

## 睡眠や食習慣の乱れに起因した精神神経障害動物モデルの作製

八百板富紀枝

**Animal Models for Elucidation of the Mechanisms of Neuropsychiatric Disorders Induced by Sleep and Dietary Habits**

Fukie Yaoita

*Department of Pharmacology, Faculty of Pharmaceutical Science, Tohoku Medical and Pharmaceutical University; 4-4-1 Komatsushima, Aoba-ku, Sendai 981-8558, Japan.*

(Received October 30, 2015)

Numerous changes in human lifestyle in modern life increase the risk of disease. Especially, modern sleep and dietary habits are crucial factors affecting lifestyle disease. In terms of sleep, decreases in total sleep time and in rapid eye movement sleep time have been observed in attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) patients. From a dietary perspective, mastication during eating has several good effects on systemic, mental, and physical functions of the body. However, few animal experiments have addressed the influence of this decline in sleep duration or of long-term powdered diet feeding on parameters reflecting systemic health. In our studies, we examined both the influence of intermittent sleep deprivation (SD) treatment and long-term powdered diet feeding on emotional behavior in mice, and focused on the mechanisms underlying these impaired behaviors. Our findings were as follows: SD treatment induced hypernoradrenergic and hypodopaminergic states within the frontal cortex. Furthermore, hyperactivity and an explosive number of jumps were observed. Both the hypernoradrenergic state and the jumps were improved by treatment with ADHD therapeutic drugs. On the other hand, long-term powdered diet feeding increased social interaction behaviors. The feeding affected the dopaminergic function of the frontal cortex. In addition, the long-term powdered diet fed mice presented systemic illness signs, such as elevations of blood glucose, and hypertension. This review, describing the SD mice and long-term powdered diet fed mice can be a useful model for elucidation of the mechanism of neuropsychiatric disorders or the discovery of new therapeutic targets in combatting effects of the modern lifestyle.

**Key words**—sleep deprivation; mastication; abnormal behavior; dopamine; noradrenaline; frontal cortex

**1. はじめに**

現代は、昼夜を問わず、一日を最大限に活用しようとする社会的背景から、睡眠を疎かにする傾向が増えている。特に、睡眠時間の減少により、注意力や集中力が散漫になること、倦怠感を招くこと、さらに、意欲の低下をもたらすことなど、日常生活の様々な活動に対して影響を与えることが懸念されている。これらは、成人のみならず小児にとっても大きな問題である。近年、幼児や学童期の睡眠習慣が夜型傾向にあることが知られており、この傾向と体重の増加、メンタルヘルスの不調、学業成績との関連性が明らかにされている。<sup>1-3)</sup> このように、睡眠

習慣が及ぼす影響は身体的なもののみならず、精神的なものも含まれており、小児の成長期における脳の発育に影響を与えている可能性が考えられる。しかし、睡眠と情動障害との間になんらかの関与が示唆されているものの、この点に関して十分な検討は行われていない。また、厚生労働省は、「健康づくりのための睡眠指針 2014」(平成 26 年 3 月)の中で、生活習慣病の予防や心の健康には、良好な睡眠が重要であるとしている。

一方、食習慣の欧米化に伴い、高脂肪食や高カロリー一食中心の食事が肥満、メタボリック症候群などの生活習慣病の一因であることは明らかであるが、これらの食品の栄養面での問題とともに、質的なもの、すなわち、軟らかい食品の摂取、早食い、あるいは欠食といった食習慣もまた生活習慣病を始め様々な疾患の発症要因に関与していることが懸念されている。<sup>4,5)</sup> こうした現状を踏まえて、食に関する適

東北医科薬科大学薬学部薬理学教室 (〒981-8558 仙台市青葉区小松島 4-4-1)

e-mail: nijima@tohoku-mpu.ac.jp

本総説は、平成 26 年度日本薬学会東北支部奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

切な判断力を養い、生涯に渡って健全な食生活を実現することにより、心身の健康増進と豊かな人間形成に資するべく「食育」という取り組みがなされている。その中でも、特に、食物をよく噛むこと、すなわち咀嚼の重要性が謳われている。

以上のことを踏まえ、現代社会の抱える問題点である「睡眠や食習慣の乱れ」に起因した様々な疾患について、それらの発症メカニズムや特異的な治療方法の開発に寄与することが期待される動物モデルの作製は重要であると考えられる。そこで本総説では、これまでの研究で得られた成果から、マウスに対する断続的断眠ストレスの負荷並びに長期間粉末食飼育を行ったときに発現する異常行動やその発現機序を中心に、精神神経障害動物モデルの作製について概説した。

## 2. 睡眠と情動行動障害

**2-1. 断続的レム断眠ストレス** 睡眠は、レム睡眠とノンレム睡眠に分類される。ノンレム睡眠では、深度に従って浅い睡眠と深い睡眠に分けられ、深い睡眠のときに出現する脳波は周波数の低い成分が中心となり、徐波睡眠と呼ばれる。一方、レム睡眠は、急速眼球運動 (rapid eye movement) が認められる睡眠であり、脳波は覚醒時と似ていることから逆説睡眠とも呼ばれる。また、このときに全身の筋肉の緊張は消失した状態となる。<sup>6)</sup> このレム睡眠を動物から奪う方法として、プラットホーム法がある。これは、水を張った水槽の中央に小さな島 (プラットホーム) を設置し、この上に動物を長時間載せることで、レム睡眠を奪う方法である。すなわち、動物がレム睡眠期になると筋弛緩状態となるため、姿勢を保持できずに水中に落下してしまうことで覚醒させるというもので、レム断眠ストレス負荷方法として広く用いられている。この方法により、自発運動量が亢進すること、<sup>7-9)</sup> 記憶・学習が障害されること、<sup>10-13)</sup> 恐怖や不安関連行動が障害されること、<sup>14-17)</sup> 並びに強制水泳試験における水泳時間が増加すること<sup>18)</sup> など、様々な行動変化が明らかにされている。さらに、これらには神経化学的な変化を伴うことが数多く報告されている。<sup>19-25)</sup> しかしながら、これらの方法は、72-94 時間といった長時間のレム断眠ストレスを負荷するものであることから、ヒトの生活様式を考慮した動物モデルとしては問題があることが懸念された。そこで本研究では、マウ

