



胎生期MAM暴露ラット仔の病理学的・行動学的解析  
:  
ヒト注意欠陥多動障害モデルへの一考察(自然科学系)

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2009-08-25 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 山本, 義為 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="https://doi.org/10.24729/00010821">https://doi.org/10.24729/00010821</a>

研究紹介

胎生期 MAM 暴露ラット仔の病理学的・行動学的解析  
— ヒト注意欠陥多動障害モデルへの一考察 —

山本義為<sup>\*</sup>

(参天製薬株式会社学術室)

Pathological and Behavior Analyses in Rats Prenatally Treated with Methylazoxymethanol Acetate (MAM)  
— An Opinion on the Human ADHD (Attention-Deficit Hyperactivity Disorder) Model —

Yoshitame Yamamoto<sup>\*</sup>

(Scientific Information Services, Santen Pharmaceutical Co. Ltd.)

**Key words:** 胎生期MAM暴露; ラット; 小頭症; 多動

1. はじめに

中枢神経細胞は一旦障害されるとほとんど再生しないことから、脳障害に対する根本治療はない。したがって、脳障害による行動異常発生についてもその予防が肝要となる。そのためには発生機序を解明する必要があるが、これまで多くの研究がなされ、脳障害モデル動物が作成されてきた。著者もエタノール<sup>1)</sup>、クロルプロマジン<sup>2)</sup>、アフラトキシン<sup>3)</sup>、オクラトキシン<sup>4)</sup>による種々の化合物を用いて動物に引き起こされる行動発達異常について報告してきた。エタノールに関しては中毒相当量を妊娠期間中暴露しても期待される胎仔性アルコール症候群(成長遅延、中枢神経系の障害および顔面形成不全の3つの異常)は見られず<sup>5)</sup>、またクロルプロマジン暴露でも学習障害は見られず<sup>6)</sup>、行動発達異常誘発物質を曝露しても必ずしも行動異常が検出できるわけではないことがわかった。

脳障害の研究には、動物種、行動発達異常誘発物質の投与量、暴露時期、行動機能の検索時期、方法および評価法など様々な要因を考慮する必要があることから、先天異常学会の行動奇形学懇話会による全国的な統一プロトコール共同研究が産学連携<sup>7)</sup>で数年間、米国<sup>8)</sup>に呼応した形で進められた。その結果、「確実に発生途中の脳神

経細胞を障害し、長期に渡って行動観察できる行動発達異常誘発物質を選択する」ことが最も重要であるとの結論に至った。

胎仔期の神経芽細胞の増殖期(DNA合成期)に直接影響を与える行動発達異常誘発物質としては、DNA合成阻害剤であるシトシンアラビノシド(Ara-C)、エチレンチオウリア(ETU)、ヒドロキシウレア(HU)、メチルアゾキシメタノール(MAM)などがある。ラットを用いたAra-C暴露実験では尾や後肢奇形<sup>9)</sup>、ETUでは四肢奇形<sup>10)</sup>、HUでは四肢奇形や曲尾<sup>11)</sup>など様々な外表奇形が共存することから、外表奇形に伴う行動異常と脳障害による行動異常との区別がつかない。しかし、MAMだけは、四肢の外表奇形が報告されていないので、生後の行動発達異常を解析するのに、適切な行動発達異常誘発物質と考えられる。

MAMはソテツの実に含まれており、胎盤を容易に通過して、胎仔の分裂の盛んな神経芽細胞の核酸と蛋白に反応し、選択的にその細胞を崩壊させる細胞毒性を有する物質である<sup>12)</sup>。これまで、ラットでのMAM暴露実験は行われているが、詳細に胎仔や新生仔を観察し、その行動異常にまで精査した研究はなかった。著者はこれまでMAMをラット胎仔に暴露し、出生後の新生仔の発達に沿って、その脳、骨格を病理学的に精査し、MAMがその仔の成長、運動、活動、学習行動にどのような影響を与えるかについて詳細に調べてきた。

今回、行動発達異常誘発物質によって中枢神経系の異

<sup>\*</sup> 大阪府立看護大学医療技術短期大学部共同研究員

(受付日 2002年10月31日, 受理日 2003年1月6日)

常から生じた先天性小頭症候群と行動異常とが、ヒトの注意欠陥多動障害 Attention-Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD) の原因解明への手がかりを求めた研究成果を基に紹介する。

## II. 胎生 MAM 曝露仔の病理学的解析

### 1. MAM 曝露時期の重要性

成熟した大脳皮質の神経細胞は脳表面に平行な6層からなる多層構造を作って配列している。これらの多くの神経細胞は脳室帯で誕生し、放射状に脳表面に向かって移動して配置したものである。各層を構成する神経細胞は脳室帯における誕生時期もかなり共通しており、2~6層については深層に局在する細胞ほど早生まれで、浅層の細胞ほど遅生まれであることが知られている(インサイド・アウトサイド)<sup>11)</sup>。

このような神経芽細胞の増殖、伸展、移動により種々の細胞が分化してくる時期は、ラットの大脳皮質のII~IV層構造は胎生14~22日の間に形成され<sup>12)</sup>、また、黒質、縫線核、青斑核のカテコールアミン神経細胞<sup>13)</sup>、視床後部の外側膝状体の視覚神経細胞<sup>14)</sup>、また視床下部の growth hormone releasing factor (GRF) 神経細胞<sup>15)</sup> および luteinizing hormone releasing hormone (LH-RH) 神経細胞<sup>16)</sup> は、胎生14日以前に形成される。このような種々の神経細胞が発生してくる時期は薬剤などの影響を受け易いので、危険期あるいは臨界期といわれ、その投与時期の選択は極めて重要となってくる。

