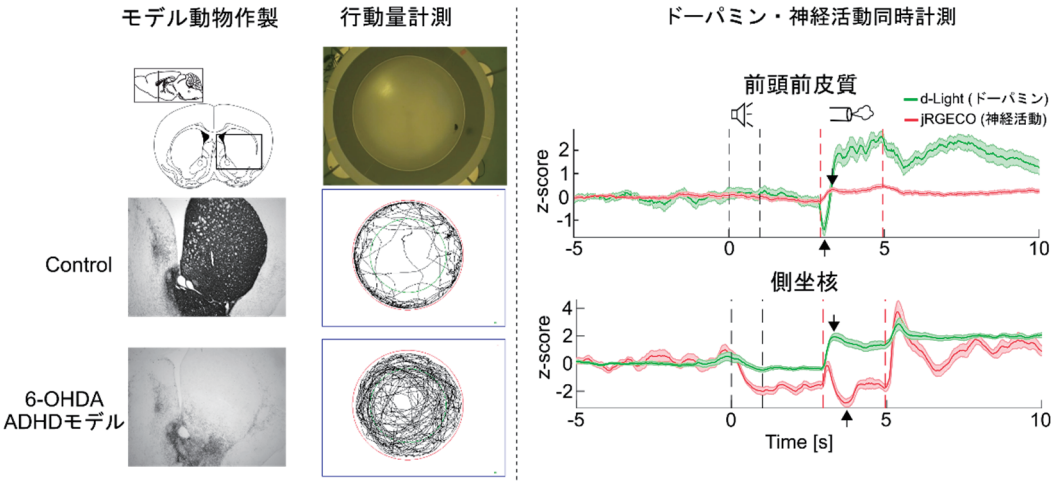
143　ADHDモデルマウスを用いた前頭前皮質の神経動態	古山　貴文

【目的】本研究の目的は、注意欠陥多動性障害（ADHD）モデル動物を対象に、前頭前皮質の神経動態を解明することである。ADHD とは不注意、多動、衝動性の行動がある神経発達性精神障害であり、小児の 5〜8%が罹患する。この症状が起因となり、ADHD の 2 次的障害である社会的な差別やいじめなどが生じるため、ADHD の生物学的原因の究明や ADHD を診断するための予測アルゴリズムの生成は、治療薬の創出や早期的な療育法の提案などに非常に重要である。これまでは、PET や fMRI を用いた ADHD 患者の脳構造や脳活動を計測した研究が多い。しかし、計測機器の分解能や環境の制限などにより、①前頭前皮質のドーパミン濃度が上昇することにより、行動と神経活動がどのように変化するのか？さらに②その神経活動変化により、なぜ症状が改善するのかについては、未だに不明なままである。本研究では、行動・ドーパミン・神経活動を同時計測する実験環境を構築し、ADHD モデルマウスに適用することで、ADHD における前頭前皮質の神経動態を解明することを目指した。

【方法】実験 1. ADHD モデルマウスの作製と行動評価：実験 1 では、マウス幼獣の脳室に 6-OHDA（ドーパミン神経を変性させる薬品）を注入し、ADHD モデルマウスを作製した。この個体と正常の個体を円形のオープンフィールドに 10 分間入れ、行動量を測定した。実験 2. 側坐核および前頭前皮質のドーパミン濃度・神経活動の同時計測：実験 2 では、3 か月齢の C57BL/6J マウスを用いて、前頭前皮質および側坐核にアデノ随伴ウイルス（AAV）を用いて、d-Light（ドーパミンセンサ、緑）と jRGECO（カルシウムセンサ、赤）を細胞に発現させた。注入部位上部 200 μm に、光ファイバーの先端が来るようにカニューレを挿入し、光学計測できるように留置した。この個体に対し、8 kHz の音刺激と Air puff 刺激による恐怖条件づけを行い、その行動中に 520 nm（緑）と 610 nm（赤）の蛍光を計測し、ドーパミンと神経活動の同時計測を行った。