スに 20 時間のレム断眠ストレス毎に 4 時間の休憩を与え、この操作を数日間繰り返す改良法、すなわち断続的にレム断眠ストレスを負荷し、その影響について検討を行うことにした。

**2-2. 断続的断眠ストレス負荷誘発性異常行動とその発現機序** 注意欠陥多動性障害 (attention-deficit hyperactivity disorder; ADHD) は、年齢に不釣り合いな不注意、多動性及び衝動性行動を主症状とする軽度の発達障害である。<sup>26)</sup> この疾患の発症原因には不明な点が多いが、特に前頭前皮質が関与する実行機能 (executive function) に障害があり、それにはノルアドレナリン (noradrenaline; NA) 神経及びドパミン (dopamine; DA) 神経の調節障害が関与する可能性が示唆されている。<sup>27)</sup> 現在、この疾患の治療薬としては、メチルフェニデート及びアトモキセチンが使用されている。このうちメチルフェニデートは中枢神経興奮薬に分類され、神経終末における DA トランスポーター (DAT) の阻害、並びにクリアランスの抑制によりシナプス間隙の DA 濃度を上昇させる。さらにこの薬物は非選択的なモノアミントランスポーター阻害薬であり、DAT のみならず NA トランスポーター (NAT) に対しても抑制的に作用することが知られている。<sup>28)</sup> また、アトモキセチンは中枢神経興奮作用を有しておらず、選択的に NAT を阻害する。<sup>29)</sup> これらのことから、ADHD 治療薬の作用点は主として DAT と NAT であり、DA 及び NA 作動性神経系の機能調節により症状を改善することが示唆される。また、近年、ADHD 患者において、健常者と比較したとき、総睡眠時間、並びにレム睡眠時間の短縮が報告されている。<sup>30)</sup>

本研究では、体重 20-22 g の ddY 系雄性マウスを用いて、プラットホーム法により 20 時間のレム断眠ストレス毎に 4 時間の休憩を与えることを 5 日間繰り返した後、自発運動量、並びにジャンプ行動の評価を行った。プラットホームの面積は、直径 2 cm 及び高さ 4.8 cm とし、プラットホームから水面までを 1 cm に設定した。この操作を行った群を sleep deprivation (SD) 群とした。対照群として水槽対照 (tank control; TC) 群及びノーマル群を設けた。TC 群は、水槽環境下にあることは SD 群と共通であるが、プラットホームの面積を直径 10 cm とし、SD 群よりも広く設定することでマウスが十

分に睡眠をとることを可能にした。また、ノーマル群は、通常のケージ飼育を行ったものである。断続的断眠ストレス負荷後の行動を評価するため、自発運動量の測定には Animex 装置（室町機械製）を使用した。ジャンプ行動の測定は、マウスを 2 L のメスシリンダーに入れて、そのジャンプ回数を記録した。いずれの測定も行動量を反映するが、その中でも自発運動量の測定では、比較的、床面積の広い測定ケージ（縦 17.3 cm × 横 24.3 cm × 高さ 12.7 cm）内の動きをカウントするため、ノーマル群においても相当のカウント数がある。その分、SD 群に顕著な異常行動として検出し難い。しかしながら、ジャンプ行動の測定の際には、底面積が直径 10 cm のメスシリンダーを用いるため、マウスは円柱の中での平面的な運動はどうしても制限されてしまう。また、ノーマル群ではジャンプ行動はほとんど認められないことから、SD 群に顕著な垂直方向への動きを検出することが可能である。その結果、SD 群では TC 群、並びにノーマル群の両対照群と比較し、負荷日数に依存した自発運動量の増加及び著しいジャンプ行動の発現が認められた。<sup>31)</sup> このことから、SD 群におけるジャンプ行動は、長時間継続した睡眠がとれないことに起因する異常行動と考えることができる。すなわち、断続的断眠ストレス負荷により、睡眠の乱れを反映した ADHD 病態動物モデルとなり得る可能性が示唆された。またこれまでも、本研究で検討した断続的な手法ではなく、休憩のない長時間の断眠ストレスの負荷により、自発運動量の亢進が認められるという報告<sup>7-9)</sup>がある。その一方で、運動量に変化はない<sup>32,33)</sup>という報告もある。これらの差異には、断眠負荷を継続した時間の長さ、運動量の観察時間、動物種、あるいは系統差などが関与するものと推測する。

次に、ADHD 病態動物モデルとしての妥当性を確かめるため、ADHD 治療薬であるメチルフェニデート及びアトモキセチンを用いて SD 群の異常行動を改善するか否かについて検討を行った。その結果、SD 群のジャンプ行動に対して、メチルフェニデート (0.03-0.1 mg/kg) 及びアトモキセチン (0.41-0.55 mg/kg) は、いずれもジャンプ行動を有意に抑制することが明らかとなった。しかしながら、高用量のメチルフェニデート (0.3 及び 1 mg/kg) では、ジャンプ行動を抑制しないことが判明

した。このことは、低用量のメチルフェニデートが、皮質下よりも前頭前皮質に選択的に作用することで ADHD の症状を改善すること、<sup>34,35)</sup> 並びに高用量では作用が広範囲に及ぶため中枢興奮作用が発現し、ジャンプ行動を抑制しなかった可能性が考えられる。<sup>36)</sup> さらに、臨床においては、低用量のメチルフェニデートが治療効果を示すことから、<sup>28)</sup> このマウスは、断続的断眠ストレス負荷による睡眠の乱れを反映した ADHD 病態動物モデルとして妥当性を有することが示された。