これまで胎生13日 MAM 曝露仔では、大脳皮質層の厚さや錐体細胞の数の減少<sup>17-19)</sup>、神経細胞の異所形成<sup>20)</sup> など多数の報告がある。また海馬では CA1 および CA2 錐体細胞層で広範囲な配列異常、海馬采の形成不全、脳梁腹側部の塊状の細胞集団の出現などが報告されている<sup>21)</sup>。さらに、海馬錐体細胞では樹状突起の形成不全や棘の数の減少<sup>22)</sup>、苔状線維の形成異常などの報告がある<sup>23)</sup>。このように、脳のさまざまな神経細胞障害が胎生13日目頃に集中して起こるので、その時期を中心にラットを用い MAM を曝露する実験を行った。

ラットの胎生12日、13日、15日、18日の各時期に MAM 30 mg/kg を1回腹腔内投与することにより、理論的にはその日に発生分化が予想される神経細胞に障害を与えた。最も障害が強く現われたのは胎生13日と15日投与であり、この時期で神経細胞の発生と分化が顕著となり、その障害は出生後にさまざまな影響を及ぼすことを予測させた。出産近くの胎生18日ではほとんどの神経細胞は分化しており、MAM による組織学的影響は認めら

れなかったので、MAM には時期特異性、つまり臨界期のあることが明らかとなった<sup>24)</sup>。

### 2. 体重および器官重量の変化

MAM は 30 mg/kg を投与した。この用量では母動物に投与後摂餌量減少に伴う体重増加の抑制を認めたのみで、妊娠期間の延長、分娩状態、哺育状態には異常を認めなかった。

いずれも自然分娩で生まれた仔の中で胎生13日 MAM 曝露仔の生後の体重増加は、雌雄ともに抑制された。生後4日の脳の平均実重量は対照群で  $0.445 \pm 0.038$  g、MAM 群で  $0.263 \pm 0.056$  g であり、MAM 群が対照群に比べて有意な減少を認めた。この時期に小頭症の判定基準<sup>25)</sup> に準じて対照群の基準値(平均値-2×標準偏差)を求めたところ 0.385 g であった。MAM 群30例中全例がこの基準値以下であったので、小頭症と診断された。

### 3. 外表変化と臓器変化

外表分化の平均発現日は、腹部発毛のみ有意な遅れを認めたが、耳介展開、切歯萌出、眼瞼開裂、陰開口、精巢下降には遅れを認めなかった。

生後4日の胎生期 MAM 曝露群の脳の背側面では大脳皮質の減形成が見られ、松果体の位置がより吻側に移動し、本来外からは見えない四丘体全体が露出していた。前頭葉、側頭葉、後頭葉形成は全体的に不十分であった。腹側面では延髄、橋には異常を認めなかったが、それ以外の各諸器官の外形には特に異常が認められなかった。

### 4. 骨形成への影響

生後4日 MAM 曝露群の後頭骨、胸骨、前肢と後肢の基節骨、中節骨、末節骨、踵骨、距骨、腰椎以下の椎体数には有意な化骨進行度の遅れは認められなかったが、MAM 曝露群の頭蓋顔面部の骨化度を指標とした前頭骨、頭頂骨、頭頂間骨、下顎骨の長径および面積は対照群に比べて有意な減少を認めた。また頭蓋部の形態異常は頭蓋底部の前蝶形骨の左右環状(視神経を囲む輪)の骨形成不全を限局して認めた。この所見はこれまで報告されていなかった。この部位を通る神経は視神経であり、その視神経の発生は胎生13~14日といわれている<sup>26)</sup>。したがって、この時期の MAM 曝露は胎仔期の視覚中枢路(網膜—外側膝状体—大脳視覚野)に影響を及ぼすことが示唆された。胎生期 MAM 曝露仔では視覚中枢経路への影響を示唆する報告が多く、胎生10~12日 MAM 曝露で視覚明暗弁別学習障害が、胎生14日 MAM 曝露で外側膝状体(背側核)の細胞数が減少し<sup>27)</sup>、さらに胎生18日以降の MAM 曝露では網膜障害が報告されている<sup>27)</sup>。

このように頭蓋骨のみに限局した骨形成異常は MAM

暴露時の特徴的な所見であった。ラット頭蓋骨の骨化開始が胎生15～19.9日、下顎骨のそれは16～18日であるといわれており<sup>28)</sup>、骨化開始よりも早い時期の胎生13日目MAM暴露が頭蓋骨の形成不全を引き起こしたものと考えられた。下肢、体幹の骨化が胎生16～17日<sup>28)</sup>であるが、この時期に頭蓋骨に限局したのは骨格の成長が神経組織などの成長により決定される<sup>29)</sup>ことと関連があるのかも知れない。今回脳中枢神経系に及ぼすMAM暴露の影響が甚大であることを窺わせた。

### III. 胎生13日MAM曝露仔の行動学的解析

#### 1. 平衡覚への影響

前庭覚、外受容器(例えば触覚)および固有受容器の発達程度を検出する方法として知られる正向反射、断崖回避反応、負の背地走性<sup>30)</sup>は、姿勢の調節機能に関与しているといわれている。胎生13日MAM曝露仔の生後4～10日に正向反射を行わせたところ、影響は認めなかったが、断崖回避反応および負の背地走性に関しては雌雄ともにその反応に遅れを認めた。これは重力に対する平衡覚の障害が生後の早い時期で認められたことを意味している。

#### 2. 運動協調性への影響

##### 2-1) 遊泳運動試験

遊泳能は正向反射、前庭反射、屈曲—伸展反射などの一連の調節・統合の発達や中枢神経(運動)の成熟指標といわれている<sup>31)</sup>。遊泳運動発達能は、「方向性は0点=沈む、1点=浮かぶ、2点=曲がって泳ぐ、3点=直進して泳ぐ。角度は0点=沈む、1点=鼻まで水面下、2点=耳はまだ水面下、3点=耳の中央まで水面、4点=耳の下まで水面。四肢の動きは0点=動きなし、1点=四肢を使用、2点=後肢のみ使用」で評価した。

