



小児の注意欠陥多動性障害の成因に関する実験心理学的手法による神経行動科学的分析

杉岡 , 幸三

(Citation)

科研報告書, 16530470

(Issue Date)

2007-05

(Resource Type)

research report

(Version)

Accepted Manuscript

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/K0001954>



小児の注意欠陥多動性障害の成因に
関する実験心理学的手法による
神経行動科学的分析

(研究課題番号 16530470)

平成 16 年度～18 年度科学研究費補助金
(基盤研究(C)) 研究成果報告書

平成 19 年 5 月

研究代表者 杉岡 幸三

神戸大学大学院医学系研究科・講師

はしがき

研究課題

小児の注意欠陥多動性障害の成因に関する実験心理学的手法による神経行動科学的分析
(課題番号 16530470)

研究組織

研究代表者： 杉岡幸三
(神戸大学大学院医学系研究科脳科学講座神経発生学分野・講師)
研究分担者： 岡市廣成
(同志社大学文学部・教授)

交付決定額 (配分額)

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 16 年度	2,600,000	0	2,600,000
平成 17 年度	600,000	0	600,000
平成 18 年度	500,000	0	500,000
総計	3,700,000	0	3,700,000

研究協力者

本研究は以下の方々の協力によって行われた。ここに感謝します。

寺島俊雄 (神戸大学大学院医学系研究科生理学細胞生物学講座神経発生学分野・教授)
薛 富義 (神戸大学大学院医学系研究科生理学細胞生物学講座神経発生学分野・技術員)
山本達朗 (神戸大学大学院医学系研究科生理学細胞生物学講座神経発生学分野・技術員)
今井英明 (神戸大学大学院医学系研究科神経発生学分野・大学院生)

研究発表

(1) 学会誌など

1. Fukui, Y., Ema, M., Fujiwara, M., Higuchi, H., Inouye, M., Iwase, T., Kihara, T., Nishimura, T., Oi, A., Ooshima, Y., Otani, H., Shinomiya, M., Sugioka, K., Yamano, T., Yamashita, K. H. and Tanimura, T.
Comments from the Behavioral Teratology Committee of the Japanese Teratology Society on OECD Guideline for the Testing of Chemicals, Proposal for a New Guideline 426, Developmental Neurotoxicity Study, Draft Document (September 2003).
Congenital Anomalies, 2004, 44(3), 172-177.
2. Tanabe, Y., Hashimoto, M., Sugioka, K., Maruyama, M., Fujii, Y., Hagiwara, R., Hara, T., Hossain, S. M. and Shido, O.
Improvement of spatial cognition with dietary docosahexaenoic acid is associated with an increase in Fos expression in rat CA1 hippocampus.
Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, 2004, 31(10), 700-703.
3. Tanabe, Y., Hashimoto, M., Haque, A. M., Sugioka, K., Katakura, M., Hara, T. and Shido, O.
Dietary effects of docosahexaenoic acid on spatial cognition learning ability in rats fed N-3 fatty acid-adequate diet.
Shimane Journal Medical Science, 2005, 22(2), 29-34.
4. Ema, M., Fukui, Y., Aoyama, H., Fujiwara, M., Fuji, J., Inouye, M., Iwase, T., Kihara, T., Oi, A., Otani, H., Shinomiya, M., Sugioka, K., Yamano, T., Yamashita, K. H., and Tanimura, T.
Comments from the Developmental Neurotoxicology Committee of the Japanese Teratology Society on the OECD Guideline for the Testing of Chemicals, Proposal for a New Guideline 426, Developmental Neurotoxicity Study, Draft Document (October 2006 version), and on the Draft Document of the Retrospective Performance Assessment of the Draft Test Guideline 426 on Developmental Neurotoxicity.
Congenital Anomalies, 2007 (in press).

5. Yanai, S., Sugioka, K. and Okaichi, H.

Dietary restriction inhibits hippocampal neurogenesis and spatial learning ability in Rats.

Japanese Psychological Research, 2007 (in press).

(2) 学会発表など（講演・シンポジウム・口頭発表）

1. 杉岡幸三

胎生期 MAM 投与による小頭（脳）症ラットの離乳期での活動性および水迷路学習と海馬の発生的形態異常との関係

第 44 回日本先天異常学会学術集会、佐賀、2004, 7/15-17

2. 杉岡幸三

実験的小頭（脳）症ラットの離乳期での水迷路事態における空間認知障害と海馬の発生的形態異常との関係

第 64 回日本動物心理学会、大阪、2004, 8/30-31

3. 杉岡幸三

海馬の発生的形態異常を伴う小頭（脳）症ラットの離乳期における活動性の分析

第 68 回日本心理学会、大阪、2004, 9/12-14

4. Sugioka, K., Setsu, T. and Terashima, T.

Spatial cognition deficit in a water maze during both weaning and adult periods in experimentally-induced microencephalic rats with an abnormal morphogenesis of the CA1 hippocampus.

第 27 回日本神経科学大会、大阪、2004, 9/21-23

5. Terashima, T., Katsuyama, Yu., Kikkawa, S. and Sugioka, K.

Postnatal development of corticospinal axons of the *reeler* mouse.

日本解剖学会第 80 回近畿支部学術集会、大阪、2004, 11/27

6. Sugioka, K., Setsu, T. and Terashima, T.

Spontaneous activity and spatial cognition in microencephalic rats with abnormal morphogenesis of the hippocampus or cerebellum induced by prenatal MAM injection

第 28 回日本神経科学大会、横浜、2005, 7/26-28

7. 杉岡幸三
大脳辺縁系の神経行動科学（教育講演）
日本行動科学学会第1回研修会、西宮、2005, 8/19
8. 杉岡幸三
海馬の発生学的形態異常を伴う実験的小頭（脳）症ラットの視覚性環境刺激変化に対する馴致
第69回日本心理学会、東京、2005, 9/10-12
9. 宮本満、杉岡幸三、三木明德
飼育環境の違いがマウスの自発活動性と空間認知に及ぼす影響—新たなリハビリテーション介入の可能性—
第41回日本理学療法学会大会、前橋、2006, 5/25-27
10. 杉岡幸三
海馬の発生学的形態異常を伴う実験的小頭症ラットの多動性および水迷路事態での空間的作業記憶障害
第46回日本先天異常学会学術集会、山形、2006, 6/29-30
11. 杉岡幸三、薛富義、山本達朗、寺島敏雄
胎生期MAM投与による海馬の発生学的形態異常を有するラットの離乳期および成体期における多動性と環境的視覚刺激変化に対する馴致遅延
第29回日本神経科学大会、京都、2006, 7/19-21
12. 杉岡幸三
大脳皮質の神経行動科学（教育講演）
日本行動科学学会第2回研修会、西宮、2006, 8/18
13. 杉岡幸三、今井英明
水迷路の中央をターゲットとする空間認知課題（第1報）—海馬の発生学的携帯異常を有するラットを用いて—
第66回日本動物心理学会、京都、2006, 10/14-15
14. Yanai, S., Sugioka, K. and Okaichi, H.
The effect of dietary restriction on hippocampal neurogenesis and spatial learning ability in rats

Neuroscience 2006, Atlanta, Georgia, USA, 2006, 10/15

15. 杉岡幸三

神経発生毒性試験における空間認知および活動性の分析—海馬の発生的形態異常を有するラットを用いて— (シンポジウム : Developmental Neurotoxicologyの新たな展開—試験ガイドラインの現状と研究の今後の課題—) (予定)
第47回日本先天異常学会、名古屋、2007,7/7-9

(3) 出版物

1. 杉岡幸三

脳の神経情報 心理学総合事典 (海保博之・楠見孝編) II部・4章、Pp. 72-90
朝倉書店、東京、2006年6月20日発行

2. 杉岡幸三

ラットの海馬の構造 比較海馬学 (渡辺茂・岡市広成編) 第4章 ナカニシヤ書房、京都、2007年 (印刷中)

3. 杉岡幸三・荒川高光 (翻訳)

能力障害およびリハビリテーションに付随する心理社会的問題 理学療法 (仮題) 第2章、乗松尋道・相川英三 (監修)、西村書店、東京、2007年 (印刷中)
Physical Rehabilitation: Assessment and Treatment 4th Edition, O'Sullivan, S. B., Schmitz, T. J. (Eds.), Chapter 2: Psychosocial Concomitants to Disability and Rehabilitation, F. A. Davis COMPANY, Philadelphia

4. 杉岡幸三

生まれる—発生生物学から見る胎児の世界—、二瓶社、大阪、2007年 (発表予定)

1.研究の背景

注意欠陥多動性障害 (Attention Deficit Hyperactivity Disorder、以後 ADHD と略す) は、現在、小児および青年臨床心理学および小児神経学の分野で、その本態がまだ解明されていない重要な課題のひとつであり、大きな教育的また社会的問題をはらんでいる。

著者らは、もともと大学および大学院において実験心理学を専門とした分野の出身であり、主にラットを用いて学習や記憶に関する行動学的研究を行ってきた。約 25 年前に、神経解剖学および小児神経学を研究する機会を得て、脳と行動の相関、特に海馬および小脳の機能に関する神経行動学的研究をすすめるうちに、海馬もしくは小脳損傷動物の行動変化が、小児の行動異常や学習障害の現れ方と類似していることに気付いた。ADHD 児は、情報処理能力の欠如に起因する特異的な学習遅滞および多動性を示すが、本申請者はこれらの蓄積から、この ADHD が周産期における何らかの原因による、海馬もしくは小脳、またこれらの脳部位と密接な線維連絡を有する他の脳部位の微細な発生学的形態異常に基づく機能不全に起因するかも知れない、という着想を得た。これが本研究の背景である。

2. 小児の注意欠陥多動性障害(ADHD)

小児の行動異常のうち、現在、アメリカや日本で特に問題となっている注意欠陥多動性障害(ADHD)は、以前は微細脳機能障害(Minimal Brain Dysfunction: MBD の範疇に入れられていたが、その後のアメリカ精神医学会(APA)による診断基準(DSM-III-R および DSM-IV-R)により新たに分類された小児の行動異常のひとつである。

ADHD は女兒に比べて男児に圧倒的に多く (女子の 6~9 倍) ,以下のような様々な行動異常を示す。我々は過去において、ADHD モデル動物に関する行動学的および形態学的研究を行ってきたが、APA の診断基準をもとにして我々がまとめた典型的な ADHD 児の行動異常は、以下のように要約される。

この障害を有する子どもの主要な特徴は、不注意・衝動性・多動性である。これらの行動異常は、家庭でも学校でもほとんどの状況下で現れる。これらの行動的特徴は、教室で先生の話を聴くといった、注意の持続が要求されるような場面でより顕著になる。学校では、課題を最後までやり遂げない、言われたことをよく聞かない、答えを出し抜けに言う、先生や友達の邪魔をする、席にじっと座っていない、教室の中を走り回ったり飛び跳ねる、落ち着きがない、といった行動を示す。家庭においても、親の指示に従えない、他人の邪魔をする、自分の意見を押し通す、不注意による失敗や怪我をする、騒々しく動き回る、といったことで上記の特徴が明らかとなる。集団場面では、ゲームのルールに従わない、順番を待てない、邪魔をしたり物をひたたく、結果を考えずに危険な行動をとる、始終しゃべっていて静かに遊べない、といったことが問題となる。学齢期以前では、一般に粗大運動過多を特徴とし、これらの子どもはいつも動き回っているとの印象を人に与える。

年長児では、落ち着きの無さが目立ち、青年期では社会的場面での衝動性がしばしば見出される。これらの行動的特徴のいくつかは年齢とともに変化し、自尊心が低い、気分的に不安定、諦めやすい、気性が荒いといった形で現れることがある。またこの障害を持つ子どもの多くは、結果的に学業不振を伴う。反抗症・行為障害・特異的発達障害のような、他の診断基準に基づく行動異常がしばしば付随して現れることもある。

