

自閉徴候を示す症例における FMR-1 遺伝子発現の量的評価について

分担研究者 杉江秀夫 浜松市発達医療総合センター所長

研究要旨

自閉症の発症原因は不明であるが、自閉症と類似した症候を持ち、責任遺伝子が判明している遺伝性疾患について遺伝子発現の様式と症候との関連を検討することは、自閉症の病因を究明する上で重要である。脆弱 X 症候群は FMR-1 遺伝子がコードする蛋白 FMRP の発現異常が原因である。FMR-1 遺伝子発現量と自閉症児が示す症候を分析し検討する。

A. 研究目的

自閉症の原因遺伝子は複数であり、発症には環境要因も関連している。明らかな遺伝学的原因が判明していかつ臨床兆候として自閉症パターンを示す疾患は自閉症の病態を解明する上で重要なモデルと考えられる。結節性硬化症 (tuberous sclerosis) と脆弱 X 症候群 (Fragile X syndrome : FRAXA) は遺伝学的原因が判明して自閉症と類似徴候を示す疾患群である。FRAXA は FMR-1 遺伝子の非翻訳領域の CGG 反復が異常に増加し gene product である FMRP が発現しないために発症する遺伝性精神遅滞である。FMRP は RNA-binding protein であり FMRP の量的発現/標的になる mRNA の機能障害と臨床徴候との関連について検討する。

B. 研究方法

(1) 浜松市発達医療総合センター小児科外来受診者で男児の発達障害と診断した症例における、FMR-1 遺伝子の発現、および末梢血を用いた FMRP に対する免疫染色

による脆弱 X 症候群のスクリーニングを行った。

(2) DSM-IV に基づき自閉症、AD/HD、単純精神遅滞と診断した症例の中で、家族の同意を得られた症例について末梢血より genomic DNA、total RNA を抽出し、real-time PCR で FMR-1 gene の発現量を検討した。

自閉症については臨床徴候を特に症状から：(1) motor hyperactivity、inattention、(2) repetitive behavior、(3) aggression、self-injury、property destruction、(4) impaired social relatedness の 4 症候に分けてそれぞれの徴候について 0, 1, 2 のスコアをつけ、症例ごとにどの徴候が優位かを分類した。その分類に基づいて FMR-1 遺伝子発現量を検討した。また AD/HD、単純精神遅滞についても発現量の比較を行った。

C. 研究結果

現在までに FRAXA のスクリーニングは男児を中心に行われ、精神遅滞男児約 1,200

例における本疾患の頻度は0.5%であり、欧米に比較するとかなり低頻度であることが判明した。FRAXA については genomic DNA から FMR-1 遺伝子の一部をサブクローニングし定量 PCR のスタンダード (基準) を作成した。これをもとに現在自閉症、ADHD、精神遅滞における FMR-1 遺伝子発現を検討している。

D. 考察

自閉症は3つの主要な behavioral domains (1 social interaction, 2 language/communication/imaginative play, 3 range of interests and activities) の障害による。単一な遺伝子疾患ではなくまた症状も複合的であるため、自閉症の行動パターンを分類し検討することは重要である。FMR-1 遺伝子は自閉性障害をきたす疾患として比較検討する上で興味深く、その症候と遺伝子発現の関係を明らかにすることで自閉症の病態を検討できると考えられる。

E. 結論

FMR-1 遺伝子の発現量を症候別に検討し自閉症発症との関連について究明するとともに薬物療法への反応性との関連についても検討することが重要である。

F. 研究発表

論文発表

- 1) Sugie Y, Sugie H, Fukuda T, et al. Relationship between Pervasive Developmental Disorders (PDDs) and Neonatal Factors: Comparison with Normal Subjects. *Autism* (in press)
- 2) 杉江陽子, 杉江秀夫. 発達障害と遺伝—

最近の知見—. 発達障害医学の進歩. 16 診断と治療社 37-44, 2004

3) Sugie Y, Sugie H, Fukuda T, et al. Clinical efficacy of fluvoxamine and functional polymorphism in a serotonin transporter gene on childhood autism. *J Autism Dev Disorder* (in press)

4) Maruyama K, Suzuki T, Koizumi T, Sugie H, et al. Congenital form of glycogen storage disease type IV: a case report and a review of the literature. *Pediatr Int.* 46: 474-477, 2004.

5) Tomihira M, Kawasaki E, Nakajima H, Imamura Y, Sato Y, Sata M, Kage M, Sugie H, Nunoi K. Intermittent and recurrent hepatomegaly due to glycogen storage in a patient with type 1 diabetes: genetic analysis of the liver glycogen phosphorylase gene (PYGL). *Diabetes Res Clin Pract.* 65: 175-182, 2004.

6) 杉江秀夫. 軽度発達障害児への援助と対応: 医療と学校保健の連携のあり方. *学校保健研究* 46:472-477, 2004.

学会発表等

1) Sugie Y, Sugie H, Fukuda T, et al. Relationship between 5-HT_{2A}R gene polymorphism and neonatal factors in autism. 51st Annual Meeting of American Academy of Child and Adolescent Psychiatry, Washington DC, USA, October 19-24, 2004.