方向性は生後12日の雄が対照群に比べて有意な遅れを認めた。基準到達例の出現頻度から評価した場合、方向性では雌雄の生後12日、角度では雄の生後14日、四肢の動きでは雄の生後18、20日に有意な遅れを認め、雄は雌よりもその程度は顕著であった。

##### 2-2) ローターロード試験

ローターロード装置にラットを回転方向とは逆向きに回転棒に乗せ、回転速度を5、10、20rpmに各々設定し、各回転速度毎にラットが回転棒から落下するまでの時間(秒)を指標として運動協調性を評価した。雄の生後3週齢では実験1日の5、10rpmおよび実験2日の10rpm、また5週齢では2日の5rpmで対照群に比べて回転棒に留まっている時間の有意な短縮を認めた。雌では対照群

との間に有意な差を認めなかった。20rpmでは雌雄とも有意な差を認めなかったが、これは回転速度が速すぎたためと思われる。

MAM曝露仔雄の離乳時(生後21日)の四肢運動協調性の遅れは生後12日の早い時期の遊泳運動で、生後3週齢のローターロード試験で確認された。これまで後肢の運動障害はドーパミン(DA)系ニューロンの障害に関連がある<sup>32)</sup>といわれていることから、胎生13日に暴露されたMAMはDA系の中枢神経系に影響を及ぼしていると考えられた。しかし生後5週齢ではローターロードによる運動協調障害は認められなかったことから、おそらくMAMは生後12日から21日にわたる行動を抑制する、おそらくDA系ニューロンの形成の遅れと関連していると考えられる。

#### 3. 活動性への影響

オープンフィールド(白色に塗られた木製、100×100×35cm、25区画)で調べた活動性については、Table 1に示すように、MAM群の生後3週齢では雄で潜時(オープンフィールドの中央におかれた仔が動き出すまでの時間: Latency)の有意な短縮を実験2日に、雌で1日と2日に認めた。移動区画数(Ambulation)では雄でのみ潜時の有意な増加を1日と2日に、立ち上がり回数(Rearing)の有意な増加を1日に、洗顔回数(Facing)の有意な減少を2日に認めた。

Table 2に示すように、MAM群の生後5週齢では雄で潜時の有意な短縮を1日に、有意な延長を3日に認めた。雌では排尿回数(Urination)の有意な増加を1日に認めただけである。

これまで胎生13日MAM曝露仔の雄の離乳時で有意な活動性増加(多動)が報告されている<sup>21, 33)</sup>。その多動は雌よりも雄で強く認められ、性差のあることが示唆されている。この性差は、性中枢と呼ばれる視床下部の発生時期が胎生12日以降といわれているので、胎生13日に暴露されたMAMが視床下部にあるLH-RH神経細胞の増殖に何らかの影響を与えたことによるものと考えられる。

活動性の評価は測定装置、測定時期、性などに大きく左右される。オープンフィールドで調べた正常ラットの活動性のピークは生後21日(離乳時)<sup>31)</sup>、electronic activity monitorで調べたそれは生後15日<sup>34)</sup>と報告されている。

離乳後の胎生MAM曝露仔の活動性については、これまで生後6週齢<sup>34)</sup>、60日齢<sup>35)</sup>、49～192日齢<sup>36)</sup>の成熟期でも多動が維持されているという報告がある一方、生後60日齢でも多動が消失したとの報告もあり<sup>37)</sup>、一定した結果は得られていない。

**Table 1** Open-field activity of pups at 3 weeks of age from dams treated with MAM on Day 13 of gestation

		Dose (mg/kg)	
		0	30
Male	1st day		
	Latency (sec)	33.8	11.2
	Ambulation	17.1	51.2 * *
	Rearing	1.8	11.2 * *
	Grooming	0.0	0.0
	Facing	2.2	0.7
	Defecation	0.8	0.5
	Urination	0.0	0.6
	2nd day		
	Latency (sec)	31.6	8.9 *
	Ambulation	35.9	68.7 * *
	Rearing	2.0	6.7
	Grooming	0.1	0.1
	Facing	1.6	0.5 *
	Defecation	0.3	0.3
	Urination	0.1	0.2
	3rd day		
	Latency (sec)	22.6	8.0
	Ambulation	47.5	66.8
	Rearing	4.6	6.4
	Grooming	0.5	0.1
Facing	1.0	1.3	
Defecation	0.7	0.4	
Urination	0.3	0.3	
Female	1st day		
	Latency (sec)	18.9	8.4 *
	Ambulation	37.4	54.5
	Rearing	4.5	8.1
	Grooming	0.0	0.0
	Facing	1.7	0.7
	Defecation	0.4	0.0
	Urination	0.0	0.1
	2nd day		
	Latency (sec)	14.6	6.3 *
	Ambulation	55.6	57.4
	Rearing	4.7	7.4
	Grooming	0.0	0.5
	Facing	1.2	0.7
	Defecation	0.0	0.2
	Urination	0.0	0.2
	3rd day		
	Latency (sec)	11.0	7.9
	Ambulation	66.9	55.1
	Rearing	6.7	3.5
	Grooming	0.5	0.2
Facing	1.3	0.8	
Defecation	0.0	0.0	
Urination	0.0	0.1	

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ : Significantly different from the control group by U-test.

