

氏名(本籍)	ハシモト ユツカ 橋本 豊 (神奈川県)
学位の種類	博士(獣医学)
学位記番号	乙第297号
学位授与の要件	学位規則第3条第2項該当
学位論文題名	N-methyl-N-nitrosourea (MNU) により実験的に誘発したラット小頭症児の行動奇形学的研究
論文審査委員	(主査) 教授 中村 経紀 (副査) 教授 江口 保暢 教授 赤堀 文昭 助教授 有嶋 和義

論文内容の要旨

近年、アルコール、向精神薬、放射線などが、ヒトで行動奇形を誘発する外因となることが明らかになったことから、動物実験においても出生後の行動・機能を検索することが重要視されるようになった。

しかし、実験動物では、化学物質の暴露により神経系の形態学的発生異常が成立した時に、行動にはどのような異常が起こるかという知見に乏しく、実験的な行動奇形学の方法論は、いまだに確立されていないのが現状である。このことから実験行動奇形学の課題の一つとして中枢神経系の巨視的ないし微視的異常と機能障害との関連を調べることが挙げられている。

本研究は、中枢神経系に選択的な催奇形作用を示すことで知られる N-methyl-N-nitrosourea (MNU) を妊娠中の母ラットに投与して誘発した小頭症(小脳症)児の行動を検索し、中枢神経系の巨視的な障害とその障害によって発現する行動異常との関連性を明らかにすることを目的とした。

第1章 ラット胎児に及ぼす MNU の影響

胎児の器官形成期にあたる妊娠時期(妊娠7~17日)の母ラットに3用量(2.5, 5, 10mg/kg)のMNUを連日、腹腔内投与し、胎児の発生、出生児の発育に及ぼす影響を検討した。その結果、10mg/kgの投与では全着床胚が死亡すること、5mg/kg以下の投与では胎児体重が減少し、ほぼ全例に外表異常として扁平な頭頂部がみられること、この外表異常は終脳の形成不全(小頭症)に基づくこと、5mg/kgの投与では出生児が、生後に生存しないことが判った。また、2.5mg/kgの投与では出生した児はほぼ全例が生育し、用量を選択すれば小頭症の出生児でも生後の長期生存が可能なが判った。この小頭症児では行動検査の結果、顕著な迷路学習能力の障害および情動性の変化を示唆する寡動傾向がみられた。

第2章 ラット胎児の脳に及ぼす MNU の影響

詳細な行動・機能検査を行うための前段実験として器官形成期にあたる妊娠時期(妊娠7~17日)のいずれか1日に1用量(5mg/kg)のMNUを投与し、胎児とその脳の発生に対する発生時期依存的な影響の有無を検討した。その結果、胎児脳の障害感受期は、妊娠10日以降にあり、感受部位は、中脳—終脳—嗅葉—後脳の順に互いに交錯しながら移行すること、最も強く障害を受ける部位は終脳であることおよび終脳の障害感受期は妊娠12~15日にあり、最障害感受期は妊娠13日にあることが判った。また、妊娠13日に2mg/kgを

単回処理した結果、胎児には他の奇形を伴わずに用量依存的な終脳の形成不全が生じることも明らかとなった。

第3章 MNUによって誘発された小頭症ラットの行動異常

そこで新生児の脳、特に終脳が最も障害を受ける時期（最障害感受期：妊娠13日）を選び、MNUの5 mg/kgおよび2 mg/kgを単回投与して誘発した小頭症児について生後1日から22日（離乳日）に神経行動学的発達検査（初期行動発達検査）を行い、生後4週齢から10週齢に情動性、迷路学習および回避学習能力の検査を行った。その結果、初期行動発達検査では5 mg/kg処理の小頭症児に脊髄反射・姿勢反応の発達遅延、生後早期の異常な反射亢進ならびに運動遂行中の四肢の位置きめ能力について測定障害を疑わせる異常がみられた。また、歩行および遊泳行動においては肢の運動に通常ではみられない左右両側肢の同期運動が発現し、この異常は2 mg/kg処理の小頭症児においても低率ながら認められた。この他に2 mg/kg処理の小頭症児にみられた変化は発達の遅延のみであった。離乳後の情動性の検査では、2 mg/kg処理の小頭症児で寡動傾向、5 mg/kg処理の小頭症児で新奇刺激に対する過敏反応がみられた。迷路学習能力は、5 mg/kg処理において高度に、2 mg/kg処理では軽度障害された。回避学習能力の検査では、5 mg/kg処理の小頭症児は全試行において、2 mg/kg処理の小頭症児は初期の試行において異常に高い回避反応率を示した。これらの結果から、脳の最障害感受期にMNU 5 mg/kgを投与しても誘発された小頭症ラットは十分に長期生存が可能なこと、および特定の行動については用量依存的な反応が行動異常として成立することが明らかとなった。

