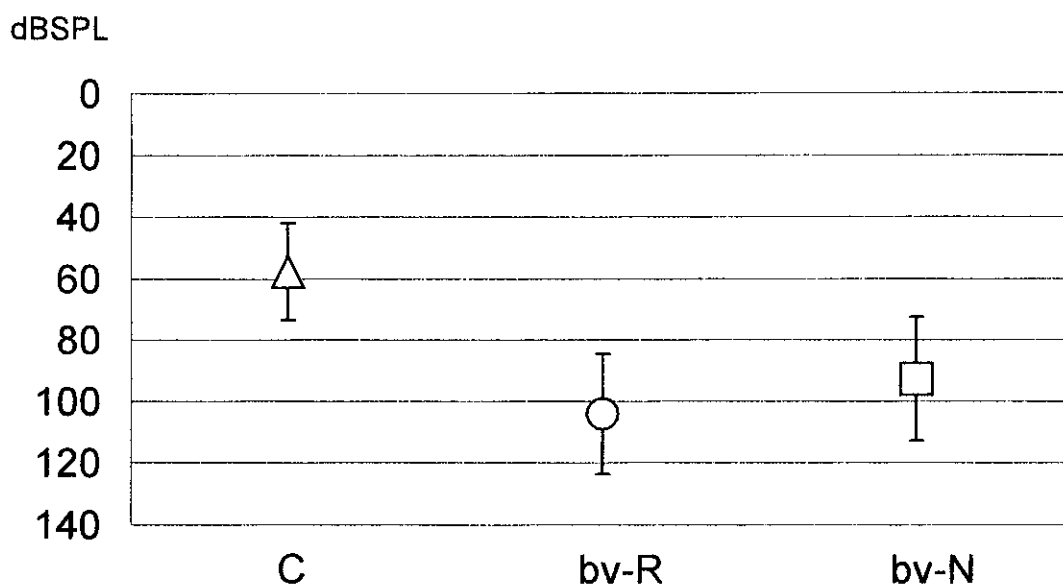


図2 聴力検査結果

a. ABR 閾値



b. OAE 閾値

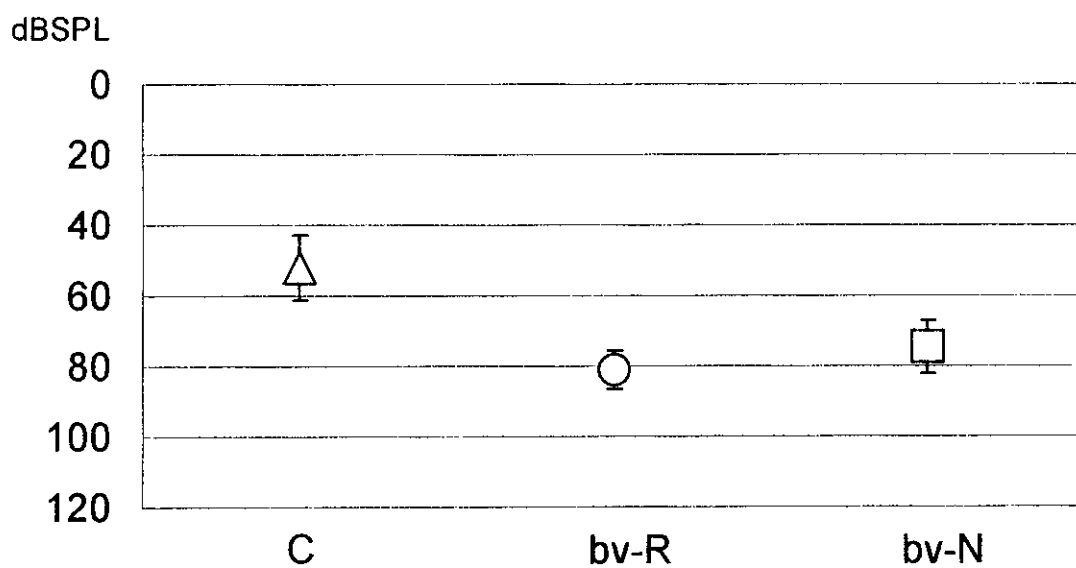
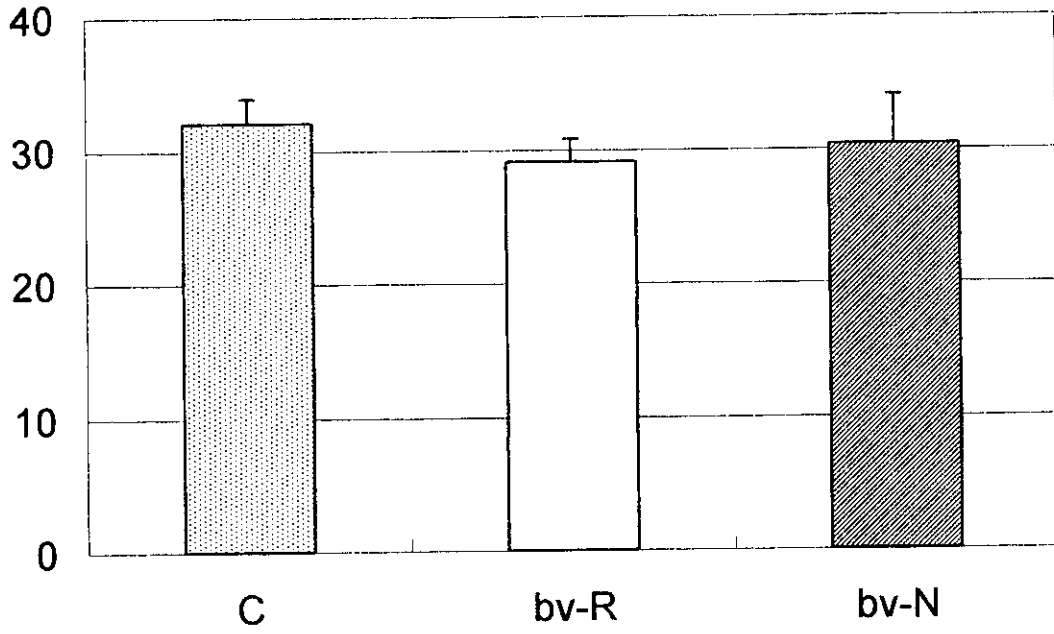