**Table 2** Open-field activity of pups at 5 weeks of age from dams treated with MAM on Day 13 of gestation

		Dose (mg/kg)	
		0	30
Male	1st day		
	Latency (sec)	27.5	16.3 *
	Ambulation	37.5	44.0
	Rearing	4.7	7.9
	Grooming	0.2	0.0
	Facing	0.5	0.5
	Defecation	0.3	1.4
	Urination	0.3	1.2
	2nd day		
	Latency (sec)	18.0	11.8
	Ambulation	52.8	53.7
	Rearing	3.5	7.2
	Grooming	0.1	0.0
	Facing	0.7	0.8
	Defecation	0.5	0.4
	Urination	0.0	1.2
	3rd day		
	Latency (sec)	4.6	11.3 *
	Ambulation	63.4	70.5
	Rearing	5.5	8.4
	Grooming	0.2	0.2
Facing	0.5	0.5	
Defecation	0.5	0.3	
Urination	0.0	0.2	
Female	1st day		
	Latency (sec)	9.9	13.9
	Ambulation	55.2	66.1
	Rearing	8.2	9.4
	Grooming	0.0	0.3
	Facing	0.2	0.5
	Defecation	0.4	0.6
	Urination	0.2	3.6 * *
	2nd day		
	Latency (sec)	16.7	8.6
	Ambulation	68.9	86.7
	Rearing	5.5	5.7
	Grooming	0.2	0.0
	Facing	0.5	0.3
	Defecation	0.3	0.0
	Urination	0.0	0.7
	3rd day		
	Latency (sec)	13.9	8.8
	Ambulation	58.0	69.4
	Rearing	4.5	5.6
	Grooming	0.3	0.2
Facing	0.6	0.6	
Defecation	0.4	0.0	
Urination	0.5	0.6	

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ : Significantly different from the control group by U-test.

オープンフィールドの自発運動に対する神経伝達物質は主として黒質、線条体、大脳辺縁系の前脳のノルアドレナリン (NA) ニューロンおよび DA ニューロンで、特に DA ニューロンの影響が強いといわれている。モノアミン系神経の発生は胎生12日齢から始まることから、MAM の胎生13日暴露は出生仔の行動に影響を及ぼしていると思われる。

これまで胎生12日と14日 MAM 暴露の研究から、大脳半球容積の低下によって、モノアミン作動性神経線維の終末が濃縮し、モノアミン濃度が増加するためといわれており<sup>39)</sup>、胎生13日 MAM 暴露仔の活動性増加を支持するものと考えられる。また DA 系の変化および海馬の組織障害も活動性増加をもたらすものと考えられる。例えば、ラットの DA ニューロンの増殖は胎生11~15日<sup>40)</sup>で、この時期の MAM 暴露は線条体湿重量当りの DA 受容体数は減少する<sup>41)</sup>。生後60日齢では多動は消失する<sup>42)</sup>が、

線条体 DA 系活性の指標となる 3,4-dihydroxy-phenyl-acetic-acid 量は対照群と差はなく、DA 受容体の down-regulation によると報告されている<sup>39)</sup>。

#### 4. 学習能への影響

学習能を測定する装置、学習課題は古くから多くの研究者により試みられてきた。ヒトでは IQ テストなどが用いられるが、ラット、マウスでは水迷路、T字、Y字、電気ショック、Morris の円形白色水槽など嫌氣的条件刺激が一般的に用いられている。学習レベルの課題が単純なものから複雑なものになるにしたがい、学習能力の差が明らかになってくる。

著者は1単位 T 型水迷路装置で4日間連日訓練(各日10試行、1試行3分間)を行った。3日間は同一試行で、最終日の4日目はゴールを反対側にして逆転試行 (Reverse) させた。複雑な複式 T 型水迷路 (Biel の 6 choice points 型)<sup>40)</sup>では3日間連日訓練(各日4試行、1

Table 3 Single T-maze of male pups from dams treated with MAM on day 13 of gestation

	Dose (mg/kg)	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4 (Reverse)
Elapsed time (SEC)	0	7.90	5.70	4.95	7.93
	30	11.08 **	8.76 *	7.13	10.19 **
Total error	0	0.46	0.20	0.10	0.57
	30	0.76 **	0.40 *	0.26 **	0.79 *

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ : Significantly different from the control group by U-test.

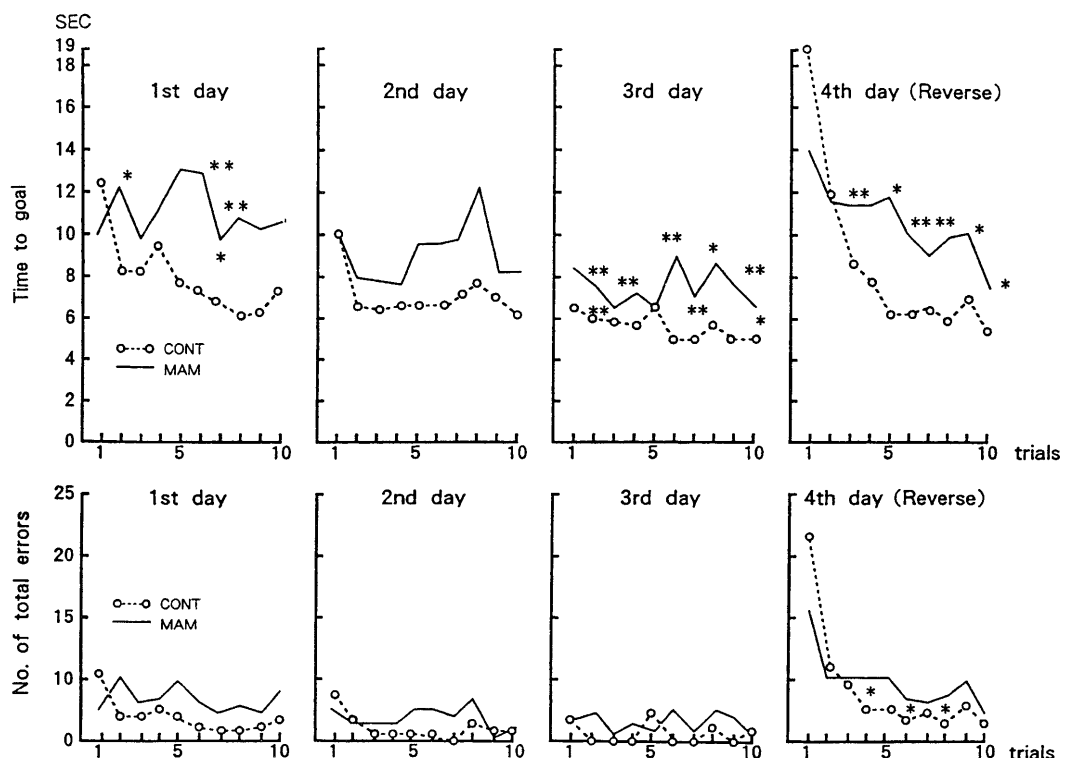


Fig. 1 Water single T-maze test of male pups born from dams treated with MAM.