2) Sugie H. Muscle Glycogen Storage Diseases: Overview and diagnostic approach. Scientific and Clinical Symposia. *Advances in Glycogen Storage*

diseases. 3rd Annual Scientific Meeting
Asian & Oceanian Myology Center.
Singapore, January 9, 2004.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

研究協力者

鈴木輝彦

大澤純子

杉江陽子

福田冬季子

Ⅱ.分担研究報告

6. 自閉症発症に関する遺伝子多型と 新生児期異常の検討

杉江秀夫

自閉症発症に関する遺伝子多型と新生児期異常の検討

分担研究者 杉江秀夫 浜松市発達医療総合センター所長

研究要旨

自閉症 (AD) の発症の病因としてセロトニン 2A 受容体遺伝子(5-HT2AR)多型と周生期における何らかの異常との関連に関し検討した。AD では 5-HT2AR102T/T 多型において新生時期異常が有意に高頻度であり、自閉傾向(AT)と単純精神遅滞(MR)では有意差が見られなかった。AD 発症予防の観点から、5-HT2AR 多型 TT になんらかの新生児期異常 (特に黄疸) が加わることで AD 発症のリスクを高めるかどうか、今後さらに検討する必要がある。

A. 研究目的

自閉症(AD)の発症には複数の遺伝子が関与している。その関連遺伝子の中には単独では原因遺伝子とならないが、環境要因の2次的関与により発症に寄与する遺伝子の存在も考えられる。セロトニンは神経伝達物質であり、自閉症で、セロトニン血中濃度高値例、SSRI 有効例、セロトニン合成能異常児が見られることより注目されているが、単独では原因遺伝子として否定的である。セロトニンは神経伝達物質のなかでは環境に左右されやすいこともあり、我々はゲノムスキャンで候補遺伝子部位のひとつに座すセロトニン 2A 受容体遺伝子(5-HT2AR)多型と周生期因子とくに新生児期早期における異常との関連に注目し検討を行った。

B. 研究方法

浜松市発達医療総合センター小児科外来受診者で DSM-IV に基づき AD と診断した

症例および自閉傾向(AT)、単純精神遅滞(MR)の症例を対象とした。家族の同意を得て末梢血より DNA を抽出し、PCR 法(Warren et al)により 5-HT2AR 遺伝子の 102T/C 多型を検索した。周生期因子は母子手帳と問診より Juul-Dam らの項目を参考に調査した。遺伝子多型と周生期因子の関係について、AD、AT、MR で比較を行った。症例は全例日本人である。

(倫理的な配慮)

患者及び家族の同意を得て、研究を行った。

C. 研究結果

AD 225 例、AT 36 例、MR 30 例で保護者の同意が得られた。

1. 多型検索 : AD では多型 TT が多い傾向であったが、AT と MR では多型頻度に差はなかった。

2. 周生期因子 : AD 症では AT または MR に比較して出生時体重が有意に重かった。

3. 5-HT2AR 多型と周生期因子について：出生時母年齢、父年齢、在胎週数、出生時体重は AD、AT、MR 3 群とも多型間で差はなかった。AD では新生児期異常が TT に有意に高頻度であったが、AT、MR では多型間に差はなかった。

新生児期異常の内容について多変量解析を行うと AD では重度黄疸に有意差が認められた。AD における知能程度別の新生児期異常の頻度は軽度と中等度遅滞で多型 TT で有意に多く、遅滞なしと重度では差はなかった。

D. 考察

AD と 5-HT2AR 多型との関係については無関係との一報告がある。また AD においては新生児期異常の頻度が高いとの報告は多い。しかし AD と関連の深い新生児期異常の内容が報告によりバラツキがあり、新生児期異常そのものが AD の発症には関係ないと結論する報告が多い。しかし、なぜ多いかについてはまだ不明な点が多い。

今回、5-HT2AR 遺伝子多型と新生児期異常の関連を検討することにより、AD では 5-HT2AR102T/T 多型において新生時期異常が有意に高頻度であり、AT と MR では有意差が見られなかったとの結果は興味を持たれる。

E. 結論

自閉症発症予防の観点から、5-HT2AR 多型 TT になんらかの新生児期異常（特に黄疸）が加わることが自閉症発症のリスクを高めるかどうか、今後さらに検討する必要がある。

F. 研究発表

論文発表

1) Sugie Y, Sugie H, Fukuda T, et al. Relationship between Pervasive Developmental Disorders (PDDs) and Neonatal Factors: Comparison with Normal Subjects. Autism (in press)

2) 杉江陽子, 杉江秀夫. 発達障害と遺伝—最近の知見—. 発達障害医学の進歩. 16 診断と治療社 37-44, 2004.

3) Sugie Y, Sugie H, Fukuda T, et al. Clinical efficacy of fluvoxamine and functional polymorphism in a serotonin transporter gene on childhood autism. J Autism Dev Disorder (in press)

4) Maruyama K, Suzuki T, Koizumi T, Sugie H, et al. Congenital form of glycogen storage disease type IV: a case report and a review of the literature. Pediatr Int. 46: 474-477, 2004.