次に、ADHD においては前頭前皮質における NA 神経の機能亢進並びに DA 神経の機能低下が示唆されていることから、<sup>27-29)</sup> マウスへの断続的断眠ストレス負荷後に観察された異常行動が、これらの神経の機能と関連しているか否かについて検討を行った。検討に先立ち、これまでの行動実験とのタイミングを合わせるため、断続的断眠ストレスの解除から 35 分後に無麻酔下で脳を取り出し、試料とした。さらに、分割した前頭皮質について、NA、NA 代謝物である methoxyhydroxyphenylglycol (MHPG)、DA、並びに DA 代謝物である dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) 及び homovanillic acid (HVA) について、それらの含有量を HPLC 法により測定した。一方、上記の測定値から MHPG/NA ratio、DOPAC/DA ratio 及び HVA/DA ratio を算出し、代謝回転の検討を行った。その結果、SD 群の前頭皮質では、MHPG 及び MHPG/NA ratio の項目において、ノーマル群及び TC 群と比較したとき有意な増加が認められた。<sup>37)</sup> 一方、DA、DOPAC 及び HVA には変化が認められなかった。しかしながら、DOPAC/DA ratio 及び HVA/DA ratio の項目では、SD 群において TC 群との間に差は認められなかったが、ノーマル群と比較したとき有意な減少が認められた。<sup>37)</sup> 以上のことから、SD 群の前頭皮質においては、NA 神経の機能亢進及び DA 神経の機能低下が示唆され、これは ADHD の病態背景と一致することが判明した。さらに、TC 群との比較から、SD 群における NA 神経の変化は、断続的断眠ストレス負荷により、長時間の継続睡眠が困難であることに起因して発現する可能性が示唆された。

NA 神経の細胞体の多くは青斑核に存在し、そこから脳のあらゆる部位に投射していることが知られ

ている。<sup>38)</sup> この NA 神経の調節障害と ADHD、睡眠-覚醒障害、情動障害、心的外傷後ストレス障害などの精神障害との関連性が示唆されている。特に興味深いことに、青斑核の発火は覚醒時に最も強いが、徐波睡眠期には弱まり、そしてレム睡眠期には停止することが明らかにされている。<sup>39)</sup> すなわち、本研究においてプラットホーム法によりレム睡眠を剥奪している間 NA 神経は休むことなく、常に活性化状態にあると考えられる。そのため、SD 群の前頭皮質において、NA 神経の機能亢進が認められたものと推測される。また、ラットを用いた実験では、レム断眠ストレス負荷 72 時間後には青斑核におけるチロシン水酸化酵素の遺伝子発現が増加すること、NAT の遺伝子発現が増加すること、並びに NA 濃度が増加することが報告されている。<sup>22,40)</sup> これは、本研究における SD 群の NA 神経の機能亢進状態を支持するものと考えられる。

Brock ら<sup>41)</sup> は、ラットへの 96 時間のレム断眠ストレス負荷群において、TC 群と比較したとき、前頭皮質の一部で、D2 受容体の増加が認められることを報告している。このことから、DA 神経の機能低下の可能性が推測されるとともに、本研究で明らかとなった SD 群の DA 神経の機能低下状態を支持するものと考えられる。さらにラットを用いた実験において、前頭前皮質では DAT の発現数が少ないことから、細胞外 DA 濃度の制御を DAT ではなく NAT が担っている可能性が示唆されている。<sup>42-44)</sup> これらのことから、本研究で明らかとなった SD 群のジャンプ行動に対する ADHD 治療薬の改善効果には、それぞれの薬物が神経終末における NAT を阻害した可能性が考えられる。さらに、NAT 阻害によるシナプス間隙の DA 濃度の上昇がジャンプ行動の改善効果に関与する可能性が考えられる。これを検証する目的で、ジャンプ行動を有意に抑制したアトモキセチン (0.55 mg/kg) の投与による前頭皮質の NA 及び DA 神経系の変化について、MHPG 及び MHPG / NA ratio、DOPAC / DA ratio、並びに HVA/DA ratio を指標に HPLC 法により検討を行った。その結果、SD 群の前頭皮質において認められた MHPG 及び MHPG/NA ratio の増加は、アトモキセチンの投与により、いずれも有意な抑制作用が認められた。しかし、DOPAC/DA ratio、並びに HVA/DA ratio の代謝回転に対する

影響は認められなかった。Swanson ら<sup>45)</sup> は、前頭皮質においてアトモキセチン投与によりシナプス間隙に増加した NA は、アドレナリン  $\alpha 2$  受容体を刺激することで自己受容体を介した抑制作用を発現することを報告している。したがって、本研究により明らかとなった SD 群のジャンプ行動に対して、アトモキセチンが改善効果を示した機序として、SD 群の前頭皮質における NA 神経の機能亢進状態に対して、アトモキセチンが NAT を阻害してシナプス間隙に NA を増加させ、その NA が  $\alpha 2$  受容体を刺激したことで、NA 神経の機能亢進状態を抑制した可能性が考えられる。

以上、断続的断眠ストレス負荷誘発性異常行動とその発現機序の検討を行い、ジャンプ行動に対して ADHD 治療薬が改善効果を示すことを明らかにした。さらに、ジャンプ行動時の前頭皮質においては NA 神経の機能亢進、並びに DA 神経の機能低下が認められ、これらは ADHD の病態背景と一致している。また、ADHD 治療薬であるアトモキセチン投与によるジャンプ行動の改善効果には NA 神経の機能亢進状態の抑制が推定された。これらのことから、本マウスは、多動様症状の動物モデルとしての有用性も併せ持つ ADHD 病態動物モデルとしての妥当性が示唆された。

### 3. 咀嚼と情動行動障害

**3-1. 咀嚼と脳の変化** 最も重要な口腔機能の 1 つに咀嚼がある。これは食物の塊を歯で噛み、粉碎して飲み込むという一連の複雑な動きからなるもので、この機能により消化管における栄養素の吸収が行われる。一方、咀嚼が不十分であるとき、肥満や高血糖の原因に発展することが報告されており、<sup>46-49)</sup> マウスを用いた実験においても、飼料の硬度が 2 型糖尿病の発症に重要な因子であることが明らかされている。<sup>50)</sup>