試行3分間)を同一試行で行った。学習能はスタートからゴールに到達するまでの所要時間(秒), 誤反応数で評価した。このことから空間位置認知による方向性の学習能を検出できる。

#### 4-1) 1単位T型水迷路における学習能

Fig. 1およびTable 3に示すように生後7週齢雄MAM群は対照群とも左右水迷路弁別学習の繰り返しにより, 学習能(記憶)の獲得を認めた。MAM群では所要時間(秒)では試験開始1日目の第2, 6, 7, 8試行, 3日目の第1試行を除く全試行, 4日目の第1, 6試行を除く全試行で有意な延長を, 誤反応では総誤反応数は4日目の第4, 6, 8試行で有意な増加を認めた。各試験日の平均所要時間(秒)および平均誤反応数の推移で見たところ, MAM群は所要時間では1, 2, 4日目で有意な延長, 誤反応では総誤反応数は試験全期間で有意な増加を示し, MAM群は対照群よりも学習能の獲得に遅れを認めた。

#### 4-2) 複式T型水迷路における学習能

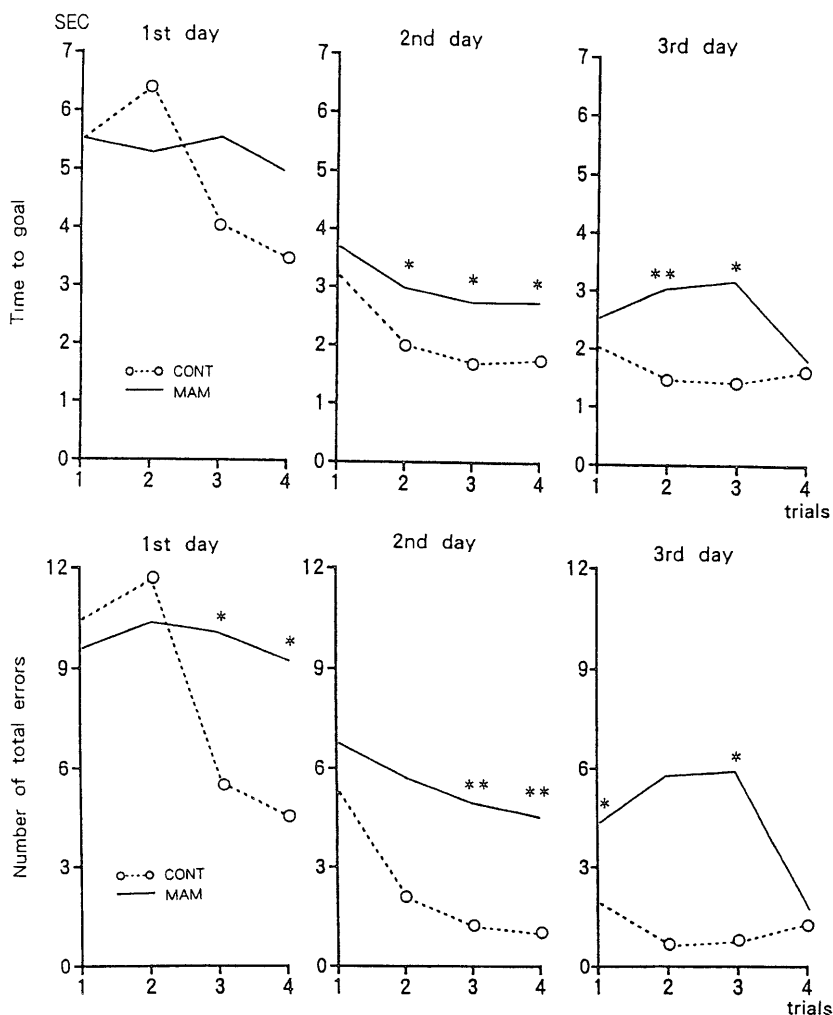
Fig. 2およびTable 4に示すように生後7週齢雄MAM

群は対照群とも同一試行の繰り返しにより学習能の獲得を認めた。MAM群は所要時間では試験開始2日目の第1試行を除く全試行で, 3日目の第2, 3試行で有意な延長, 誤反応では総誤反応数は1, 2日目とも第3, 4試行, 3日目の第1, 3試行で有意な増加を認めた。各試験日の平均所要時間および平均誤反応数はMAM群は所要時間では2, 3日目で有意な延長, 誤反応では総誤反応で2, 3日目で有意な増加を示し, MAM群は対照群より学習能獲得に遅れを認めた。

**Table 4** Multiple T-maze test of male pups from dams treated with MAM on day 13 of gestation

	Dose (mg/kg)	Day 1	Day 2	Day 3
Elapsed time (SEC)	0	51.9	22.7	17.5
	30	56.5	31.6 *	27.8 *
Total error	0	8.7	2.6	1.3
	30	10.4	5.7 **	4.7 **

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ : Significantly different from the control group by U-test.