5) Tomihira M, Kawasaki E, Nakajima H, Imamura Y, Sato Y, Sata M, Kage M, Sugie H, Nuno K. Intermittent and recurrent hepatomegaly due to glycogen storage in a patient with type 1 diabetes: genetic analysis of the liver glycogen phosphorylase gene (PYGL). Diabetes Res Clin Pract. 65: 175-182, 2004.

2. 学会発表等

1) Sugie Y, Sugie H, Fukuda T, et al. Relationship between 5-HT2AR gene polymorphism and neonatal factors in autism. 51st Annual Meeting of American Academy of Child and Adolescent Psychiatry, Washington DC, USA October 19-24, 2004

2) Sugie H. Muscle Glycogen Storage Diseases: Overview and diagnostic approach. Scientific and Clinical Symposia. Advances in Glycogen Storage diseases. 3rd Annual Scientific Meeting Asian & Oceanian Myology Center. Singapore, January 9, 2004.

G. 知的財産権の出願・登録状況

- | | |
|-----------|----|
| 1. 特許取得 | なし |
| 2. 実用新案登録 | なし |
| 3. その他 | なし |

研究協力者

杉江陽子

鈴木輝彦

大澤純子

福田冬季子

Ⅱ.分担研究報告

7. Bronx waltzer mouse にみられるサーカディアンリズム 障害 —照明条件による行動パターンの変化—

稲垣真澄

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
分担研究報告書

Bronx waltzer mouse にみられるサーカディアンリズム障害
—照明条件による行動パターンの変化—

分担研究者 稲垣真澄
国立精神・神経センター精神保健研究所 知的障害部 診断研究室長

研究要旨：本研究では遺伝性難聴マウスである Bronx waltzer mouse (bv) の回転性行動異常を示す多動群と寡動群についてサーカディアンリズム障害の有無について検討を行い、4 照明条件（8～20 時/20～翌 8 時；明暗(L/D)、恒明(L/L)、恒暗(D/D)、暗明(D/L)）下の行動パターンの特徴と条件変更時の変化について比較した。

L/D 条件下の行動量最大値と休息時間の日内変動リズムでは、bv 寡動群において明期と暗期の差が乏しかった。L/L 条件では全群にサーカディアンリズムのフリーラン ($\tau > 24\text{h}$) が認められた。bv 寡動群では活動期と休息期の境界が不明確で、記録途中でサーカディアンリズムが消失した例が存在した。D/D 条件下ではほぼ全例でリズムが短縮するフリーラン ($\tau < 24\text{h}$) があり、とくに bv 寡動群で有意に短縮していた。L/D および D/L 条件間での変化に対しては、全ての群に新たな明暗周期への再同調がみられたが、再同調に要した日数は bv 群で短く、とくに bv 寡動群でその傾向が顕著な特徴がみられた。

これらの結果より、bv マウス、とくに bv 寡動群において健常とは異なったサーカディアンリズムパターンがあり、環境条件に影響を受けやすい特徴がわかった。その要因として、行動量がもともと少ないことや休息時間の多さがあげられた。また、サーカディアンリズムにおけるネガティブフィードバック機構、とくにセロトニン神経系の機能障害が考えられ、自閉症に認められる睡眠障害のモデルを一部反映している可能性があった。

A. 研究目的

サーカディアンリズムとは、約 24 時間周期を持ち、様々な環境周期に同調する自律性の生物リズムを指す。サーカディアンリズムは生物内の様々な組織、臓器に存在している内因性リズムであり、照度や気温変化のない恒常環境下においても持続する。恒常条件下でのサーカディアンリズム（フリーランリズム）は多くの場合 24 時間より多少変動し、その周期は生物種、性別、年齢によって異なることが知られている。哺乳類において、サーカディアンリズム調節機構の最も重要な中枢は「視交叉上核」である。視交叉上核を破壊したラット等齧歯類ではリズムの消失が起こることが確認されている。そして、視交叉上核に依存し

ている体内時計機構の同調には、様々な要因が関係していることがわかっている。

一方、Bronx waltzer mouse (bv) は、常染色体劣性遺伝性難聴マウスであり、内耳有毛細胞の選択的障害が生後 1 週間程度で生じることが特徴とされている。bv マウスは頭部を振ることや、ワルツ様の行動を取ることが知られていたが、その原因は主に難聴であると考えられてきた。しかしながら、分担研究者の研究室で bv マウスの兄妹交配を繰り返すに伴い、激しい回転行動を示す運動過多群 (bv 多動群) と、回転行動が認められない運動寡少群 (bv 寡動群) の 2 群に大別できることが確認された。bv 多動群、bv 寡動群の DPOAE (歪成分耳音響放射) を比較したところ、ともに重度

の難聴があり、2群の間でその程度に差は認められず、難聴による行動の多寡ではないものと思われた。そして、bvの脳内モノアミン系の中で、ドパミン受容体、とくにD1系受容体における機能障害が疑われている。またbv寡動群については、記憶・学習機能の低下が示され、海馬の機能障害が推測されてもいる。このように、bvマウスは様々な行動学的特徴や大脳機能障害を有しており、ヒトにおいて示される種々の行動障害のモデルとなる可能性を有している。

