

図4 bv 治療群 (bv-SCT) 軽快耳における ABR 波形変化

A; 1 カ月齢, B; 3 カ月齢

▼ II 波 ○ IV 波

3 カ月時に 135dB 音での II 波振幅が増大した。また, IV 波は低振幅ながら 80dB 音に対して認められたが, 60dB 音には不明瞭であった。

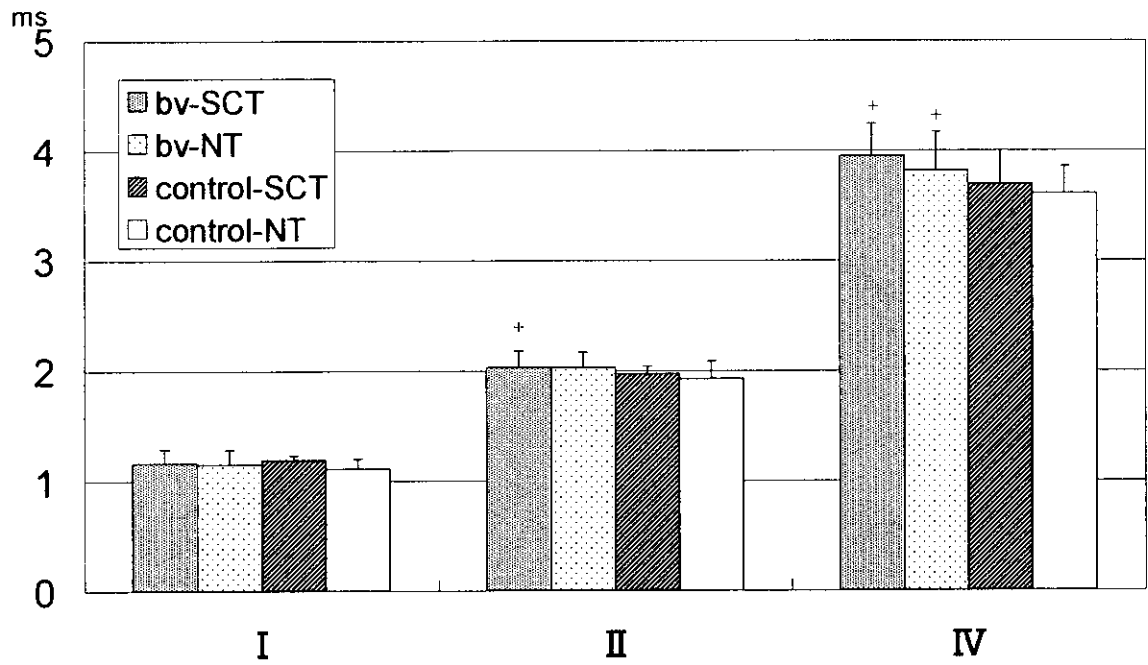


図5 各群の ABR 潜時比較

\* : 治療群 vs. 未治療群 \*; p<0.05, \*\*; p<0.01, \*\*\*; p<0.001  
 + : bv vs. 対照群 +; p<0.05, ++; p<0.01, +++; p<0.001  
 bv, 対照群ともに治療によって ABR 各波潜時の変化はなかった.

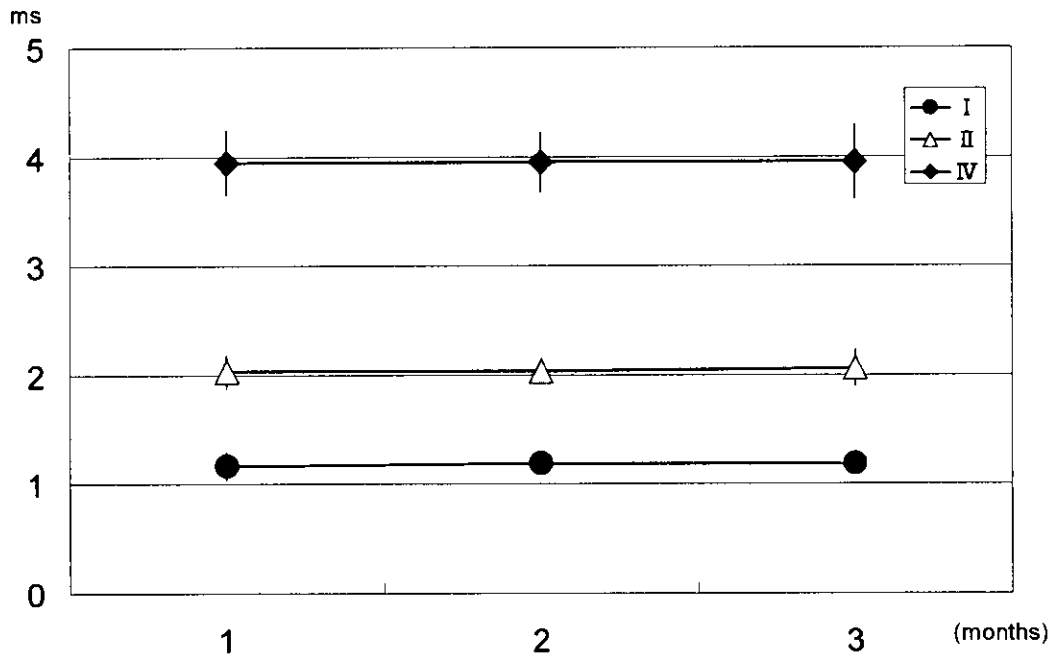


図6 bv 治療群 (bv-SCT) における ABR 潜時の月齢による変化  
 bv 治療群全例を平均した結果, ABR 各波潜時の変化は  
 なかった.