**Fig. 2** Water multiple T-maze test of male pups born from dams treated with MAM.

これまで胎生期 MAM 暴露仔の学習能力は知覚能力や運動能力、あるいは動機付けの障害以外に、Morris の円形白色水槽 (ミルクグループ課題) では手がかりとの相対的な位置関係が記憶できない空間記憶障害が報告されている<sup>41)</sup>。またオペラント条件付き課題では記憶の消去が困難で反応を制止できず、固執的傾向を示すといわれている<sup>42)</sup>。また潜在制止を形成できず、刺激事態の複雑な配置の中で自分にとって何が有効で有効でないのか、選択的に注意を向ける能力に欠けているなどが報告されてきた<sup>43)</sup>。

また左右弁別学習では放射状迷路学習<sup>44)</sup>、電撃回避学習で<sup>45, 46)</sup>、単純な T 型迷路では影響はないが<sup>42)</sup>、学習課題を複雑にした多数の T 型迷路を組み立てた複式迷路で学習障害が示唆されており<sup>46, 47)</sup>、学習課題の難易度に左右されるものと考えられる。

しかし、著者による T 型水迷路では単一、複式とも MAM 群は対照群に比べて学習能に遅れを認め、学習課題の難易度に左右されなかった。単一課題でも十分に学習障害の検出が可能であった。また学習障害を示す胎生期 MAM 暴露仔は連日の同じ学習課題の繰り返しでゴール到達時間の短縮や誤反応数の減少による学習能の獲得が明らかになり、中枢神経の可塑性を示唆することができた。

MAM に暴露されたラット新生仔の学習障害の原因は、多動に起因するという解釈<sup>48)</sup>と、あるいは記憶低下によるとする説がある<sup>49, 51)</sup>。前者の多動による学習障害については海馬の組織障害が挙げられる。海馬には空間的な表象とか地区、すなわち場所に関するエムブレム (記憶痕跡) を形成ないし保持する機能があり、また海馬背側部 CA1 領域の神経細胞には場所細胞があり<sup>52)</sup>、この領域の細胞層の配列異常が、空間記憶障害の原因ではないかと考えられている。後者の記憶低下については海馬で多く認められる興奮性グルタミン酸受容体 (N-methyl-D-aspartate 型)<sup>49)</sup>の数の減少<sup>52)</sup>から記憶障害の関与が示唆されていることから、胎生13日目 MAM 暴露仔の学習障害は、空間記憶障害の可能性があるとわれ、本研究でもヒト ADHD の学習障害のひとつに空間記憶障害との関わりが推察される。

#### IV. ま と め

##### IV-1) 出産から離乳までの時期

MAM に曝露されて産まれた新生仔の4日目の脳重量を測定すると対照群に比べ有意に低く、また体重を指標とした成長も遅れていた。また、生後の特定の時期に発

現し完了していく外表変化の腹部発毛、反射機能の断崖回避反応および負の背地走性、運動協調性などが正常対照仔に比べ遅れが認められた。しかしその遅れは成長とともに消失し一時的なものであった。ヒトではこの早期の段階では同一世代の児の身体発育、反射機能、協調運動などの諸症状の比較を詳細に観察すればおそらく ADHD のシグナルが出始めているのかも知れない。

##### IV-2) 離乳後から成熟までの時期

活動性と学習が指標となる。実際に活動性を評価するためフィールドとして円形、四角、白、黒などさまざまな装置が開発されてきた。著者は黒線で25区画に分けた四角白のオープンフィールドの装置を用いた。探索開始までの時間 (潜時)、区画を横切った回数、立ち上がり回数、情動行動の指標にもなっている脱糞と排尿の回数をカウントした。生後3週齢では MAM 胎生13日暴露群で正常対照群に比べ区画を横切る回数、立ち上がりなど多動を示唆する探索活動の有意な増加を認めた。また潜時が短くすぐに動きたがる特徴的な行動が観察された。情動性については明らかでなかった。情動性とは不安、恐怖などを指すが、脱糞と排尿の回数を指標としたラットでは評価に無理があるのかも知れない。学習の評価に水迷路がよく用いられるが、著者による単純な T 型と、T 型を複雑に組み合わせた複式型を用いた場合、学習課題の難易度には関連しない学習障害 (空間記憶障害) を認めた。学習障害の中で MAM 暴露群は経日的な同一試行により学習能の獲得 (可塑性) は認めるが、正常対照仔に比べると常に遅れを示した。ヒト ADHD では学習課題によっては対照となる同一世代の児に比べ学習能力の遅れに違いが見られることもある。

これまで胎生13日 MAM 暴露ラット仔では大脳皮質層の厚さや錐体細胞の数の減少<sup>17, 19)</sup>、神経細胞の異所形成などの断片的な報告<sup>20)</sup>はある。また、海馬では胎生13日 MAM 暴露仔でも CA1 および CA2 錐体細胞層で広範囲な錐体細胞層の配列異常、海馬采の形成不全、脳梁腹側部の塊状の細胞集団などの組織障害について報告<sup>21)</sup>されている。さらに、海馬錐体細胞では樹状突起の形成不全や棘の数の減少<sup>22)</sup>、苔状線維の形成異常などの報告<sup>23)</sup>があり、脳の肉眼的異常から微細な組織構造まで様々な神経細胞障害が胎生13日付近に集中していたことから、胎仔脳への侵襲に時期特異性があると思われる。

多動は胎生13日 MAM 暴露ラットでは性差を認め、雄仔は雌仔より影響が強かった。性中枢と呼ばれる視床下部の発生時期が胎生12日以降といわれており、胎生13日 MAM 暴露は LH-RH 神経細胞の増殖に何らかの影響を及



ぼした可能性が考えられる。米国の報告でも ADHD 児の性差は9:1と男児が圧倒的に多い。

今回胎生期 MAM 曝露で身体発育では体重増加抑制および脳重量の減少, 外表分化では腹部発毛の遅れ, 反射機能では断崖回避反応および負の背地走性の遅れ, 運動協調性(遊泳および回転棒)の遅れ, 活動性では多動, 学習能では空間記憶障害などの過程を通じて ADHD モデル動物としての有用性を紹介した。

最近, ヒトの脳画像診断法が急速に進歩してきたが, 中でも注目されるのは fMRI (functional magnetic resonance imaging) である。この装置で ADHD 児の脳の特徴が解明でき, 異常な行動の原因が脳のどこに限局しているのかを突き止めることができれば, 治療法の開発ができるかも知れない。今後の課題として病態解明に向けて, ラットでの ADHD 仔の脳組織および行動をさらに解析していきたい。