本研究の目的は、Bronx waltzer mouseの多動群および寡動群におけるサーカディアンリズムを明らかにすることであり、ヒト行動異常あるいは発達障害の一側面を反映するか否かを検討することである。

B. 研究方法

1. 実験動物および飼育環境

実験には国立精神・神経センター神経研究所 実験動物研究施設にて飼育したBronx-waltzerマウス(bv)を使用した(多動群; n=3, 寡動群; n=5)。対照としてはC57BL/6J (n=5)を日本クレア(株)より購入し、使用した。

bvマウスの遺伝的診断はbvマーカー遺伝子領域のPCRで確認した。bvにおける多動群、寡動群の判定には夜間における自発性行動量の測定結果を用い、12時間での全行動カウント数が30,000以上、あるいは1分あたりの最大カウント数が150以上のマウスを多動群、それ以下を寡動群とした。

各マウスはプラスチックケージ(182×260×128mm)中にて個別飼育とし、恒温、恒湿条件下にて食餌、水ともに自由摂取とした。またマウスの飼育上必要なケアは1

週間に1度とし、曜日および時間を一定にした。また暗明条件での暗期および恒暗条件におけるケアは、赤色照明を使用し、照明条件を維持した状態で行った。

2. サーカディアンリズムの測定

1) 自発性運動量の測定

各マウスの自発性運動量の測定には、動物体温による放出赤外線検出型の自発運動量センサー(NS-AS01)およびデータ集録解析システム(DAS-008; いずれも株式会社ニューロサイエンス社製)を用いた。計測は1分毎とし、実験開始時より終了まで連続して行った。

2) 照明条件

自発性運動量の測定は、明暗(L/D)、恒明(L/L)、恒暗(D/D)、暗明(D/L)の4条件にて行った。各条件は午前8時から午後8時、および午後8時から翌朝8時の各12時間を1サイクルとし、各々の条件にて14から49日間の継続記録を行った。

各条件間には必ずL/D条件をはさみ、サーカディアンリズムが完全に復帰したことを確認した後に、次の条件に変更するようにした。

3. データ解析

1) Double Plot Actogramの作成

各照明条件下、KaleidaGraph (Synergy Software)を用いてStandard Double Plotting Actogramを作成し、サーカディアンリズムのパターンを検討した。

2) 明暗条件下における明期および暗期での行動量比較

各群の明暗期で測定した行動量データについて、明期及び暗期12時間での行動量総量、休息时间および1分あたりの最大値をMicrosoft Excel®を用いて比較した。照明

条件を明暗条件に変更してから1週間後から10日間のデータを用いた。休息时间については、1分あたりの行動量が5以下に該当する時間とした。さらに休息时间および1分あたりの行動量最大値については、日内変動を比較するために1時間毎の結果についても検討した。

3) フリーラン周期 (τ) の計算

フリーラン周期 (τ) の計算は、Microsoft Excel®を用いた。明暗、暗明条件下における各日、及び恒明、恒暗条件下における各サイクルでの活動期の開始時間を決定するために、次のような処理を行った。

まずある時点 (a) に関する active 及び non-active の判定を行った。ある時点 (a) およびその前後2分 (a-2, a-1, a+1, a+2) を含む計5分間での行動量平均値を求め (A')、同一照明条件下全体での行動量平均値 (X) の30%値 ($0.3X$) と比較し、 $A' > 0.3X$ ならば a は active、 $A' < 0.3X$ ならば non-active とした。

ある1日および1サイクルにおいて、active が30分以上連続し、かつそれ以前の期間で2時間以上連続していない場合の active 期の始まりを「活動開始時間」とした。

活動開始時間および日数との間で線形回帰分析を行い、得られた傾きよりフリーラン周期を求めた。

4) 明暗および暗明条件間の変化に対するリズム再同調に要する日数

各照明条件変更後、各サイクルでの活動開始時間を、上記方法にて決定した。それぞれ求めた活動開始時間が、条件変更下での暗期開始時間に到達するのに掛かった日数を求め、再同調に要した日数とした。

5) 統計学的検討

統計学的検討はすべて ANOVA (StatView for windows ver.4.54) にて行った。

(倫理面の配慮)

対象マウスは処置を注意深くおこない、疼痛緩和や苦痛を与えない配慮により実験を行った。

C. 結果

1. 自発運動量のサーカディアンリズム

1) 明暗条件 (L/D)

各群の明暗条件における Double Plotting Actogram の例を図に示す。なお、各群とも代表的な2例ずつ示している。

全ての群において、明から暗への切換時に活動期に入る傾向が認められ、約24時間周期を示していた。

対照群では明期で明らかな休息状態を示し、活動期と休息期の区別が比較的明瞭であった (図1)。活動期には行動パターンが二帯分離を示し、休息期に比べて活動期が長い傾向が認められた。

また bv 多動群でも対照群同様に、活動期と休息期の行動量の差が明確に示された (図2)。活動期と休息期の区別は明瞭で、休息期に比較して活動期が長くなる結果となった。

一方 bv 寡動群では活動期と休息期の境界が不明瞭な例が存在しており、活動期と休息期の行動量の差は小さかった (図3)。また活動期と休息期の長さは同程度であった。

2) 恒明条件 (L/L)