図3 striatum 中のモノアミン計測値

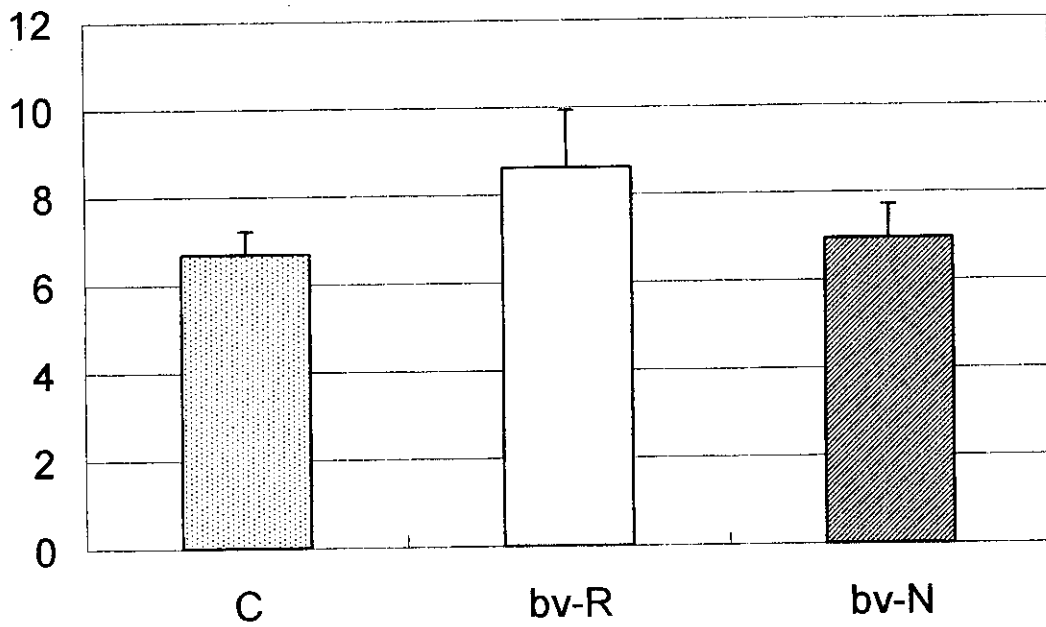
a. DA

ng/mg brain



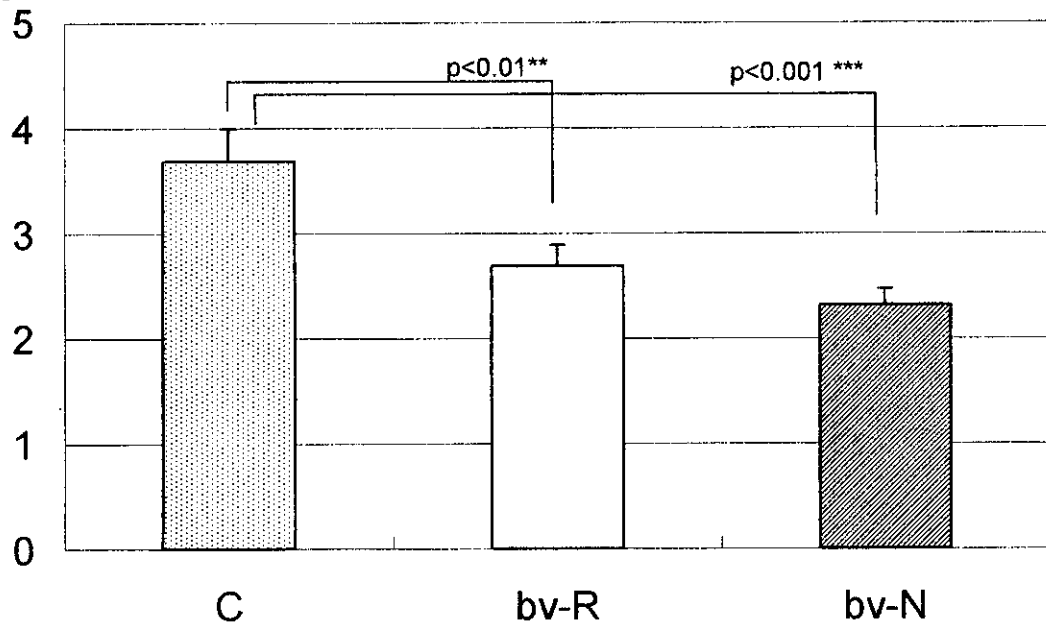
b. DOPAC

ng/mg brain



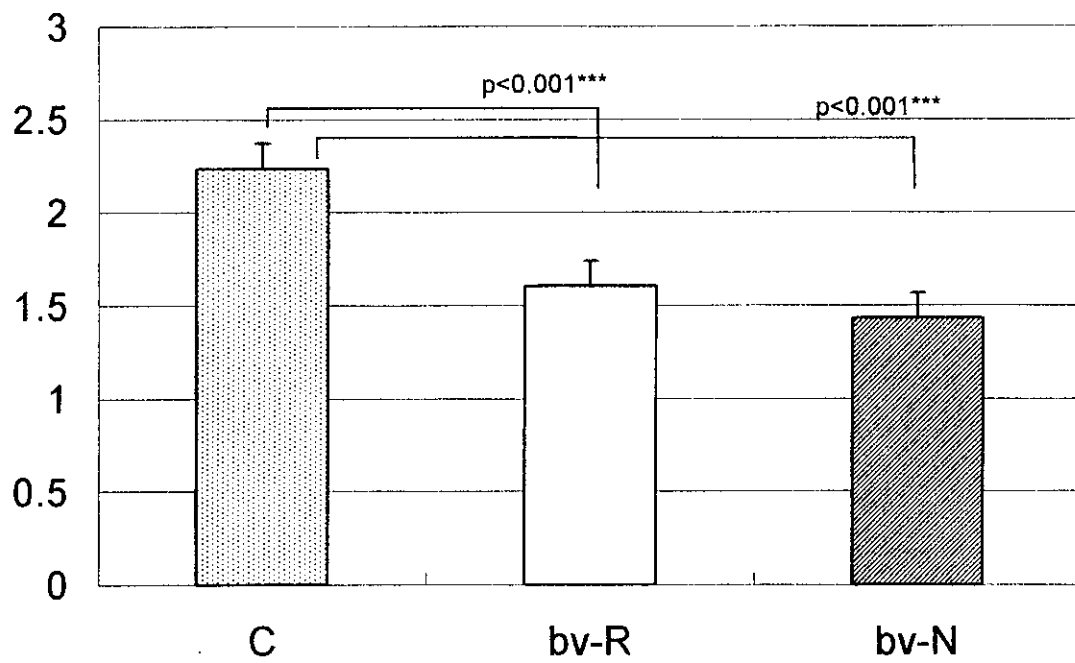