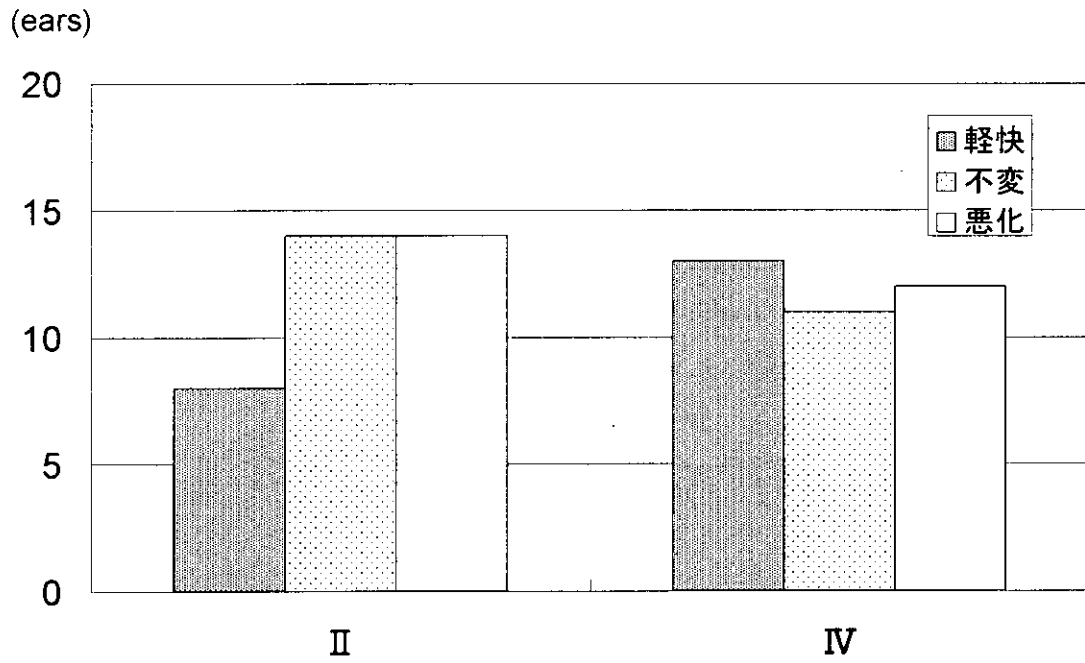


図7 bv 治療群 (bv-SCT) における ABR 潜時の経時変化  
 II 波, IV 波とも 6 割以上に ABR 潜時の維持, 改善が認められた.

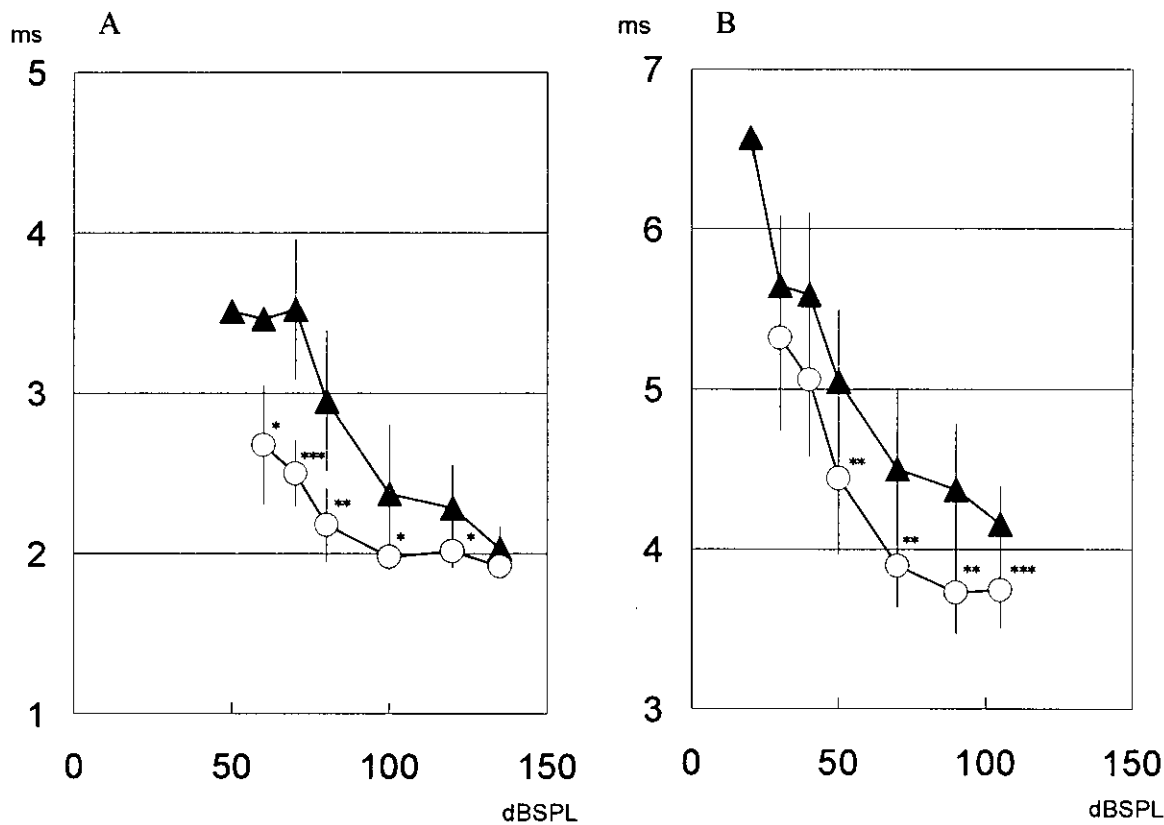


図8 bv 治療群(bv-SCT)における ABR 軽快群の刺激-潜時比較

A; II波, B; IV波 ▲; 1ヵ月齢, ○; 3ヵ月齢

\*;  $p < 0.05$ , \*\*;  $p < 0.01$ , \*\*\*;  $p < 0.001$

II波においては, 最大刺激音圧では差がなかったものの, 音圧を下げるにつれて改善効果が強く現れるようになった. 一方, IV波では音圧が高いほど改善効果が強く, 低音圧では改善しているものの有意な差ではなかった.