各群の恒明条件における Double Plotting Actogram の例を図4-6に示す。な

お、各群とも代表的な 2 例を示している。

3 群全ての例において、恒明条件下での位相の後退が認められた。

対照群では明暗条件下で見られた活動期における行動パターンの二帯分離は認められず、また休息期よりも活動期が短かった (図 4)。

bv 多動群において恒明条件下での位相後退が顕著な例が存在していた (図 5)。活動期と休息期の比較では、活動期が長く、明暗条件下と変わらなかった。

bv 寡動群では他の照明条件に比べ、活動期と休息期の区別が曖昧であった (図 6)。条件変更後約 14 日で境界の判定が出来なくなり、リズム消失を示した例も存在した。また活動期に比べ休息期が長くなった。

3) 恒暗条件 (D/D)

各群の恒暗条件における Double Plotting Actogram の例を図 7-9 に示す。なお、各群とも代表的な例を 2 例ずつ示している。

対照群では緩徐な位相前進が認められた例と、位相前進が認められない例が存在していた (図 7)。活動期と休息期の区別は明瞭で、活動期が休息期に比べ長くなる傾向が認められた。

bv 多動群においても同様に位相前進が認められた例と、ほとんど認められない例が存在していた (図 8)。しかしながら、最初位相前進が認められなかった例では、恒暗条件切替後約 40 日を過ぎてから急激な位相前進を示した。また、活動期が休息期に比べ長くなっており、その程度は他の群に比べて顕著であった。

一方、bv 寡動群では全ての例で位相前進が認められ、他の 2 群と比較してその程度

が大きかった (図 9)。また、一定期間後に位相の変化が消失する例が認められたが、その時期は一定ではなかった。

4) 明暗条件 (L/D) および暗明条件 (D/L) での条件変更

各群の明暗条件および暗明条件に変更した際の Double Plotting Actogram の例を図 10-12 に示す。なお、各群とも代表的な 2 例を示している。

3 群全てにおいて、新たな明暗周期への再同調が示されており、とくに bv 寡動群において照明条件変更後、急激な再同調が起こった例がみとめられた。

2. 明暗条件下における明期および暗期の比較

1) 明期及び暗期での行動量総量

明暗条件での明期および暗期 12 時間毎の行動量総量を比較したところ、対照群と bv 多動群で明期に比較して暗期で有意に行動量が多くなっていた (図 13)。一方、bv 寡動群では明、暗期間の行動量の差が小さかった。

2) 明期及び暗期での休息時間の比較

明暗条件下での明期および暗期 12 時間毎の休息時間を比較した。その結果、対照群および bv 多動群においては、活動期である暗期では休息時間がそれぞれ 3.8 時間 (31.7%)、2.3 時間 (19.0%) と低かったが、休息期である明期では 8.7 時間 (72.4%)、8.6 時間 (72.0%) とともに高くなり、休息時間における明期と暗期での明らかな違いが認められた (図 14)。一方 bv 寡動群においては、休息期である明期では 10.3 時間 (85.6%) と休息時間が極めて高くなったことに加えて、活動期である暗期について

も休息時間が 8.2 時間 (68.2%) となり、一日を通して休息状態を示す割合が高いことが確認された。

各群の休息時間における日内変動パターンをみるため、1 時間毎の休息時間について検討した。その結果、対照群では、明期開始 3 時間後より休息時間の割合が高く、明期終了 2 時間前より次第にその割合が減少した。暗期開始後 6 時間は休息期の割合が極めて小さく、その後徐々にその割合が上昇した (図 15)。

bv 多動群においては、明期はほぼ対照群と同様のパターンを示した。暗期に入ると同様に休息期の割合が極めて小さくなり、それが暗期終了時まで持続した。一方 bv 寡動群については、明期開始直後より休息時間の割合が極めて高く、明期終了 2 時間前より次第にその割合が減少した。暗期開始直後は休息時間が約 50% まで減少したが、他の 2 群に比較するとその割合は高く、その後は休息時間の割合が高い状態を保っていた。

3) 明期及び暗期における 1 分あたりの行動量最大値の比較

明暗条件での明期および暗期における 1 分あたりの行動量最大値を比較した (図 16)。

bv 多動群では明期、暗期ともに他群に比べ行動量最大値が大きかった。一方、対照群および bv 寡動群では、行動量最大値に差は認められなかった。また各群における明期および暗期についても、差は認められなかった。

行動量最大値の日内変動を 1 時間毎の値で検討したところ、対照群では、明期開始後次第に減少した。また暗期開始 3 時間前か

ら次第に増加し、暗期開始後は高値を維持していた (図 17)。

bv 多動群においては、日内変動については対照群と同様のパターンを示していた。活動期である暗期は対照群の約 2.4 倍の行動量最大値を示していた。一方明期では減少割合が大きく、明期開始 3 時間で行動量最大値が減少し、対照群と差が認められなくなった。

一方 bv 寡動群については、暗期開始 3 時間前からの増加については他の 2 群と同様のパターンを示したが、明期開始時には行動量最大値がすぐに減少するパターンを示した。

3. 各照明条件下におけるフリーラン周期

1) 恒明条件 (L/L)