第4章 各投与時期に誘発された小頭症ラットの初期行動発達の異常

上の実験において初期行動発達にみられた小頭症児の行動異常が、MNUによって特異的に、あるいは妊娠13日の処理に限って誘発される異常であるかを調べる目的で、終脳の障害感受期間である妊娠12日～15日のいずれか1日にMNUの5 mg/kg、あるいは小頭症を誘発することで知られる methylazoxymethanol (MAM) の40 mg/kgを単回投与し、得られた出生児の初期行動発達を比較した。その結果、MNU、MAM処理の間で生じた行動異常に差は認められなかった。一方、処理時期が異なると、特に随機的要素の高い行動に生じた異常には著しい差が認められた。すなわち、妊娠12、13および14日処理の小頭症児では、歩行あるいは遊泳行動時に異常な左右両側肢の同期運動が生じ、この異常は妊娠12日処理の小頭症児で前肢に、妊娠13日および14日処理の小頭症児で後肢に支配的に発現する新知見が得られた。また、この異常は、妊娠14日処理の小頭症児では生後早期に回復したが、妊娠12および13日処理の小頭症児では離乳時に至っても消失しなかった。上位中枢からの投射により抑制的制御を受けるといわれる脊髄反射および姿勢反応の一部は、処理時期と無関係に生後早期に亢進していた。また、その多くは、発達が遅延する傾向にあったが、いずれも最終的には正常に生じた。これらの結果から終脳の形成が障害されると処理時期とは無関係に、出生児の感覚—運動統御機構の機能構築は遅延すること、随意運動中に発現する肢の異常運動の責任障害部位は上位中枢にあることおよびその責任障害部位は処理日に対応して異なる可能性が示唆された。

第5章 小頭症の程度と小頭症ラットの高次行動の異常

妊娠13日に5段階濃度（1, 2, 3, 4および5 mg/kg）のMNUを処理して得た出生児について、離乳後に情動性、自発運動量（走行運動量）、迷路学習能力および回避学習能力の検査を行い、成立した小頭症の程度と高次行動異常との関連性を検討した。対照群に対する各処理群の脳重量の比は、95～55%の範囲で用量依存的に減少した。情動性の検査では、全処理群の小頭症児で総移動距離および立ち上がり回数が増加が、

また4および5 mg/kg 処理の小頭症児で反応潜時の減少が、5 mg/kg 処理の小頭症児で排尿数の増加および後肢の歩行運動異常がみられた。自発運動量は全処理群の小頭症児で明瞭に増加し、とくに5 mg/kg の処理で顕著であった。迷路学習および回避学習能力の異常は、5 mg/kg 処理の小頭症児においてのみみられた。これらの結果から、終脳の最障害感受期に誘発された小頭症ラットの基本的な行動の変化は、活動性の増大であり、加えて終脳形成障害の程度に応じた用量依存的な情動性の変化が重複していることが判った。また軽度の小頭症では明らかな学習能力の障害は成立しないことが示唆された。