3. 研究目的

以上のような背景から、本研究では、学習、注意また活動性に深く関与する海馬および小脳の機能不全に焦点を絞り、ラットを材料として、1) 胎生期後期に（実際上は、母ラットの妊娠後期に）発生および分化過程にある幼若神経細胞（神経芽細胞）に対して特異的に神経毒性を有する methylazoxymetanol (MAM) を経胎盤的に投与することによって、海馬もしくは小脳の発生的形態異常を有する ADHD モデル動物を作成し、これらの動物に対して、離乳期および成体期に、1) 実験的飼育環境事態での明期および暗期での自発活動性を赤外線センサーを用いて 15 分間隔で定量的に測定し、2) 室内光を 5 分交代で点滅させることによってもたらされる行動学的変化（視覚性驚愕反射）を指標として、その馴致過程を分析することによって、注意欠陥について行動学的に分析し、さらに 3) Morris 型水迷路事態での空間認知学習を参照記憶および作業記憶に分類してその学習障害の質的評価を行い、また Morris 水迷路事態での学習後の逆転学習による情報処理操作の変化に対する適応性について分析する。さらに、脳の形態学的検索および神経ネットワークの分析のために、4) 海馬および小脳の発生的細胞構築異常を形態学的に観察するとともに、これらの発生的形態異常を有する部位の神経細胞が正常な神経ネットワークを有するのかどうかについて、様々な手法を用いて神経解剖学的に検索し、これらの行動学的結果と神経形態学的所見間の相関を求め、ADHD 発症の成因およびその機序を探ろうとするものである。

4. 胎生期 MAM 投与

MAM は、自然界ではソテツの種子に含まれる有毒配糖体であり、妊娠動物に投与すると容易に胎盤を通過して、胎児の脳の神経細胞またグリア細胞の核酸および蛋白質に作用し、細胞分裂などの活性下にある幼若神経細胞（神経芽細胞）を選択的に死滅させる、強力な細胞毒性を有する物質である。この MAM を妊娠ラットに投与すると、小頭（脳）症がもたらされるということが Spatz & Lacquer (1968) によって初めて報告されて以来、ヒト小頭（脳）症のモデル動物として、多くの神経解剖学的、生化学的および行動学的研究が行われてきた。

妊娠中のどの時期にどの程度の量の MAM を投与するかによって、当然、脳の発生的

形態異常の程度またそれらの異常がもたらされる脳部位は異なる。小頭（脳）症は一般に、大脳皮質の低形成としてとらえられているので、ラットの場合、皮質を形成する神経芽細胞の発生時期に相当する、胎生 15 日前後で MAM を投与する研究が最も多い。皮質は inside-out の発生、分化および移動の過程を有するので、より早く発生する細胞は皮質の深層に、より遅く発生する細胞は皮質の浅層に位置することが知られている。このように、この時期での MAM 投与は、新皮質の発育不全をもたらすが、海馬を形成する神経芽細胞もほぼ同時期に発生・分化・移動を行うので、この時期での MAM 投与は、海馬 CA1 領野に特異的な発生学的形態異常をもたらすということが多くの研究で示されている。また、胎生後期や新生児期での MAM 投与は、小脳の低形成および発生学的形態異常をもたらすということも多くの研究で示されている。

1) 胎生期 MAM 投与および出生後から離乳までの観察

雌雄のラット(Jcl-Wistar)を型通り交配させ、膣栓確認日を妊娠 0 日齢と規定し、妊娠 15 日 (MAM-15 群) もしくは 19 日 (MAM-19 群) の午後 12 時に、生理食塩水に溶解した MAM(25 mg/kg)を腹腔内投与した。対照群 (Control 群) の動物には同日に同量の生理食塩水のみを同様に投与した。

出生を確認した日を 0 日齢とし、2 日齢の時点で雌雄ほぼ同数になるように各リッター 10 匹程度に間引きし、以後、その母親 (生物学的母親) とともに 21 日齢の離乳日まで通常条件下で飼育した。その間、母親および出生児の生物学的所見 (母子の体重測定、外表奇形の有無、耳介開展および開眼日齢など) を観察した。

2) 脳重および海馬・小脳の肉眼的形態異常

以下に記載する行動分析終了後、脳を摘出し (吻側部は嗅索の後端、尾側部は小脳の後端で脳幹を切断した)、脳重を測定した。

脳重に関しては、離乳期もしくは成体期での行動分析後に脳を摘出したため、各動物の脳重の絶対値は異なるが、MAM-15 群の脳重は対照群のおよそ 70%、MAM-19 群の脳重は対照群のおよそ 90-95%程度であった。

背側からの肉眼的観察においては、MAM-15 群の大脳皮質は対照群に比べて小さく、特に頭頂葉から後頭葉にかけての発育不全が顕著であり、正常動物では皮質に被われている上丘が MAM-15 群では露呈していた。MAM-19 群の大脳皮質は対照群と肉眼的には異ならなかったが、小脳がやや小さく、数例の動物ではカリフラワー状に盛り上がった小脳葉が観察された。いずれの発達時期においても、3 群の脳重に関して統計学的に有意差があった ($p<.01$)。

5. 飼育環境事態での明期および暗期での自発的活動性の分析

実験室内に設置した、深さ 1 cm の床敷（チップ）を敷いた 34×30×18 (cm) のケージ内に、各群の雌雄のラットを 1 匹ずつ放置し、ケージを含むすべての実験状況に対する 1 時間の馴致ののち、赤外線センサー（ニューロサイエンス社、AB System）（ケージの中央、高さ 25cm の位置に設置）によってラットの自発活動量を測定した。

測定は明期（午後 5 時～午後 6 時）および暗期（午後 6 時～午後 7 時）の計 2 時間に渡って 5 分もしくは 15 分間隔で行った。測定は、2 つのケージを用いて 2 匹同時に行った。

このセンサーは、移動や立ち上がり行動などの大きな動きから首振り行動のような小さな動きまで、質的な区別をすることなく、すべての自発的活動を定量的に測定できる非常に鋭敏なものである。得られたデータは、PC に集積され、のちにエクセル上で処理した。

図 1 は、成体期における雌雄の MAM-15 群および対照群の平均自発活動量を示したものである（横軸左側 4 ブロックは明期、右側 4 ブロックは暗期をそれぞれ 15 分ブロックで示している）。明期で対照群の雌ラット (Cont-AF) の活動量がやや多い傾向が認められるが、統計的には有意ではなかった。すべての群ともに、暗期に入ると自発的活動量は急激に増大したのち、1 時間後には明期とほぼ同じレベルまで次第に低下したが、その現れ方は群間 (MAM-15 vs Cont) および雌雄間 (AF vs AM) で異なっていた。図から明らかなように、暗期の前半に関して、雌雄いずれにおいても、MAM-15 群の自発活動量は対照群よりも高く、この傾向は雌ラットにおいて顕著であった。しかしながら、この高い活動性はその後急速に低下し、後半においてはほぼ対照群と同じレベルに達した。暗期に関する行った群 (2) × 性 (2) × ブロック (4) の分散分析では、群の主効果、ブロックの主効果および性とブロックとの交互作用がいずれも有意であった (いずれも $p < .005$)。暗期の前半に関する同様な分散分析においても、上記と同様な統計学的結果とさらに性の主効果が有意に得られた ($p < .01$)。

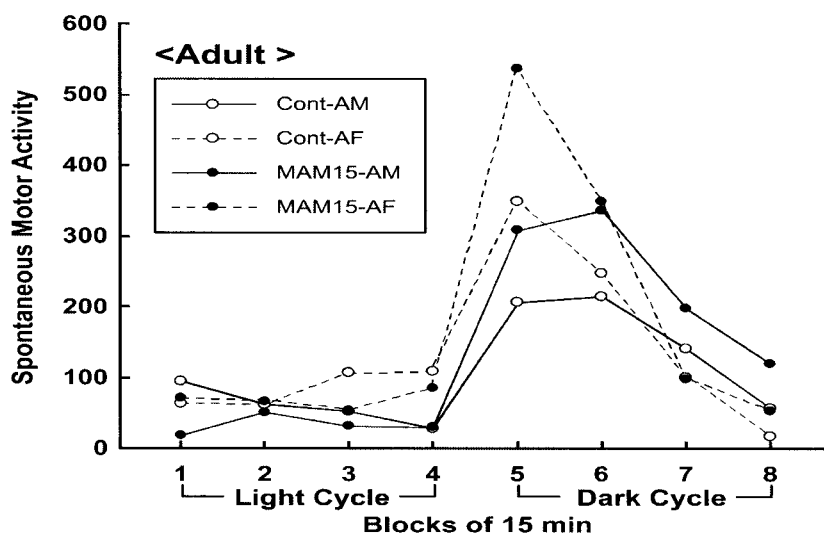


図 1. 成体期における各群の平均自発活動量 (AM: Adult Male, AF: Adult Female)

図2は、同じく、成体期における雄のMAM-15群、MAM-19群および対照群の平均自発活動量を示したものである。先のグラフと同様、明期では群間の有意差は得られなかったが、暗期では、MAM-15群の一貫した多動傾向、また顕著ではないがMAM-19群の hypoactive な傾向が観察された。暗期に関して分散分析を行ったところ、群の主効果が有意に得られた。また、各ブロック毎に *t* 検定を行ったところ、初期の2ブロックに関してMAM-15群と他の2群との間に有意差が得られた。また、その有意差の程度は、MAM-15群とMAM-19群との間で顕著であった。上に記載したすべての統計学的有意差は $p < .05$ であった。

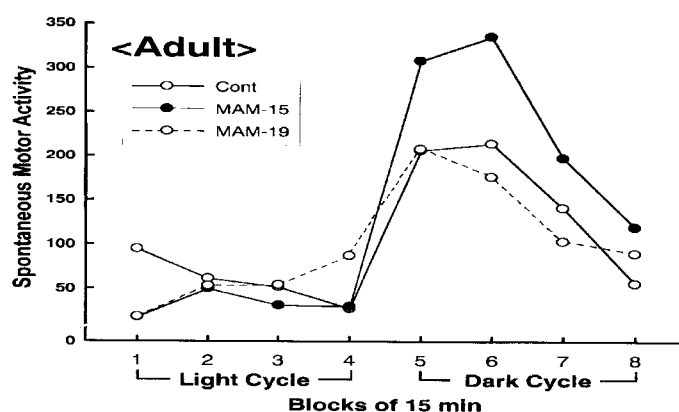


図2. 成体期における各群の雄ラットの平均自発活動量

図3は、離乳期における各群の雌雄のラットの平均自発活動量を示したものである。成体期で得られた行動推移と同様な傾向が観察されるが、雌雄の差異は認められない。成体期と同様な分散分析の結果、群の主効果およびブロックの主効果のみ有意に得られた (いずれも $p < .001$)。暗期の前半に関する同様な分散分析においてもまったく同じ統計学的結果が得られた。

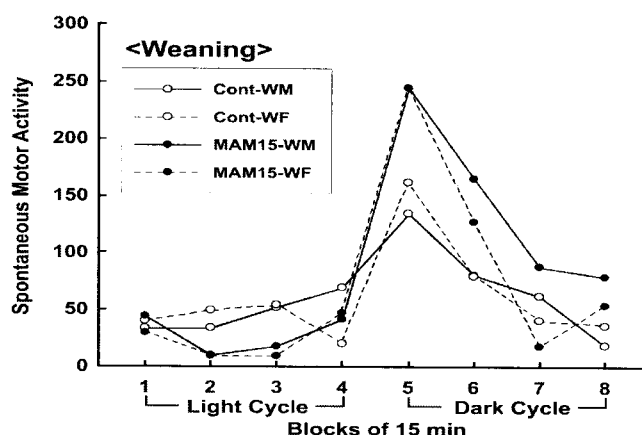


図3. 離乳期における各群の雌雄ラットの平均自発活動量

図4は、同じく、離乳期における雄のMAM-15群、MAM-19群および対照群の平均自発活動量を示したものである。先のグラフと同様、明期では群間の有意差は得られなかったが、暗期では、MAM-15群の一貫した多動傾向、また時間経過に伴うMAM-19群の急激な活動性の低下傾向が観察された。暗期に関して分散分析を行ったところ、群の主効果が有意に得られた。また、暗期の最初のブロックに関して t 検定を行ったところ、MAM-15群と対照群、およびMAM-19群と対照群の間に有意差が得られた（いずれも $p < .01$ ）。他のブロックに関しては、MAM-15群と他の2群との間に有意差が得られた（いずれも $p < .05$ ）。

