

乳仔期の甲状腺ホルモン抑制剤投与による 発達障害モデルラットにおける水迷路課題学習の性差

中野 裕史・池尻 麻紀・岩永麻由子・中溝 祐子

The effect of Methimazole-induced neonatal hypothyroidism on sex difference of spatial learning in young rats

Hiroshi Nakano・Maki Ikejiri・Mayuko Iwanaga・Yuko Nakamizo

緒言

甲状腺ホルモンは中枢神経系の発達に重要であり、クレチン症のように先天性に甲状腺ホルモンが著しく低下した場合には、精神発達遅滞を引き起こす。ポリ塩化ビフェニル (PCB) やビスフェノール A (BPA) は甲状腺ホルモンの作用を阻害する代表的な内分泌かく乱化学物質であり、アメリカの五大湖の PCB 汚染魚を食べた母親から生まれた子どもの知能指数が低下することや、出生前後における PCB や BPA のばく露が自閉症スペクトラム障害 (ASD) や注意欠陥多動性障害 (ADHD) の発症リスクに関連する (de Cock ら, 2012) ことも指摘されている。

げっ歯動物を用いた実験では出生前後に低甲状腺ホルモン状態にさらされると、その後の成長にわたって学習・記憶能力の低下 (Akaike ら, 1991; Gilbert と Sui, 2006; Liu ら, 2010; Liu ら, 2013; Sadamatsu ら, 2006; Wang ら, 2012) や多動 (Akaike ら, 1991; Goldey ら, 1995; Sadamatsu ら, 2006) が認められる。このような行動学的特徴から、出生前後に低甲状腺ホルモン状態にさらされたラットを発達障害モデルの一つとみなすことができる。

ヒトの発達障害の発症率が女児よりも男児で高いことはよく知られた事実である。2012 (平成24) 年に実施した文部科学省の調査でも、知的発達に遅れはないものの学習面または行動面で著しい困難を示す児童生徒の割合は男子が 9.3%, 女子が 3.6% であったと報告されている (文部科学省, 2012)。それでは、ヒトと同様に前述した発達障害モデルラットにおいても、

その行動学的特徴に性差の影響が見られるのであろうか。本研究では空間学習・記憶能力を行動学的指標として用い、乳仔期に母乳を介して甲状腺ホルモン抑制剤を投与した発達障害モデルラットにおけるモリス水迷路課題学習の性差を検討した。モリス水迷路課題は、プールに放たれたげっ歯動物が周囲の視覚の手がかりをもとに、水面下に隠れた退避場所 (プラットフォーム) を学習・記憶する課題である (Morris, 1984)。

方法

1. 実験動物

成熟した Wistar 系ラットのオスとメスをそれぞれ 2 匹ずつ交配し、それらの出産仔 28 匹 (オス 13 匹, メス 15 匹) を使用した。仔ラットは 3 週齢時に離乳させ、その後の餌と水は自由摂取とした。ラットの飼育は本学アニマルセンターにて行い、照明は 12 時間毎の明暗サイクルとした。本研究は、本学実験動物委員会の承認を得て実施された。

2. メチマゾール投与

甲状腺ホルモン抑制剤として、メチマゾール (Methimazole, Sigma, M8506) を使用した。出産直後より、2 匹の母ラットの内、一方に 0.02% 濃度のメチマゾールを飲料水として 3 週間自由摂取させ、その仔ラット (オス 7 匹, メス 7 匹) を MMI 群とした。もう一方にはコントロールとして水を 3 週間自由摂取させ、その仔ラット (オス 6 匹, メス 8 匹) を CON 群とした。投与期間中の母ラットの餌は自由摂取と

した。

3. モリス水迷路課題

水迷路装置として直径150cmの青色の円形プールを使用し、プラットフォーム(直径18cm)と記憶の手がかりとなるランドマーク(★, ●, ▲, ■の4つの図形)を設置した(図1)。水はプラットフォームより2cm上の高さまで入れ、遊泳中のラットに水面下のプラットフォームの位置が見えないようにした。水温は 22 ± 1 ℃, 照明は100luxに維持した。