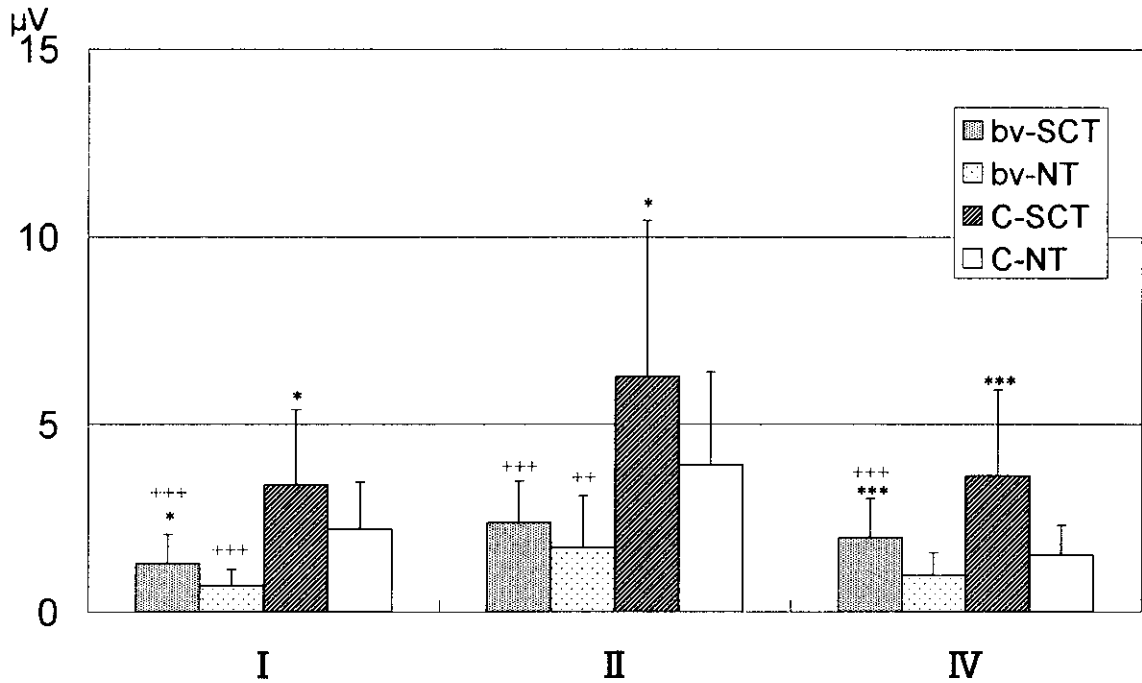


図9 各群間における ABR 振幅比較(135 dB SPL 刺激音)

\* : 治療群 vs. 未治療群 \*; p<0.05, \*\*; p<0.01, \*\*\*; p<0.001

+ : bv vs. 対照群 +; p<0.05, ++; p<0.01, +++; p<0.001

bv, 対照群ともに治療に伴う ABR 各波振幅の増大が認められた。

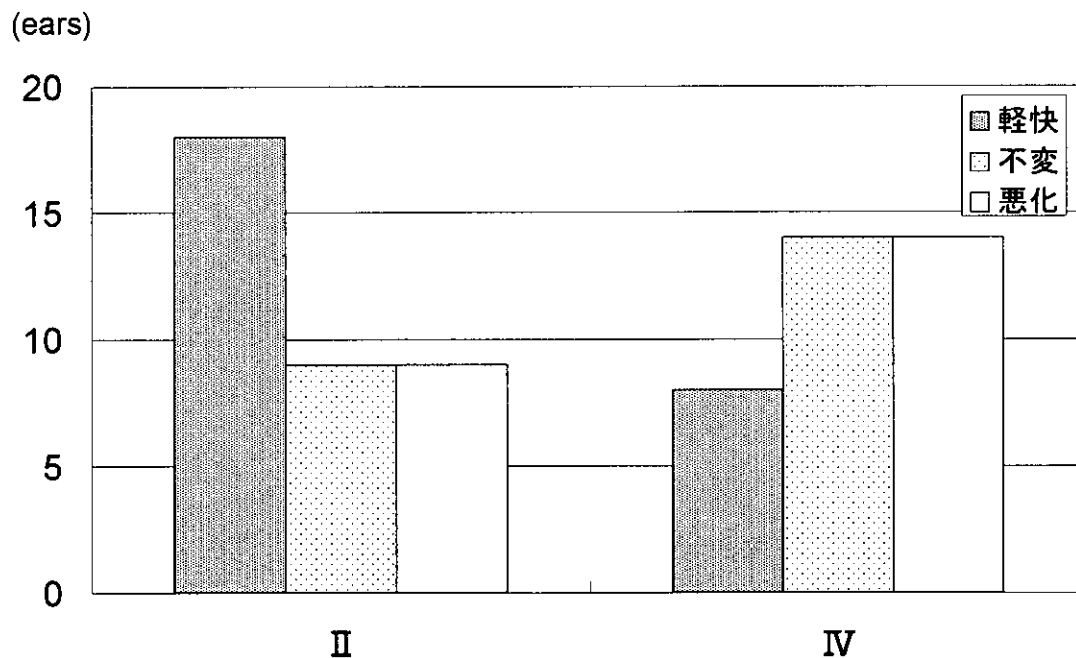


図 10 bv 治療群 (bv-SCT) における ABR 振幅の経時変化  
 II 波では 75%に, IV 波では 61.1%に振幅の維持ないし改善が認められた。  
 特に II 波では軽快例が全体の半数を占めていた。

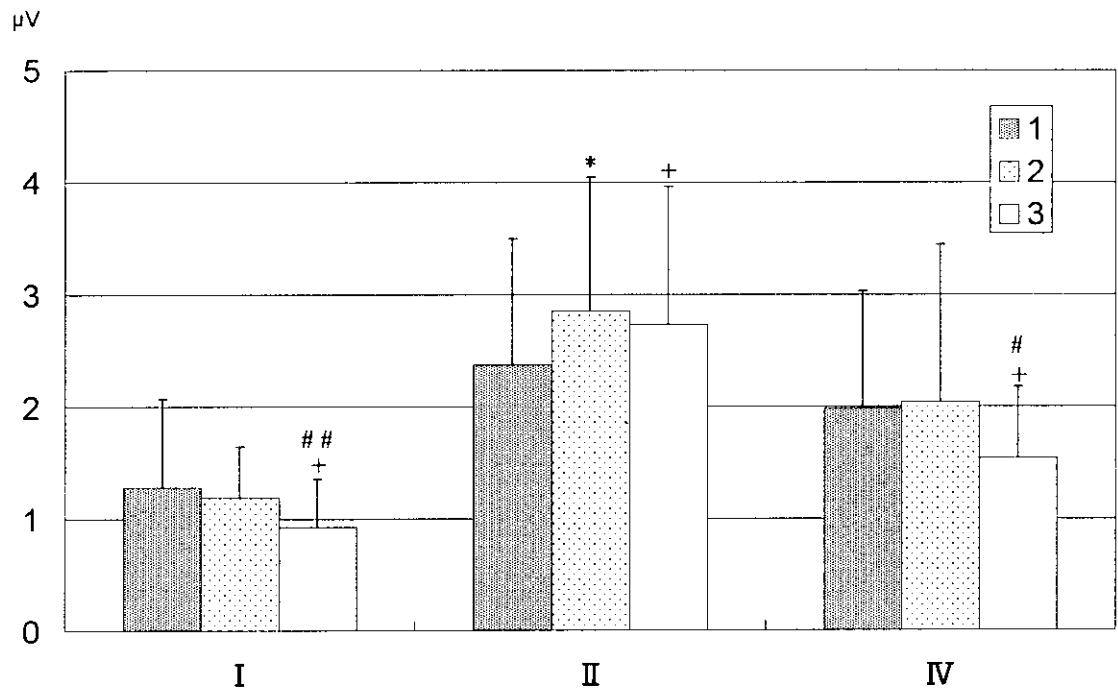


図 11 bv 治療群 (bv-SCT) における ABR 振幅の月齢変化

\* : 1 カ月齢 vs. 2 カ月齢, \* ;  $p < 0.05$

+ : 1 カ月齢 vs. 3 カ月齢, + ;  $p < 0.05$

# : 2 カ月齢 vs. 3 カ月齢, # ;  $p < 0.05$ , ## ;  $p < 0.01$

(対応ある t 検定による)

I, II 波では, 1, 2 カ月齢に対し 3 カ月齢で ABR 振幅が有意に減少した.