c. HVA

ng/mg brain



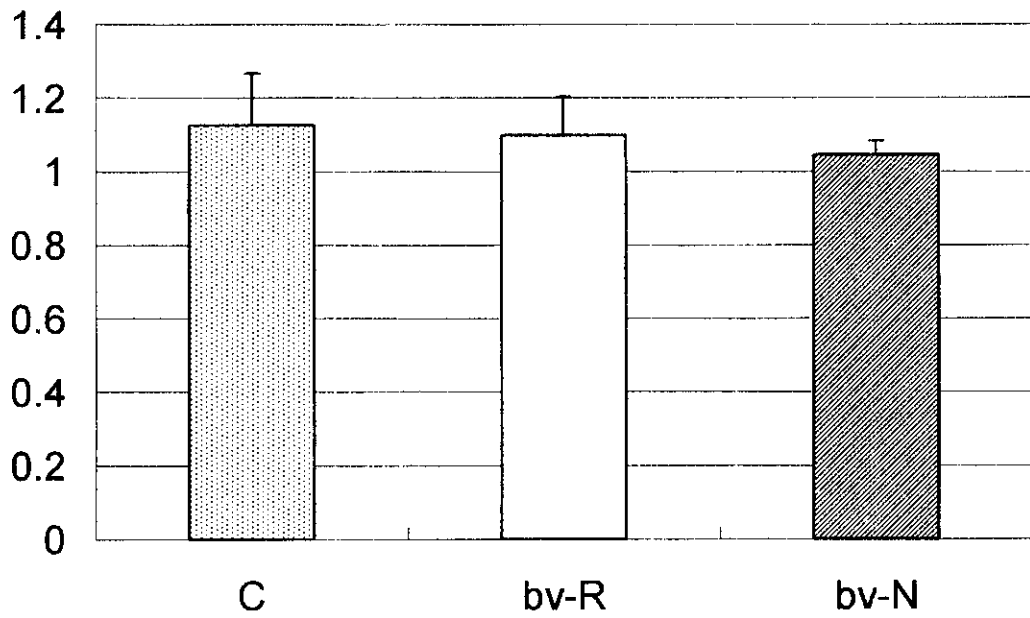
d. 3-MT

ng/mg brain



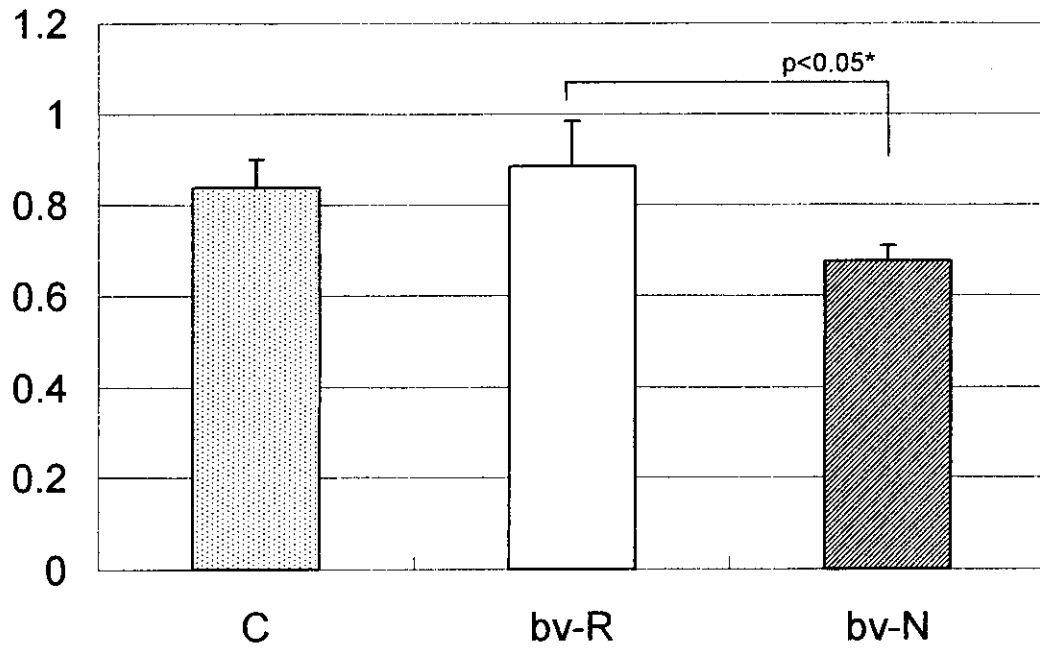
e. 5-HT

ng/mg brain

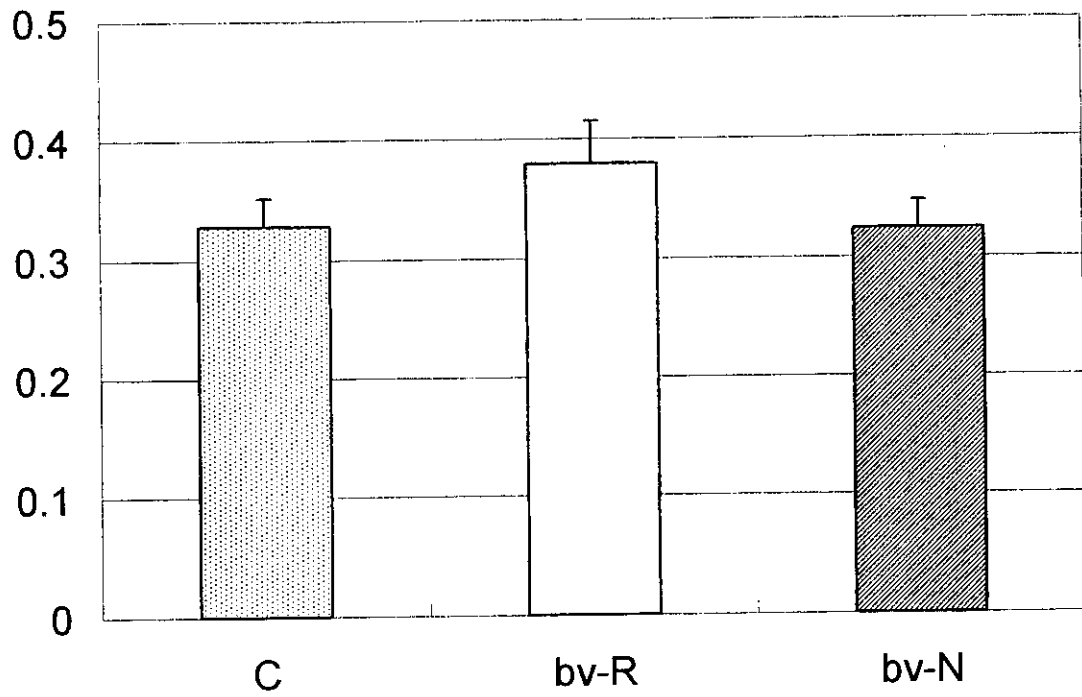