両群ともに6週齢時に1日当たり4試行, 7日間の訓練を行った。試行間隔は15分とし, 4試行の遊泳時間の平均値を逃避潜時として算出した。開始に先立ち, ラットをプラットフォーム上に20秒間静置し, プラットフォームの場所を記憶させた。各試行は, 4つのランドマーク地点のいずれかよりランダムな順序でプール内にラットを投入してから, ラットがプラットフォームに到達するまでとし, その間の遊泳時間を測定した。プラットフォームに到達後はそのまま10秒間静置させ, プラットフォームの場所を再記憶させた。測定時間は最大60秒とし, 60秒経過してもプラットフォームに到達できない場合は, 検者がプラットフォームに誘導して10秒間静置させ, プラットフォームの場所を再記憶させた。

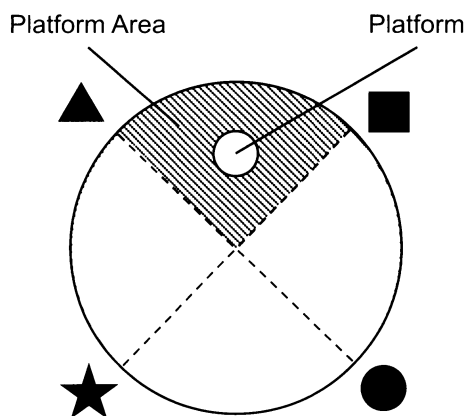


図1 水迷路装置

4. プローブテスト

7日間の訓練後, 8日目にプラットフォームをプール内から取り除き, プローブテストを実施した。プールの中央よりラットを投入し, 60秒間遊泳させ, 図1に斜線で示した4分円内におけるプラットフォームエリアでの滞在時間を算出した。

5. 血清総サイロキシン (T4)

プローブテストの翌日, 断頭屠殺により体幹から採血し, その血清を凍結保存した。T4濃度測定は(株)SRLにて電気化学発光免疫測定法(ECLIA法)により実施した。

6. 統計処理

体重とT4濃度において, 群と性別を要因とする2元配置の分散分析を実施した。水迷路課題において, 群, 性別, 訓練日を要因とする3元配置の分散分析を実施した。また, 性別ごとに水迷路課題の各訓練日における群間比較をマン・ホイットニのU検定により実施した。プローブテストにおいて, 群と性別を要因とする2元配置の分散分析を実施した。すべての統計量は平均値±標準誤差で示し, 有意水準は $p < 0.05$ とした。

結果

図2に6週齢時の体重の結果を示した。群の主効果($F(1, 24) = 173.5, p < 0.001$), 性別の主効果($F(1, 24) = 124.9, p < 0.001$), 交互作用($F(1, 24) = 15.8, p < 0.005$)のいずれも有意であり, 下位検定の結果, MMI群はCON群よりも体重が有意に軽く(Bonferroni, $p < 0.001$), メスはオスよりも体重が有意に軽かった(Bonferroni, $p < 0.001$)。

図3に7週齢時のT4濃度の結果を示した。性別の主効果($F(1, 24) = 124.9, p < 0.001$)が有意であり, オスはメスよりもT4濃度が高かった。群の主効果と交互作用は有意でなかった。

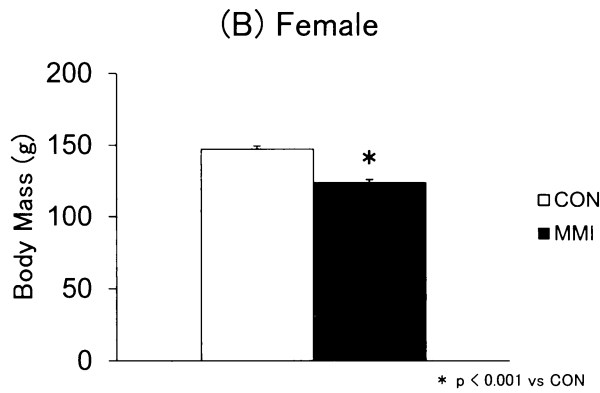
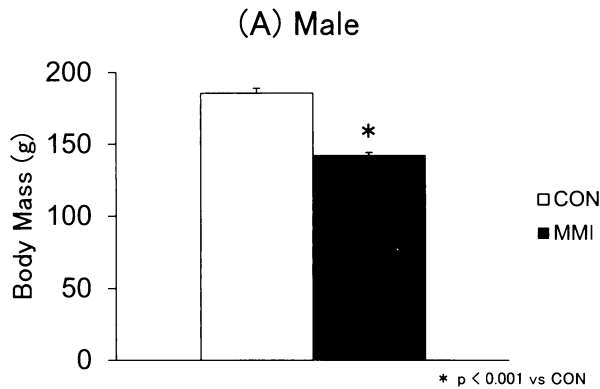


