

【助成 39-47】

行動・ドーパミン・神経活動の同時計測による注意欠陥多動性障害の予測アルゴリズムの創出

代表研究者 金沢医科大学 医学部 助教 古山 貴文

共同研究者 准教授 山本 亮

〔研究の概要〕

注意欠陥多動性障害(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。現在の ADHD 診断には、問診や知的水準を計測する心理検査が中心である。そのため、子供の時に診察機会に巡り合えず、成人後に ADHD と診断されるケースも増加しており、ADHD を簡易計測にて早期診断できる機器の開発は重要である。本研究の目的は、ADHD モデル動物を対象に、前頭前皮質の神経動態を解明し、ADHD 簡易診断用の予測アルゴリズムを創出することである。ADHD のモデル動物作成および蛍光バイオセンサを用いて、行動中の被験体を対象にドーパミンおよび神経活動を同時計測する実験環境の構築を行った。その結果、多動性が生じるモデル動物の作製、ドーパミンおよび神経活動の同時計測に成功した。今後は、これらを組み合わせ、ADHD 症状時の前頭前皮質のドーパミンおよび神経活動を計測し、予測アルゴリズムの創出を目指していく。

〔研究経過および成果〕

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。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(Fona and Nutt, 2005)。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。

報告者のこれまでの研究で、ファイバーフォトメトリ法を用いて、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に研究を進めてきた。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。

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のデシプラミン塩酸塩(20mg/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 μ g / 3 μ l の 6-OHDA(PBS で溶解)を注入した(図 1)。6-OHDA 注入後、37 度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°C の部

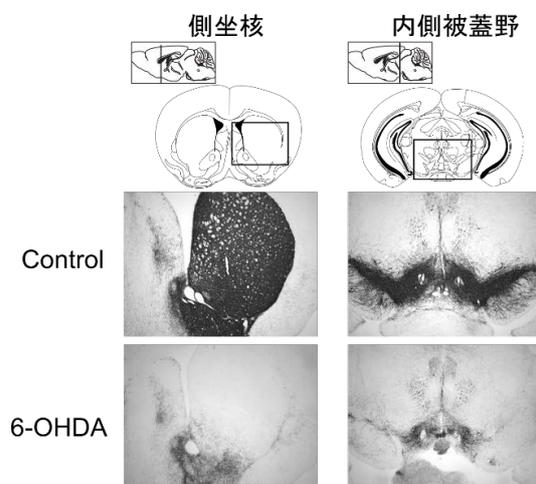


図1 脳室に6-OHDAを入れた個体とコントロール個体のチロシンヒドロキシラーゼ(TH)染色。

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:1m、高さ:45cm)テストを 10 分間行い、行動量を測定した。その結果、Control 個体と比べて、6-OHDA 個体では、行動量が増加した(図 2)。そのため、ADHD モデル動物の作成に成功した。

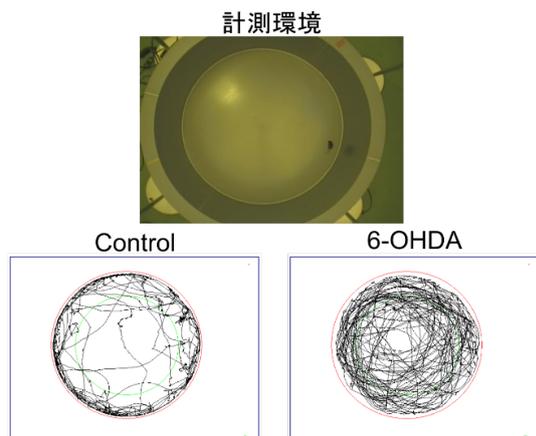


図2 Control個体と6-OHDA注入個体の行動量の違い。オープンフィールドで各個体の行動量を計測した結果、Control個体は円の縁を探している野に対し、6-OHDA 個体では、円の縁や円の中心を回るような行動が観測された。

実験 2 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°)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)をそれぞれ 100nl 注入した。注入部位上部 200 μ m 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、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 5s の Air puff を使用し、被験体の左目に Air puff が当たるように設置した。音刺激を 5s 間提示後、Air puff を提示した。ドーパミン濃度と神経活動の計測には、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。d-Light は緑色、jRGECO は赤色の蛍光を発するため、ドーパミンと神経活動をそれぞれ独立に計測可能となる。その結果、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 の蛍光変化量は変化せず、jRGECO の蛍光は上昇した。一方、嫌悪刺激終了後は、jRGECO の蛍光が減少し、d-Light の蛍光が上昇した。

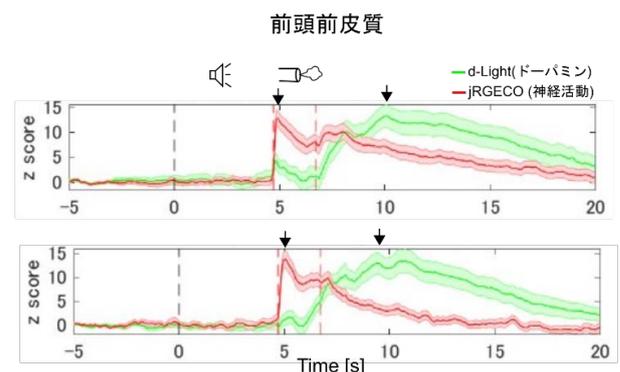


図3 前頭前皮質のドーパミンと神経活動の同時記録。蛍光バイオセンサ(d-Light:ドーパミン濃度、jRGECO:神経活動で生じるカルシウム濃度変化)により、行動中の被験体からドーパミンと神経活動の記録に成功した。

これらの結果から、前頭前皮質において、ドーパミンと神経活動の同時計測に成功したと考えられる。さらに、前頭前皮質において、神経活動およびドーパミンは恐怖音の予測として反応せず、嫌悪刺激に対して反応することが明らかになった。また、神経活動が生じた後にドーパミン濃度の上昇が確認されたため、嫌悪刺激に抵抗するために、ドーパミンを放出している可能性が示唆された。

[発表論文]

なし