f. 5-HIAA

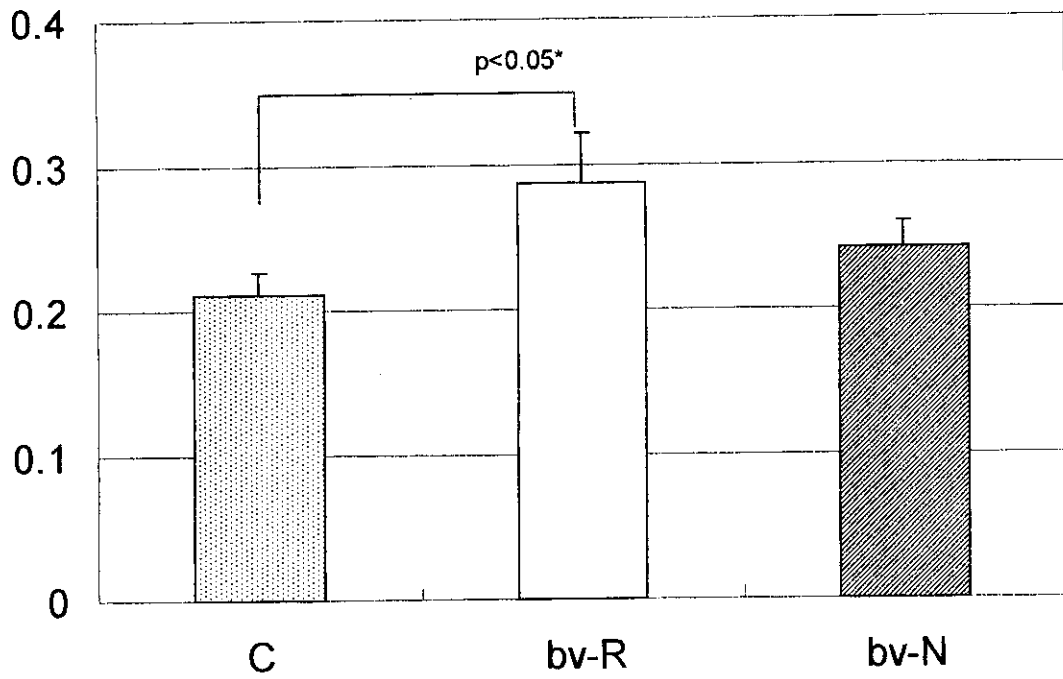
ng/mg brain



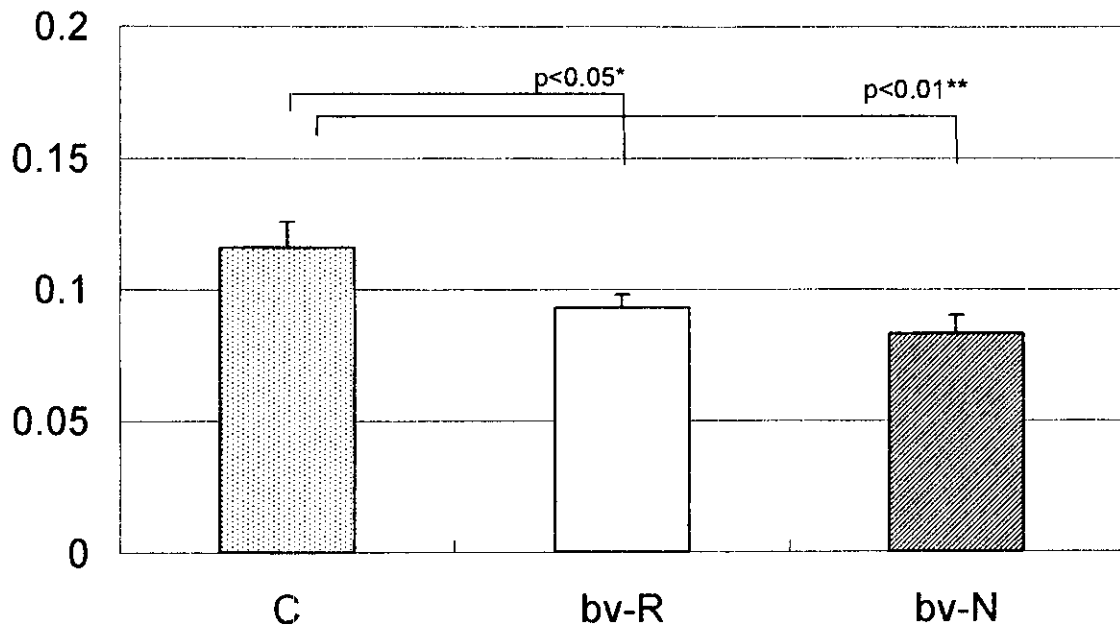
g. (DOPAC+HVA)/DA



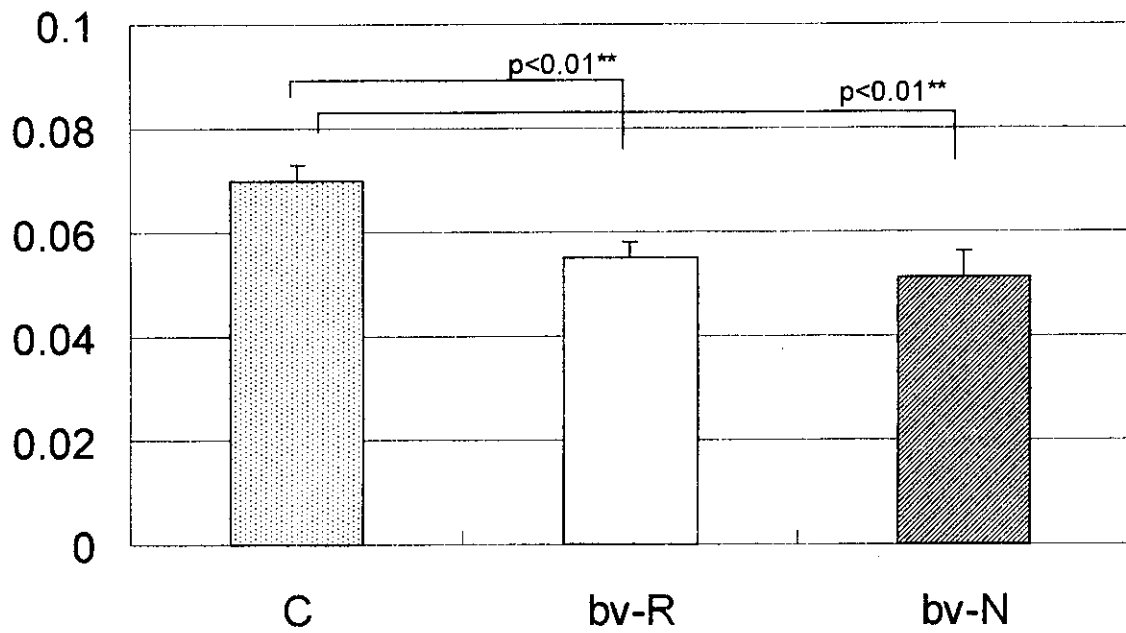