図2 体重

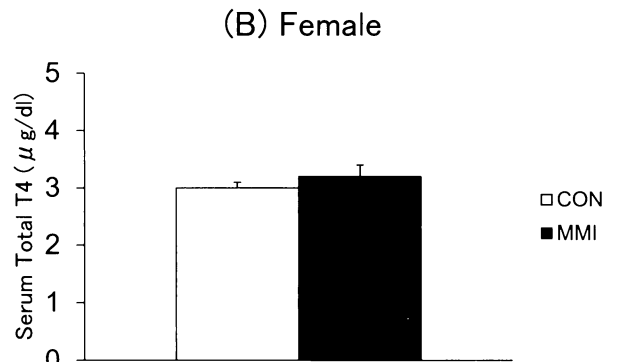
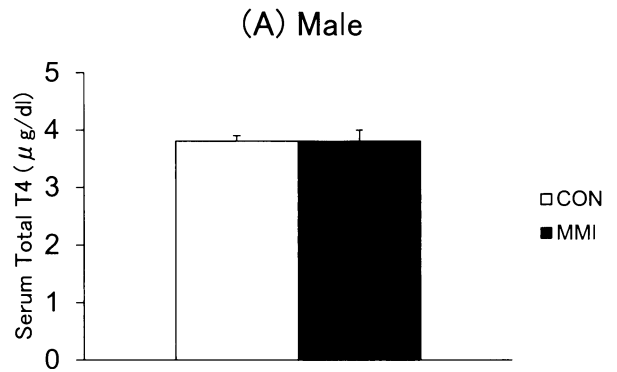


図3 血清総サイロキシン濃度

図4にモリス水迷路課題における逃避潜時の結果を示した。群の主効果 ($F(1, 24) = 33.9, p < 0.001$) と訓練日の主効果 ($F(6, 144) = 57.0, p < 0.001$) が有意であり、MMI群とCON群ともに逃避潜時が訓練により短縮していたものの、MMI群はCON群よりも逃避潜時が長かった。性別の主効果と交互作用は有意でなかった。また、性別ごとに各訓練日における群間比較を行ったところ、オスでは訓練1日目 ($p < 0.005$)、2日目 ($p < 0.05$)、4日目 ($p < 0.05$)、6日目 ($p < 0.01$)、7日目 ($p < 0.005$) において、MMI群の逃避潜時がCON群よりも有意に長く、両群間に差がみられなかったのは訓練3日目と5日目のみであった。一方、メスにおいては、訓練1日目 ($p < 0.005$) と6日目 ($p < 0.05$) のみMMI群の逃避潜時がCON群よりも有意に長く、他の訓練日では両群間に差はみられなかった。

プローブテストにおけるプラットフォームエ

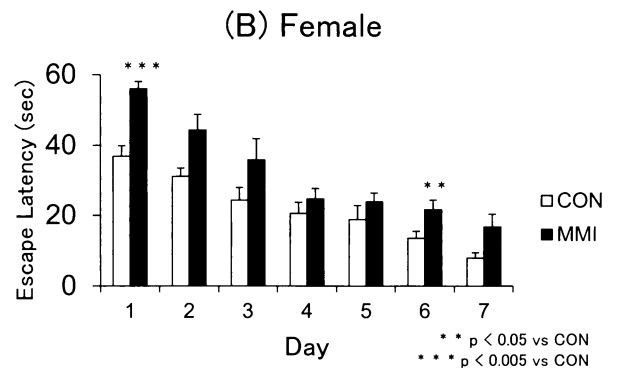
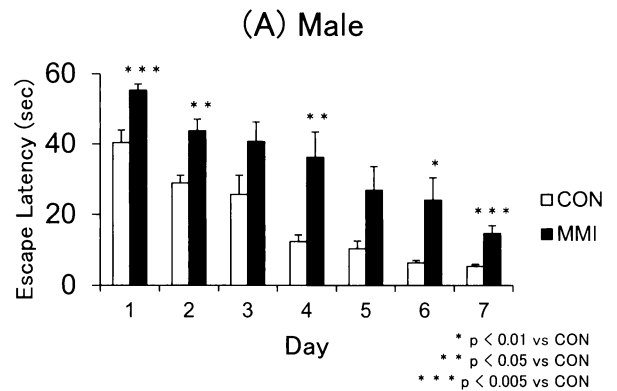