恒明条件下におけるフリーラン周期を図 18 に示す。

全ての群において、サーカディアンリズムにおけるフリーラン周期の延長が認められた (bv 多動群: $\tau=25.4\pm 0.51$ 時間、bv 寡動群: $\tau=25.1\pm 0.14$ 時間、対照群: $\tau=25.1\pm 0.08$ 時間)。各群間で比較したところ、bv 多動群で長い傾向が見られたが、有意な差とはいえなかった。

2) 恒暗条件 (D/D)

恒暗条件下におけるフリーラン周期を図 19 に示す。

ほぼ全例でサーカディアンリズムのフリーラン周期の短縮が認められた。各群間を比較したところ、とくに bv 寡動群のフリーラン周期 ($\tau=23.6\pm 0.11$ 時間)、他の 2 群に比べ有意に短縮していた。bv 多動群の平均周期 ($\tau=23.8\pm 0.01$ 時間) は対照群 ($\tau=23.9\pm 0.11$ 時間) とほぼ同じであったが、

bv 多動群において、恒暗条件 30 日目を過ぎた頃のフリーラン周期の急激な短縮が確認された例が存在していた。

3. 明暗および暗明条件間の変化に対するリズム再同調について

明暗および暗明条件間での照明条件変化に対するサーカディアンリズムの再同調に要した日数を図 20 に示す。

明暗条件から暗明条件へと照明条件を変更すると、全ての例で新たな周期へのサーカディアンリズムの再同調が認められた。再同調に要した日数は対照群に比べ bv で短い傾向が示された。とくに bv 寡動群では有意に短くなっており、照明条件変更後、急激な再同調が起こった例が確認された。また、暗明条件から明暗条件への条件変更についても同様の結果が得られ、対照群に比べ bv 多動群、寡動群ともに再同調に要した日数は有意に短かった。また明暗条件から暗明条件、および暗明条件から明暗条件へ照明条件を変化させた場合に、マウス各群において再同調に要する時間に差は認められなかった。

D. 考察

哺乳動物の体内時計が示す約 24 時間の周期形成には Period 遺伝子 (Per1, Per2, Per3) およびその産生物が主に関与している。サーカディアンリズムの光同調に関し、視神経から視交叉上核への神経伝達路の主な神経伝達物質はグルタミン酸である。光同調では、グルタミン酸受容体のうち N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) の活性が関与しており、それに伴い Per 遺伝子の誘導が励起されている。反対に非光刺激は

昼間に作用し体内時計のリセットを行うが、それにはセロトニン神経系やメラトニン、GABA といった作動物質が関与している。とくにセロトニン受容体である 5-HT7 は視交叉上核における発現が確認されており、5-HT1/5-HT7 アゴニストを投与することにより Per1、Per2 遺伝子の発現を低下している。またセロトニンの放出が増大することにより、光刺激による行動の位相変化を抑制する。

今回の研究で、Bronx-waltzer マウスにおけるサーカディアンリズムに関し、様々な照明条件下の自発性運動の変化を長期間詳細に検討したところ以下の点が明らかとなった。つまり、明暗条件下ではサーカディアンリズムパターンについては差が認められなかったものの、行動量や休息時間のパターンなどにおいて違いが bv 群で存在することが判明した。また他の照明条件では、対照群との間でサーカディアンリズムパターンに違いが認められた。恒明条件下でのリズム消失は、bv 寡動群における行動量、つまりリズム振幅が小さいためにもたらされた可能性が考えられる。また恒暗条件下でのフリーラン周期が bv 寡動群で短縮しており、さらには bv 多動群でも一定期間後の短縮傾向が認められていることから、bv 群のサーカディアンリズムにおけるネガティブフィードバック機構、とくにセロトニン神経系の障害が存在する可能性が考えられた。照明条件の変更つまり明暗→暗明および暗明→明暗によつての再同調は、bv 寡動群で有意に早かった。これは対照群と bv 群との間で位相反応曲線の振幅に違いがあり、bv 寡動群でとくに高くなっていることを示していると考えられる。

自閉症の症例の中には、夜間入眠時間および朝の覚醒時間が遅く不規則であり、断眠、再入眠困難、昼間睡眠時間が長いといった、睡眠・覚醒リズム障害が存在している、自閉症の中枢神経病態とモノアミン神経系の障害との関連性を示唆する報告もあり、セロトニン神経系の障害を示す症例が実際存在していることも事実である。

以上の検討により、bv 群、とくに寡動群においてはサーカディアンリズムパターンに健常群との違いがあることがわかった。bv におけるサーカディアンリズム形成、とくにセロトニン神経系における機序についてさらに検討を行うことにより、自閉症にてみとめられる睡眠障害のモデルとして追求する可能性があるとも考えられ、今後一層発展させる必要があると思われる。