II 波では逆に, 1 カ月齢に比べ 2, 3 カ月齢にて有意な振幅増大が認められた.



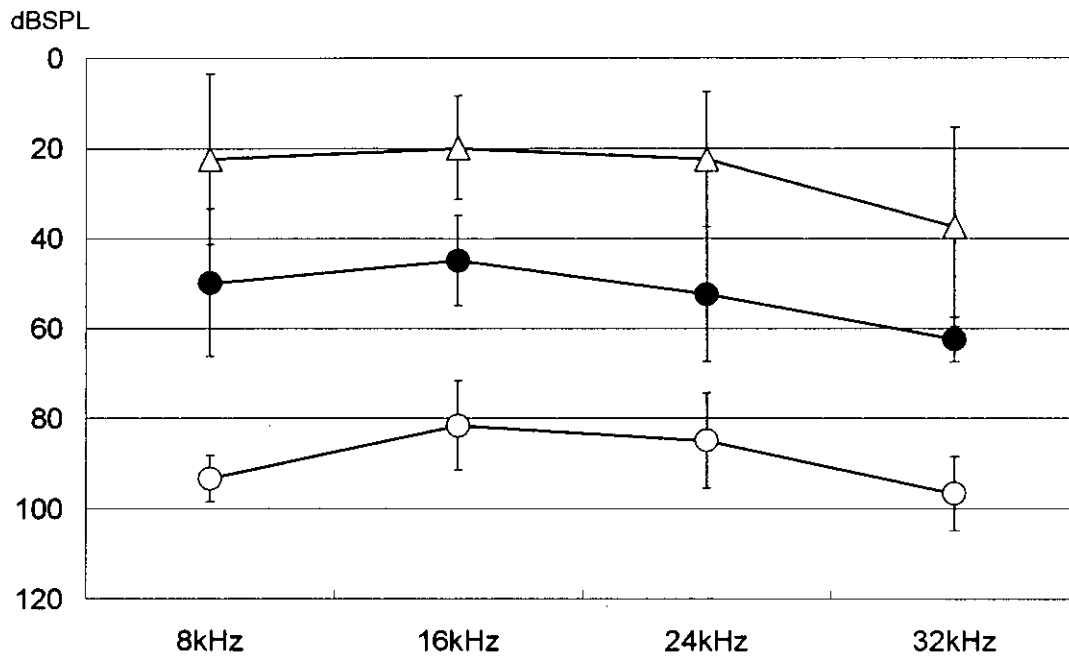


図 12 Tone-burst 音の各周波数における ABRIV 波閾値の変化 (2 ヶ月齢)

● : bv 治療群, ○ : bv 未治療群, △ : 対照群

bv 治療群は全ての周波数刺激音に対して ABRIV 波閾値の改善が中等度認められたが, 対照群の値にまで達しなかった.

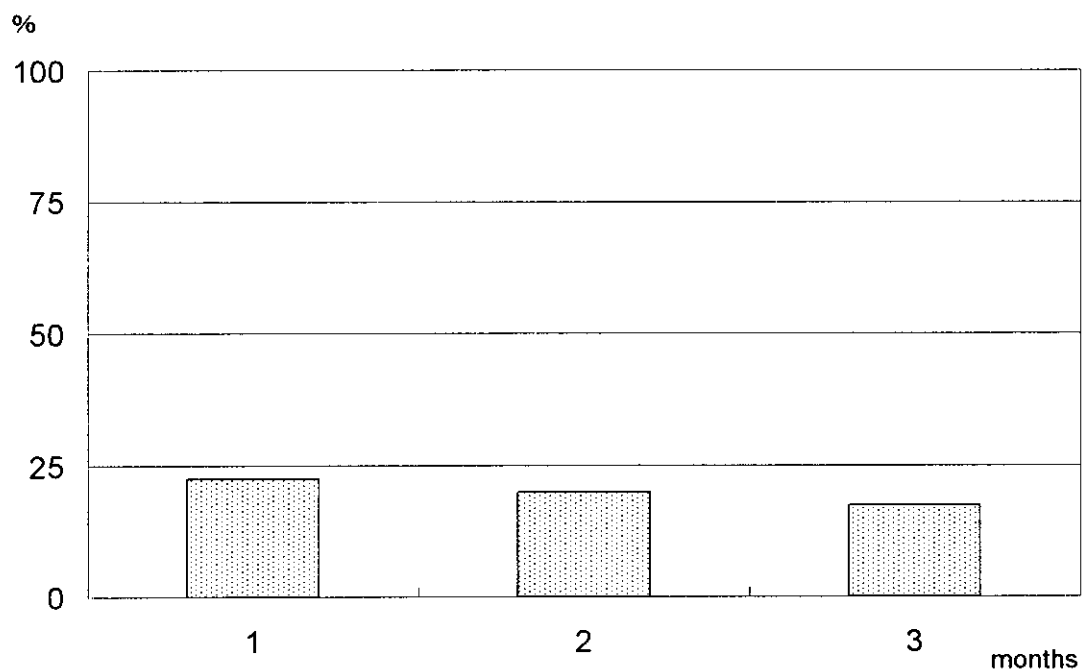


図 13 bv 治療群 (bv-SCT) における DPOAE 非検出率の月齢変化  
 bv 治療群は月齢とともに DPOAE 非検出率が低下する  
 傾向が認められた。