h. DOPAC/DA



i. HVA/DA



j. 3-MT/DA



k. 5-HIAA/5-HT

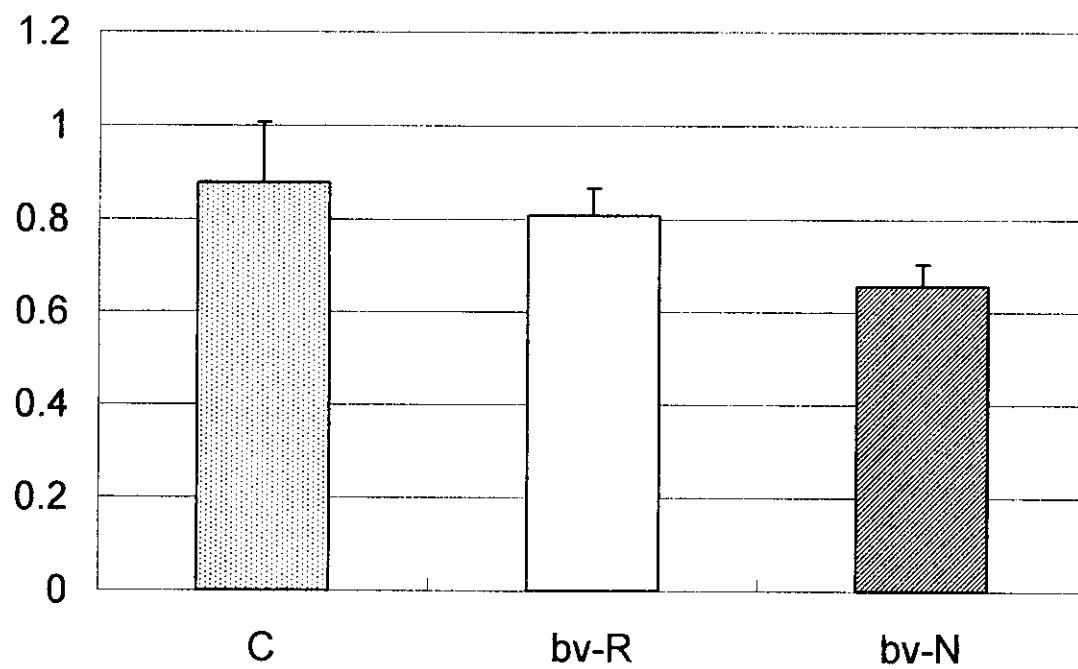
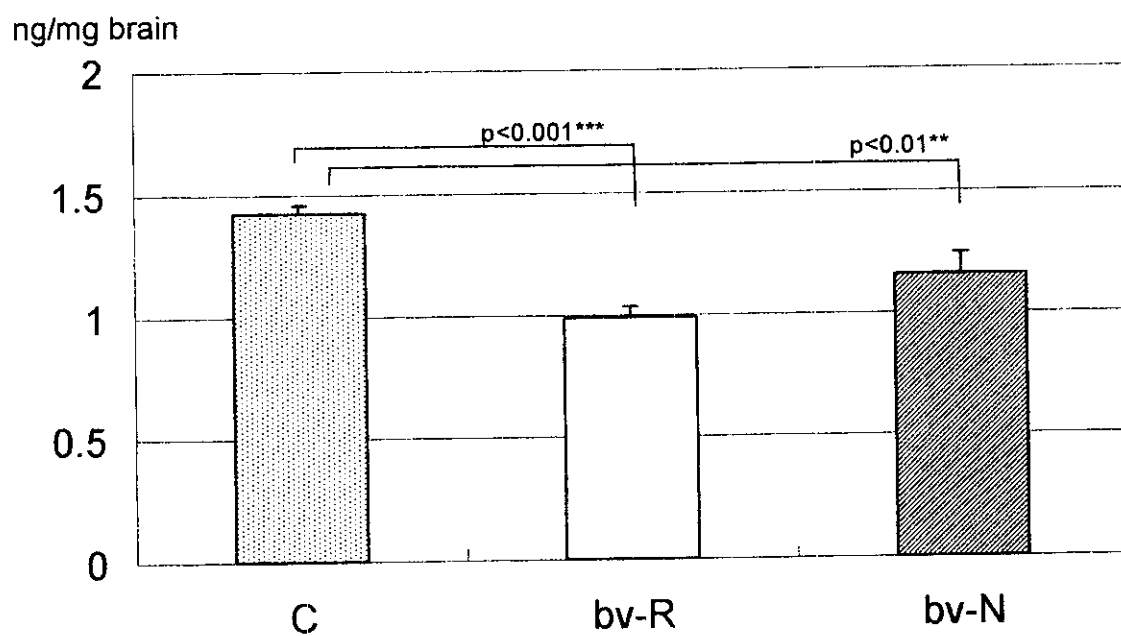
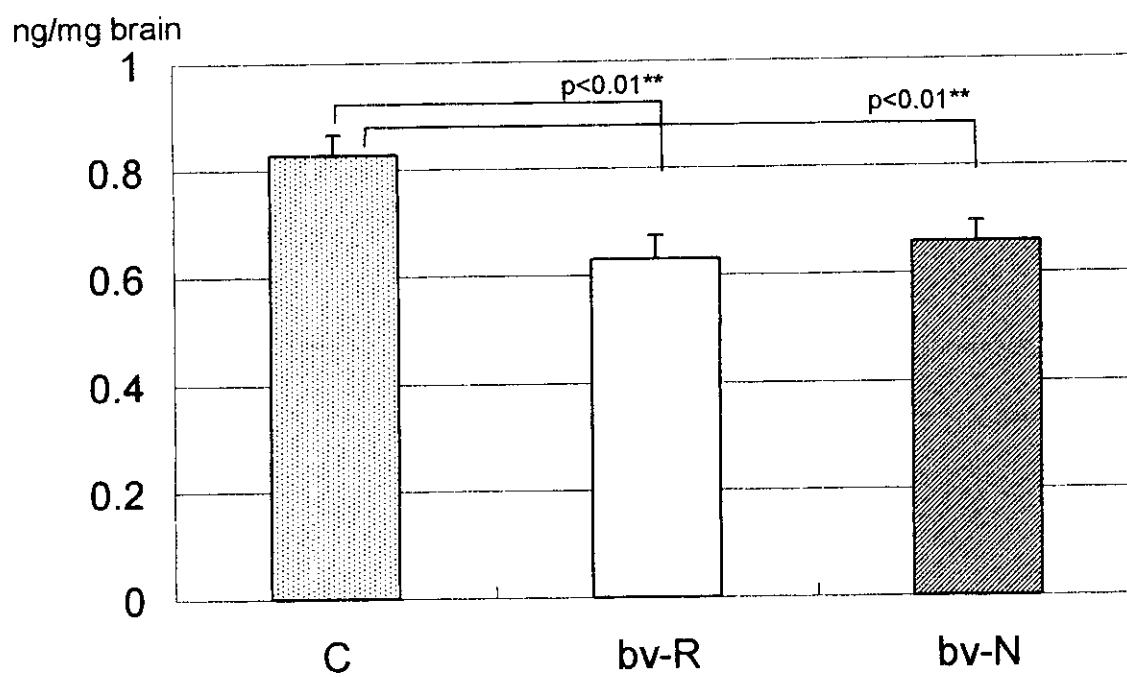