E. 結論

遺伝性難聴マウスである Bronx waltzer mouse (bv) のサーカディアンリズム障害の有無について検討を行った。

明暗条件下の行動量最大値と休息時間の日内変動リズムでは、bv 寡動群において明期と暗期の差が乏しかった。明明条件では全群にサーカディアンリズムのフリーラン ($\tau > 24h$) が認められた。bv 寡動群では活動期と休息期の境界が不明確で、記録途中でサーカディアンリズムが消失した例が存在した。暗暗条件下ではほぼ全例でリズムが短縮するフリーラン ($\tau < 24h$) があり、とくに bv 寡動群で有意に短縮していた。L/D および D/L 条件間での変化に対しては、全ての群に新たな明暗周期への再同調がみられたが、再同調に要した日数は bv 群で短く、とくに bv 寡動群でその傾向が顕著な特

徴がみられた。

これらの結果より、bv マウス、とくに bv 寡動群において健常とは異なったサーカディアンリズムパターンがあり、環境条件に影響を受けやすい特徴がわかった。サーカディアンリズムにおけるネガティブフィードバック機構、とくにセロトニン神経系の機能障害が考えられ、自閉症に認められる睡眠障害のモデルを一部反映している可能性が考えられた。

F. 研究発表

論文発表

小林奈麻子, 稲垣真澄. Bronx waltzer mouse の多動性回転行動に対する D1 アゴニスト投与の影響. 日本神経精神薬理学雑誌 24: 354, 2004.

学会発表

山口奈緒子, 稲垣真澄, 小林奈麻子, 小穴信吾, 加我牧子. 難聴モデル動物 (Bronx Waltzer mouse) の認知機能に関する行動学的解析. 第46回日本小児神経学会(東京) 平成16年7月15~17日

小林奈麻子, 稲垣真澄. Bronx waltzer mouse の多動性回転行動に対する D1 アゴニスト投与の影響 第34回日本神経精神薬理学会(東京) 平成16年7月22日