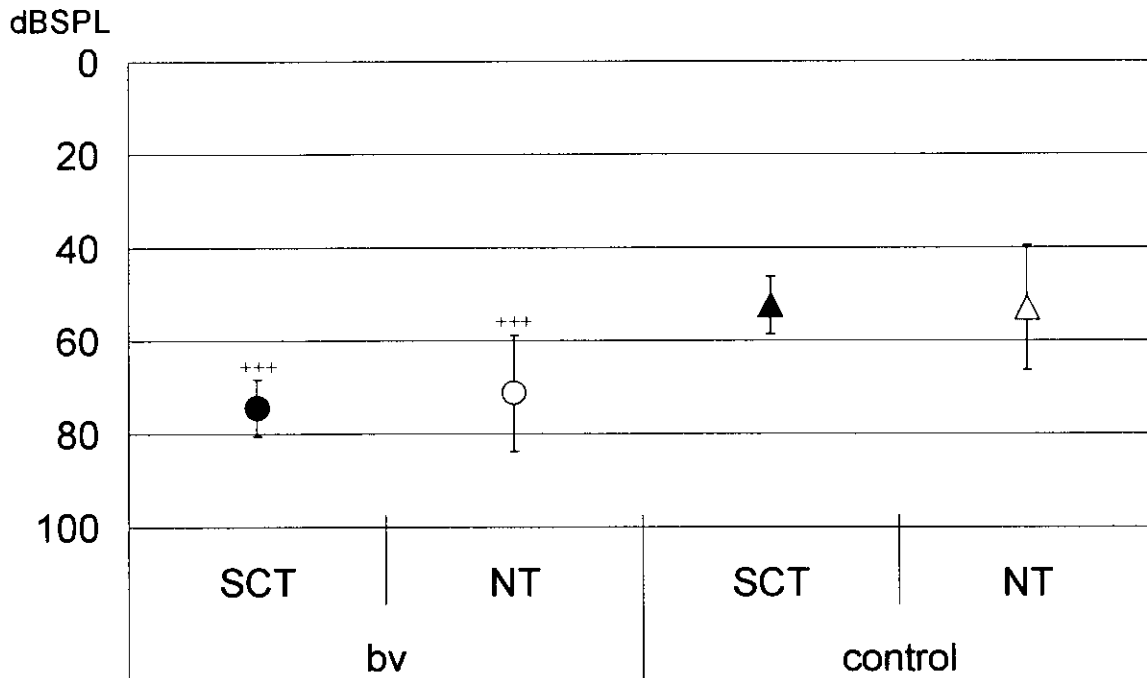


図 14 各群間における DPOAE 閾値比較

\* : 治療群 vs. 未治療群 \*;  $p < 0.05$ , \*\*;  $p < 0.01$ , \*\*\*;  $p < 0.001$

+ : bv vs. 対照群 +;  $p < 0.05$ , ++;  $p < 0.01$ , +++;  $p < 0.001$

bv 群, 対照群ともに治療に伴う DPOAE 閾値の変化は認められなかった.

