

論文の内容の要旨

新規マウス認知行動試験系の開発とその発達神経毒性研究への応用

遠藤俊裕

[目的]

ヒト精神・神経疾患モデルとしての遺伝子改変マウスや薬物投与マウスの行動学的実験観察法は、疾患の治療・予防戦略の確立に向けた基礎的・前臨床試験として、そして疾患発症の分子メカニズム解明のため研究手法として、不可欠なツールとなっている。また、発達期における胎児や新生児への環境化学物質への曝露が脳に及ぼす影響が懸念されている昨今、健康リスク評価や化学物質の発達神経毒性発現メカニズムの解明に向け、マウスの行動学的実験観察法は欠かせない。本研究の目的は、精神・神経疾患研究や発達神経毒性研究に広く応用可能な、新規マウス認知行動試験系の確立にある。特に、ヒト精神・疾患症状に直結する高次脳機能指標としての「行動柔軟性」の解析を可能とする、科学的信頼性、妥当性、効率性の高い試験系を開発することを目指した。

[方法]

本研究における新規マウス認知行動試験系の開発には、IntelliCage と呼ばれる集団飼育ホームケージ環境下における、全自動マウス行動試験装置を用いて行った。試験課題として、これまで脳卒中、軽度認知障害／早期認知症、精神疾患、加齢性認知機能低下等の患者・健常者を対象に、その前頭葉機能試験としての信頼性・妥当性が認められてきた「Brixton Spatial Anticipation Test」(Burgess & Shallice, 1997) を参考に、マウスのための新しい認知行動試験「Spatial Anticipation Task (SAT)」をデザインした。

この SAT では、マウスはホームケージ内で報酬（飲み水）を得ることのできる場所を 4 つの選択肢の中から探さなければならない。この報酬を得ることのできる場所は、常に単純な規則（特定の 2 か所の交替ルール）に従って変更されているため、マウスは数日のトレーニングによって、その規則を学習し、新たに報酬を得られる場所を予測して行動することができるようになる。そこで、報酬を得られる場所を予告なく変更すること（＝逆転課題）により、マウスが既に学習し習慣化された行動を、どのように新しいルールに柔軟に適応させることができるかを評価することで、行動柔軟性試験とした。

まず、この SAT が行動柔軟性試験として科学的信頼性および妥当性が認められるかについて、「初めに経験したルールが十分に学習されればされるほど、ルールが変更された時の行動の適応が困難になる」という理論的仮説をもとに検証、そしてプロトコルの最適化のための条件検討を行った。

続いて、SAT による行動柔軟性試験を、様々な認知機能障害モデルマウスの表現型解析に用いてその試験法としてのさらなる妥当性の検証を行った。

まず、ヒトを対象とした心理学的研究から得られた「セロトニンの合成阻害は行動柔軟性を障害する」という仮説がこの SAT を用いて実証できるかどうかを確かめた。このため、体内のセロトニン合成を減少させるトリプトファンハイドロキシラーゼ阻害剤 (PCPA) を投与したマウスに SAT を行った。

次に、化学変異原の ENU を用いた「マウスミュータジェネシスプロジェクト」から見出された、*Grin1*^{Rgsc174} および *Tuba1*^{Rgsc1736} という 2 種類の AD/HD 様の多動性を示す発達障害モデルマウスを用い、ヒト AD/HD 症状で報告されている行動柔軟性異常が再現できるかどうかを確かめた。

最後に、以上の実験から確かめられた行動柔軟性試験としての信頼性・妥当性を踏まえ、SAT を発達神経毒性研究に応用した。妊娠マウスに低用量の 2,3,7,8-tetrachloro-dibenzo-*p*-dioxin (TCDD) を経口曝露し、産まれてきた仔が成熟した後、SAT による行動表現型解析を適用した。

[結果]

本研究において考案された SAT は、「初めに経験したルールが十分に学習されればされるほど、ルールが変更された時の行動の適応が困難になる」という初期学習の達成度と逆転学習時の成績の相関性に関する理論的仮説に合致する結果を、非常に正確に示すデータを得られることがわかった ($r=0.84$, $P<0.0001$)。すなわち、行動柔軟性試験として非常に信頼性・妥当性の高い試験系であることが示された。

この SAT を用いた PCPA 投与マウスにおける行動表現型解析では、対照群に対して PCPA 投与マウスが新しいルール (逆転学習) への適応の遅れが観察され、確かに、従来の「セロトニンの合成阻害は行動柔軟性を障害する」という仮説を支持するデータを得ることができた。

また、SAT を用いた、2 種類の AD/HD 様の多動性を示す発達障害モデルマウス (*Grin1* 遺伝子変異マウスおよび *Tuba1* 遺伝子変異マウス) の行動表現型解析においても、同様にヒト AD/HD 症状で報告されている行動柔軟性異常が観察された。

これらの実験により、新たに開発した SAT を用いた行動柔軟性試験は、ヒトを対象とした心理学的研究や、ヒト精神・疾患症状から予想される行動柔軟性障害を検出し得る試験系として、そのさらなる妥当性が支持される結果を得ることが出来た。

また、SAT を用いて繰り返しルール変更 (連続逆転課題) を行うことにより、行動柔軟性の低下が、特定の学習段階において限定的な表現型なのか、それとも繰り返し顕れる持続的な表現型なのか、さらに高度なルール変更そのものに対する適応 (reversal learning-set の獲得) が困難な表現型なのかまで詳細に解析することができるようになった。

さらに、これらの実験で得たデータの詳細な解析から、この SAT では行動柔軟性のみならず、新奇環境における探索活動性、基底状態における自発活動性、全く新しい社会的行動指標としての集団内競争優位性、報酬イベントに対する固執性行動を同時に解析可能であることがわかった。

これらの行動指標を総合し、周産期 TCDD 曝露マウスの行動表現型解析を行ったところ、行動柔軟性の低下、社会的行動指標としての集団内競争優位性の低下、固執性行動の亢進が見られた。また免疫組織化学染色の結果、これらの行動異常が前頭前皮質における神経活動レベルの低下、および扁桃体神経核（扁桃体中心核、扁桃体基底外側部）の神経活動レベルの亢進と関連があることが示された。

[まとめ]

本研究で行われた一連の実験結果から、今回開発された SAT が、行動柔軟性の理論的仮説に合致する実験データを精度高く示すことができる試験系であること、ヒトを対象とした心理学的研究や、ヒト精神・疾患症状から予想される行動柔軟性障害を検出し得る試験系であること、わずかな化学物質曝露による高次脳機能への影響を検出できることから、その試験系としての信頼性・妥当性が支持された。

また繰り返しのルール変更を行うことにより、これまでマウスにおいて評価が困難であった、新規かつ高度な行動柔軟性の解析までが可能となった。さらに、これまで複数の試験系を組み合わせることでは実現できなかった情動性・自発活動性・社会性・固執性指標を同時に、効率的に評価することが可能になった点から、他の試験方法では再現することのできない、ユニークな行動表現型解析法として確立することができた。

以上から、本研究で確立された SAT によるマウス行動柔軟性試験は、今後精神・神経疾患研究や発達神経毒性研究の進展に広く活用されることが大いに期待される。