第6章 各投与時期に誘発された小頭症ラットの高次行動の異常

妊娠12, 13, 14および15日の各日にMNUを処理し、得られた小頭症児について情動性、自発運動量（走行運動量）、迷路学習能力および回避学習能力を検査した。その結果、出生児の終脳の障害程度には、12日<13日>14日>15日の関係がみられ、15日の処理による終脳形成不全が、他の処理日群と比較して最も軽度であった。情動性の検査においては、13日処理の行動特性が多動であるのに対し、12日および15日処理の特性はともに寡動であった。しかし、15日処理ではこの反応が動物の積極的な対応行動と推察されたのに対し、12日処理の小頭症児では生理的反応亢進が随伴しており、寡動傾向は情動性の変化を示唆していた。自発活動性についても処理日の差は明らかで、12日処理で寡動傾向、15日処理で無変化であった。迷路学習は、12日、13日および15日処理において障害されていたが、脳重量の低下の程度からみて15日処理が相対的に最も高度に障害されているものと考えられた。したがって妊娠12日～15日に限れば、迷路学習の最障害感受期は、妊娠15日にあると結論される。一方、回避学習能力の異常がみられたのは、妊娠13日処理の小頭症児のみであり、この課題の遂行に係わる中枢神経系の責任部位が、迷路学習のそれとはかなり異なることが示唆された。14日処理の小頭症児ではいずれの行動検査においても顕著な変化はみられず、14日処理の小頭症児における行動の変容は、不明であった。

以上、本研究の結果からMNUの胎生期投与に起因する中枢神経系の巨視的な発生障害は、妊娠12日～15日の短期間においてもその処理強度および処理時期の差異により、異なる行動異常を誘発することが明らかとなった。また、動物の活動性は中枢神経系の障害を敏感に反映すること、学習能力の障害には終脳の障害量より障害を受ける時期が重要に関与していること、ならびに神経行動学的発達検査は、生後、早期の段階で敏感に行動異常を捉え、神経系に生じた障害の性質を推定しえる点で有用性が高いことが示唆された。従って生後の行動検索においては、動物の活動性、学習能力および神経行動学的発達の検索が重要と判断される。

論文審査の結果の要旨

脳は、構造・機能ともに極めて高度に分化した器官であり、脳の発生には細胞の増生、遊走、配列等の発生事象が時間的、空間的に秩序正しく正確に進行することが要求される。それ故に発生過程の胎児の脳は環境因子の侵襲に対して障害感受性が高く、また胎生期のある特定の段階の侵襲は、脳の限られた構成単位を選択的に障害し、多彩な非可逆的機能欠陥をもたらすといわれる。ヒトでは放射線、アルコール、向精神薬、抗癲癇薬などが胎児に外因性の中枢神経系障害をもたらす、出生後の児に行動・機能の欠陥すなわち行動奇形を誘発することが明らかとなっており、このことから近年、動物実験においても出生後の行動・機能を検

索することが重要視されるようになった。しかし、ヒトと実験用小動物とは脳の系統発生的なへだたりが大きく、特に小動物では脳の構造と機能の関連について基礎的知見に乏しいことが、実験行動奇形学の方法論を制限している一つの要因となっている。この課題を克服するうえで実験的に誘発した中枢神経系の構造的な異常と発現する行動の変化を詳細に対比させ、その関連を明らかにすることは、有用性の高い知見を提供しえるものと考えられる。本研究は、中枢神経系に選択的な催奇形作用を示すことで知られる N-methyl-N-nitrosourea (MNU) を妊娠中の母ラットに投与して誘発した終脳の形成不全を主徴とする出生児、すなわち小頭症(小脳症)の児の行動を多様な検査法を用いて詳細に検索し、中枢神経系の巨視的な障害とその障害によって発現する行動異常との関連性を明らかにしようとしたものである。なかでも哺育期の児について既存の行動発達検査法を駆使し、その結果を神経学的検査の診断基準を応用して整理し、評価した方法は斬新であり、興味深いものがある。本論文は、六つの章からなっており、その内容を要約すれば次の通りである。