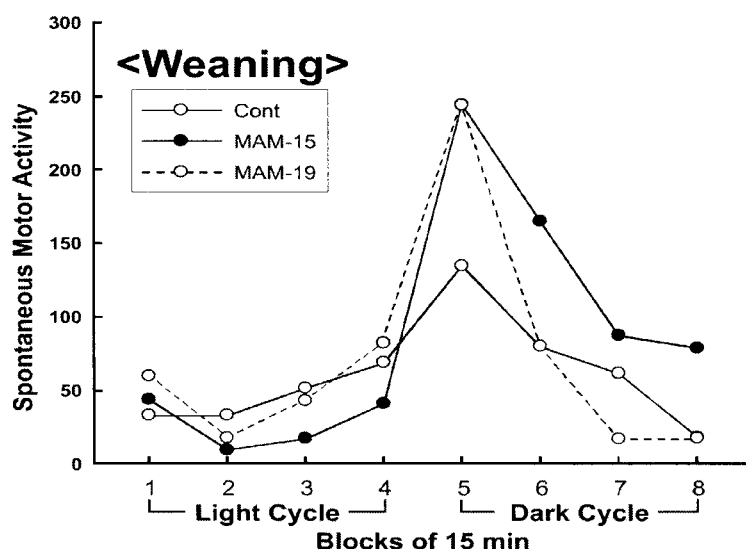


図4. 離乳期における各群の雄ラットの平均自発活動量

以上のことから、成体期においてはいずれの群とも雌ラットの活動性は高く、また離乳期においては雌雄差は観察できないが、いずれの発達時期においても雌雄ともに、特に暗期の前半においてMAM-15群の自発活動性は対照群よりも高い（多動性）、ということを示すものである。一方、MAM-19群はいずれの発達時期においても *hypoactive* な傾向を示す、ということが示唆された。

6. 視覚性環境刺激変化に対する行動学的馴致

各群のラットの離乳期（21・23日齢）および成体期（90・95日齢）に、上記と同様の装置を用いて、視覚性環境刺激変化に対する馴致の過程を自発活動量の変化の過程として行動学的に分析した。実験室に置いたホームケージ（35×30×17 cm）内に各群のラットを1時間放置したのち、赤外線センサーを用いて、1時間にわたり、1分間隔で各動物の自発活動量の測定を開始した。測定開始後、10分後から室内光を5分間隔で *off/on* した。測定は午

後1時から6時の間に、群間でコントロールして行った。

図5は、離乳期における各群の雄のラットの平均自発活動量を示したものである（横軸L1-L7は明期、D1-D5は暗期をそれぞれ5分ブロックで示している）。両群ともに、最初の暗期(D1)の5分間の自発活動量は顕著に増大し、続く5分間の明期で低下するというジグザグパターンが見られた。この自発活動量のジグザグパターンは対照群ではD2で最大値を示してL4まで観察され、その後次第に自発活動量は低下していった。一方、MAM-15群ではD3で最大値を示してL5まで自発活動量のジグザグパターンが観察され、その後、高い自発活動量を示しながら次第に低下していき、L6以降安定した。これらの群間の自発活動量のパターンの違いは、視覚性環境刺激変化に対する馴致がMAM-15群で（15分程度）遅延するということを示唆するものである。

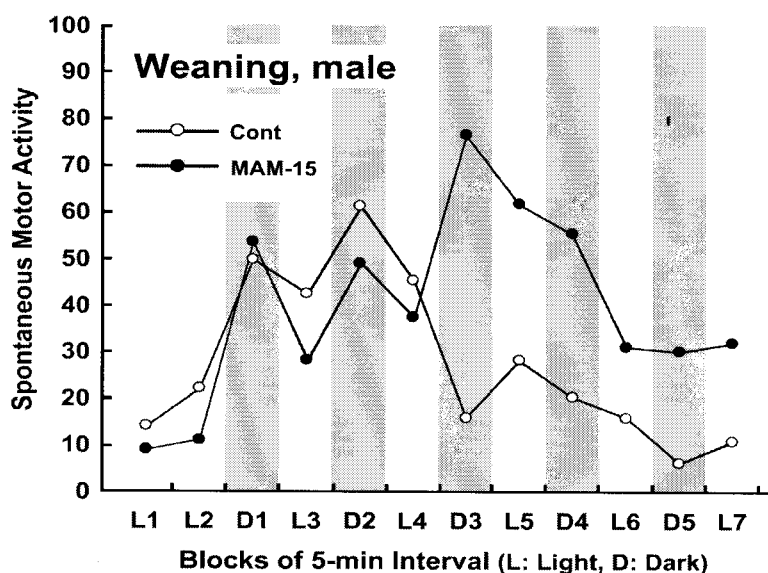


図5 離乳期における各群の雄ラットの平均自発活動量の5分毎の変化の推移

上記のデータを前半と後半に分けて処理して群(2)×ブロック(2)の分散分析を行ったところ、群とブロックとの交互作用が有意に得られた($p<.05$)。すなわち、対照群は後半の自発活動量が低下し、視覚性環境刺激変化に対する馴致の過程を示しているのに対し、MAM-15群では逆に後半の自発活動量は増加しており、馴致の過程はまったく観察できない。これらのことから、顕著ではないが、視覚性環境刺激変化に対する馴致がMAM-15群で遅延するということがいえる。

図6は、同じく、離乳期における各群の雌のラットの平均自発活動量を示したものである。グラフから明らかなように、雄ラットで観察されたジグザグパターンが顕著に見られた。先のデータと同様、前半と後半に分けて処理して群(2)×ブロック(2)の分散分析を行ったところ、群の主効果が有意に得られた($p<.05$)。これらのことは、雄雌ともに、視覚性環境刺激変化に対する馴致がMAM-15群で遅延するということを示すものである。

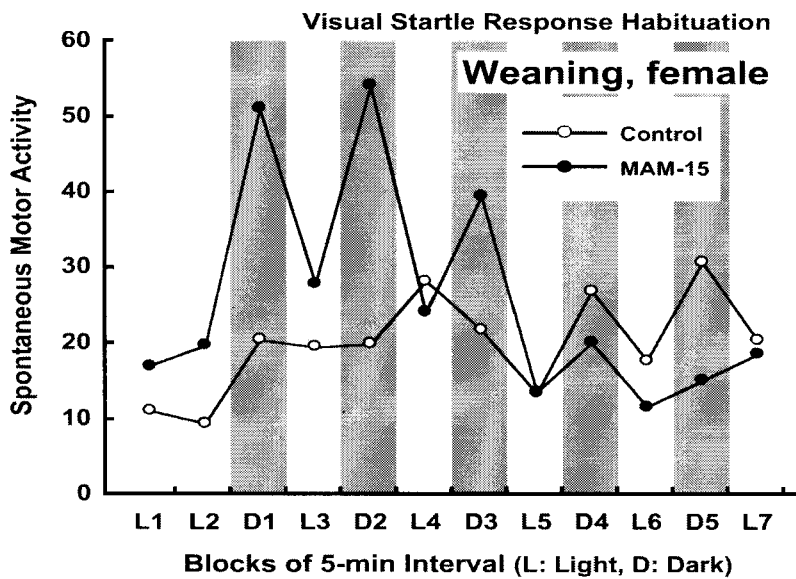


図6 離乳期における各群の雌ラットの平均自発活動量の5分毎の変化の推移

図7は、成体期における各群の雄のラットの平均自発活動量を示したものである。グラフから明らかなように、離乳期で観察されたジグザグパターンは見られなかったが、一貫してMAM-15群の自発活動量が多い。このデータを10分ブロックでまとめて行った、群(2)×ブロック(5)の分散分析の結果、群およびブロックの主効果がいずれも有意に得られたが(いずれも $p < .005$)、群とブロックとの交互作用は有意ではなかった。これらのことから、成体期においては、いずれの群も同様に視覚性の環境刺激変化に対して馴致していくが、一貫してMAM-15群の刺激変化に対する反応性は高い、ということが出来る。

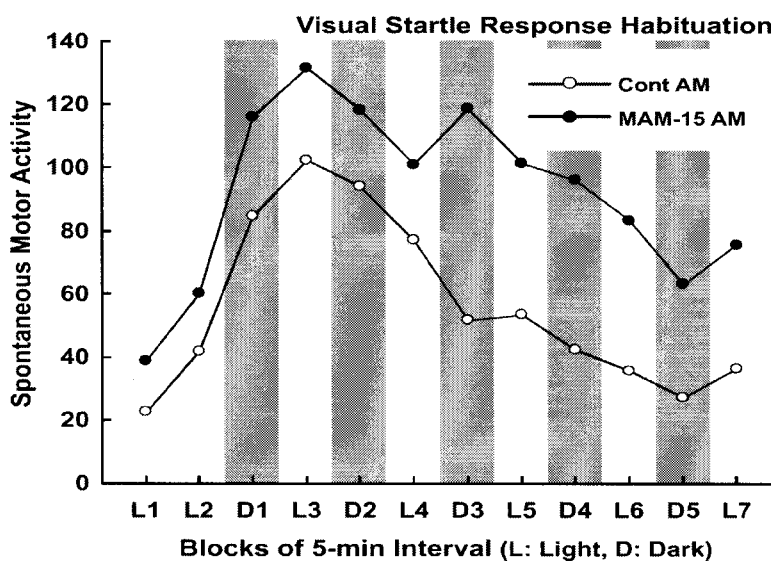


図7 成体期における各群の雄ラットの平均自発活動量の5分毎の変化の推移

図8は、成体期における各群の雌のラットの平均自発活動量を示したものである。グラフから明らかなように、MAM-15群の自発活動量はこの群の雄ラットよりも顕著に高いが、全体的な変化の推移はほぼ同様である、といえる。このデータを10分ブロックでまとめて分散分析を行ったところ、群およびブロックの主効果がいずれも有意に得られたが（いずれも $p < .005$ ）、群とブロックとの交互作用は有意ではなかった。

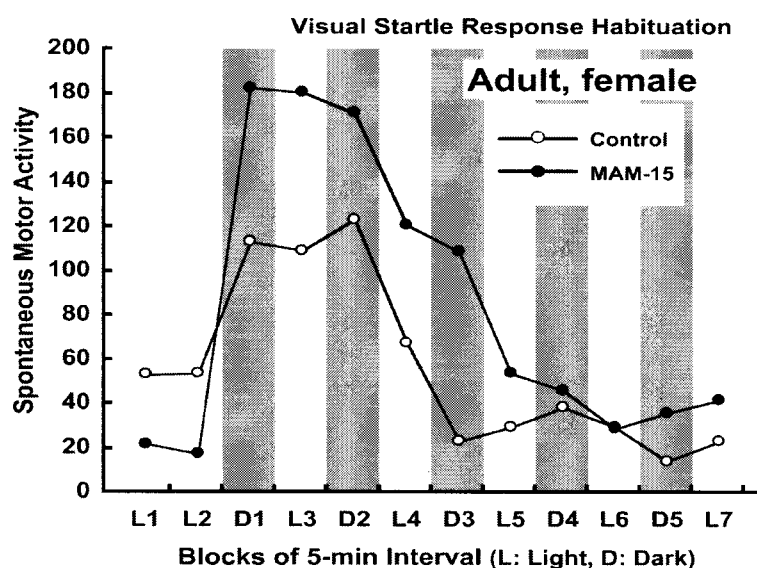


図8 成体期における各群の雌ラットの平均自発活動量の5分毎の変化の推移

これらのことから、室内光の5分毎の点滅による視覚性環境刺激変化に対する馴致過程を、飼育環境場面でのホームケージでの自発活動量の変化を指標として分析したところ、離乳期では対照群が視覚性環境刺激変化に対する馴致の過程を示したのに対し、MAM-15群ではこの馴致が遅延する傾向を示した。成体期においては馴致の過程の推移は群間で顕著に異なることはなかった。しかし成体期においても、一貫してMAM-15群の自発活動性は高く、このことは視覚性環境刺激変化に対する反応性が高い、ということを示唆するものである。これらのことは、MAM-15群は、自己にとって有益でない刺激（変化）を無視することが遅延するということを示すものであり、いわゆる「注意欠陥」に類似した行動学的異常を示すということを意味する。しかしながら、先の分析で示されたように、もともとMAM-15群は多動傾向を有するために、この群が馴致の遅延を示す、ということを一一般化することにはまださらなる研究が必要であると思われる。

7. 水迷路での空間認知の分析

1) モリス型水迷路事態での空間的参照記憶の分析 (STAGE 1)

成体期および離乳期において、MAM-15群、MAM-19群および対照群に対し、円形のプ

ール（直径 110cm、深さ 13cm、水面上の側壁の高さ 27cm）を用い、任意に決めた東西南北のいずれかの点を出発点として、プールの 4 分領域の象限の中央（標準条件）もしくはプールの中央（中央条件）の水面下 1cm にある逃避台（直径 10cm、高さ 12cm）にラットがたどり着くまでの潜時を測定した。プールの底板、側壁および逃避台はすべて黒く塗られ、プールの水も墨汁により黒濁していた。このような試行を 1 日 4 試行で 6 日間もしくは 8 日間行った。最終日の訓練後に、逃避台を取り除いて、1 分間のプローブテストを行い、逃避台を中心とした直径 40cm の範囲内に滞在していた時間を測定した。