【結果】幼獣の脳室に 6-ODHA を注入した個体と Control 個体を比較すると、側坐核、内側被蓋野において、チロシンヒドロキシラーゼ（TH、ドーパミンを産出する酵素）陽性細胞の脱落が観測された（図左）。さらに、オープンフィールドによる行動量を計測した結果、Control 個体と比較して 6-OHDA 個体では、円の縁の他に、円の中心などにも移動する行動が観測された。また、一つの場所にとどまる行動が少なく、常に動いている行動が観測された（図中央）。AAV ウイルスを用いて d-Light と jRGECO を前頭前皮質と側坐核に発現させ、行動中の被験体からドーパミン濃度変化と神経活動を記録した（図右）。前頭前皮質において、音の提示では d-Light および jRGECO では傾向に変化は観測されなかった。一方、嫌悪刺激提示に対して、d-Light の蛍光変化量は減少し、jRGECO の蛍光はわずかに増加した。また、側坐核においては、音の提示開始時に d-Light および jRGECO の蛍光が減少し、Aif puff 提示では、d-Light の蛍光変化量は増加し、jRGECO の蛍光は減少した。

本研究で得られた結果



143. ADHD モデルマウスを用いた前頭前皮質の神経動態

古山　貴文

金沢医科大学 医学部 基礎医学 生理学 1

Key words：ファイバーフォトメトリー法，同時計測，蛍光バイオセンサ

緒　言

本研究の目的は、注意欠陥多動性障害（ADHD）モデル動物を対象に、前頭前皮質の神経動態を解明することである。ADHD とは不注意、多動、衝動性の行動がある神経発達性精神障害であり、小児の 5〜8%が罹患する。ADHD の原因究明を目指した研究では、ADHD 患者の脳構造や脳活動を計測した研究が多い。例えば、ポジトロン放出断層撮影法（PET）を用いてドーパミン神経活動を計測した結果、健常者と比較して、ADHD 患者のドーパミン放射活性の低下および脳全体の活性が低下していることがわかっている［1］。さらに、ADHD 患者は前頭前野や尾状核などの脳容積が減少している［2］。また、ADHD 患者には、メチルフェニデートという精神刺激薬が処方され、この薬の服用により、前頭前皮質のドーパミン濃度が上昇することがわかっている［3］。しかし、計測機器の分解能や環境の制限などにより、①前頭前皮質のドーパミン濃度が上昇することにより、行動と神経活動がどのように変化するのか？さらに②その神経活動変化により、なぜ症状が改善するのかについては、未だに不明なままである。

報告者のこれまでに、ファイバーフォトメトリー法を用いて、報酬と恐怖条件付け時のドーパミンの役割を明らかにするための研究を進めてきた。この実験を通して、ファイバーフォトメトリー法を用いたドーパミン濃度の計測手法を獲得した。この実験手法に対して、蛍光バイオセンサを工夫することで、ドーパミンおよび神経活動を同時計測することができると考えた。そこで本研究では、ADHD モデルマウスを対象に、行動・ドーパミン濃度・神経活動を同時計測する実験手法を適応し、ADHD の神経動態を明らかにすることを目的とした。

方　法

1. 実験 1：ADHD モデルマウスの作製と行動評価

生後 5 日目の幼獣 C57BL/6J マウスを被験体として用いた。幼獣に、セロトニンおよびノルアドレナリン再取り込み阻害剤薬のデシプラミン塩酸塩（20 mg/kg）を皮下注射した。30 分後に、被験体を氷の上に 1 分間置き、麻酔をかけた。頭部固定後、側脳室に 30 μg/3 μl の 6-OHDA（0.1%アスコルビン酸で溶解）を注入した。6-OHDA 注入後、37℃のホットプレート上に乗せ、覚醒後、母親のもとに戻した。各被験体は、22〜24℃の部屋で飼育され、12 時間の光管理（Light on : 7:00、Light off : 19:00）、水および食べ物については自由に摂取可能であった。生後 24 日目に、円形のオープンフィールド（直径：1 m、高さ：45 cm）テストを 10 分間行い、行動量を測定した。

2. 実験 2：側坐核および前頭前皮質のドーパミン濃度・神経活動の同時計測

実験 2 では、3 か月齢の C57BL/6J マウスを用いた。被験体をイソフルランで麻酔（導入：3%、維持：1%）し、頭部固定装置に固定した。表面麻酔後、頭蓋骨上部の皮膚を切開し、頭蓋骨を露出させた。前頭前皮質（Bregma から AP：＋1.8 mm、ML：－0.9 mm、DL：－2.2 mm、角度 20°）、側坐核（Bregma から AP：－1.0 mm、ML：－2.0 mm、DL：－4.2 mm）の部分にドリルで頭蓋骨に穴をあけた。この被験体に対して、アデノ随伴ウ