## 謝 辞

御助言頂きました大阪府立看護大学医療技術短期大学部 高橋研一教授に深謝いたします。

## 文 献

- 1) 山本義為, 谷村 孝 (1986) エタノールのラット母獣および次世代仔に及ぼす影響. 近畿大学医学雑誌, 11:493-506.
- 2) Yamamoto, Y. (1986) Collaborative studies of chlorpromazine on behavioral teratology in rats during histogenesis period: Multiple T-maze. *Teratology*, 34:483.
- 3) Kihara, T., Matsuo, T., Sakamoto, M., Yasuda, Y., Yamamoto, Y. and Tanimura, T. (2000) Effects of prenatal aflatoxin B<sub>1</sub> exposure on behaviors of rat offspring. *Toxicol. Sci.*, 53:392-399.
- 4) Kihara, T., Nakagawa, K., Yamamoto, Y., Matuso, T. and Tanimura, T. (1983) Effects of prenatal ochratoxin A exposure on behavior in postnatal rats. *Teratology*, 28:16A.
- 5) Behavioral teratology meeting (1986) *Teratology*, 34:483A-486A.
- 6) Buelke-Sam, J., Kimmel, C.A., Adams, J., Nelson, C.J., Vorhees, C.V., Wright, D.C., St.Omer, V., Korol, B.A., Butcher, R.E., Geyer, M.A., Holson, J.F., Kutscher, C.L. and Wayner, M.J. (1985) Collaborative behavioral teratology study: Results. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.*, 7:591-624.
- 7) Ritter, E.J., Scott, W.J. and Wilson, J.G. (1973) Relationship of temporal patterns of cell death and development to malformations in the rat limb. Possible mechanisms of teratogenesis with inhibitors of DNA synthesis. *Teratology*, 7:219-226.
- 8) Druckrey, H., Ivankovic, S. and Preussmann, R. (1966) Teratogenic and carcinogenic effects in the offspring after single injection of ethylnitrosourea to pregnant rats. *Nature*, 210:1378-1379.
- 9) Butcher, R.E., Scott, W.J., Kazmaier, K. and Ritter, E.J. (1974) Postnatal effects in rats of prenatal treatment with hydroxyurea. *Teratology*, 7:161-166.
- 10) Nagata, Y. and Matsumoto, H. (1969) Studies on methylazoxymethanol: Methylation of nucleic acids in the fetal rat brain. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 132:383-385.
- 11) 仲嶋一範, 御子柴克彦 (2002) ニューロンの位置決定メカニズム, “脳の発生・分化・可塑性” (御子柴克彦, 清水孝雄/日本生化学会編), 共立出版株式会社, 東京, p.67-76.
- 12) Hicks, S.P. and D'Amato, C.J. (1968) Cell migrations to the isocortex in the rat. *Anat. Rec.*, 160:619-634.
- 13) Lauder, J.M. and Bloom, F.E. (1974) Ontogeny of monoamine neurons in the locus coeruleus, raphe nuclei and substantia nigra of the rat. *J. Comp. Neurol.*, 155:469-482.
- 14) Lund, R.D. and Mustari, M.J. (1977) Development of the geniculocortical pathway in rats. *J. Comp. Neurol.*, 189:711-720.
- 15) Rodier, P.M., Kates, B., White, W.A. and Phelps, C.J. (1990) Birthdates of the growth hormone releasing factor cells of the rat hypothalamus. An autoradiographic study of immunocytochemically identified neurons. *J. Comp. Neurol.*, 291:363-372.
- 16) Gavin, C.E., Kates, B., Hoffman, G.E. and Rodier, P.M. (1994) Changes in the reproductive system following acute prenatal exposure to ethanol or methylazoxymethanol in the rat: 1. Effects on immunoreactive LHRH cell number. *Teratology*, 49:13-19.