近年、過食、早食い、軟らかい食品の摂取などの食習慣が幼少期から見受けられており、これらが咀嚼機能の発達を妨げることで、さらに肥満や糖尿病へと発展することが示唆されている。<sup>4,51-53)</sup> 特に、乳幼児期は咀嚼機能の獲得に重要な時期であり、その咀嚼経験が中枢神経系の発達や成熟に対して相互に影響することで脳の成長にも関与することが明らかにされている。<sup>54-56)</sup> さらに、機能的磁気共鳴画像法 (f-MRI) やポジトロン放出断層撮影 (PET) を用

いた研究から、咀嚼や規則的な顎の動きが前頭皮質など脳のあらゆる部位を活性化させることが知られている。<sup>57-60)</sup>

一方、粉末食で飼育を行った老化促進マウス (SAMP8) 及び抜歯したラットなどの実験において、海馬での神経新生の低下が認められること、並びに記憶や学習に関連した行動が障害されていることが報告されている。<sup>61-63)</sup> また、粉末食で飼育を行ったラットの海馬においては DA 神経系の機能が減弱しているという報告もあり、<sup>64,65)</sup> これらのことは歯の喪失や長期間の粉末食飼育による咀嚼機能の低下が記憶や学習といった脳の機能に影響を及ぼし、認知症の発症に関与する可能性を示唆するものである。

以上のことから、咀嚼と脳の変化には密接な関連性のあることが示唆されている。筆者は、これまでに検討がなされていない自発運動量や社会性行動 (social interaction) テストを指標とした情動行動に対する粉末食飼育の影響について検討を行った。

**3-2. 長期粉末食飼育と異常行動** 本研究では、離乳後から粉末食でマウスを飼育することにより発現する異常行動について検討した。すなわち、雄の Balb/c マウス (日本クレア) を用い、離乳後から粉末食 (ラボ MR 粉末タイプ, 日本農産工業) で飼育を 17 週間行い、自発運動量を測定した。測定にはスーパーメックス装置 (室町機械製) を使用し、対照群として粉末食と同じ組成の固形食 (ラボ MR 固型タイプ, 日本農産工業) を給餌したマウスを用いた。その結果、粉末食で飼育を行った群 (粉末食群) では対照群と比較したときに、有意な自発運動量の増加が認められた。<sup>66)</sup> 特に、測定開始後 30 分間の運動量の増加が顕著であることが判明した。<sup>66)</sup> このことから、粉末食飼育群では測定ケージという新規の環境下に順応し難いことが考えられた。このような行動の順応には DA 神経系の関与が示唆されている。<sup>67,68)</sup> また、これまでに、マウスの粉末食飼育により海馬の DA 神経系に変化が認められること、<sup>64,65)</sup> 並びに f-MRI から咀嚼運動が前頭皮質を活性化させることが判明している。<sup>57)</sup> そこで本研究では、粉末食飼育群のマウスの海馬や前頭皮質における DA 神経系の変化について検討を行った。脳を無麻酔下で取り出し、分割した海馬と前頭皮質を試料とし、DA、DA 代謝物である

DOPAC 及び HVA の含有量を HPLC 法により測定した。また、上記の測定値から DOPAC/DA ratio 及び HVA/DA ratio を算出し、代謝回転の検討を行った。その結果、前頭皮質において、粉末食群の HVA/DA ratio が対照群よりも有意に高いことが判明したが、他の項目及び海馬では有意な変化は認められなかった。<sup>66)</sup> さらに、前頭皮質における DA 受容体 (D1 から D5) の遺伝子発現量を検討したところ、D4 受容体に有意な発現量の低下が認められた。<sup>66)</sup> これらの結果は、粉末食飼育群のマウスの前頭皮質において、DA 神経系の代謝回転が亢進し、D4 受容体のダウンレギュレーションが生じている可能性あるいは、DA 神経系の亢進が D4 受容体の減少を補っている可能性を示唆するものである。興味深いことに、D4 受容体欠損マウスでは、新規の環境下で行われるオープンフィールド試験の測定早期において運動量の増加が認められることが報告されている。<sup>69,70)</sup> このことは、粉末食飼育群のマウスで観察された自発運動量の増加には D4 受容体の遺伝子発現量の低下が関連している可能性を支持するものと考えられる。

一方、マウス (テストマウス) が、これまでに接触したことの無い新規のマウス (ゲストマウス) に対して行う匂い嗅ぎ行動や追従行動などを指標とするものに social interaction 行動テストがある。このテストにおける social interaction 行動時間の減少は、不安状態、あるいは統合失調症動物モデルにおける陰性症状を反映することが知られている。<sup>71)</sup> 本研究では、自発運動量を検討したときの結果を踏まえて、テストマウスを観察ケージの中に、30 分間放置し測定環境に順応させた後に、同性同週令のゲストマウスを入れて social interaction 行動の観察を行った。その結果、粉末食飼育群のマウスの social interaction 行動時間は、対照群と比較して有意に増加しており、低不安行動を発現することが明らかとなった。<sup>66)</sup> この低不安行動という表現は、あたかも粉末食飼育が抗不安薬を投与したときと同等の効果を有するものと誤解されてしまう恐れがある。しかし、対照群 (本研究では固形食飼育群) が示す行動を基準としたとき、その基準をはるかに逸脱したならば、それは異常行動の指標であると考えている。さらに、D4 受容体遺伝子発現量の低下と social interaction 行動時間の増加と関連性を検討する目的