イルス（AAV）を用いて、AAV9-CAG-d-Light（ドーパミンセンサ、緑）と AAV9-hsyn-jRGECO（カルシウムセンサ、赤）を各部位にそれぞれ 100 nl 注入した。注入部位上部 200 μm に、光ファイバーの先端が来るようにカニューレを挿入し、頭部固定用プレートとともにデンタルセメントで固定した。

2 週間の回復期間後に、行動実験を行った。音刺激として、8 kHz のトーンバースト音を使用した。嫌悪刺激として 2 s の Air puff を使用した。被験体の口元にはスポイトを設置し、左目に Air puff が当たるように設置した。8 kHz の音を 1 s 間提示、2 s の空隙後、嫌悪刺激を提示した。ドーパミン濃度と神経活動の計測には、ファイバーフォトメトリー法を用いた。記録方法として、励起光 470 nm と 560 nm を使用し、蛍光 520 nm（緑）と 610 nm（赤）を計測した。

結　果

1. 実験 1：ADHD モデルマウスの作製と行動評価

チロシンヒドロキシラーゼ（TH）染色を生後 5 日の幼獣の脳室に 6-ODHA（ドーパミン神経を変性させる薬品）を注入した個体と Control 個体を比較すると、側坐核、内側被蓋野において、TH 陽性細胞の脱落が観測された（図 1）。しかし、6-OHDA で処置した個体は、成獣になる前に亡くなることが多かった。

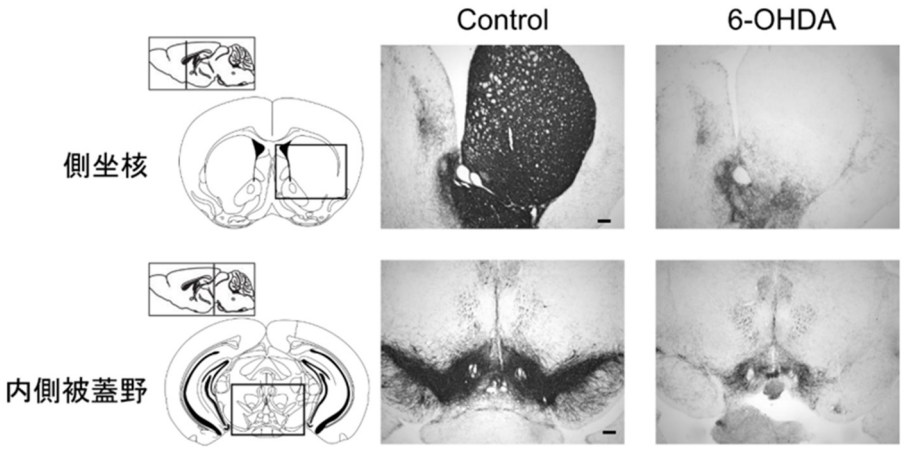


図1. 6-OHDAを脳室投与した個体とコントロール個体のTH染色

チロシンヒドロキシラーゼ（TH）は、ドーパミン精製に必要な酵素である。そのため、TH陽性細胞は、ドーパミン神経であり、その染色により、ドーパミン神経の分布が明らかになる。6-OHDA（ドーパミン神経を変性させる薬品）を脳室投与することにより、ドーパミン神経の脱落が観測された。スケールバーは200 μm。

さらに、オープンフィールドで行動量を観測した。その結果、Control 個体では、円の縁を探索している行動が観測され、中心を探索する行動は少なかった。一方、6-OHDA 個体では、円の縁の他に、円の中心などにも移動する行動が観測された。また、一つの場所にとどまる行動が少なく、常に動いている行動が観測された（図 2）。

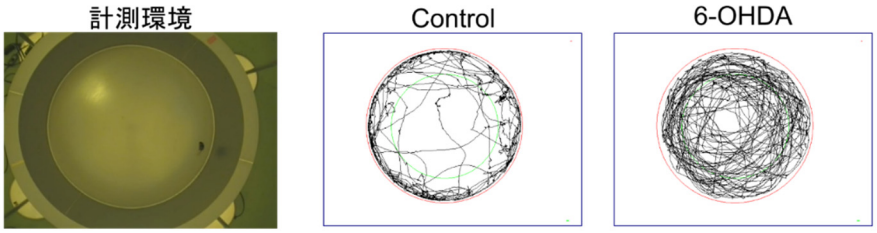


図 2. コントロール個体と 6-OHDA 注入個体の行動量の違い
オープンフィールドで各個体の行動量を計測した結果、コントロール個体は円の縁を探索しているのに対し、6-OHDA個体では、円の縁および中心を回るような行動が観測された。