図 9 は、成体期での各条件下での各群（MAM-15 群および対照群）の逃避潜時を 4 試行ブロックで示したものである。どの群も訓練の進行とともに逃避潜時は短くなったが、ブロックの初期において、両群ともに、中央条件の方が標準条件に比べて逃避潜時は長く、ブロックが進むにつれてその関係は逆転する傾向が見られた。後半のブロックにおいては、標準条件において群間の差異が顕著になったが、中央条件では明確な群間の差異は観察されなかった。群×条件×ブロックの分散分析の結果、前半のブロックにおいて、条件差（中央条件>標準条件）に有意な傾向が得られた ($p<.10$)。また後半のブロックの標準条件において、群とブロックとの交互作用（MAM 群>対照群）が有意に得られたが ($p<.01$)、中央条件では群間の差異は有意ではなかった。これらのことから、水迷路の中央に逃避台を設置した中央条件では MAM 群の空間的参照記憶の障害は観察できないが、通常のコリス型課題において MAM 群の空間的参照記憶の障害が認められる、ということが出来る。標準条件は、迷路外刺激に基づいたいわゆる場所方略を用いる課題であるのに対し、中央条件は場所方略以外の方略（反応方略また迷路内手掛かり方略）を用いることが可能であり、このことが上記のような群間の差異の現れ方の違いをもたらしたと考えられる。

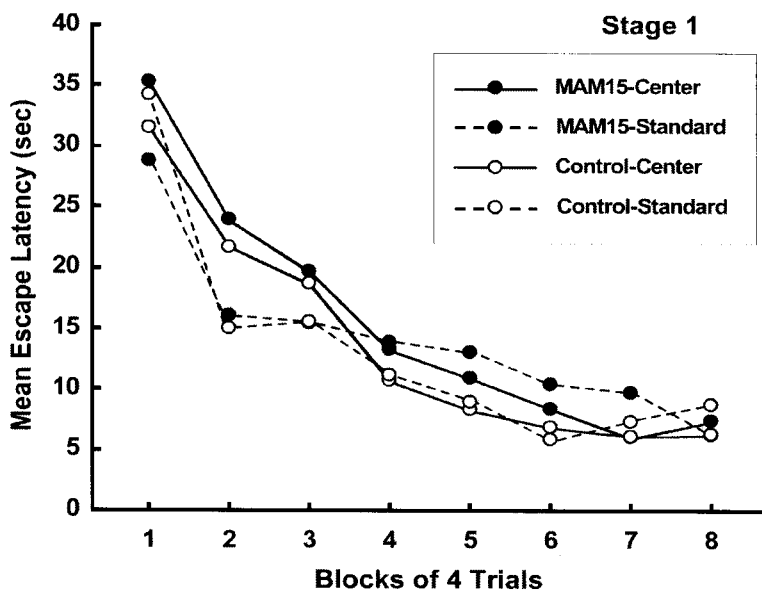


図 9 成体期での各条件（標準・中央）下での各群（MAM-15 群・対照群）の逃避潜時

2) 水迷路での遅延場所あわせ課題による空間的作業記憶の分析 (STAGE 2)

STAGE 1 と同様の仕様のプールを用い、図 10 で示されるように、プール内に黒色の塩化ビニール板 (高さ 40cm、幅 55cm) で T 字型の仕切りを設置し、プールを選択領域と 2 つのターゲット領域の計 3 つの領域に分割した。強制試行では左右どちらかの入り口をドアで閉じ、テスト試行ではいずれの入り口も開放した。1セッションは強制試行とテスト試行の 2 試行からなり、各試行は選択領域の中央のスタート位置から動物をプールの内壁に向けて入れることによって開始された。強制選択では逃避台を含む領域にのみ進入できるようにした。テスト試行では、両方のターゲット領域に進入可能であった。両試行間の遅延時間は 2 分間であった。このような試行を 1 日 1 セッションで 24 日間行い、各試行における潜時を測定した。

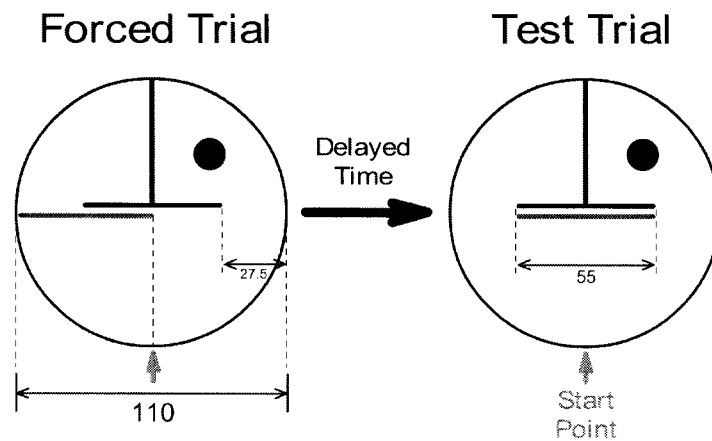


図 10 水迷路での遅延場所あわせ課題で用いた装置 (左: 強制試行、右: テスト試行)

図 11 は、STAGE 2 での各群のテスト試行での平均正選択率 (%) を 4 日 (4 セッション) ブロックで示したものである。図から明らかなように、対照群ではブロックの初期から 75% を超える高い正選択率を示し、それはブロックを通して維持され、最終ブロックにおいては 90% を超える高い正選択率を示しているのに対し、MAM 群の正選択率はブロックを通してほぼチャンスレベル (50%) にあり、まったく作業記憶は保持されておらず、顕著な空間的作業記憶の障害を示した。群×ブロックの分散分析の結果、群の主効果 (対照群 > MAM 群) が有意に得られた ($p < .01$)。

ここでは示さないが、テスト試行では勿論、強制試行においても、セッションを通して対照群の潜時の方が短かった。しかしながら、このことがテスト試行での正選択率における群間の差異をもたらした、とは一概にいえない。すなわち、強制試行の第 1 ブロックにおいても、また最終ブロックにおいても各群の潜時における差異は t test の結果、有意ではなかったからである。

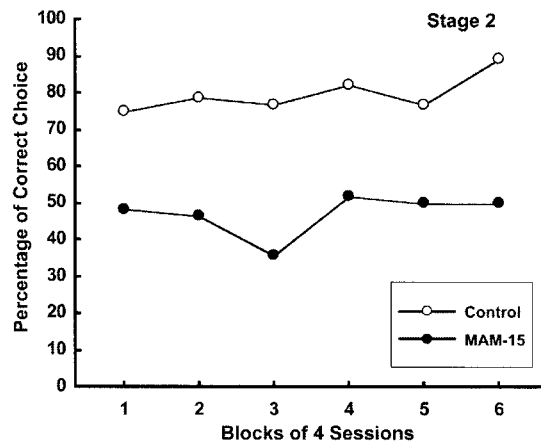


図 11. 各群のテスト試行での平均正選択率 (%)

ここでは示さないが、離乳期のラットを用いて、水迷路事態における空間的参照記憶および空間的作業記憶に関して、成体期で用いた方法とまったく同様な方法を用いて分析を行ったところ、上で示した成体期で得られた結果とほぼ同様な統計学的結果が得られた。

3) MAM-19 ラットの水迷路事態での空間的参照および作業記憶の分析

まったく同じ装置および方法を用いて、MAM-19 群の成体ラットの空間的参照記憶および空間的作業記憶についても分析した。図 12 は、Stage 1 での空間的参照記憶に関する結果を示したものである。図から明らかなように、中央条件および標準条件ともに、群間の統計学的有意差はまったく得られなかった。

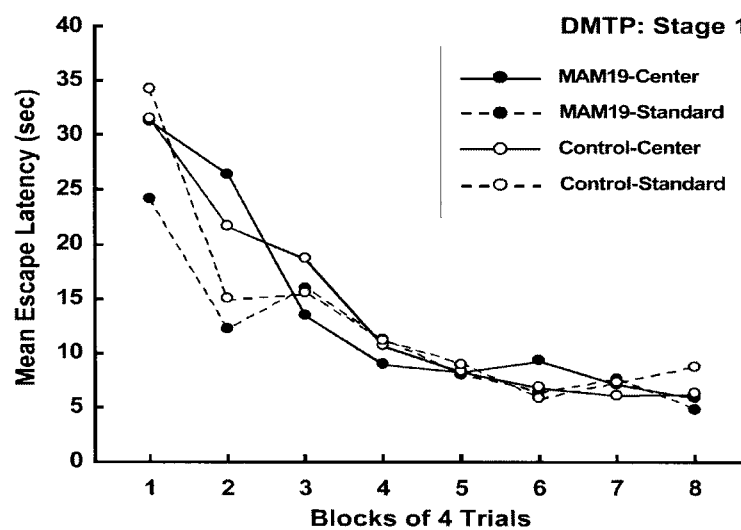


図 12 成体期での各条件（標準・中央）下での各群（MAM-19 群・対照群）の逃避潜時

図 13 は、Stage 2 での空間的作業記憶に関する結果を示したものである。図から明らかのように、両群ともに学習初期から高い正答率を示し、群間の統計学的有意差はまったく得られなかった。しかしながら、図 14 で示されるように、テスト試行（選択試行）での MAM-19 群の逃避潜時はブロックの後半において有意に長くなった ($p < .05$)。この理由は明らかではない。しかし、この群の動物は、たとえ正選択を行った試行においてさえ、非常に躊躇した行動パターンを示していたことは観察データからも明らかである。このような、いわゆる **Timidity**（臆病さ）ともいえるような行動は、我々が先に行った放射状迷路での分析でも観察され、このことはこの群の情動性における何らかの変化の存在を示唆するものであるかも知れない。

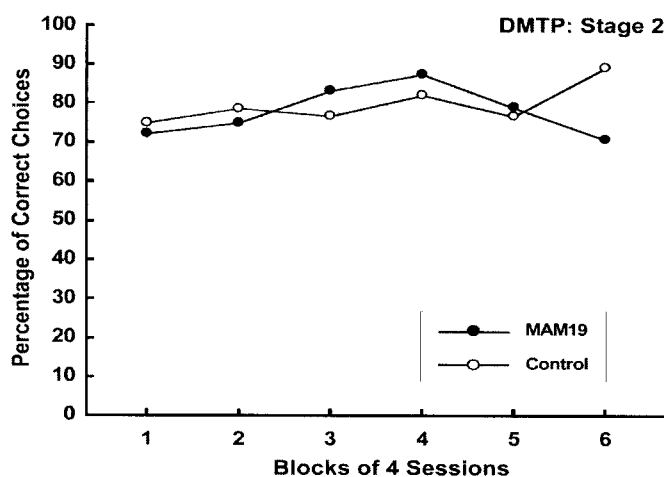


図 13. 各群のテスト試行での平均正選択率 (%)

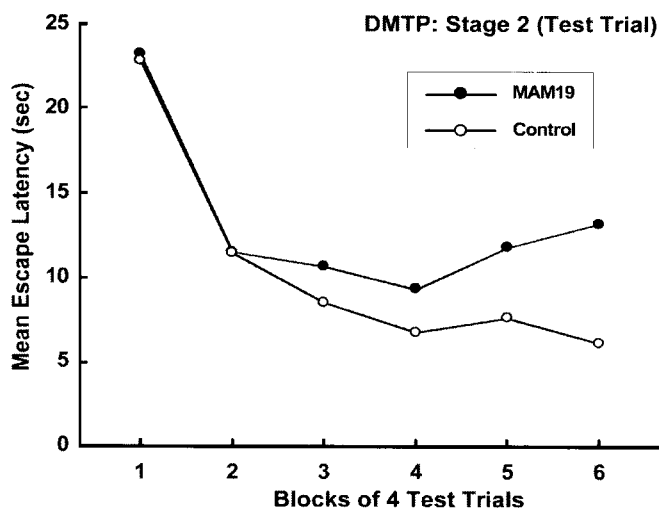


図 14. 各群のテスト試行での平均逃避潜時

4) MAM-15 ラットの水迷路事態での逆転学習

この実験では、Stage 1 として、通常のコリス型の水迷路学習を1日4試行で6日間行ったのちに、Stage 2 として、逃避台の位置を180度、すなわち反対方向に移動させて再び1日4試行で6日間の訓練を行った。これは、予め学習していた逃避台の空間的位置を突然変化させることによって、すでに獲得している空間的参照記憶を放棄し、新たな空間的参照記憶の獲得を必要とする課題である。