図4 mid brain モノアミン計測値

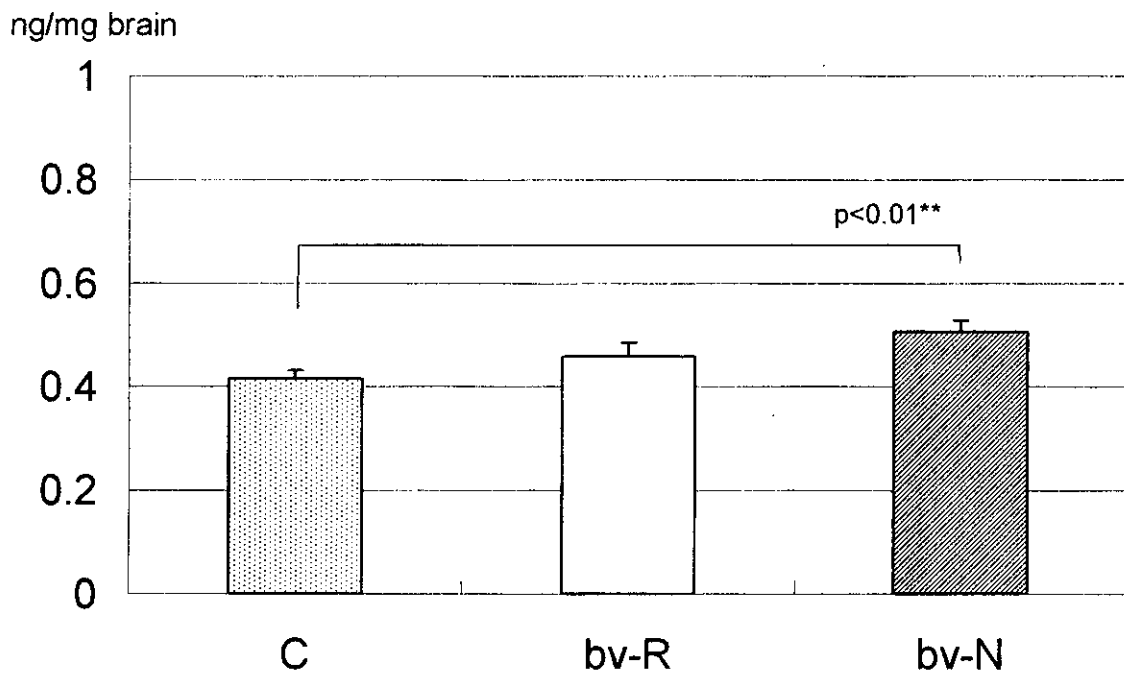
a. NE



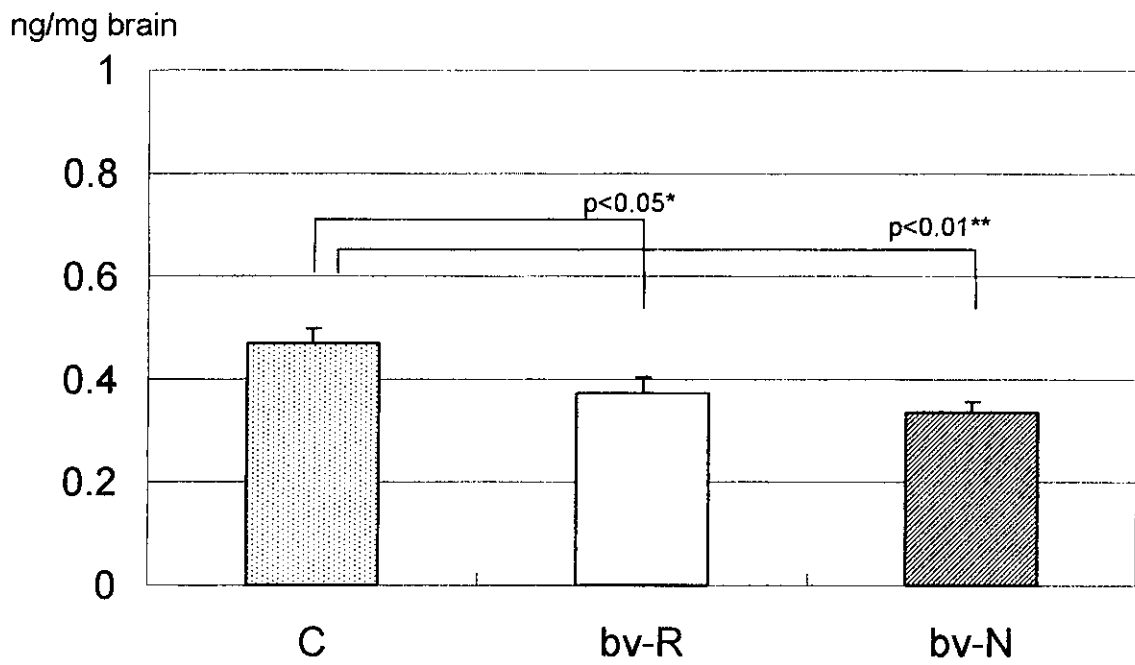
b. DA



c. DOPAC

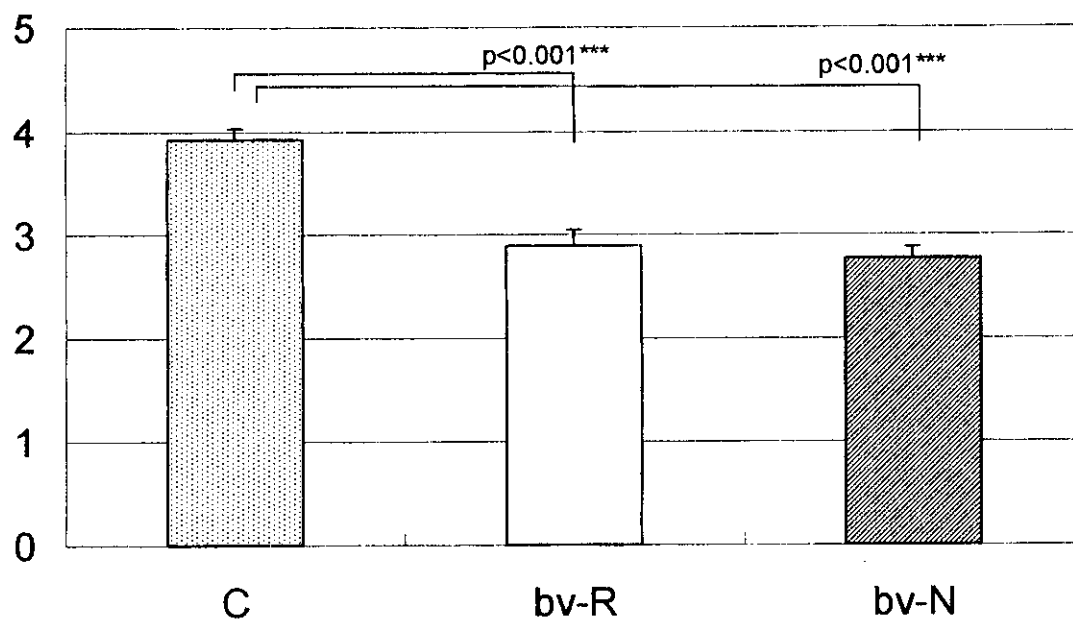


d. HVA



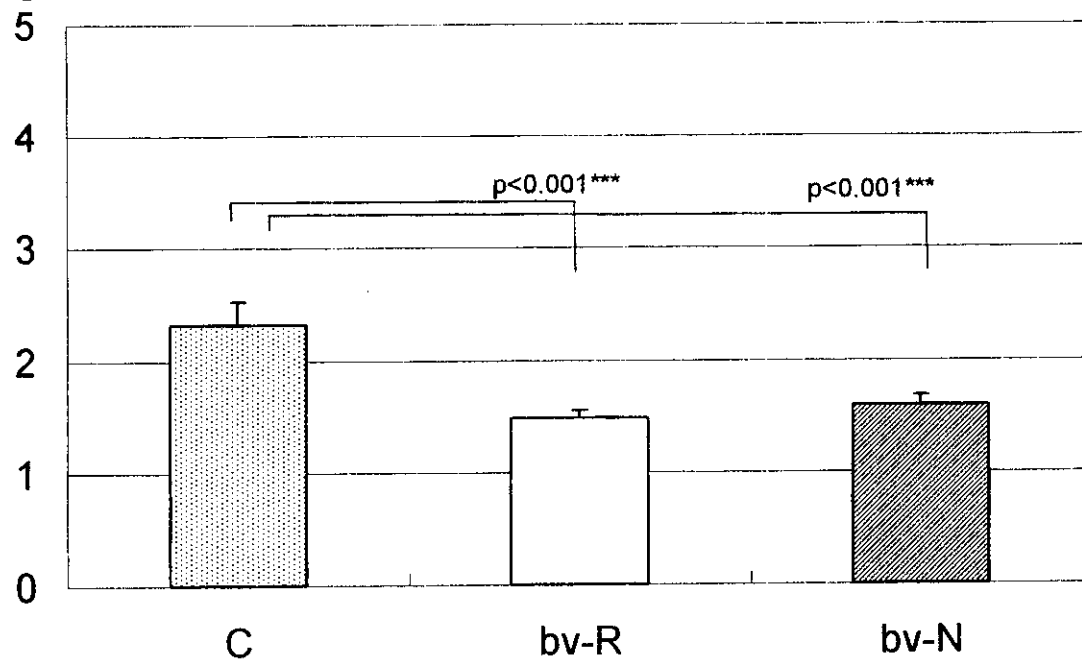
e. 5-HT

ng/mg brain