2. 実験 2：前頭前皮質および側坐核のドーパミン濃度・神経活動の同時計測

AAV ウイルスにて、d-Light と jRGECO を前頭前皮質と側坐核に発現させ、行動中の被験体からドーパミン濃度変化と神経活動を記録した（図 3）。前頭前皮質において、音の提示では、d-Light および jRGECO では傾向に変化は観測されなかった。一方、嫌悪刺激提示に対して、d-Light の蛍光変化量は減少し、jRGECO の蛍光はわずかに増加した。また、側坐核においては、音の提示開始時に d-Light および jRGECO の蛍光が減少し、Aif puff 提示では、d-Light の蛍光変化量は増加し、jRGECO の蛍光は減少した。

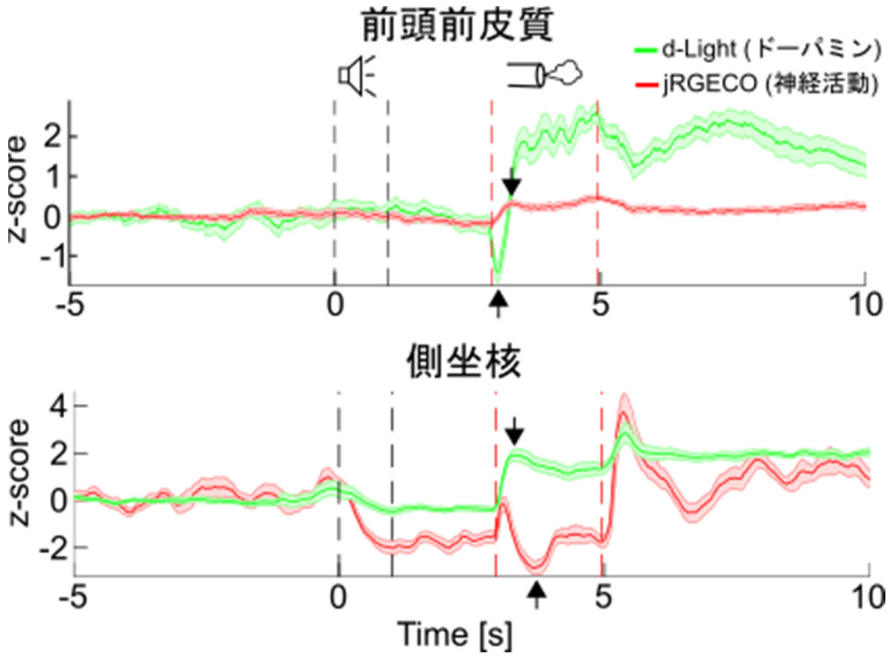


図3. 前頭前皮質および側坐核におけるドーパミンと神経活動の同時計測
蛍光バイオセンサ（d-Light：ドーパミン濃度、jRGECO：神経活動で生じるカルシウム濃度変化）により、行動中の被験体からドーパミンと神経活動の記録に成功した。
前頭前皮質の↓はair puff時に神経活動が上昇した時間、↑はドーパミンが減少した時間。
側坐核の↓はair puff時にドーパミンが上昇した時間、↑は神経活動が減少した時間。

考　察

1. 実験 1：ADHD モデルマウスの作製と行動評価

実験 1 では、6-OHDA を用いて、ADHD モデルマウスを作製し、その行動評価を行った。その結果、幼獣の脳室に 6-OHDA を注入した個体では、Control 個体と比較すると、ドーパミン神経の脱落が観測された（図 2）。この結果から、脳室に 6-OHDA を注入することで脳全体のドーパミン神経を欠落させることに成功した。さらに、行動量を計測した結果、正常個体と比較すると、一つの場所に落ち着くことがなく、常に移動していることが明らかになった。また、オープンフィールドの中心に行くなどの不安行動も減少していた。これらの結果から、6-OHDA による ADHD 様行動を示すモデルマウスの作製に成功した。しかし、6-OHDA で処置した個体は、成獣になる前に亡くなることが多かった。これは、運動時に必要な黒質–線条体ドーパミン神経の欠落により、吸啜行動が減少し、母親からうまく授乳できない状態になっていた可能性が考えられる。今後は、6-OHDA 処置をした個体に対し、L-dopa（ドーパミンの前駆体、血液脳関門を抜け、脳全体のドーパミン濃度を高めると考えられている）を投与し、離乳・飼料の摂取可能になるかを確認する必要がある。