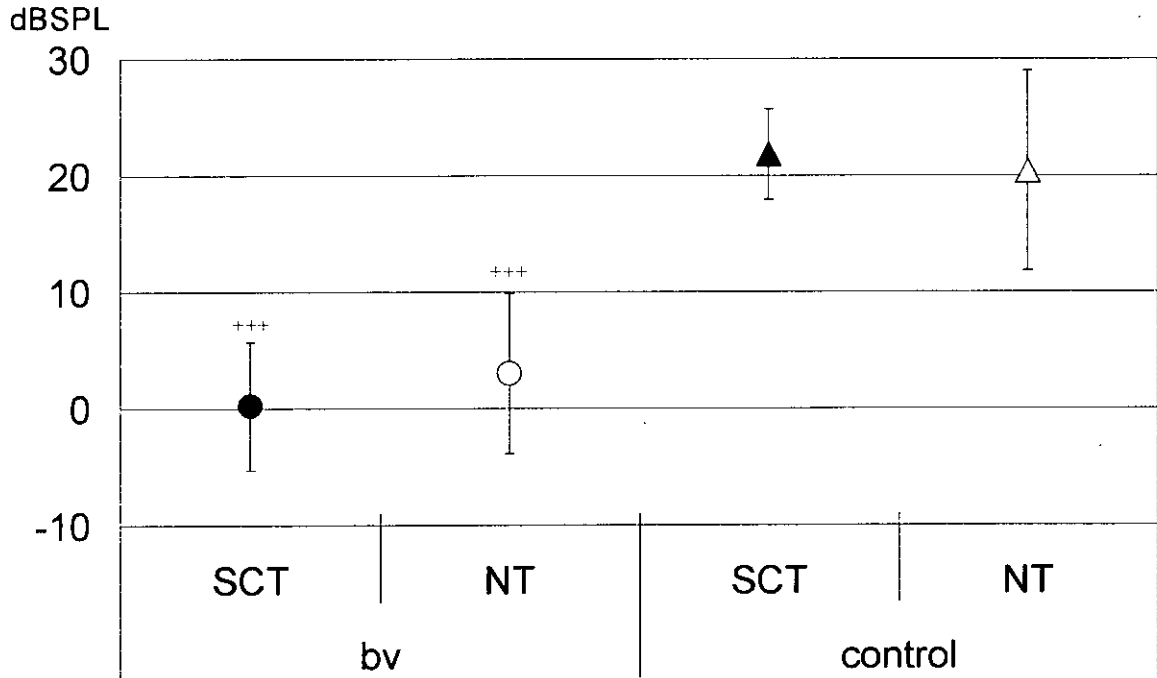


図 15 各群間における DPOAE-最大 DP 値比較

\* : 治療群 vs. 未治療群 \*;  $p < 0.05$ , \*\*;  $p < 0.01$ , \*\*\*;  $p < 0.001$

+ : bv vs. 対照群 +;  $p < 0.05$ , ++;  $p < 0.01$ , +++;  $p < 0.001$

bv, 対照群ともに治療に伴う DPOAE-最大 DP 値の変化は認められなかった。

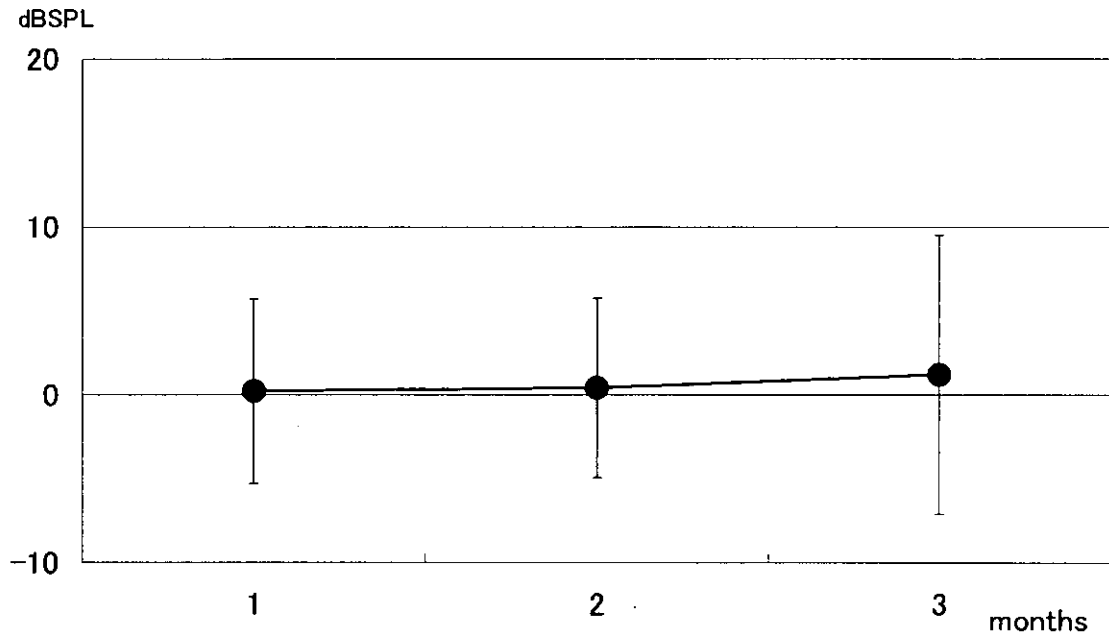


図 16 bv 治療群 (bv-SCT) における DPOAE 最大 DP 値の月齢変化  
 bv 治療群における DPOAE-最大 DP 値の経時変化は認められなかった。

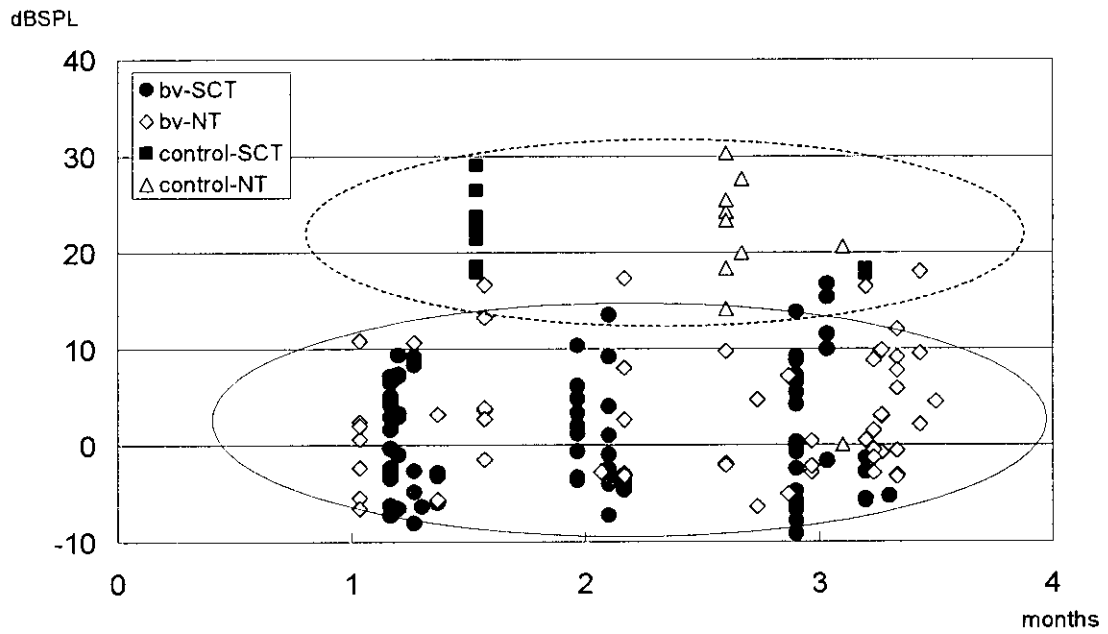


図 17 各群の DPOAE 最大 DP 値の月齢による分布  
 bv と対照群の間では DPOAE-最大 DP 値の分布に差があった。  
 一方、治療および月齢による違いは認められなかった。

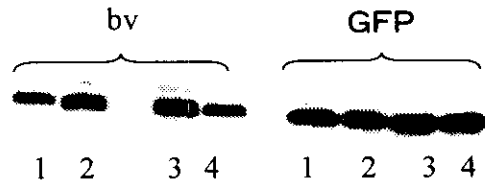


図 18a GFP のウェスタンブロット

GFP は GFP-TG マウスでは中枢神経系に均等に発現していた。

一方、生後 3 ヶ月 bv では頭頂葉皮質と中脳に比較的多く存在していた。

(1:橋, 2:中脳, 3:頭頂葉皮質, 4:前頭葉皮質)

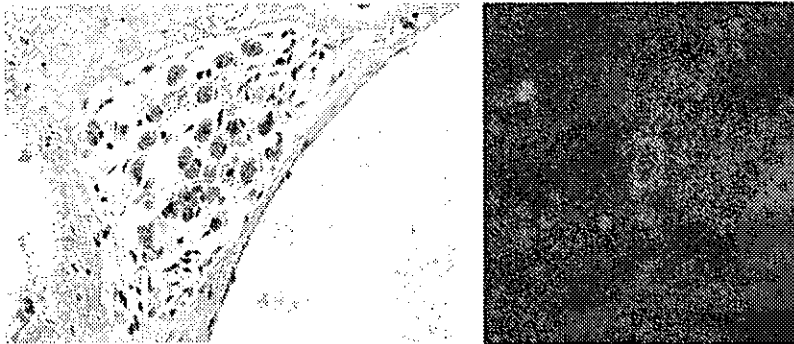


図 18b 治療群 bv(1 ヶ月)のラセン神経節蛍光顕微鏡像

左のHE染色で細胞の存在する場所にはほぼ一致して  
緑色蛍光が得られた。

## II. 分担研究報告

### 2. 遺伝性難聴 bv にみられる回転性行動異常の病態解明と治療に 関する研究

稲垣真澄



厚生労働科学研究費補助金（感覚器障害研究事業）  
分担研究報告書

遺伝性難聴マウス bv にみられる回転性行動異常の病態解明と治療に関する研究

分担研究者 稲垣真澄  
国立精神・神経センター精神保健研究所  
知的障害部 診断研究室長

研究要旨

遺伝性難聴マウス Bronx waltzer (bv/bv) の回転性行動異常の原因を明らかにするため耳音響放射と聴性脳幹反応を測定したところ、回転群と非回転群の間に聴力閾値の明らかな差はなかった。一方、脳内モノアミン値は回転群、非回転群とも中脳のドーパミン (DA) 値低下があるものの線条体では対照群と有意差がみられなかった。DA 代謝率は線条体、中脳ともに亢進する傾向があり、回転群線条体では DOPAC/DA 比が高く、HVA/DA 比が低かった。線条体ドーパミン受容体結合能は D1 系の有意な機能低下が認められた。また、DA 受容体の直接的・間接的作動薬が bv の回転や多動行動を抑制する「逆説的効果」が観察された。以上より、本マウスは DA 伝達の障害が基盤にあると考えられ、ヒト AD/HD などの多動病態の一側面を反映する動物モデルと考えられた。