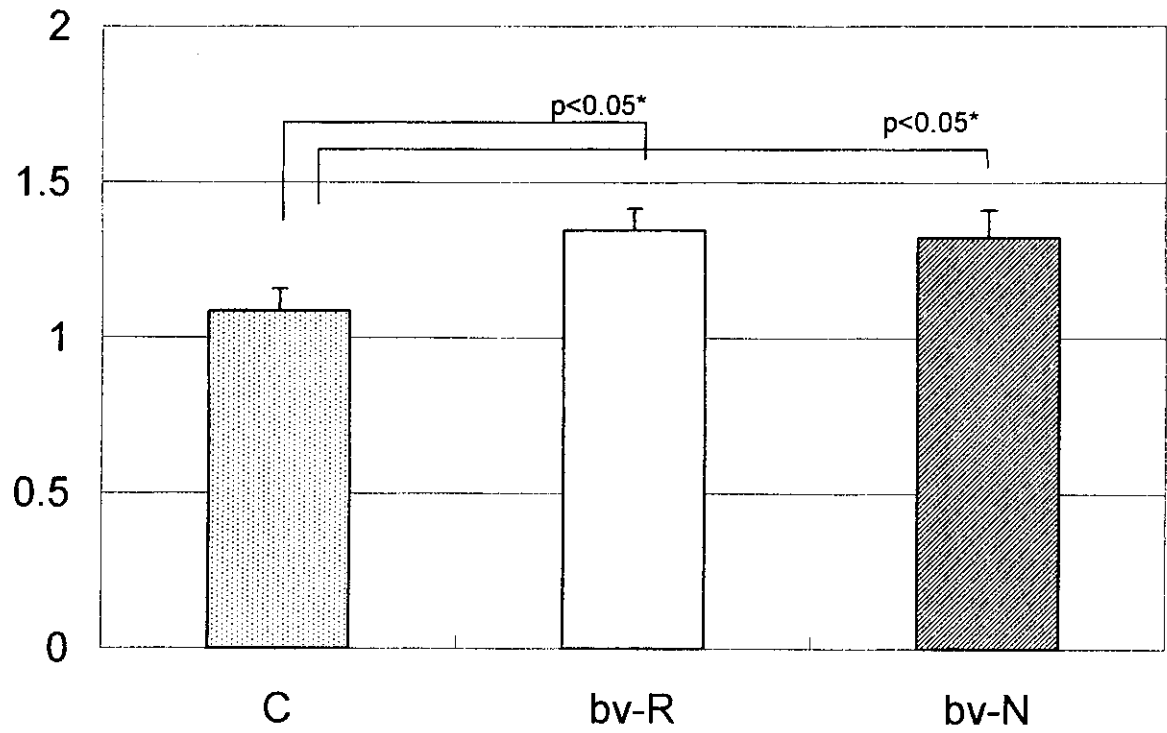


f. 5-HIAA

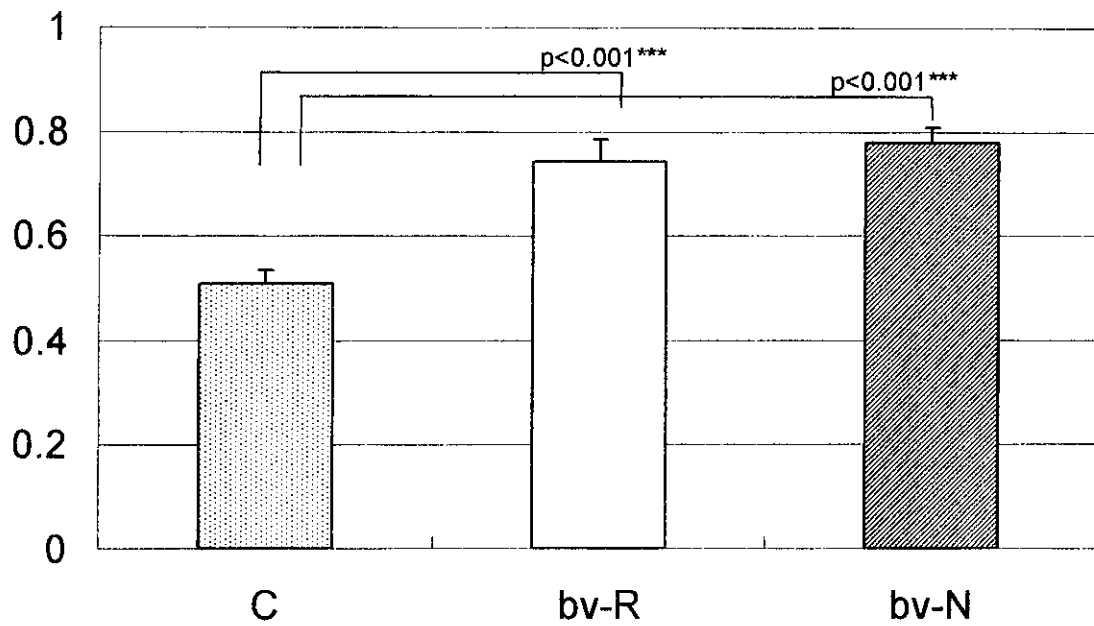
ng/mg brain



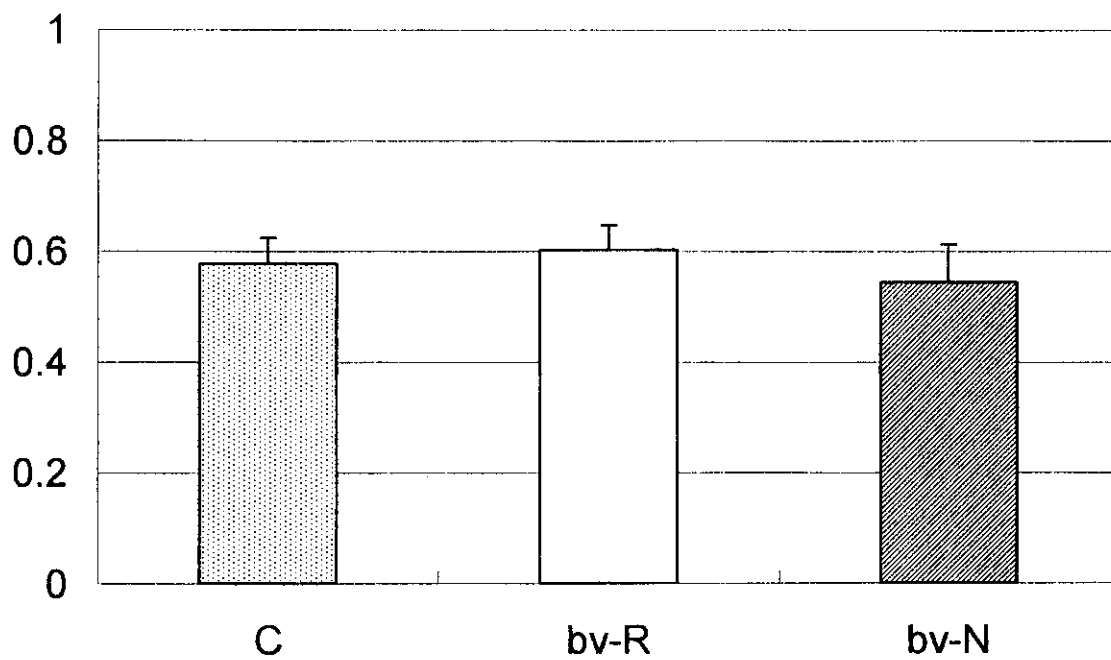
g. (DOPAC+HVA)/DA



h. DOPAC/DA



i. HVA/DA



j. 5-HIAA/5-HT

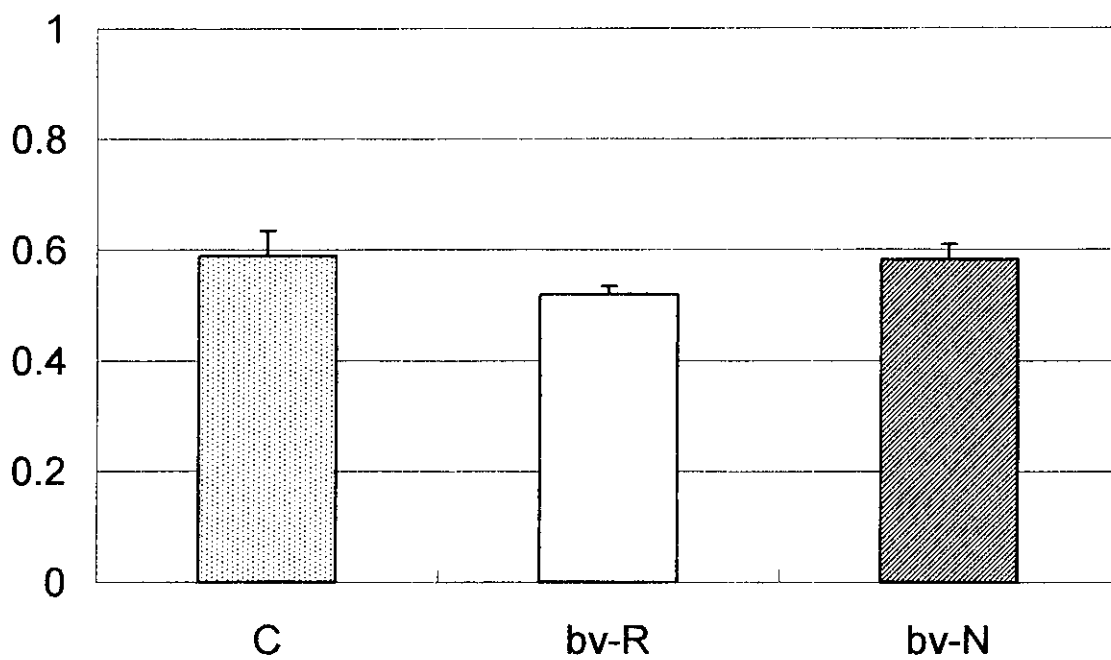