で、選択的 D4 受容体刺激薬である PD168077 を投与したところ、粉末食飼育群において認められる social interaction 行動時間の増加に対して、PD168077 (0.3 及び 1 mg/kg) は有意な改善作用を示した。<sup>66)</sup> このとき、固形食飼育群に 1 mg/kg の用量の PD168077 を投与したが、social interaction 行動に対する変化は認められなかった。<sup>66)</sup> したがって、長期間の粉末食飼育により認められる social interaction 行動の増加を指標とした異常行動の発現には、前頭皮質の DA 神経系、特に D4 受容体の変化が関与する可能性が示唆された。一方、D4 受容体遺伝子発現量の低下にはグルココルチコイドが関与していることを示唆する報告がある。<sup>72)</sup> また、マウスに拘束ストレスを負荷したとき、血漿中のグルココルチコイドが増加するという報告もある。さらに、拘束時にマウスの口元へプラスチックプレートを渡し、それを噛み砕くことにより拘束状態から脱出できるように設置するとグルココルチコイドの増加が抑制されることが明らかにされていることから、<sup>73,74)</sup> 噛むという行動によりストレス状態を緩和させている可能性が推察される。さらに本研究の結果から、粉末食飼育群では血漿グルココルチコイド(コルチコステロン)が増加すること、副腎皮質においては束状層が対照群よりも有意に厚いことが判明している。<sup>75)</sup> 以上のことから、長期間の粉末食飼育により認められた血漿コルチコステロンの増加や副腎皮質における束状層の肥厚が D4 受容体の遺伝子発現を低下させる可能性が示唆された。

**3-3. 長期粉末食飼育誘発性の異常行動や血圧の変化における耐糖能の影響** 次に、長期間粉末食で飼育を行ったマウスが示す耐糖能の変化について検討を行った。はじめに、短期間(3日間)、粉末食で飼育を行ったマウスに一晚絶食させた後、再び摂食させ血糖値を測定した。その結果、粉末食飼育群及び対照群ともに、再摂食後に血糖値の上昇が認められた。<sup>75)</sup> さらにその差は、粉末食飼育群の方が有意に大きいことが判明した。<sup>75)</sup> これは、粉末食は固形食と比較して表面積が大きいことから、消化や吸収が容易であることに起因するものと考えられる。<sup>50,76,77)</sup> また、短期間であっても粉末食飼育が耐糖能へ影響することが判明したことから、このような状態が長期間に渡り続くことによりなんらかの身体症状へと発展していくことは容易に推測できる。

Ranawana ら<sup>77)</sup>は、ヒトにおける粉末食摂取により、血糖値並びにインスリン分泌の上昇が速やかで、かつ空腹を招き易いことを報告している。しかしながら本研究では、マウスにおける長期間の粉末食飼育群において固形食飼育群と比較したとき、血糖値が高いものの、血清インスリン濃度は低いという結果が得られている。<sup>75)</sup> この検討は、絶食や糖負荷などの条件下で行ったものではないため、糖負荷試験を行い、その 30 分後の血清インスリン濃度を検討した。その結果、粉末食飼育群の血清インスリンの値は、固形食飼育群よりも高くなることが明らかとなった。このことは、粉末食の摂取後にインスリンが速やか上昇するという報告<sup>77)</sup>と一致し、粉末食飼育群のマウスは空腹となり易い可能性が考えられる。さらに本研究の結果から、粉末食飼育群では血漿コルチコステロンが有意に増加することが判明している。<sup>75)</sup> これらのことは、粉末食飼育群における耐糖能異常、すなわち血糖値の上昇の発現に関与するものと推測する。

一方、粉末食飼育群のマウスの血圧について、非観血式血圧計(室町機械製)を用いて検討を行った。その結果、長期間の粉末食飼育により収縮期血圧は有意ではないが高値を示し、平均血圧及び拡張期血圧は有意に高値を示すことが判明した。<sup>75)</sup> また、血漿のアドレナリン及び NA も対照群と比較して高値を示すことが明らかとなった。<sup>75)</sup> したがって、本研究において判明した粉末食飼育群の高血圧や耐糖能の異常は、長期間に渡り咀嚼が不十分であることに起因する可能性が示唆される。さらに、これらのことは、咀嚼が自律神経のバランスの維持に関与することやストレス負荷時の交感神経の緊張状態を緩和することからも支持される。<sup>78,79)</sup>

Fransson ら<sup>80)</sup>は、マウスにコルチコステロンを投与して作製したメタボリック症候群動物モデルにおいて認められる体重増加や耐糖能異常に対して、glucagon-like peptide-1 (GLP-1) アナログのリラグルチドが抑制作用を示すことを明らかにしている。GLP-1 アナログには、血糖値が高い時のみインスリンの分泌を促進する作用、神経保護作用、直接あるいは間接的に心筋や血管内皮に作用して心血管系疾患発症リスクを軽減する作用が報告されている。<sup>81,82)</sup> これらのことを踏まえて、粉末食飼育マウスにリラグルチド (100–200 µg/kg/d) を飼育 15 週

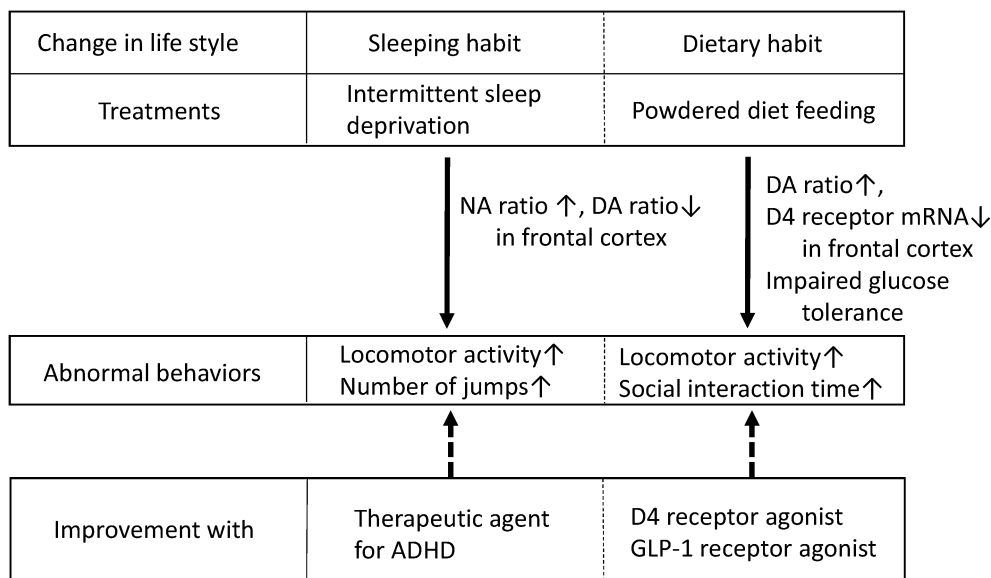


Fig. 1. Schematic Representation of Abnormal Behaviors Induced by Treatment of Intermittent Sleep Deprivation and Long-term Powdered Diet Feeding in Mice