図15は、Stage 2 での逆転学習課題での結果を示したものである。図から明らかなように、対照群は180度移動した逃避台の位置を第2ブロック以降、速やかに学習していったのに対し、MAM-15 群の逃避潜時はブロックの前半において有意に長く、Stage 1 で学習した逃避台の位置に固執する傾向を示した。群×ブロックの分散分析の結果、群とブロックとの交互作用が有意に得られた ($p<.05$)。なお、ここでは示していないが、Stage 1 の最終ブロックの逃避潜時は群間で異ならなかった。また Stage 2 の第1ブロック（逆転学習開始日）においても群間の差異は有意ではなかった。これらのことから、MAM-15 群はすでに獲得している空間的参照記憶を放棄して新たな空間的参照記憶を獲得する能力の障害、すなわち適応的行動変容の障害を示したといえることができる。

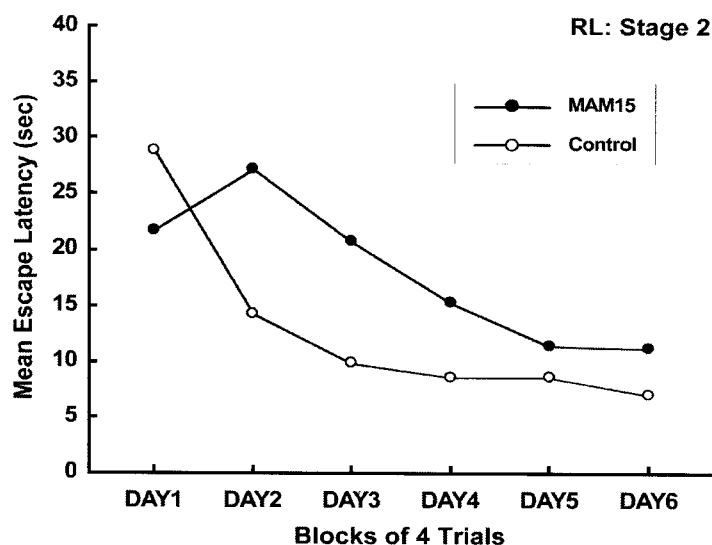


図 15. 逆転学習課題での各群の平均正逃避潜時

8. 海馬および小脳の発生学的異常の分析

1) セロイジン包埋による形態学的分析

上記の行動分析終了後、脳を摘出して脳重を測定後、型通り、10%バッファーホルマリオン溶液にて浸漬固定後、水洗およびアルコールによる脱水後、セロイジン包埋し、その後、

40 μ m の冠状断もしくは矢状断連続切片を作成し、その 5 枚もしくは 10 枚毎の切片について型通り、髄鞘およびニッスル顆粒の同時染色を施し検鏡した。

写真 1 は、MAM-15 群の脳の組織学的所見である。これらの組織学的所見は、検索したどの発達時期においても同様に観察されたので、以下にまとめて記載する。

MAM-15 群においては、すべての動物に大脳皮質（特に頭頂葉から後頭葉にかけて）の低形成が認められたが、1)皮質は薄いが 6 層構造は保たれている、しかし深層部に pyknosis 様の濃縮・強染した細胞が観察される、2)皮質は顕著に薄くなっており、6 層構造が乱れ、数例の動物では縞状に細胞が抜け落ちていたり、またパッチ（島）状に細胞が集塊している、3)海馬の形態学的異常（CA1 領域の錐体細胞層が上行（昇）層および網状分子層の両方向性に特異的に拡散しており、またこれらの錐体細胞の拡散と連続して、海馬白板を突き破って、海馬白板の背側と脳梁の腹側の間に、吻側方向に広がる異所性の錐体細胞の集塊）が存在する、という 3 つの発生学的形態異常のパターンが観察された。また数例の動物においては、第 1 層である分子層よりも表層に、しかし軟膜よりも下層に、錐体細胞の集塊が観察され、その部位が盛り上がっていた。これらの所見は写真 1 に示されているが、胎生期 MAM 投与動物で分子層よりも表層に錐体細胞が集塊する所見を得たのは、本研究が最初である。これらの形態学的異常のパターンの現れ方、その組み合わせまたその異常の程度は、リッター間によってもまたリッター内によっても異なっていた。

写真 2 および 3 は、MAM-19 群の脳の組織学的所見である。写真 1 は連続冠状断切片、写真 2 は連続矢状断切片である。MAM-19 群においては、MAM-15 群で観察されたような大脳皮質の層構造の異常や海馬の形態学的異常はまったく観察されなかった。しかしながら、これらの写真から明らかのように、小脳の前葉は、渦巻き状にねじれた葉形成を呈しており、小脳の前葉の葉形成（小脳活樹の形成不全）が完全に破壊されている像が観察された。この渦巻き状の葉形成は、しかしながら、後葉に近づくにつれ次第に正常像を呈するようになっていた。また、この葉形成の異常は、小脳の外側部において顕著であった。しかしながら、顆粒細胞層は正常像を呈しており、移動の異常を示す所見は得られなかった。また小脳核も組織学的異常を示すことはなかった。

(2) トレーサーによる神経ネットワークの分析

MAM-15 群のラットについて、1) 皮質脊髓路が正常に保たれているのかどうか、また、先に記した分子層よりも表層に観察された異所性の錐体細胞が、果たして皮質脊髓路ニューロンとしての形態学的機能を有しているのか、および 2) 先に記した海馬錐体細胞層の拡散部位の錐体細胞が、海馬の主要な投射部位である中隔野と正常な神経ネットワークを保っているのかどうか、また、海馬白板の背側と脳梁の腹側の間に観察される、吻側方向に広がる異所性の錐体細胞の集塊が皮質脊髓路ニューロンなのか、それとも海馬由来の錐体細胞なのか、について、それぞれ頸髄および内側中隔核に、逆行性標識色素であるフルオロゴールド(FluoroGold: FG)を注入することによって検索した。

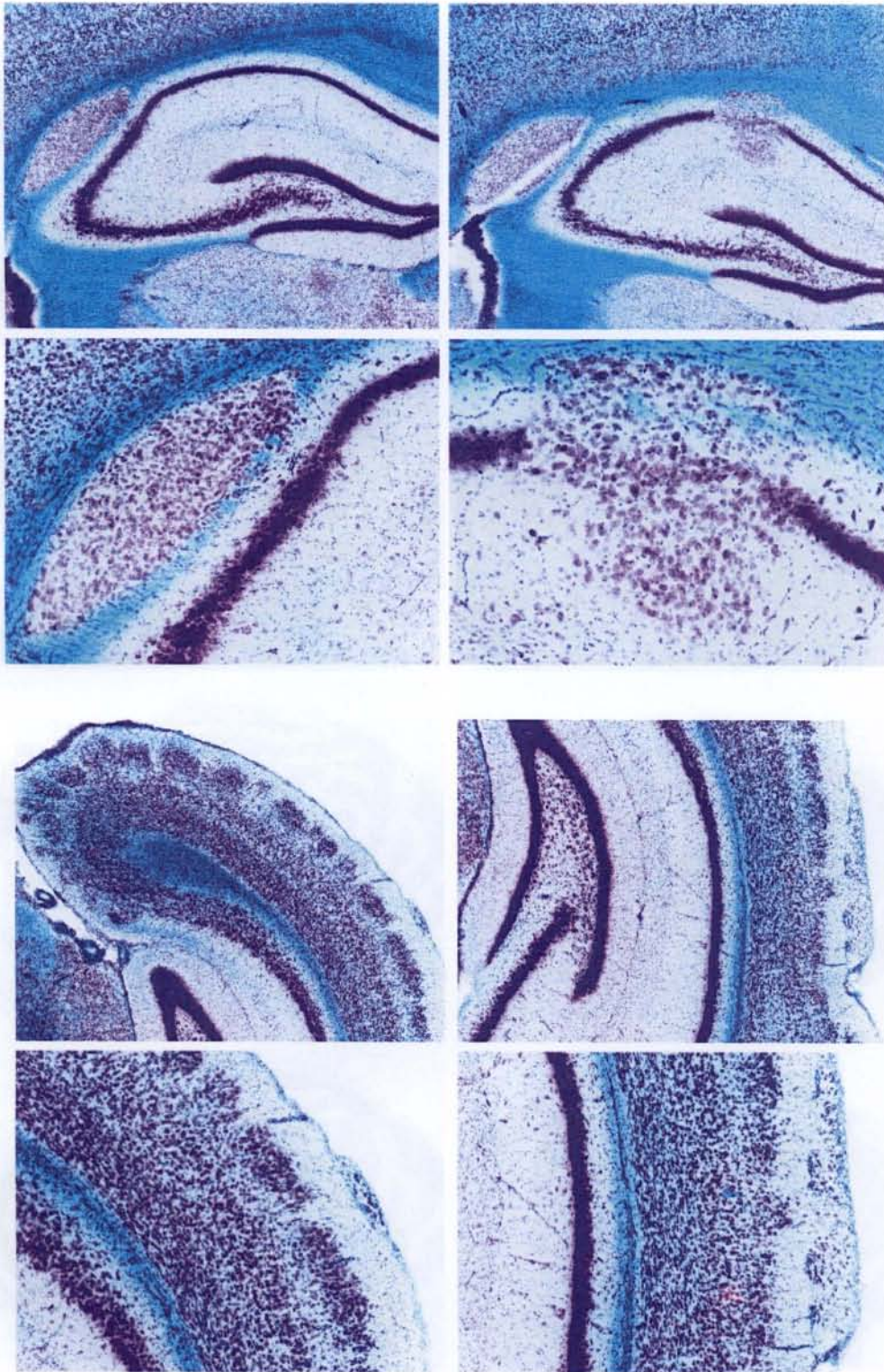


写真1 MAM-15 ラットの組織学的所見

海馬錐体細胞層の拡散、海馬白板と脳梁の間に存在する異所性の細胞集塊、皮質で観察されるパッチ状の細胞集塊および皮質の分子層の表層に観察される異所性の細胞集塊



写真2 MAM-19 ラットの組織学的所見(1)

小脳吻側部（小脳前葉部）から中部にかけて観察される葉形成の異常（渦巻き状の葉形成）

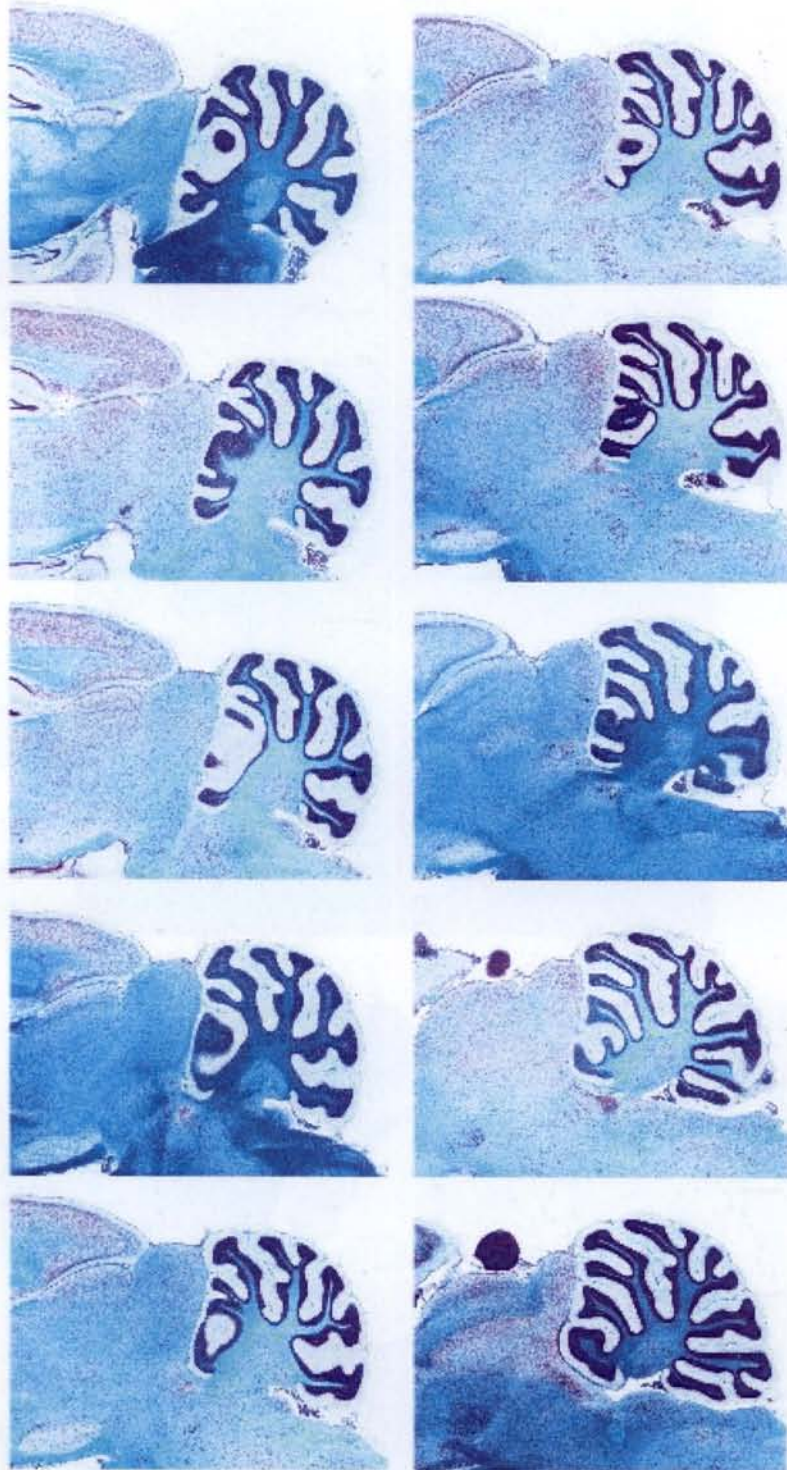


写真3 MAM-19 ラットの組織学的所見(2)