A. 研究目的

Bronx waltzer mouse (bv) マウスは自然発生で見出された遺伝性難聴マウスで、5 番染色体に原因遺伝子座がある<sup>1,2)</sup>。本マウス内耳蝸牛病変の特徴は内毛細胞のみにもみられる選択的変性および細胞死であり、それが出生後 1 週間で生じ、約 20 パーセントの細胞は生存する<sup>3)</sup>。我々は新生仔期から生後 1 カ月までの bv 蝸牛を電顕的に検討し、外毛細胞の形態異常がみられないことと聴覚求心系に局限した病変であることを確認した。これらの点から bv はヒト先天難聴病態の純粋なモデルと考えられる<sup>4)</sup>。

bv の頭部を振る動作やワルツ様の行動は今まで難聴に伴うものとして理解されてきた<sup>1)</sup>。一方、マウスの「回転性行動異常」に関しては、黒質線条体系のドーパミン (DA) 系経路の片側性病変によりひきおこされるものや Whirler mouse の 'circling behavior' 等が報告され<sup>5)</sup>、脳内モノアミン系とくにドーパミン (DA) 系機能障害の関与が注目されている。本研究では bv マウスにみられる回転運動が難聴に伴うものか否か、そして脳内モノアミ

ン系障害と関わるのかを明らかにするため bv 回転群と非回転群の聴力および脳内モノアミン値の比較検討を行った。さらに、DA 系作動薬や阻害薬投与による回転行動への影響を評価し、ヒトの多動モデルとしての可能性について検討した。

B. 研究方法

3~6 カ月齢の bv マウスと BALB/c 系マウス、ICR 系マウスを対象として以下の実験を行った。まず bv 群の日中の行動を 1 匹毎ビデオテープに記録し、行動パターンの特徴を解析した。さらに行動量解析はニューロサイエンス社製 DAS システムでカウントした。本システムはマウスの体から放出される赤外線センサーで感知し、時間当たりの移動数を計測できる特徴を持つ。ケージ内におけるマウスの行動を運動量として持続的に測れるため、日常生活や睡眠・活動パターンなどのサーカディアンリズムを検討することも可能となる。本研究では対象マウス一個体の 1 分あたりの移動回数と夜間の 12 時間連続記録による積算値を求めた。

聴力検査は Distortion Product Otoacoustic Emission (DPOAE) の DP growth 法 (f2 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 IV 波閾値を求めた。

モノアミン測定は EiCom 社の HPLC-ECD300 を用いて線条体および中脳の脳内モノアミンを測った。薬物投与の場合は投与後 30 分に断頭して, アイスプレート上で各脳部位を取り出し,  $-80^{\circ}\text{C}$  で一定期間保存したのちに測定に用いた。HPLC-ECD300 は Macintosh software Power Chrom ver 2.1.3J でコントロールされ, DA およびその代謝産物, セロトニンおよびその代謝産物, エピネフリン等のクロマトグラムを求めてエリア解析を行い, カテコラミン値 (ng /mg brain) を求めた。なお, 内部標準として Isoproterenol 200ng を用いた。

薬物投与実験は DA 受容体作動薬として Apomorphine, Quinpirole を各々 1mg/kg body weight, 0.5mg/kg body weight 腹腔内投与した。拮抗薬は D1 系として SCH23390 (0.5 mg/kg body weight), D2 系として raclopride (1.0 mg/kg body weight) を投与した。そのほかに中枢神経刺激薬として Methamphetamine (2.0 mg/kg body weight) や Methylphenidate (10 mg/kg body weight), そして Dopamine transporter selective inhibitor である GBR-12909 (10 mg/kg body weight) を投与した。なお, 薬物投与は夜 10 時に統一した。いずれも投与前後の行動量を DAS システムでカウントし, 一部の個体は投与後 30 分での脳内のモノアミン値も測定した。

受容体機能は D1-R については [3H]SCH23390, D2-R については [3H]YM-09151-2 を標識リガンドに用いた。培養細胞系で確立された方法<sup>6)</sup>と同様に, 解析ソフトウェア EBDA/LIGAND を用いて最大結合量 (Bmax) 及び解離定数 (Kd) を求めた。なお, 上記のデータに関する統計学的処理にはパッケージソフト Stat View for Windows ver 4.5 を用いて有意差検定を行

った。

## C. 研究結果

### 1) 行動パターンについて

回転群 bv マウスの行動パターンは夜間に目立つ回転運動であり, そのスピードがきわめて速く, 時に 8 の字様の動きも示した。二次元的な動きが多く, rearing や grooming が少ない特徴を示した。回転方向性はマウス毎で様々であり, とくに決まっていなかった。すばやい回転は 10 回程度で止まり, 停止後同一方向への回転, あるいは逆向きへの回転がみられた。回転は下半身を殆ど動かさずに回る自転様の動きと一定の半径をもって回転する二つのタイプに分けられた。一瞬行動を停止したときに飲水や摂食行動をおこなっていた。同一ケージに入れた回転群 bv マウス 2 匹はそれぞれ同方向に回転する場合と逆方向に回転する場合がみられ, 隣接した回転でも衝突することなく巧みに体をかわした。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。一方, bv マウスには同胞でも回転行動を示すもの, 全く示さないもの (非回転群) が存在した。

また, bv マウスは回転群, 非回転群に関わらずマイペースであり, 探索行動をいっさい示さなかった。そして, 他のマウスや遊具など周囲の環境にあまり興味を示さない特徴がみられた。

### 2) ABR と OAE 所見

聴力検査の結果, 回転群と非回転群に難聴の程度に差はみられなかった (図 1)。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。

### 3) モノアミン計測

線条体 DA 値は bv 回転群も非回転群も対照と比べて有意な上昇・低下はなかった。DA 代謝に関しては対照群と比較すると DOPAC/DA 比が高いこと, 逆に HVA/DA 比が低下している所見を示した。全体としての代謝率 (HVA+DOPAC/DA) は上昇していた。一方, 中脳 DA 値は bv マウスでは回転, 非

回転ともに低下しており、代謝率に関しては線条体と同様の結果を示した(図 2)。また、DA 合成酵素であるチロシン水酸化酵素は中脳黒質緻密層および線条体において免疫組織学的に明瞭に染色された。

#### 4) DA 受容体機能

線条体の DA 受容体機能をトリチウムでラベルされたリガンドを用いて、解離定数と最大結合能を計測したところ回転群では明らかに D1 受容体機能低下があり、受容体数は増加していた。D2 受容体機能・受容体数については D1 と同様の傾向がみられたが、統計学的な有意差はみられなかった(図 3)。