図4 モリス水迷路課題における逃避潜時

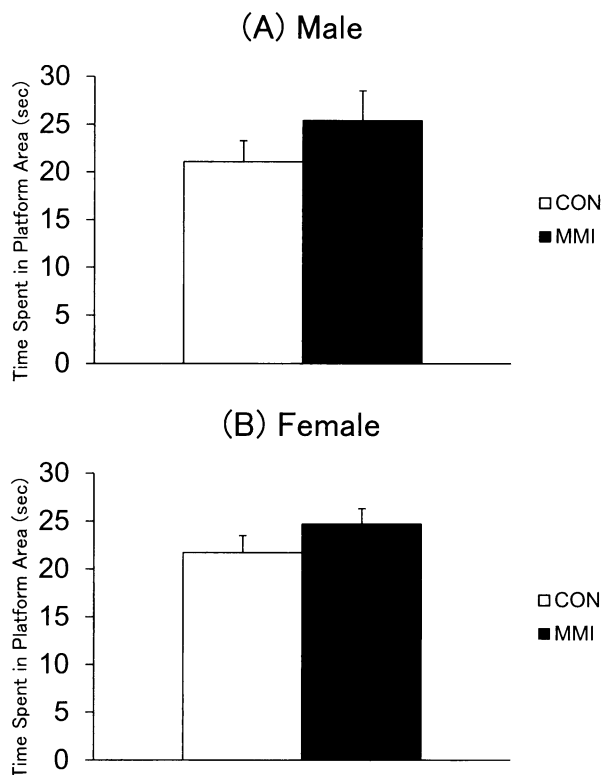


図5 プローブテストにおけるプラットフォームエリアでの滞在時間

リアでの滞在時間の平均値はMMI群がCON群よりも長かったが、統計学的に群の主効果、性別の主効果、交互作用のいずれも有意ではなかった(図5)。

考察

先行研究において、出生前後に低甲状腺ホルモン状態にさらされたラットでは、発育による体重増加が抑制されることが示されており(Akaikeら, 1991; GilbertとSui, 2006; Koibuchiら, 2001; LasleyとGilbert, 2011; Liuら, 2010; Goldeyら, 1995), 本研究においても6週齢時の体重はMMI群がCON群よりも軽かった。

甲状腺ホルモン抑制剤投与中の仔ラットのT4濃度は検出できないほど低下するものの(Akaikeら, 1991; Chakrabortyら, 2012; GilbertとSui, 2006; Goldeyら, 1995; LasleyとGilbert, 2011; Liuら, 2010; SuiとLi, 2010),

投与終了後は正常値に戻ると考えられている(Akaikeら, 1991; GilbertとSui, 2006; LasleyとGilbert, 2011; SuiとLi, 2010)。本研究ではメチマゾール投与中の仔ラットのT4濃度は測定していないが、7週齢時の仔ラットのT4濃度にはCON群とMMI群で差がなかったことから、先行研究と同様にMMI群ではメチマゾール投与中に低下したT4濃度が7週齢時には正常値に戻っていたと考えられる。

本研究では、行動学的指標として空間学習・記憶能力を測定するモリス水迷路課題を実施した。その結果、CON群とMMI群ともに逃避潜時が短縮して学習がなされるものの、MMI群はCON群よりも逃避潜時が遅延しており、空間学習・記憶能力が低下していた。その際、メスでは、逃避潜時の遅延が訓練1日目と6日目の2回であったのに対し、オスでは訓練1日目、2日目、4日目、6日目、7日目の5回であったことから、乳仔期に低甲状腺ホルモン状態にさらされた発達障害モデルラットの空間学習・記憶能力の低下は、メスよりもオスで大きいと考えられる。ヒトの発達障害の発症率が女児よりも男児で高いことはよく知られており、ヒトと同様に発達障害モデルラットにおいても、その行動学的特徴に性差の影響が見られることが示唆された。