小脳前葉に観察される葉形成の異常（左上が最も外側、右下がほぼ正中） この葉形成の異常（渦巻き状の葉形成）は小脳の外側部で顕著であり、内側にいくにつれて正常像に近くなる

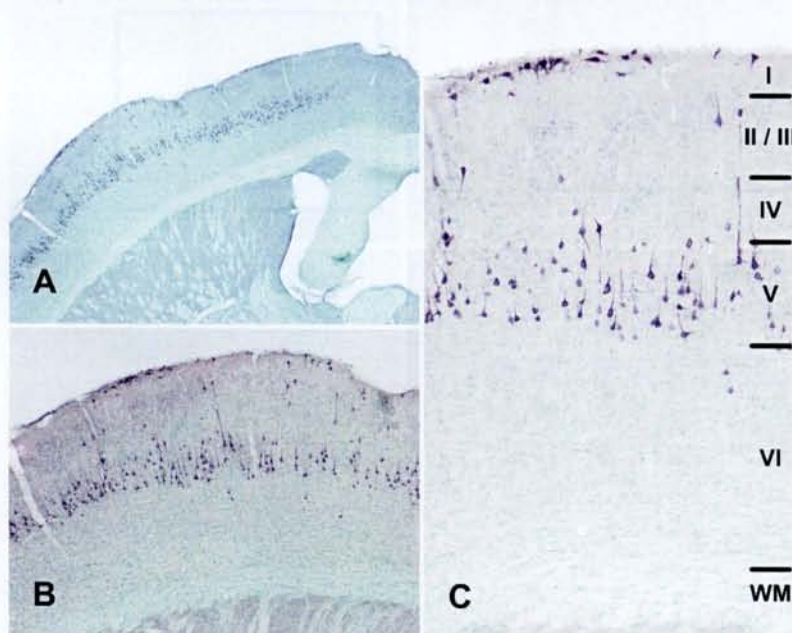
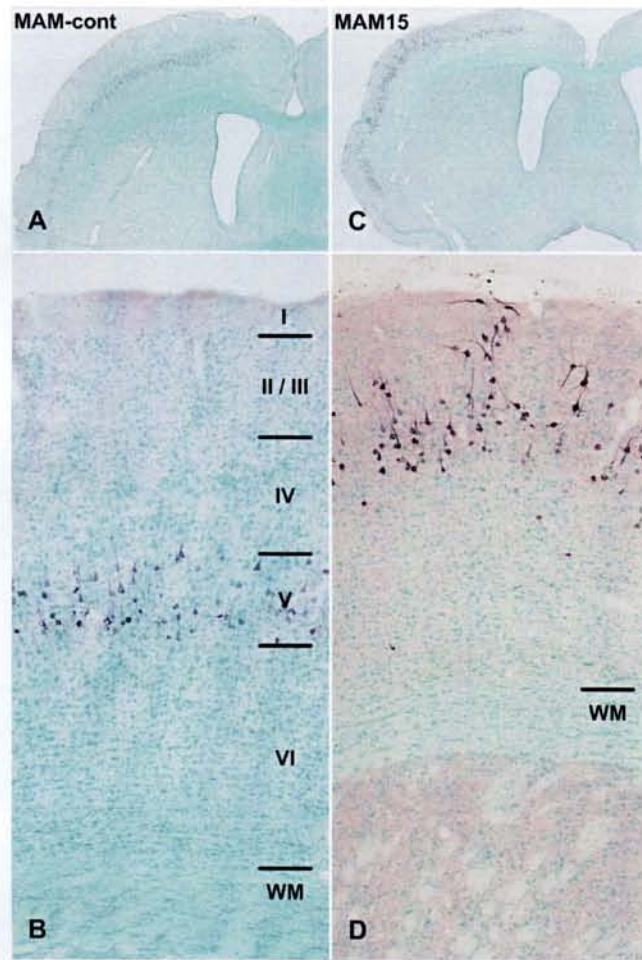


写真4 MAM-15 ラットの皮質脊髄路ニューロンの異所性分布
 第1層から第5層にかけて観察される、皮質脊髄路ニューロンの放射状の異所性分布

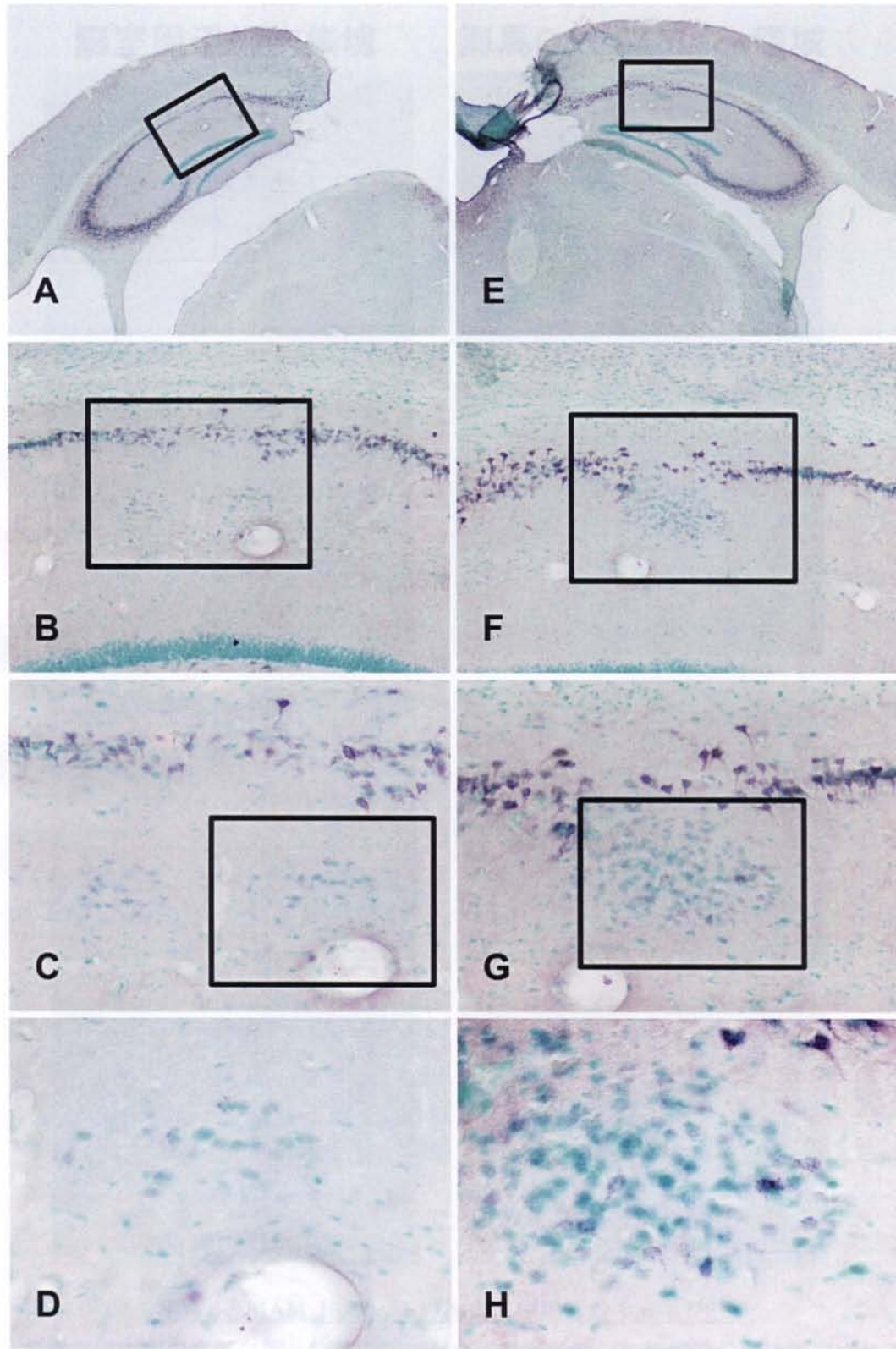
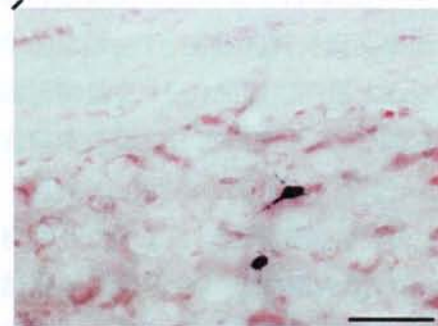
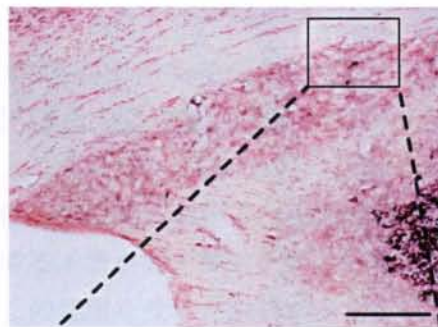
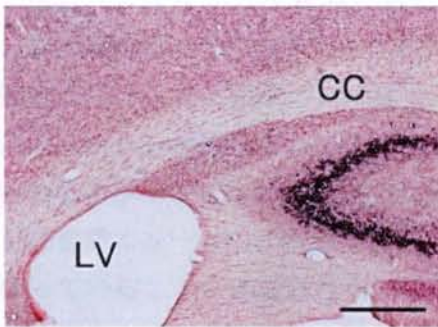


写真5 MAM-15 ラットの海馬-中隔野のネットワーク
 海馬錐体細胞層の拡散部位で観察される、中隔野と線維連絡を有する標識錐体細胞

脳室周辺細胞集塊



海馬CA1 diffusion領域

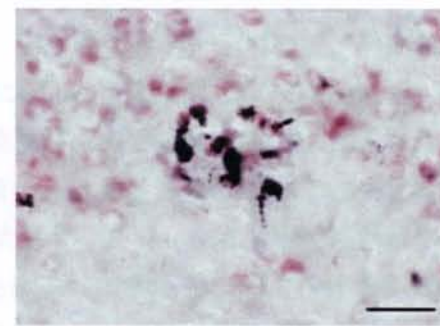
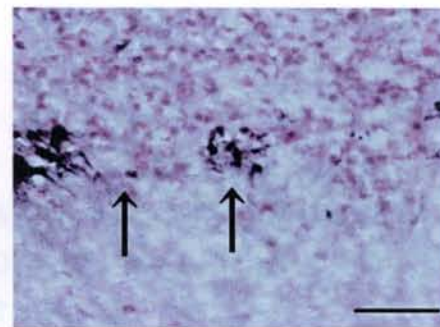
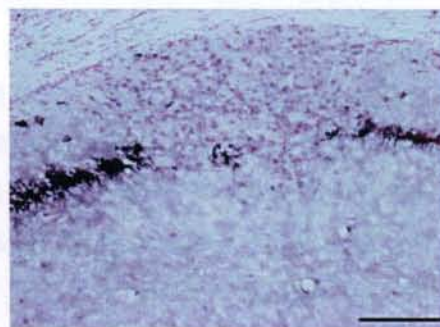
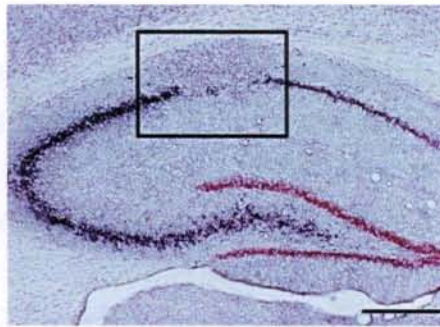