第1章 ラット胎児に及ぼす MNU の影響

この章では、胎児の器官形成期にあたる妊娠時期に連続して MNU を投与したときの胎児の発生と出生児の発育に及ぼす影響を取り扱っている。このことは、第2章以下の研究の基礎となるとともに、MNU による発生障害の一般的な様相をとらえる意義をもっている。すなわち、10mg/kg の投与では胚が死亡すること、5および2.5 mg/kg の投与では児のほぼ全例に外表異常として扁平な頭頂部がみられ、この外表異常は終脳の形成不全(小頭症)に基づくこと、5 mg/kg の投与では出生児は生存しないが、2.5 mg/kg の投与では出生児はほぼ全例が生育し、用量を選択すれば小頭症の出生児でも生後の長期生存が可能なが明らかとなった。この小頭症児では行動検査の結果、顕著な迷路学習能力の障害と情動性の変化を示唆する寡動傾向がみられている。

第2章 ラット胎児の脳に及ぼす MNU の影響

この章では、MNU に対する胎児脳の感受期を決定するために器官形成期のいずれか1日に1用量(5 mg/kg)の MNU を投与し、形態学的に胎児の脳を調べた。その結果、胎児脳の障害感受期は、妊娠10日以降にあり、感受部位は、中脳-終脳-嗅葉-後脳の順に互いに交錯しながら移行すること、最も強く障害を受ける部位は終脳であることおよび終脳の障害感受期は妊娠12~15日にあり、その最障害感受期は妊娠13日にあることが判った。また、妊娠13日に2 mg/kg を単回処理した結果、胎児には他の奇形を伴わずに用量依存的な終脳の形成不全が生じることが明らかとなった。

第3章 MNU によって誘発された小頭症ラットの行動異常

そこでこの章では特に終脳が最も障害を受ける時期(最障害感受期:妊娠13日)を選び、MNU の5 mg/kg および2 mg/kg を単回投与して誘発した小頭症児について哺育期に初期行動発達を調べ、離乳後に情動性、迷路学習および回避学習能力を検査した。その結果、初期行動発達検査では5 mg/kg 処理の小頭症児に脊髄反射・姿勢反応の発達遅延、生後早期の異常な反射亢進ならびに運動遂行中の四肢の位置きめ能力について測定障害を疑わせる異常がみられ、歩行および遊泳行動においては肢の運動に通常ではみられない左右両側肢の同期運動が発現した。この異常は2 mg/kg 処理の小頭症児においても低率ながら認められたが、この他に2 mg/kg 処理の小頭症児でみられた変化は発達の遅延のみであった。離乳後の情動性の検査では、2 mg/kg 処理の小頭症児で寡動傾向、5 mg/kg 処理の小頭症児で新奇刺激に対する過敏反応がみられ、迷路学習能力

は、5 mg/kg 処理において高度に、2 mg/kg 処理では軽度に障害された。回避学習能力の検査では、5 mg/kg 処理の小頭症児は全試行において、2 mg/kg 処理の小頭症児は初期の試行において異常に高い回避反応率を示した。これらの結果から終脳の最障害感受期に誘発された小頭症ラットは充分に長期生存が可能であり、特定の行動については用量依存的な反応が行動異常として成立することが示唆された。

第4章 各投与時期に誘発された小頭症ラットの初期行動発達の異常

この章では、第3章において示された小頭症児の初期行動発達の異常がMNUによって特異的に、あるいは妊娠13日の処理に限って誘発される異常であるかどうかを調べる目的で、終脳の障害感受期間である妊娠12日～15日のいずれか1日にMNUの5 mg/kg、あるいは小頭症を誘発することで知られる methylazoxymethanol (MAM) の40mg/kgを単回投与し、得られた出生児の初期行動発達を比較した。その結果、MNU、MAM処理の間で生じた行動異常に差はみられず、むしろ処理時期による差が、特に随意的要素の高い行動に生じることが明らかとなった。すなわち、妊娠12、13および14日処理の小頭症児では、歩行あるいは遊泳行動時に異常な左右両側肢の同期運動が生じ、この異常は妊娠12日処理の小頭症児で前肢に、妊娠13日および14日処理の小頭症児で後肢に支配的に発現する新知見が得られた。また、この異常は、妊娠14日処理の小頭症児では生後早期に回復したが、妊娠12および13日処理の小頭症児では離乳時に至っても消失しなかった。上位中枢からの投射により抑制的制御を受けるといわれる脊髄反射および姿勢反応の一部は、処理時期と無関係に生後早期に亢進していた。また、その多くは、発達が遅延する傾向にあったが、いずれも最終的には正常に生じた。これらの結果から終脳の形成が障害されると処理時期とは無関係に、出生児の感覚—運動統御機構の機能構築は遅延すること、随意運動中に発現する肢の異常運動の責任障害部位は上位中枢にあること、およびその責任障害部位は処理日に対応して異なる可能性が示唆された。