- 17) Johnston, M.V. Carman, A.B. and Coyle, J.T. (1981) Effects of fetal treatment with methylazoxymethanol acetate at various gestational dates on the neurochemistry of the adult neocortex of the rat. *J. Neurochem.*, 36:124-128.
- 18) Ashwell, K.W.S. and Webster, W.S. (1988) The contribution of primary and secondary neuronal degeneration to prenatally-induced micrencephaly. *Neurotoxicol. Teratol.*, 10:65-73.
- 19) Collier, P.A. and Ashwell, K.W. (1993) Distribution of neuronal heterotopiae following prenatal exposure to methylazoxymethanol. *Neurotoxicol. Teratol.*, 15:439-444.
- 20) Funahashi, A. (1989) Distribution of corticogeniculoneurons and projection of geniculocortical fibers in methylazoxymethanol-induced microcephalic rats. *Cong. Anom.*, 29:125-137.
- 21) Sugioka, K. and Yamadori, T. (1992) A developmental study of reflex and activity in rats with micrencephaly induced by prenatal methylazoxymethanol acetate (MAM) treatment. *Cong. Anom.*, 32:143-151.
- 22) Singh, S.C. (1980) Deformed dendrites and reduced spine numbers on ectopic neurons in the hippocampus of rats exposed to methylazoxymethanol-acetate. *Acta Neuropathol.*, 49:193-198.
- 23) Cheema, S.S. and Lauder, J.M. (1983) Infrapyramidal mossy fibers in the hippocampus of methylazoxymethanol acetate-induced microcephalic rats. *Dev. Brain Res.*, 9:411-415.
- 24) Yamamoto, Y. (1996) Behavioral and morphological alterations in rats prenatally treated with methylazoxymethanol acetate (MAM). *Acta Med. Kinki Univ.*, 21:205-228.
- 25) Edwards, M.J., Gray, C.H. and Beatson, J. (1984) Retardation of brain growth of guinea pigs by hyperthermia: Effect of varying intervals between successive exposure. *Teratology*, 29:305-312.
- 26) 藤井孝朗, 中塚敏夫 (1984) 各器官の発生, “実験動物学 ラット” (石橋正彦, 高橋寿太郎, 菅原七郎, 安田泰久編), 講談社サイエンティフィック, 東京, p.67-80.
- 27) Eiden, L.E., Latker, C. and Zatz, M. (1981) Retinal toxicity of methylazoxymethanol acetate is developmental specific. *Dev. Brain Res.*, 1:425-428.
- 28) 星野 清 (1967) マウスおよびラット胎仔の骨格形成の比較考察 (予報). *先天異常*, 7:32-38.
- 29) Moss, M.L. and Salentijn, L. (1969) The primary role of functional matrices in facial growth. *Am. J. Orthod.*, 55:566-577.
- 30) Fox, W.M. (1965) Reflex-ontogeny and behavioral development of the mouse. *Anim. Behav.*, 13:234-241.
- 31) Altman, J. and Sudarshan, K. (1975) Postnatal development of locomotion in the laboratory rat. *Anim. Behav.*, 23:896-920.
- 32) Tamaru, M. (1994) Neurochemical correlates of learning impairment in microencephalic rats induced by methylazoxymethanol acetate. *Cong. Anom.*, 34:13-25.
- 33) Candland, D. and Nagy, Z.W. (1969) The open field: Some comparative data. *Ann. NY. Sci.*, 159:831-851.
- 34) Nishida, A., Asano, Y. and Okaniwa, A. (1992) Postnatal behavioral development in methylazoxymethanol-induced microcephalic rats - A behavioral teratology study -. *Exp. Anim.*, 41:413-419.
- 35) Goldey, E.S., O'Callaghan, J.P., Stanton, M.E., Barone, S. and Crofton, K.M. (1994) Developmental neurotoxicity: Evaluation of testing procedures with methylazoxymethanol and methylmercury. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 23:447-464.
- 36) Vorhees, C.V., Fernandez, K., Dumas, R. and Haddad, R. (1984) Pervasive hyperactivity and long-term learning impairments in rats with induced micrencephaly from prenatal exposure to methylazoxymethanol. *Dev. Brain Res.*, 15:1-10.
- 37) Balduini, W. Lombardelli, G., Peruzzi, G. and Cattabeni, F. (1991) Treatment with methylazoxymethanol at different gestational days: Physical, reflex development and spontaneous activity in the offspring. *Neurotoxicology*, 12:179-188.
- 38) Matutani, T., Nagayoshi, M., Tamaru, M. and Tsukada, Y. (1980) Elevate monoamine levels in

- the cerebral hemispheres of microcephalic rats treated prenatally with methylazoxymethanol or cytosine arabinoside. *J. Neurochem.*, 34:950-956.
- 39) Balduini, W., Cimino, M., Lombardelli, G., Abbracchio, M.P., Peruzzi, G., Cecchini T., Gazzanelli, G.C. and Cattabeni, F. (1986) Microcephalic rats as a model for cognitive disorders. *Clin. Neuropharm.*, 9:S8-S18.
- 40) Biel, W.C. (1940) Early age differences in maze performance in the albino rat. *J. Genet. Psycho.*, 56:439-453.
- 41) Lee, M.H. and Rabe, A. (1992) Premature decline in morris water maze performance of aging micrencephalic rats. *Neurotoxicol. Teratol.*, 14:383-392.
- 42) Rabe, A. and Haddad, R.K. (1972) Methylazoxymethanol-induced micrencephaly in rats: Behavioral studies. *Fed. Proc.*, 31:1536-1539.
- 43) Mohammed, A.K., Jonsson, G., Soderberg, U. and Archer, T. (1986) Impaired selective attention in methylazoxymethanol-induced microencephalic rats. *Pharm. Biochem. Behav.*, 24:975-981.
- 44) Sugioka, K. and Yamadori, T. (1991) Spatial memory impairment under a radial-arm maze task in microcephalic rats induced by prenatal methylazoxymethanol acetate (MAM) treatment. *Neurosci. Res.*, 5159.
- 45) Plonsky, M., Riley, E.P., Lee, M.H. and Haddad, R.K. (1985) The effects of prenatal methylazoxymethanol acetate (MAM) on holeboard exploration and shuttle avoidance performance in rats. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.*, 7:221-226.
- 46) 永吉道子, 平田ゆかり, 田丸政男, 杉本助男, 清水遵, 平林邦夫, 松谷天星丸 (1986) 脳発育障害モデルラットにおける神経化学的研究—障害の時期と脳内物質および学習機能の変化—. *日本生理誌*, 48:14-25.
- 47) Hanada, S., Nakatsuka, T., Hayasaka, I. and Fujii, T. (1982) Effects of prenatal treatment with methylazoxymethanol acetate on growth, development, reproductive performance, learning ability and behavior in the rat offspring. *J. Toxicol. Sci.*, 7:93-110.
- 48) Archer, T., Hiltunen, A.J., Järbe, T.U.C., Kamkar, M.R., Luthman, J., Sundstrom, E. and Teiling, A. (1988) Hyperactivity and instrumental learning deficits in methylazoxymethanol-treated rat offspring. *Neurotoxicol. Teratol.*, 10:341-347.
- 49) Monaghan, D.T. and Costman, C.W. (1985) Distribution of N-methyl-D-aspartate-sensitive L<sup>3</sup>H glutamate binding sites in rat brain. *J. Neurosci.*, 5:2909-2919.
- 50) Olton, D.S., Walker, J.A. and Grage, F.H. (1978) Hippocampal connection and spatial discrimination. *Brain Res.*, 139:295-308.
- 51) Jonston, M.V., Grzanna, R. and Coyle, J.T. (1987) Methylazoxymethanol treatment of fetal rats result in abnormally dense noradrenergic innervation of neocortex. *Science*, 303:369-371.
- 52) O'Keefe, J. and Speakman, A. (1987) Single unit activity in the rat hippocampus during a spatial memory task. *Exp. Brain Res.*, 68:1-27.