写真6 MAM-15 ラットの海馬-中隔野のネットワーク

左：側脳室周辺部の海馬白板と脳梁の間に存在する異所性の細胞集塊の中に観察される、中隔野と線維連絡を有する標識錐体細胞

右：海馬錐体細胞層の拡散部位で観察される、中隔野と線維連絡を有する標識錐体細胞

写真 4 は、頸髄に FG を微量注入し、大脳皮質の皮質脊髄路ニューロンを標識したものである。写真 4 上左 B に示されるように、対照ラットの皮質脊髄路ニューロンは皮質第 5 層にほぼ限局して分布していたが、写真 4 上 D および下に示されるように、MAM-15 群のラットの皮質脊髄路ニューロンは皮質第 1 層から第 5 層にかけてやや散在しながらコラム状に分布していた。また、分子層よりも表層に観察された異所性の錐体細胞の集塊に散在性に標識ニューロンが観察された (写真 4 下 C)。このことは、この異所性の錐体細胞も形態学的には頸髄に正常に軸索を伸ばしている皮質脊髄路ニューロンであることが示唆された。

写真 5 および 6 は、それぞれ内側中隔核に FG を微量注入し、海馬錐体細胞層の拡散部位の錐体細胞 (写真 5 および 6 右) および海馬白板の背側と脳梁の腹側との間の異所性の錐体細胞の集塊を観察したものである (写真 6 左)。写真から明らかなように、拡散していない錐体細胞はバンド状に標識ニューロンが観察されるが、拡散している錐体細胞にも散在性に標識ニューロンが観察され、これらの細胞は内側中隔核と正常な神経ネットワークを保っていることが示唆された。また、写真 6 左に見られるように、異所性の錐体細胞の集塊の一部に標識ニューロンが観察され、これらの細胞も内側中隔核と正常な神経ネットワークを保っていることが示唆された。従来、これらの異所性の錐体細胞は大脳皮質由来の細胞であり海馬由来の細胞ではない、と報告されてきたが、本結果はそれを覆す最初の所見である。

9. 研究のまとめと今後の問題

我々は、本研究において、小児の注意欠陥多動性障害の成因を探るために、神経発生毒性を有するメチルアゾキシメタノール(MAM) をラット胎生期の 15 日もしくは 19 日に投与し、この処置を受けた動物が示す行動異常と脳の発生的形態異常との関係を求める一連の神経行動奇形学的研究を行った。

行動学的には、1) 実験的飼育環境場面で、赤外線センサーを用いて、明期および暗期での自発的活動量を 15 分間隔で測定することによって多動性について分析した。また、2) 実験的飼育環境事態で、室内光を 5 分間隔で点滅させることによってもたらされる視覚性驚愕反応 (自発的活動量の変化) の馴致の過程を分析することによって、注意欠陥に焦点をあてて検索した。また、認知機能を分析するために、3) Morris 型水迷路学習事態での空間認知機能を遅延場所合わせ課題を用いることによって参照記憶および作業記憶に分類して分析するとともに、逆転学習課題を与えることによって学習機能と注意欠陥との関係性に着目した一連の行動分析を行った。そして所定の行動実験終了後、脳を摘出し、脳重を測定後、Kluver-Barrera 染色変化法による髄鞘およびニッスル顆粒の同時染色による組織学的検索を行って形態学的発生異常の有無を検索するとともに、これらの動物で観察される海馬および大脳皮質の形態学的異常が正常なもしくは異常な神経ネットワークを有してい

るのかどうか、について逆行性トレーサーを用いて分析し、これらの行動学的結果と脳の組織学的結果との相関を求めた。

1) 行動学的結果

これらの行動分析で得られた結果を要約すると、1) 離乳期および成体期の雌雄の動物を用いて行った、実験的飼育環境場面での自発活動性の分析では、分析したどの発達時期においても、明期においてはいかなる群間の差異は得られないが、暗期において胎生 15 日 MAM 投与ラットは有意な多動傾向を示し、特に雌ラットにおいてその傾向は顕著であった。一方、胎生 19 日 MAM 投与ラットは、統計学的には有意ではないが、逆に **hypoactive** な傾向を示した。また、2) 離乳期および成体期の雌雄の胎生 15 日 MAM 投与ラットを用いて行った視覚性環境刺激変化に対する馴致の過程を分析したところ、いずれの時期においても雌雄ともに、胎生 15 日 MAM 投与ラットの馴致が遅延する傾向を示し、このことは、この動物の注意欠陥の存在の可能性を指摘するものであった。また、3) 離乳期およびもしくは成体期での Morris 型水迷路学習事態での分析では、胎生 15 日 MAM 投与ラットは標準型の課題（空間的参照記憶課題）ではいずれの発達時期においても顕著な空間認知障害を示したが、場所方略以外の方略（手掛かり方略もしくは反応方略）を用いる課題では空間認知障害を示さなかった。しかし、その後に行われた 2 分間という非常に短い遅延時間を用いた遅延場所合わせ課題下で、顕著な空間的作業記憶の障害を示した。一方、胎生 19 日 MAM 投与ラットは、場所方略を用いる課題であってもそうでない課題であっても、いずれもほとんど空間認知の障害を示さなかった。ただ、今回の研究は成体期の動物を用いており、我々が過去に行った離乳期での分析では、胎生 19 日 MAM 投与ラットも学習の初期に空間認知を示すことが示されており、その意味で、分析時期との交互作用が存在する可能性は残っている。また、その後に行われた遅延場所合わせ課題下でも胎生 19 日 MAM 投与ラットはまったく空間的作業記憶の障害を示さなかったが、テスト試行で有意に長い潜時（躊躇行動）を示し、この群の動物の情動性が変化している可能性が示唆された。また、4) 同じ水迷路学習事態で行った逆転学習課題では、対照群が速やかにこの課題を解決したのに対し、胎生 15 日 MAM 投与ラットは逆転前の逃避台に固執する傾向を示し、この群の動物が新たな状況に対する適応的な行動変容を速やかに行えない可能性を示唆した。

2) 胎生期 MAM 投与ラットの脳の組織学的所見

胎生 15 日 MAM 投与は顕著な脳重の低下を生み出した。測定したどの発達時期においても、MAM 投与群の脳重は対照群のほぼ 70%前後であった。肉眼的にも明らかに新皮質の発育不全が著しく、特に頭頂葉から後頭葉にかけての発育不全が顕著であった。胎生 19 日投与ではほとんど新皮質への影響は肉眼的には見られず（対照群の脳重のほぼ 90-95%）、

脳重の軽度の低下は小脳の低形成が主たる原因であった。

胎生 15 日 MAM 投与ラットに関する組織学的検索では、すべての動物に大脳皮質（特に頭頂葉から後頭葉にかけて）の低形成が認められたが、1)皮質は薄い6層構造は保たれている、しかし深層部に pyknosis 様の濃縮・強染した細胞が観察される、2)皮質は顕著に薄くなっており、6層構造が乱れ、数例の動物では縞状に細胞が抜け落ちていたり、またパッチ（島）状に細胞が集塊している、3)海馬の形態学的異常（CA1 領域の錐体細胞層が上行（昇）層および網状分子層の両方向性に特異的に拡散しており、またこれらの錐体細胞の拡散と連続して、海馬白板を突き破って、海馬白板の背側と脳梁の腹側の間に、吻側方向に広がる異所性の錐体細胞の集塊）が存在する、という 3 つの発生学的形態異常のパターンが観察された。また数例の動物においては、分子層よりも表層に錐体細胞の集塊が観察され、その部位が盛り上がっていた。胎生期 MAM 投与動物でこのような所見を得たのは、本研究が最初である。これらの形態学的異常のパターンの現れ方、その組み合わせまたその異常の程度は、リッター間によってもまたリッター内によっても異なっていた。

胎生 19 日 MAM 投与ラットにおいては、胎生 15 日 MAM 投与ラットで観察されたような大脳皮質の層構造の異常や海馬の形態学的異常はまったく観察されなかった。しかしながら、小脳の低形成が顕著であり、小脳の前葉は渦巻き状にねじれた葉形成を呈しており、小脳の前葉の葉形成（小脳活樹の形成不全）が完全に破壊されている像が観察された。この渦巻き状の葉形成は、後葉ではほとんど観察されなかった。また、この葉形成の異常は小脳の前葉外側部において顕著であった。顆粒細胞層は正常像を呈しており、小脳核も組織学的異常を示すことはなかった。

3) 胎生期 MAM 投与による ADHD モデル動物の行動異常と脳の発生学的形態異常との関係

先に示したように、胎生 15 日 MAM 投与は、飼育環境事態での多動傾向、馴致遅延（注意欠陥）および水迷路事態での空間認知障害（特に空間的作業記憶の障害）をもたらした。これらの行動学的異常は、胎生期 MAM 投与がもたらす新皮質の発育不全とだけではなく、海馬の発生学的形態異常とより関係していると思われる。

本研究で用いた実験パラダイムは、成体ラットの海馬を外科的に損傷する研究で用いられているものと非常に類似しており、それらの研究で得られた海馬損傷ラットが示す行動学的異常とほとんど同様な結果が我々の一連の研究でも得られたことは注目に値する。しかしながら、胎生期 MAM 投与処置が海馬にのみ特異的に形態学的・機能的異常をもたらす、とは考えにくい。当然のことながら、胎生期 MAM 投与によって、海馬の形態学的異常だけでなく、海馬と密接な線維連絡を有する他の脳部位（中隔核、乳頭体、視床前核また帯状皮質や嗅内野など）の 2 次的変性、また海馬や皮質での神経成長因子の減少などの 2 次的影響も存在すると考えられる。

胎生 19 日 MAM 投与動物は、飼育環境事態での **hypoactive** な傾向および情動性の変化と関連すると思われる、2 次的な水迷路事態での **mild** な空間認知の障害を示した。これらの行動学的変化は小脳の低形成および葉形成の異常と関係していると思われるが、小脳の損傷が **hypoactive** な傾向をもたらすという報告は過去にほとんど無く、むしろ多動傾向をもたらすという報告の方が多い。外科的損傷と発生的形態異常という障害の違いによるのかは明らかではない。ただ、先に示したように、小脳の葉形成の形態学的異常は驚くほど大きいにも関わらず、その行動学的異常がそれほど顕著ではないことにも逆に驚かされる。この意味で、小脳は、本研究が目的としていた注意欠陥や多動性また空間認知学習の一義的責任脳部位ではないのかも知れない。しかしながら最近の研究では、小脳がいわゆる運動学習だけではなく、より高次の認知機能に深く関わっているという報告が多くなされており、その意味でさらなる今後の研究が待たれるところである。

本研究は、小児の注意欠陥多動性障害(ADHD)の成因を探るために、ADHD をもたらす可能な原因のひとつが海馬もしくは小脳の機能不全かもしれない、という仮説のもとに、そのモデル動物を作成することを意図して、胎生期に MAM を投与することによって作出した、海馬もしくは小脳の発生的形態異常を有する動物の行動分析を行った。得られた行動的結果は、胎生 15 日 MAM 投与動物において、海馬を直接損傷した動物と類似した行動結果、さらに ADHD 児が示す行動と類似した行動的異常が観察された。また、これらの行動異常が新皮質とだけではなく、海馬の発生的形態異常と相関している可能性を示す所見を得た。一方、胎生 19 日 MAM 投与による小脳の発生的形態異常を有する動物においては ADHD 児と類似した行動異常は観察できなかった。これらのことは、小児の注意欠陥多動性障害をもたらす責任病巣が海馬を含む神経ネットワークにある、ということを示唆するものである。しかし、先に述べたように、小児の注意欠陥多動性障害はひとつの症候群であり、その行動的現れは様々である。おそらく、本研究で指摘した海馬系の神経ネットワークだけでなく、これを含む他の辺縁系の脳部位の機能異常との相互作用も関与していることは間違いない。