#### 5) 薬物による回転行動変化(図 4)

D2 受容体作動薬である Apomorphine と Quinpirole をそれぞれ少量ずつ回転群と対照群に投与した結果、回転群ではいずれの薬物も回転に対して著明な抑制があり、行動量低下がみられた。いずれも投与後1時間ではほぼ完全に無動状態になり、それが1時間持続した。その後徐々に、行動量が増えて投与 3 時間で投与前とほとんど同じ回転状態に戻った。対照群では行動が若干抑制される傾向がみられた。Apomorphine 投与後の線条体 DA 値は対照群では不変であり、回転群では増加した(図 5)。

中枢神経刺激薬である Methamphetamine と dopamine transporter inhibitor (GBR-12909)を投与したときの行動変化については、回転群でおよそ二分の一に行動量が減り、前者では 3 時間程度抑制効果が持続した。一方、対照群や bv 非回転群では行動量が一過性に増大し、回転群と非回転群では全く逆の反応を示した。とくに非回転群は Methamphetamine 投与により著しい行動増加を示した。また、Methamphetamine 投与後 30 分で脳内モノアミン値は線条体での DA の増加は回転群も対照群とも同じパターンを示した。

Methylphenidate 投与による行動量変化は同一マウスでもそのパターンが異なっていた。すなわち、全く回転していない状況で注

射すると針刺入が刺激となり、持続的な回転運動を誘発した。一方、回転行動の最中に注射できた場合、直後から回転運動が減少して、すこしリバウンドの増加を示したのちに 2 時間あまり行動を著しく抑制することもあった。別の機会では回転中に投与したが、若干抑制がみられたもののほとんど不変であった。このように Methylphenidate に対する反応性に関しては一貫した抑制とはいえなかった。しかし、対照群や非回転群では Methylphenidate 投与後約1時間続く行動量上昇がすべてのマウスに共通してみられた。

bv の回転に対してもっとも迅速かつ著明な抑制効果が得られたのは DA 受容体拮抗薬であり、とくに D1 受容体特異的拮抗薬である SCH23390 が無動状態を強くひきおこした。しかし、この行動抑制は余り持続せず、短時間で元に戻る特徴があった。また、この「無動」はカタレプシー状態ではなく、筋緊張は比較的低下していた。

#### D. 考察

本研究によって、特異的遺伝性難聴マウス「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。また、脳内モノアミン値の測定により bv は線条体における DA の基礎値に異常はなく、中脳においては対照より減少していた。DA 代謝系の指標(HVA+DOPAC/DA)は線条体、中脳ともに bv 群が高く、代謝が亢進する傾向が示された。さらに、回転群の線条体では 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。

DA 作動薬への反応性は行動量低下が回転群と対照群ともにみられた点から、節前に存在する DA 自己受容体機能に差はないものと思われた。しかしながら、Apomorphine 投与後の線条体 DA 値変化が対照群と異なり回転群では増加するパターンを示した。このことから bv での行動抑制の機序は対照マウスと異なっており、DA の増加反応が回転行動減少と関わっていることが示唆された。

一方、回転群bvの線条体はDA系受容体とくにD1受容体機能が低下し、受容体数が増えていることが示された。そして、直接的なDA作動薬に加えてMethamphetamineなどの間接的DA作動薬も回転行動抑制に有効であった。

以上より、bvマウス回転群においては線条体レベルでのDA放出障害とpost synapticの受容体とくにD1系受容体の機能障害が同時に生じており、DA伝達の障害が基盤にあると考えられた。そして、DA系の賦活が多動の改善にとって基本的に重要であったと思われる。非回転群ではMethamphetamineに対する行動量増加が投与前の10倍以上という著しいパターンを示し、対照群ではむしろDAT inhibitorに対する行動増加が目立ち両者は異なる行動反応を示した。非回転群では受容体機能が健常とほぼ同じであったため、放出不全状態にあったDAがシナプス間隙に伝達されたため過剰な行動増加反応を呈したのかもしれない。また、回転群と非回転群の遺伝的背景は難聴の点から考えても同一であると思われる。受容体機能低下が二次的に出現することで回転行動の有無を決定している可能性も考えられる。

注意欠陥/多動性障害 Attention Deficit Hyperactivity Disorder (AD/HD)の齧歯類モデルとして今まで報告された動物はいずれもカテコラミン系の機能異常に注目されている<sup>8-11)</sup>。たとえばDA系神経毒6-Hydroxydopamineを新生仔期に脳室内投与され、同時にDesmethylimipramine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によって障害側に回転する特徴を示す。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線条体における細胞外DAが対照の5倍に達し、多動を示すとされる。一方、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推測されている。高

血圧自然発症ラット(SHR)でもDA貯留低下がおこり、雄性ラットにAD/HD様の多動性行動が現れる。治療的な研究ではWhirler mouseの多動症状にMethylphenidate(Ritalin)が有効であることが知られている<sup>12)</sup>。

一方、ヒトAD/HDの家系例の遺伝的検索から5つあるDA受容体のうちとくにD4受容体が病態と関わりと注目され、DATの遺伝子多型 polymorphism にも関心が寄せられている<sup>13)</sup>。今回の検討により、bvの回転行動の背景にもDA系機能障害が示唆された点は本マウスがヒトの多動病態の一部を反映していることを示していると言えよう。もっとも小児AD/HDの臨床場面で比較的使用されるMethylphenidateへの反応性が乏しかった点はAD/HDとの類似性を示す反面、「多動」の病態の異なった側面を示唆しているのかもしれない。しかしながら、本マウスにはヒト行動異常の病態について多くの類似性があるものと思われ、その疾患モデルとして多動の発生機序や治療法をさらに追求する必要があると考えられる。

## E. 結論

遺伝性難聴マウス Bronx waltzer(bv/bv)の回転性行動異常の原因を明らかにするため耳音響放射と聴性脳幹反応を測定したところ、回転群と非回転群の間に聴力閾値の明らかな差はなかった。一方、脳内モノアミン値は回転群、非回転群とも中脳のドーパミン(DA)値低下があるものの線条体では対照群と有意差がみられなかった。線条体ドーパミン受容体結合能はD1系の有意な機能低下が認められた。また、DA受容体の直接的・間接的作動薬がbvの回転や多動行動を抑制する「逆説的効果」が観察された。以上より、本マウスはDA伝達の障害が基盤にあると考えられ、ヒトAD/HDなどの多動病態の一側面を反映する動物モデルと考えられた。