目から2週間、1日1回皮下投与することにより高血糖状態を改善させたとき、social interaction 行動時間の増加、高血圧及びコルチコステロンの増加に対して改善作用を示すか否かについて検討を行った。その結果、リラグルチドの連続投与(200 µg/kg/d)を行った粉末食群では、salineの連続投与を行った群と比較して血糖値、血漿コルチコステロン濃度、血圧及びsocial interaction 行動のいずれも有意に減少することが判明した。<sup>75)</sup> また、いずれの項目においても、対照の固形食群ではリラグルチドの連続投与(200 µg/kg/d)群及びsaline連続投与群との間に有意な差は認められなかった。<sup>75)</sup> これらのことから、長期間の粉末食飼育によって認められるコルチコステロンの増加、高血圧、social interaction 行動時間の増加には、いずれも耐糖能の異常が関与していることが示唆された。さらに、この異常は血糖値や血圧などに全身性の症状をもたらすことのみならず、情動行動障害の発現にも関与することが示唆された。

#### 4. おわりに

本研究では、ヒトの生活様式、特に、睡眠や食習慣の乱れを考慮した精神神経障害の動物モデルの作製を目的に研究を行った。マウスへ断続的レム断眠ストレス負荷を行い、その影響について検討を行った結果、その負荷によりジャンプ行動に代表される多動様症状を主とした異常行動の発現が観察され、

これはADHDの治療薬により改善されることを見出した。さらに、その発現には前頭皮質におけるNA神経の機能亢進及びDA神経の機能低下といったADHDの病態背景と一致する変化が関与することを明らかにした。これらのことから、本マウスはADHD病態動物モデルとしての妥当性が示唆された。また、軟らかい食品の摂取や不十分な咀嚼に起因する食習慣の質的低下について、飼料の硬度に着目した検討を行ったところ、長期間粉末食で飼育を行ったマウスは、多動やsocial interaction 行動の異常といった情動行動に著しい変化が認められた(Fig. 1)。また、この行動変化にはDA神経系、特にD4受容体が関与することを明らかにした。さらに、本粉末食で飼育したマウスは精神的な症状のみならず、血糖値及び血圧が有意に上昇することも観察された。これらは、生活習慣病における身体的な症状と類似していることから、糖尿病治療薬であるインクレチン製剤(GLP-1アナログ、リラグルチド)の連続投与を行い、その改善効果について検討を行ったところ、高血糖、高血圧、並びに情動行動の変化に対する改善効果が認められた。このことは、長期間の粉末食飼育による耐糖能の異常が精神神経障害の発現に関与することを示唆する(Fig. 1)。すなわち、本マウスは、食習慣の乱れに起因した精神神経障害の動物モデルとして妥当性のあることが考えられる。

以上、ヒトの生活様式、特に、睡眠や食習慣の乱れを考慮した精神神経障害の動物モデル作製について、その概略を述べた。今後、これらの動物モデルを用いることにより、本疾患の病態メカニズムの解明、さらに特異的治療法や治療薬開発への寄与が期待される。

**謝辞** 本研究に際し、終始懇切なご指導、ご鞭撻を賜りました東北薬科大学名誉教授 只野 武先生、同教授 丹野孝一先生に厚く御礼申し上げます。また、多大なるご支援を頂きました青森大学薬学部前教授 村井繁夫先生、同教授 斉藤弘子先生、東北福祉大学准教授 土谷昌広先生、東北大学歯学部 遠藤康男先生、東京有明医療大学教授 荒井裕一朗先生に感謝致します。ここに紹介しました研究成果は、多くの学生諸氏の努力の結果得られたものであり、ここに感謝の意を表します。