2. 実験 2：前頭前皮質および側坐核のドーパミン濃度・神経活動の同時計測

実験 2 では、正常個体を用いて、ドーパミン濃度と神経活動の同時計測が可能かどうかを検証した。AAV ウイルスにて、d-Light と jRGECO を発現させた個体を対象に、ファイバーフォトメトリー法を用いて、行動中の被験体から計測を行った。その結果、前頭前皮質および側坐核において、ドーパミン濃度と神経活動の同時計測に成功した。前頭前皮質では、嫌悪刺激に対して、ドーパミン濃度が減少し、神経活動が増加した。一方側坐核では、嫌悪刺激前の音に対して、ドーパミン濃度および神経活動が減少し、嫌悪刺激に対して、ドーパミン濃度は上昇し、神経活動は減少した。これらの結果から、前頭前皮質と側坐核において、ドーパミン濃度変化と神経活動の同時計測に成功した。さらに、前頭前皮質および側坐核では、内側被蓋野からドーパミン神経の投射を受けているが、嫌悪刺激に対して、それぞれの部位で反応が異なっていた。これらの結果から、内側被蓋野において、ドーパミン神経が送る情報は、前頭前皮質および側坐核で異なっていることが明らかになった。また、前頭前皮質では、ドーパミン濃度が減少することで神経活動が上昇し、側坐核では、ドーパミン濃度が上昇することで神経活動が減少していた。これらの結果から、ドーパミン濃度変化に対し、神経活動はドーパミン濃度と反対の活動を示すことが明らかになった。今後、報酬と組み合わせた実験を行うことで、嫌悪刺激と報酬を分ける脳内機構が明らかになると考えられる。

本研究では、ADHDモデルマウスを対象に、行動・ドーパミン濃度・神経活動を同時計測する実験手法を適応し、ADHDの神経動態を明らかにすることを目的とした。方法として、6-OHDAを用いてドーパミン神経を欠落させ、ADHD様行動を示すモデル動物を作製した。さらに、正常個体の前頭前皮質および側坐核に、AAVウイルスを用いて、ドーパミン濃度および神経活動に付随して蛍光変化するバイオセンサをそれぞれ発現させ、行動中の被験体から計測を行った。その結果、ドーパミン濃度変化に対し、神経活動はドーパミン濃度と反対の活動を示すデータを得ることに成功した。これらの結果から、ドーパミン濃度と神経活動を同時に計測する手法の開発に成功した。今後、ADHDモデル動物を対象に、この手法を適応することで、ADHD様行動時のドーパミン濃度変化と神経活動変化が明らかになると考えられる。さらに、ADHDの処方薬であるメチルフェニデートを投与した際に、脳内のドーパミンおよび神経活動がどのように変化するかを明らかにすることで、薬の効用が明らかになり、今後の製薬につながる結果が得られるだろう。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、金沢医科大学医学部生理学 1 の山本亮准教授である。

文　献

1) Forssberg H, Fernell E, Waters S, Waters N, Tedroff J. Altered pattern of brain dopamine synthesis in male adolescents with attention deficit hyperactivity disorder. Behavioral and Brain Functions. 2006;2(1):1-10. PMID: 17144907 DOI: 10.1186/1744-9081-2-40.

2) Valera EM, Faraone SV, Murray KE, Seidman LJ. Meta-analysis of structural imaging findings in attention-deficit/hyperactivity disorder. Biological psychiatry. 2007;61(12):1361-9. PMID: 16950217 DOI: 10.1016/j.biopsych.2006.06.011.

3) Fone KC, Nutt DJ. Stimulants: use and abuse in the treatment of attention deficit hyperactivity disorder. Current opinion in pharmacology. 2005;5(1):87-93. PMID: 15661631 DOI: 10.1016/j.coph.2004.10.001.