我々は、これらの一連の研究において、胎生期 MAM 投与による海馬の発生的形態異常を有する動物が ADHD に代表される小児の行動異常のモデル動物になる可能性を指摘したが、これらの児には多動や注意欠陥だけでなく、左右混同などの視知覚認知障害や身体内および身体外空間認知障害も観察される。このことは、ADHD の行動異常が新皮質とくに頭頂葉の機能に関与することを示唆するものでもある。また、最近のいくつかの研究は、我々の報告と同様、胎生期 MAM 投与が海馬-嗅内皮質系の神経発生に変化をもたらし、それが空間認知を含む多くの学習・記憶機能に障害をもたらすだけでなく、アルツハイマー型痴呆やさらには統合失調症のモデル動物になる可能性も指摘しており、ADHD だけでなく、これらの機能に深く関与する海馬系の機能を調べるための、さらに綿密に計画された小児の行動テストの開発が今後望まれる。

本報告に関連する参考文献

- Battaglia, G., Pagliardini, S., Saglietti, L., Cattabeni, F., Di Luca, M., Bassanini, S., Setola, V. (2003) Neurogenesis in cerebral heterotopia induced in rats by prenatal methylazoxymethanol treatment. *Cerebral Cortex*, 13, 736-748.
- Bobee, S., Mariette, E., Tremblay-Leveau, H. & Caston, J. (2000) Effects of early cerebellar lesion on cognitive and emotional functions in the rat. *Behavioral Brain Research*, 112, 107-117.
- Burgess, N., Donnet, J. G., Jeffery, K. J., & O'keefe, J. (1999) Robotic and neuronal simulation of the hippocampus and rat navigation. In N. Burgess, K. J. Jeffery and J. O'Keefe (Eds.) *The Hippocampal and Parietal Foundations of Spatial Cognition*, Oxford: Oxford University Press, Pp. 149-166.
- Chen, S. & Hillman, D. (1986) Selective ablation of neurons by methylazoxymethanol during pre- and postnatal brain development. *Experimental Neurology*, 94, 103-119.
- Chevassus-Au-Louis, N., Rafiki, A., Jorquera, I., Ben-Ari, Y., & Represa, A. (1998) Neocortex in the hippocampus: An anatomical and functional study of CA1 heterotopias after prenatal treatment with methylazoxymethanol in rats. *The Journal of Comparative Neurology*, 394, 520-536.
- Colacitti, C., Sancini, G., DeBiasi, S., Franceschetti, S., Caputi, A., Frassoni, C., Cattabeni, F., Avanzini, G., Spreafico, R., Di Luca, M., Battaglia, G. (1999) Prenatal methylazoxymethanol treatment in rats produces brain abnormalities with morphological similarities to human developmental brain dysgeneses. *Neuropathol Exp Neurol*, 58, 92-106.
- Cox, C., Clarkson, T. W., Marsh, D. O., Amin-Zaki, L., Tikriti, S. & Myers, G. G. (1989) Dose-response analysis of infants prenatally exposed to methylmercury: an application of a single compartment model to single-strand hair analysis. *Environmental Research*, 49, 318-332.
- Fiore, M., Aloe, L., Westenbrek, C., Amendola, T., Antonelli, A., & Korf, J. (2001) Bromodeoxyuridine and methylazoxymethanol exposure during brain development affects behavior in rats: consideration for a role of nerve growth factor and brain derived neurotrophic factor. *Neuroscience Letter*, 309, 113-116.
- Fiore, M., Korf, J., Antonelli, A., Talamini, L., & Aloe, L. (2002) Long-lasting effects of MAM treatment on water maze performance in rats: Association with altered brain development and neurotrophin levels. *Neurotoxicology and Teratology*, 24, 179-191.
- Fukui, Y., Ema, M., Fujiwara, M., Higuchi, H., Inouye, M., Iwase, T., Kihara, T., Nishimura, T., Oi, A., Ooshima, Y., Otani, H., Shinomiya, M., Sugioka, K.,

- Yamano, T., Yamashita, K. H. and Tanimura T. (2004) Comments from the Behavioral Teratology Committee of the Japanese Teratology Society on OECD Guideline for the Testing of Chemicals, Proposal for a New Guideline 426, Developmental Neurotoxicity Study, Draft Document (September 2003) *Congenital Anomalies*, 44(3), 172-177.
- Gandhi, C. C., Kelly, R. M., Wiley, R. G., & Walsh, T. J. (2000) Impaired acquisition of a Morris water maze task following selective destruction of cerebellar purkinje cells with OX7-saporin. *Behavioral Brain Research*, 109, 37-47.
- Jarrard, L. E. (1983) Selective hippocampal lesions and behavior: Effects of kainic acid lesions on performance of place and cue tasks. *Behavioral Neuroscience*, 97, 873-889.
- Jongen-Rêlo, A. L., Leng, A., Lubber, M., Pothuizen, H. H. J., Weber, L., Feldon, J. (2004) The prenatal methylazoxymethanol acetate treatment: a neurodevelopmental animal model for schizophrenia? *Behav Brain Res*, 149, 159-81.
- Kawai, N., Sugioka, K. (1999) A study of emotionality assessed using licking suppression in rats with microencephaly induced by prenatal methylazoxymethanol acetate (MAM) treatment. *Behav Sci Res*, 38(1, 2), 1-6.
- Leng, A., Jongen-Rêlo, A. L., Pothuizen, H. H. J., Feldon, J. (2005) Effects of prenatal methylazoxymethanol acetate (MAM) treatment in rats on water maze performance. *Behav Brain Res*, 161, 291-98
- Markowska, A. L., Price, D., Koliatsos, V. E. (1996) Selective effects of nerve growth factor on spatial recent memory as assessed by a delayed nonmatching-to-position task in the water maze. *J Neurosci*, 16, 3541-3548.
- Morris, R. G. M. (1981) Spatial localization does not require the presence of local cues. *Learning and Motivation*, 12, 239-260.
- Nakamura, K., Sugioka, K., Yoshioka, T. (1981) A neuroanatomical aspect on behavioral teratology. *Cong Anom*, 21, 17-24.
- Nakamura, K., Sugioka, K., Yoshioka, T. (1982) Morphological and behavioral analysis in rats with early postnatal electrical stimulation: An experimentally-induced model of minimal brain dysfunction (MBD). Child Neurology (Fukuyama, Y., Arima, M., Maekawa, K., Yamaguchi, K. eds.), Pp. 294-300, Excerpta Medica.
- 岡市広成 (1996) 海馬の心理学的機能の研究 - 空間認知と場所学習 -, ソフィア.
- Okaichi, H. (2001) Effects of dorsal-striatum lesions and fimbria-fornix lesions on the problem-solving strategies of rats in a shallow water maze. *Cognitive, Affective, & Behavioral Neuroscience*, 1, 229-238.
- 岡市洋子・岡市広成 (1997) ラットの弁別型プール課題遂行に及ぼす装置内外刺激と海馬采-脳弓損傷の効果, 動物心理学研究, 47, 67-76.
- O'Keefe, J. (1991) The hippocampal cognitive map and navigational strategies. In J.

- Paillard (Ed.) *Brain and Space*, Oxford: Oxford University Press, Pp. 273-295.
- Olton, D. S., Becker, J. T., & Handelmann, G. E. (1980) Hippocampal function: Working memory or cognitive mapping? *Physiological Psychology*, 8, 239-246.
- Paredes, M., Pleasure, S. J., Baraban, S.C. (2006) Embryonic and early postnatal abnormalities contributing to the malformations in a rodent model of dysplasia. *J comp Neurol*, 495, 133-148.
- Ploner, C. J., Gaymard, B. M., Rivaud-Pechoux, S., Baulac, M., Clemenceau, S., Samson, S., & Pierrot-Deseilligny, C. (2000) Lesions affecting the parahippocampal cortex yield spatial memory deficits in humans. *Cerebral Cortex*, 10, 1211-1216.
- Redish, A. D. (2001) The hippocampal debate: are we asking the right questions? *Behavioral Brain Research*, 127, 81-98.
- Sanberg, P. R. Moran, T. H. & Coyle, J. T. (1987) Microencephaly: Cortical hypoplasia induced by methylazoxymethanol. In J. T. Coyle (Ed.), *Animal models of dementia*. Alan R. Liss, Inc. Pp. 253-278.
- Spatz, M., & Lacquer, G. L. (1968) Transplacental chemical induction of microencephaly in two strains of rats. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 129, 705-710.
- 杉岡幸三, 中村和成 (1980) ダイコクネズミにおける電撃による初期刺激の行動的および神経学的発達に及ぼす影響, *医学と生物学*, 100, 105-109.
- 杉岡幸三, 吉岡孝文, 中村和成 (1981) ラットにおける新生児期電撃処置の行動的、形態学的発達に及ぼす効果, *先天異常*, 21, 165-173.
- 杉岡幸三 (1982) 行動奇形学における行動試験の時期に関する方法論的検討. *先天異常*, 22, 101-110.
- 杉岡幸三 (1983) 微細脳障害症候群(MBD)の成因に関する行動学的・形態学的分析. *先天異常*, 23, 433-443.
- 杉岡幸三 (1984) 微細脳障害(MBD)症候群モデル動物. *異常行動研究会誌*, 24, 57-65.
- 杉岡幸三 (1988) 行動異常のメカニズムを探る. 胎児は訴える (岩崎康男、島井哲志編), Pp.187-223, 福村出版.
- Sugioka, K., Yamadori, T. (1992) A developmental study on reflex and activity in rats with microcephaly induced by prenatal methylazoxymethanol (MAM) acetate. *Cong Anom*, 32, 143-151.
- 杉岡幸三 (1992) 子どもの多動と海馬機能不全. *動物実験心理学セッション* (磯博行, 杉岡幸三編), Pp.109-167, 二瓶社.
- 杉岡幸三 (1994) 注意欠陥多動障害の動物モデル. *情動・学習・脳* (磯博行, 杉岡幸三編), Pp.55-71, 二瓶社.
- 杉岡幸三 (1995) 脳の発達. *行動の生理心理学* (岡市広成編), Pp.83-100, ソフィア.

- 杉岡幸三 (1995) ささえる・障害と空間認知. 空間に生きる－空間認知の発達的研究－(空間認知の発達研究会編), Pp.191-206, 北大路書房.
- 杉岡幸三 (1997) 放射状迷路課題における空間認知と大脳辺縁系. 動物心理学研究, 47, 155-169.
- 杉岡幸三・岡市広成 (1998) 小児の注意欠陥多動障害と海馬の機能不全に関する神経行動学的研究. 平成 9-10 年度科学研究費補助金研究成果報告書, Pp 1-42.
- 杉岡幸三 (1998) 脳と神経の解剖学. 新生理心理学 1 巻 生理心理学の基礎 (宮田洋監修, 藤沢清, 柿木昇治, 山崎勝男編), Pp.46-51, 北大路書房.
- 杉岡幸三 (1998) 組織学的方法. 新生理心理学 1 巻 生理心理学の基礎 (宮田洋監修, 藤沢清, 柿木昇治, 山崎勝男編), Pp.82-85, 北大路書房.
- Sugioka, K., Setsu, T., & Terashima, T. (2000) Spatial memory impairment in experimentally-induced microencephalic rats correlates with the morphological abnormality in the hippocampus: 2nd report. *Neuroscience Research*, supplement 24, S102.
- Sugioka, K., Setsu, T., & Terashima, T. (2001) Spatial memory impairment in rats with experimentally-induced disorders in morphogenesis of the hippocampus or anterior cerebellum. *Neuroscience Research*, supplement 25, S93.
- Sugioka, K. (2002) An analysis of activity in experimentally-induced microencephalic rats with abnormal morphogenesis of the hippocampus or the cerebellum. *Congenital Anomalies*, 42, 247(Abstract)
- 杉岡幸三・薛富義・寺島俊雄 (2003) 海馬の発生学的形態異常を伴う実験的小頭(脳)症ラットの空間認知障害. 生理心理学と精神生理学, 21, 19-30.
- 杉岡幸三・薛富義・寺島俊雄 (2003,) 胎児からのメッセージ－神経行動奇形学からのアプローチ. 行動科学, 42, 11-24.
- 杉岡幸三・岡市広成 (2004) 小児の注意欠陥多動障害と海馬・小脳の細胞構築異常の相関に関する神経行動学的研究. 平成 13-15 年度科学研究費補助金研究成果報告書, Pp 1-44.
- 杉岡幸三 (2006) 脳の神経情報. 心理学総合事典 (海保博之, 楠見孝編) 第 2 部・4 章, Pp. 72-90, 朝倉書店.
- 杉岡幸三 (2007) ラットの海馬の構造. 比較海馬学 (渡辺茂, 岡市広成編) 第 4 章 (印刷中) ナカニシヤ書房.