**利益相反** 開示すべき利益相反はない。

#### REFERENCES

- 1) Snell E. K., Adam E. K., Duncan G. J., *Child Dev.*, **78**, 309–323 (2007).
- 2) Kaneita Y., Ohida T., Osaki Y., Tanihata T., Minowa M., Suzuki K., Wada K., Kanda H., Hayashi K., *J. Clin. Psychiatry*, **68**, 1426–1435 (2007).
- 3) Wolfson A. R., Carskadon M. A., *Sleep Med. Rev.*, **7**, 491–506 (2003).
- 4) Toschke A. M., Thorsteinsdottir K. H., von Kries R., GME Study Group, *Int. J. Pediatr. Obes.*, **4**, 242–248 (2009).
- 5) Lee Y. C., Chien K. L., Chen H. H., *J. Formos. Med. Assoc.*, **106**, 565–572 (2007).
- 6) Timo-Iaria C., Negrão N., Schmidek W. R., Hoshino K., Lobato de Menezes C. E., Leme da Rocha T., *Physiol. Behav.*, **5**, 1057–1062 (1970).
- 7) Fadda P., Martellotta M. C., Gessa G. L., Fratta W., *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, **17**, 269–278 (1993).
- 8) Gessa G. L., Pani L., Fadda P., Fratta W., *Eur. Neuropsychopharmacol.*, **5**(Suppl.), 89–93 (1995).
- 9) Benedetti F., Fresi F., Maccioni P., Smeraldi E., *Behav. Brain Res.*, **187**, 221–227 (2008).
- 10) Bueno O. F., Lobo L. L., Oliveira M. G., Gugliano E. B., Pomarico A. C., Tufik S., *Physiol. Behav.*, **56**, 775–779 (1994).
- 11) Smith C. T., Conway J. M., Rose G. M., *Neurobiol. Learn Mem.*, **69**, 211–217 (1998).
- 12) Dametto M., Suchecki D., Bueno O. F., Moreira K. M., Tufik S., Oliveira M. G., *Behav. Brain Res.*, **129**, 171–178 (2002).
- 13) Moreira K. M., Hipólido D. C., Nobrega J. N., Bueno O. F., Tufik S., Oliveira M. G., *Brain Res.*, **977**, 31–37 (2003).
- 14) Hicks R. A., Moore J. D., *Physiol. Behav.*, **22**, 689–692 (1979).
- 15) Mogilnicka E., Boissard C. G., Hunn C., Delini-Stula A., *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **23**, 93–97 (1985).
- 16) Suchecki D., Tiba P. A., Tufik S., *J. Neuroendocrinol.*, **14**, 549–554 (2002).
- 17) Martinez-Gonzalez D., Obermeyer W., Fahy J. L., Riboh M., Kalin N. H., Benca R. M., *Sleep*, **27**, 609–617 (2004).
- 18) Asakura W., Matsumoto K., Ohta H., Watanabe H., *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **48**, 43–46 (1994).
- 19) Nunes Júnior G. P., Tufik S., Nobrega J. N., *Brain Res. Bull.*, **34**, 453–456 (1994).
- 20) Nunes Júnior G. P., Tufik S., Nobrega J. N., *Brain Res.*, **645**, 247–252 (1994).
- 21) Farooqui S. M., Brock J. W., Zhou J., *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **54**, 385–391 (1996).
- 22) Porkka-Heiskanen T., Smith S. E., Taira T., Urban J. H., Levine J. E., Turek F. W., Stenberg D., *Am. J. Physiol.*, **268**, R1456–R1463 (1995).
- 23) Hipólido D. C., Tufik S., Raymond R., Nobrega J. N., *Neuroscience*, **86**, 977–987 (1998).
- 24) Hipólido D. C., Moreira K. M., Barlow K. B., Wilson A. A., Nobrega J. N., Tufik S., *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, **29**, 297–303 (2005).
- 25) Blanco-Centurion C. A., Salin-Pascual R. J., *Brain Res.*, **923**, 128–136 (2001).
- 26) Himelstein J., Newcorn J. H., Halperin J. M., *Front. Biosci.*, **5**, D461–D478 (2000).
- 27) Russell V. A., *Behav. Brain Res.*, **130**, 191–196 (2002).
- 28) Schmeichel B. E., Berridge C. W., *Neuropsychopharmacology*, **38**, 1078–1084 (2013).



- 29) Bymaster F. P., Katner J. S., Nelson D. L., Hemrick-Luecke S. K., Threlkeld P. G., Heiligenstein J. H., Morin S. M., Gehlert D. R., Perry K. W., *Neuropsychopharmacology*, **27**, 699–711 (2002).
- 30) Gruber R., *Child Adolesc. Psychiatr. Clin. N. Am.*, **18**, 863–876 (2009).
- 31) Nijjima F., Nakagawasai O., Tan-No K., Tadano T., *Biog. Amines*, **20**, 99–111 (2006).
- 32) Asakura W., Matsumoto K., Ohta H., Watanabe H., *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **46**, 111–115 (1993).
- 33) Tadano T., Nakagawasai O., Nijjima F., Tan-No K., Hanawa M. A., Sakata Y., Sutoo D., Nemoto Y., Ida Y., Endo Y., *Pharmacol. Res.*, **47**, 195–199 (2003).
- 34) Berridge C. W., Devilbiss D. M., Andrzejewski M. E., Arnsten A. F., Kelley A. E., Schmeichel B., Hamilton C., Spencer R. C., *Biol. Psychiatry*, **60**, 1111–1120 (2006).
- 35) Kuczenski R., Segal D. S., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **296**, 876–883 (2001).
- 36) Kuczenski R., Melega W. P., Cho A. K., Segal D. S., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **282**, 591–596 (1997).
- 37) Nijjima F., Saito H., Murai S., Arai Y., Nakagawasai O., Tan-No K., Watanabe H., Hiraga H., Tadano T., *Biol. Pharm. Bull.*, **33**, 617–621 (2010).
- 38) Berridge C. W., Waterhouse B. D., *Brain Res. Brain Res. Rev.*, **42**, 33–84 (2003).
- 39) Hobson J. A., McCarley R. W., Wyzinski P. W., *Science*, **189**, 55–58 (1975).
- 40) Basheer R., Magner M., McCarley R. W., Shiromani P. J., *Brain Res. Mol. Brain Res.*, **57**, 235–240 (1998).
- 41) Brock J. W., Hamdi A., Ross K., Payne S., Prasad C., *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **52**, 43–48 (1995).
- 42) Carboni E., Tanda G. L., Frau R., Di Chiara G., *J. Neurochem.*, **55**, 1067–1070 (1990).
- 43) Morón J. A., Brockington A., Wise R. A., Rocha B. A., Hope B. T., *J. Neurosci.*, **22**, 389–395 (2002).
- 44) Yamamoto B. K., Novotney S., *J. Neurochem.*, **71**, 274–280 (1998).
- 45) Swanson C. J., Perry K. W., Koch-Krueger S., Katner J., Svensson K. A., Bymaster F. P., *Neuropharmacology*, **50**, 755–760 (2006).
- 46) Sonoki K., Iwase M., Takata Y., Nakamoto T., Masaki C., Hosokawa R., Murakami S., Chiwata K., Inoue H., *Endocr. J.*, **60**, 311–319 (2013).
- 47) Marshall T. A., Warren J. J., Hand J. S., Xie X. J., Stumbo P. J., *J. Am. Dent. Assoc.*, **133**, 1369–1379 (2002).
- 48) Yamazaki T., Yamori M., Asai K., Nakano-Araki I., Yamaguchi A., Takahashi K., Sekine A., Matsuda F., Kosugi S., Nakayama T., Inagaki N., Bessho K., Nagahama Study Collaboration Group, *PLoS One*, **8**, e64113 (2013).
- 49) Murakami K., Sasaki S., Takahashi Y., Uenishi K., Yamasaki M., Hayabuchi H., Goda T., Oka J., Baba K., Ohki K., Kohri T., Muramatsu K., Furuki M., *Am. J. Clin. Nutr.*, **86**, 206–213 (2007).
- 50) Nojima K., Ikegami H., Fujisawa T., Ueda H., Babaya N., Itoi-Babaya M., Yamaji K., Shibata M., Ogihara T., *Diabetes Res. Clin. Pract.*, **74**, 1–7 (2006).
- 51) Yamanaka R., Akther R., Furuta M., Koyama R., Tomofuji T., Ekuni D., Tamaki N., Azuma T., Yamamoto T., Kishimoto E., *J. Oral Rehabil.*, **36**, 584–591 (2009).
- 52) Pearce J., Langley-Evans S. C., *Int. J. Obes. (London)*, **37**, 477–485 (2013).
- 53) Suzuki H., Fukushima M., Okamoto S., Takahashi O., Shimbo T., Kurose T., Yamada Y., Inagaki N., Seino Y., Fukui T., *Metabolism*, **54**, 1593–1599 (2005).
- 54) Fucile S., Gisel E. G., Lau C., *Dev. Med. Child Neurol.*, **47**, 158–162 (2005).
- 55) Le Révérend B. J., Edelson L. R., Loret C., *Br. J. Nutr.*, **111**, 403–414 (2014).
- 56) Gisel E. G., *Dev. Med. Child Neurol.*, **33**, 69–79 (1991).
- 57) Takada T., Miyamoto T., *Neurosci. Lett.*, **360**, 137–140 (2004).
- 58) Momose T., Nishikawa J., Watanabe T., Sasaki Y., Senda M., Kubota K., Sato Y., Funakoshi M., Minakuchi S., *Arch. Oral Biol.*, **42**, 57–61 (1997).
- 59) Onozuka M., Fujita M., Watanabe K., Hirano Y., Niwa M., Nishiyama K., Saito S., *J. Dent. Res.*, **81**, 743–746 (2002).
- 60) Tamura T., Kanayama T., Yoshida S., Kawasaki T., *J. Oral Rehabil.*, **30**, 614–622 (2003).