空間学習・記憶には海馬の脳由来神経栄養因子(BDNF)が重要な役割を果たしていることが明らかとなっている。出生前後に低甲状腺ホルモン状態にさらされたラットでは、海馬のBDNFの発現低下が示されており(Chakrabortyら, 2012; LasleyとGilbert, 2011; Liuら, 2010; Liuら, 2013; SuiとLi, 2010; Wangら, 2012), その機序としてBDNF遺伝子のCpGアイランドのメチル化の促進およびBDNF遺伝子のプロモーター領域のヒストンH3とヒストンH4のアセチル化の低下が想定されている(SuiとLi, 2010)。また、その際、生後初期ではBDNFの発現低下に性差が認められないものの(Chakrabortyら, 2012), 成長

するとオスでのみ正常レベルよりも BDNF の発現が低下しており、メスでは正常レベルと差がないことが示されている (Lasley と Gilbert, 2011)。本研究では海馬の BDNF の発現は測定していないが、モリス水迷路課題学習時のラットの週齢が生後初期ではなく性成熟直前の 6 週齢であることから、オスにおいて海馬の BDNF の発現が低下していた可能性が考えられる。それゆえ空間学習・記憶能力の低下がメスよりもオスで大きかったのかもしれない。

プローブテストにおける先行研究では、出生前後に低甲状腺ホルモン状態にさらされたラットではプラットフォームエリアでの滞在時間が減少する報告 (Gilbert と Sui, 2006 ; Liu ら, 2010) と変化しない (Wang ら, 2012) という報告があり一致していない。本研究ではプラットフォームエリアでの滞在時間に CON 群と MMI 群で差がなく、むしろ MMI 群では滞在時間がやや長い傾向にあり、記憶した場所への固執傾向があるのではないかと推測もなされる。この点については今後の詳細な検討が必要である。

文献

- Akaike M, Kato N, Ohno H and Kobayashi T: Hyperactivity and spatial maze learning impairment of adult rats with temporary neonatal hypothyroidism. *Neurotoxicol Teratol.* 13:317-322, 1991.
- Chakraborty G, Magagna-Poveda A, Parratt C, Umans JG, MacLusky NJ and Scharfman HE: Reduced hippocampal brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in neonatal rats after prenatal exposure to propylthiouracil (PTU). *Endocrinology.* 153:1311-1316, 2012.
- de Cock M, Maas YG and van de Bor M: Does perinatal exposure to endocrine disruptors induce autism spectrum and attention deficit hyperactivity disorders? Review. *Acta Paediatr.* 101:811-818, 2012.
- Gilbert ME and Sui L: Dose-dependent reductions in spatial learning and synaptic function in the dentate gyrus of adult rats following developmental thyroid hormone insufficiency. *Brain Res.* 1069:10-22, 2006.
- Goldey ES, Kehn LS, Rehnberg GL and Crofton KM: Effects of developmental hypothyroidism on auditory and motor function in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol.* 135: 67-76, 1995.
- Koibuchi N, Yamaoka S and Chin WW: Effect of altered thyroid status on neurotrophin gene expression during postnatal development of the mouse cerebellum. *Thyroid.* 11:205-210, 2001.
- Lasley SM and Gilbert ME: Developmental thyroid hormone insufficiency reduces expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in adults but not in neonates. *Neurotoxicol Teratol.* 33:464-472, 2011.
- Liu D, Teng W, Shan Z, Yu X, Gao Y, Wang S, Fan C, Wang H and Zhang H: The effect of maternal subclinical hypothyroidism during pregnancy on brain development in rat offspring. *Thyroid.* 20:909-915, 2010.
- Liu Y, Zhang L, Li J, Shan Z and Teng W: Maternal marginal iodine deficiency affects the expression of relative proteins during brain development in rat offspring. *J Endocrinol.* 217:21-29, 2013.
- 文部科学省：「通常の学級に在籍する発達障害の可能性のある特別な教育的支援を必要とする児童生徒に関する調査」調査結果, 2012.
- Morris R: Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods.* 11:47-60, 1984.
- Sadamatsu M, Kanai H, Xu X, Liu Y and Kato N: Review of animal models for autism: Implication of thyroid hormone. *Congenit Anom.* 46:1-9, 2006.
- Sui L and Li BM: Effects of perinatal hypothyroidism on regulation of reelin and brain-derived neurotrophic factor gene expression in rat hippocampus: Role of DNA methylation and histone acetylation. *Steroids.* 75:988-997, 2010.
- Wang S, Teng W, Gao Y, Fan C, Zhang H and Shan Z: Early levothyroxine treatment on maternal subclinical hypothyroidism improves spatial learning of offspring in rats. *J Neuroendocrinol.* 24:841-848, 2012.