第5章 小頭症の程度と小頭症ラットの高次行動の異常

この章では、妊娠13日に1、2、3、4および5 mg/kgのMNUを処理して得た出生児について、離乳後に情動性、自発運動量(走行運動量)、迷路学習能力および回避学習能力の検査を行い、成立した小頭症の程度と高次行動異常との関連性を検討した。対照群に対する各処理群の脳重量の比は95～55%の範囲で用量依存的に減少した。情動性の検査では、全処理群の小頭症児で総移動距離および立ち上がり回数の増加が、また4および5 mg/kg処理の小頭症児で反応潜時の減少が、5 mg/kg処理の小頭症児で排尿数の増加および後肢の歩行運動異常がみられた。自発運動量は全処理群の小頭症児で明瞭に増加し、とくに5 mg/kgの処理で顕著であった。迷路学習および回避学習能力の異常は、5 mg/kg処理の小頭症児においてのみみられた。これらの結果から、終脳の最障害感受期に誘発された小頭症ラットの基本的な行動の変化は、活動性の増大であり、加えて終脳形成障害の程度に応じた情動性の変化が重複していることが判った。また軽度的小頭症では明らかな学習能力の障害は成立しないことが示唆された。

第6章 各投与時期に誘発された小頭症ラットの高次行動の異常

この章では、妊娠12、13、14および15日の各日にMNUを処理し、得られた小頭症児について情動性、自発運動量(走行運動量)、迷路学習能力および回避学習能力を検査した。その結果、出生児の終脳の障害程度には12日<13日>14日>15日の関係がみられ、15日の処理による終脳形成不全が、他の処理日群と比較して最も軽度であった。情動性の検査では、13日処理の行動特性が多動であるのに対し、12日および15日処理の特性はともに寡動であった。しかし、15日処理ではこの反応が動物の積極的な対応行動と推察されたのに対し、

12日処理の小頭症児では生理的反応亢進が随伴しており、寡動傾向は情動性の変化を示唆していた。自発活動性についても処理日の差は明らかで、12日処理で寡動傾向、15日処理で無変化であった。迷路学習は、12日、13日および15日処理において障害されていたが、脳重量の低下の程度からみて15日処理が相対的に最も高度に障害されていることが示唆された。したがって妊娠12日～15日に限れば、迷路学習の最障害感受期は妊娠15日にあると結論される。一方、回避学習能力の異常がみられたのは、妊娠13日処理の小頭症児のみであり、この課題の遂行に係わる中枢神経系の責任部位が、迷路学習のそれとはかなり異なることが示唆された。14日処理の小頭症児では、いずれの行動検査においても顕著な変化はみられず、14日処理の小頭症児における行動の変容は不明であった。

以上の結果から本論文は、MNUの胎生期投与に起因する中枢神経系の巨視的な発生障害は、妊娠12日～15日の短期間においても処理時期および処理強度の差異により、輻輳した行動異常を誘発することを明らかにし、動物の活動性は中枢神経系の障害の差異を敏感に反映すること、学習能力の障害には終脳の障害量より障害を受ける時期が重要に関与していること、神経行動学的発達検査は、生後、早期の段階で敏感に行動異常を捉え、神経系に生じた障害の性質を推定しえる点で有用性が高いことを示した。これらは、実験行動奇形学において用いべき行動検査法に実証的な根拠を与えたものであり、本論文は行動奇形学の方法論の確立に大きく貢献したものとして高く評価でき、博士（獣医学）の学位を授与するにふさわしいものである。