- 61) Yamamoto T., Hirayama A., *Brain Res.*, **902**, 255–263 (2001).
- 62) Mitome M., Hasegawa T., Shirakawa T., *Neuroreport*, **16**, 249–252 (2005).
- 63) Yamazaki K., Wakabayashi N., Kobayashi T., Suzuki T., *Hippocampus*, **18**, 542–547 (2008).
- 64) Kushida S., Kimoto K., Hori N., Toyoda M., Karasawa N., Yamamoto T., Kojo A., Onozuka M., *Neurosci. Lett.*, **439**, 208–211 (2008).
- 65) Yoshino F., Yoshida A., Hori N., Ono Y., Kimoto K., Onozuka M., Lee M. C., *Neurosci. Lett.*, **508**, 42–46 (2012).
- 66) Nijijima-Yaoita F., Tsuchiya M., Saito H., Nagasawa Y., Murai S., Arai Y., Nakagawasai O., Nemoto W., Tadano T., Tan-No K., *Neurochem. Int.*, **63**, 309–315 (2013).
- 67) Le Moal M., Simon H., *Physiol. Rev.*, **71**, 155–234 (1991).
- 68) Jackson D. M., Westlind-Danielsson A., *Pharmacol. Ther.*, **64**, 291–370 (1994).
- 69) Helms C. M., Gubner N. R., Wilhelm C. J., Mitchell S. H., Grandy D. K., *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **90**, 387–393 (2008).
- 70) Keck T. M., Suchland K. L., Jimenez C. C., Grandy D. K., *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **103**, 831–841 (2013).
- 71) File S. E., Seth P., *Eur. J. Pharmacol.*, **463**, 35–53 (2003).
- 72) Barros V. G., Boado L. A., Adamo A. M., Caviedes R., Caviedes P., Antonelli M. C., *Neurotox. Res.*, **5**, 369–373 (2003).
- 73) Ayada K., Tadano T., Endo Y., *Physiol. Behav.*, **77**, 161–166 (2002).
- 74) Ono Y., Kataoka T., Miyake S., Cheng S. J., Tachibana A., Sasaguri K. I., Onozuka M., *Neuroscience*, **154**, 1352–1359 (2008).
- 75) Tsuchiya M., Nijijima-Yaoita F., Yoneda H., Chiba K., Tsuchiya S., Hagiwara Y., Sasaki K., Sugawara S., Endo Y., Tan-No K., Watanabe M., *Life Sci.*, **103**, 8–14 (2014).
- 76) LeBlanc J., Brondel L., *Am. J. Physiol.*, **248**, E333–E336 (1985).
- 77) Ranawana V., Clegg M. E., Shafat A., Henry C. J., *Nutr. Res.*, **31**, 452–459 (2011).
- 78) Shiba Y., Nitta E., Hirono C., Sugita M., Iwasa Y., *J. Oral Rehabil.*, **29**, 956–960 (2002).
- 79) Koizumi S., Minamisawa S., Sasaguri K., Onozuka M., Sato S., Ono Y., *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **301**, H1551–H1558 (2011).
- 80) Fransson L., Dos Santos C., Wolbert P., Sjöholm A., Rafacho A., Ortsäter H., *Diabetol. Metab. Syndr.*, **6**, 3 (2014).
- 81) Hölscher C., *CNS Drugs*, **26**, 871–882 (2012).
- 82) Lorber D., *Cardiovasc. Ther.*, **31**, 238–249 (2013).