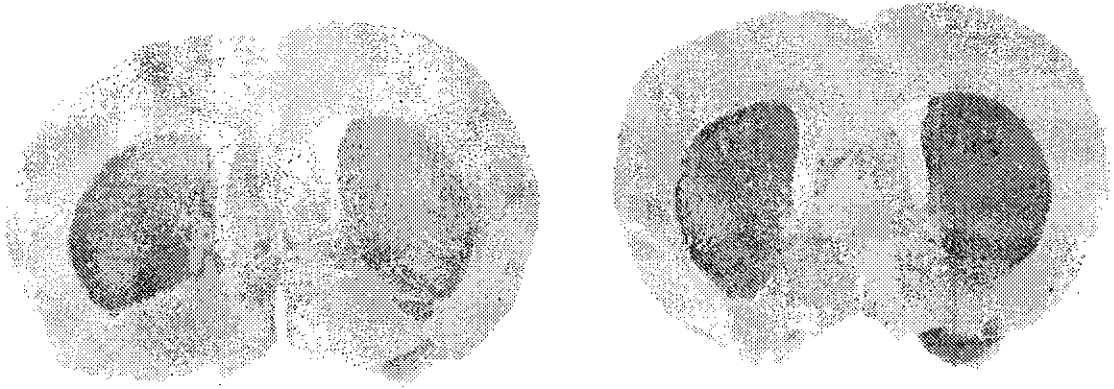


図5 Tyrosine hydroxylase 免疫染色(ABC法)

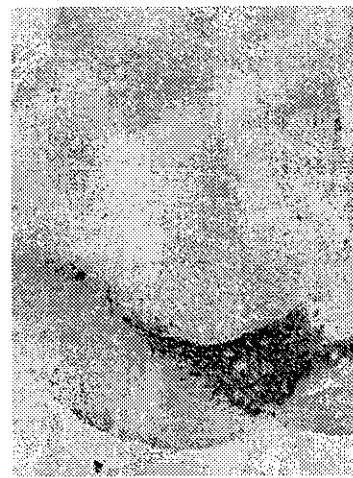
a: striatum



b: midbrain



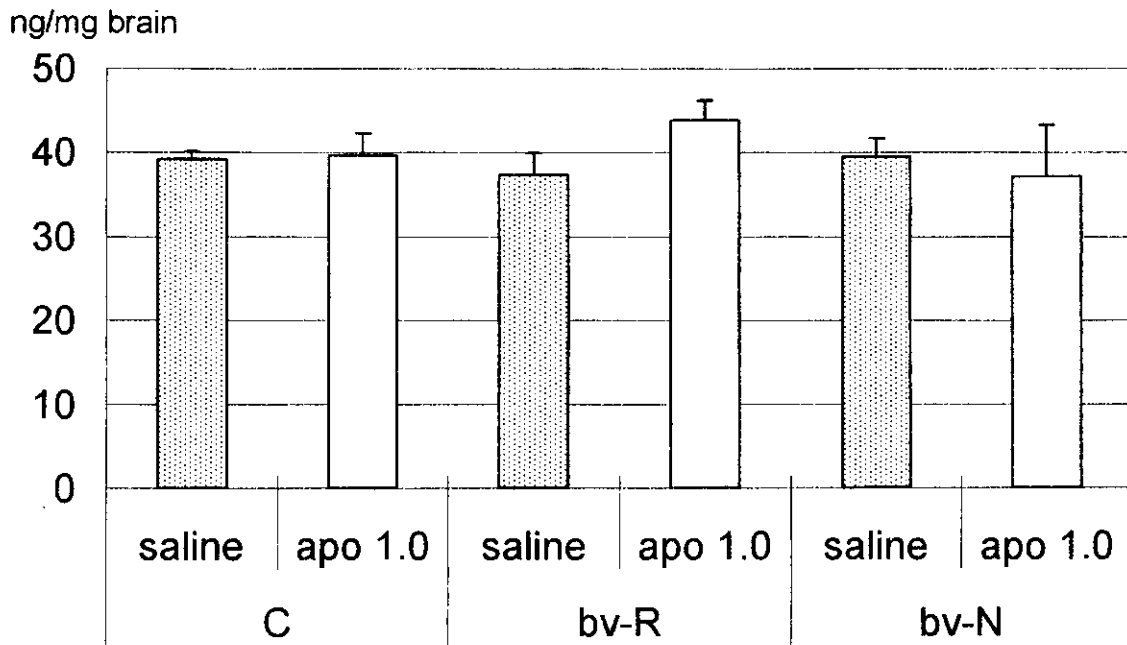
Control



bv

図6 striatum 中の apomorphine 投与時におけるモノアミン変化

a. DA



b. DOPAC