G. 知的財産権の出願・登録状況

- | | |
|-----------|----|
| 1. 特許取得 | なし |
| 2. 実用新案登録 | なし |
| 3. その他 | なし |

研究協力者：小林奈麻子, 加我牧子 国立精神・神経センター精神保健研究所

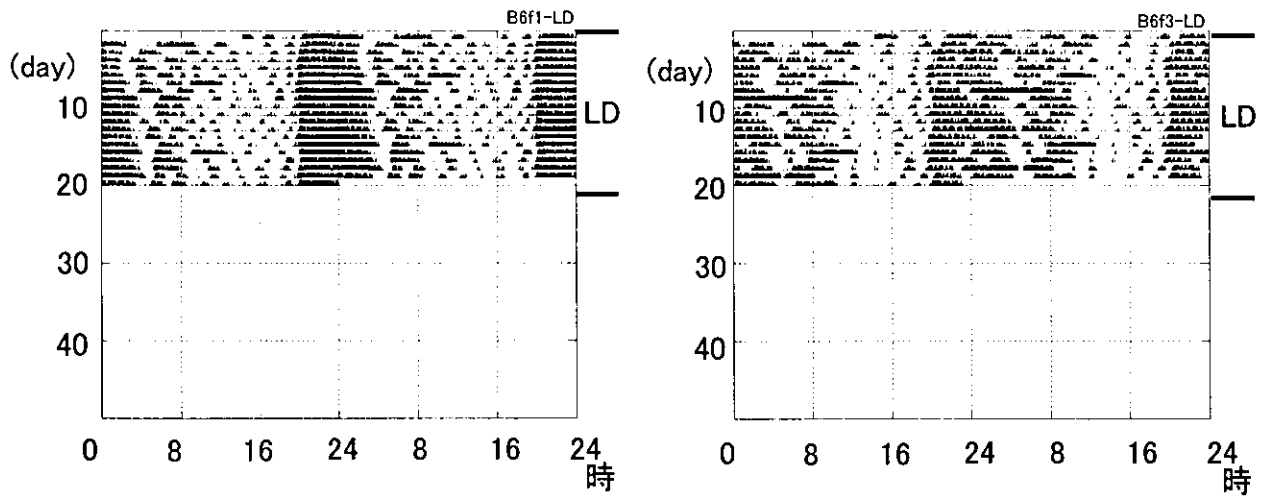


図1 対照群における明暗条件下でのサーカディアンリズム

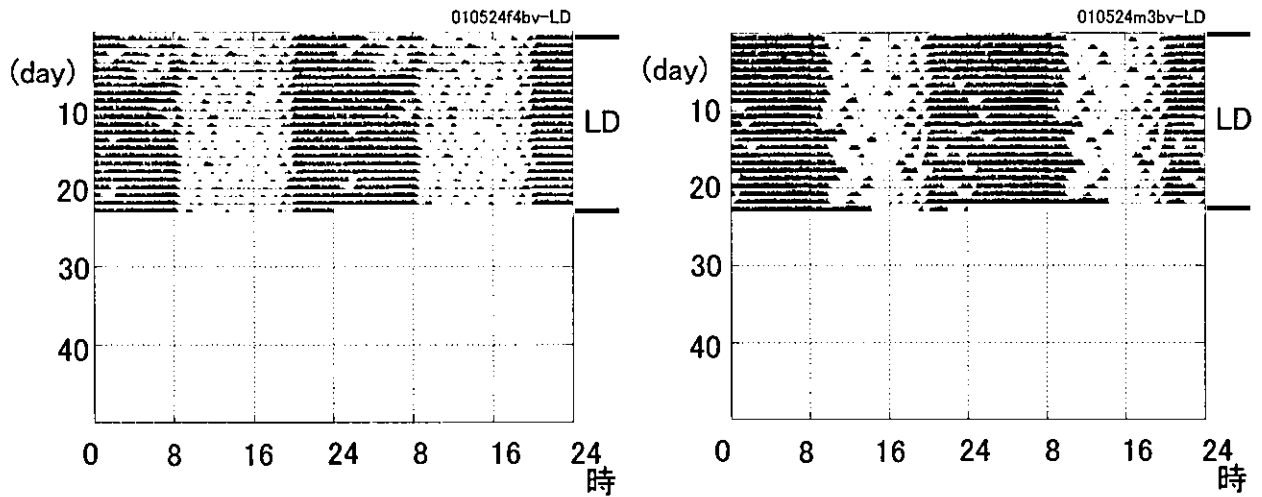


図2 bv多動群における明暗条件下でのサーカディアンリズム

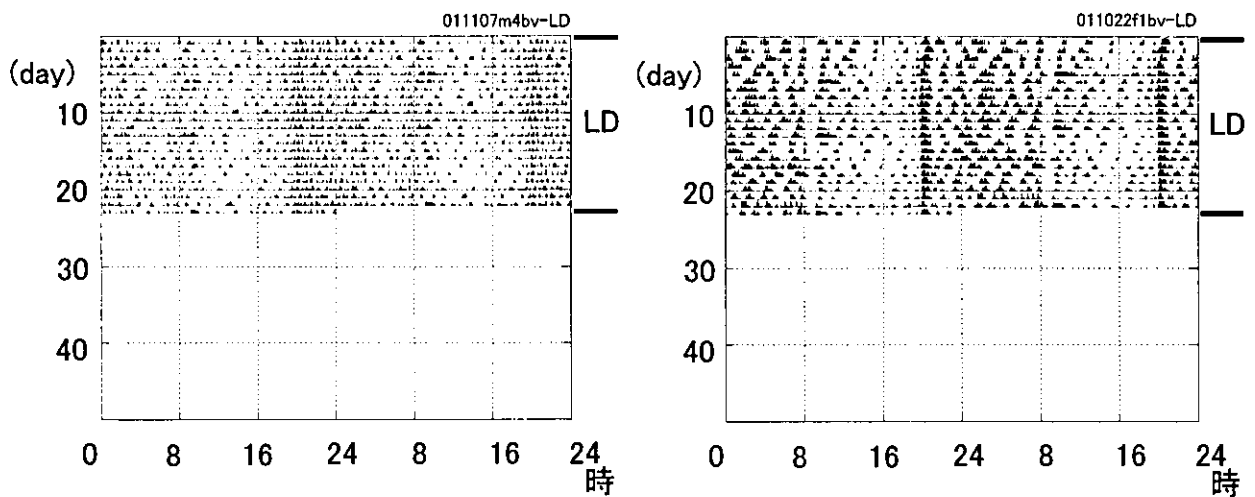


図3 bv寡動群における明暗条件下でのサーカディアンリズム

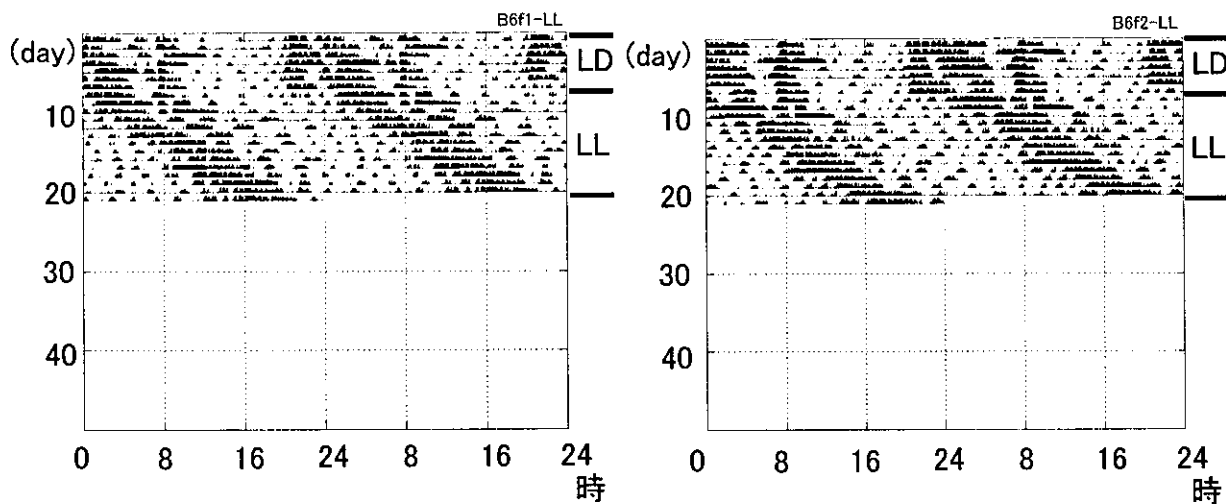


図4 対照群における恒明条件下でのサーカディアンリズム

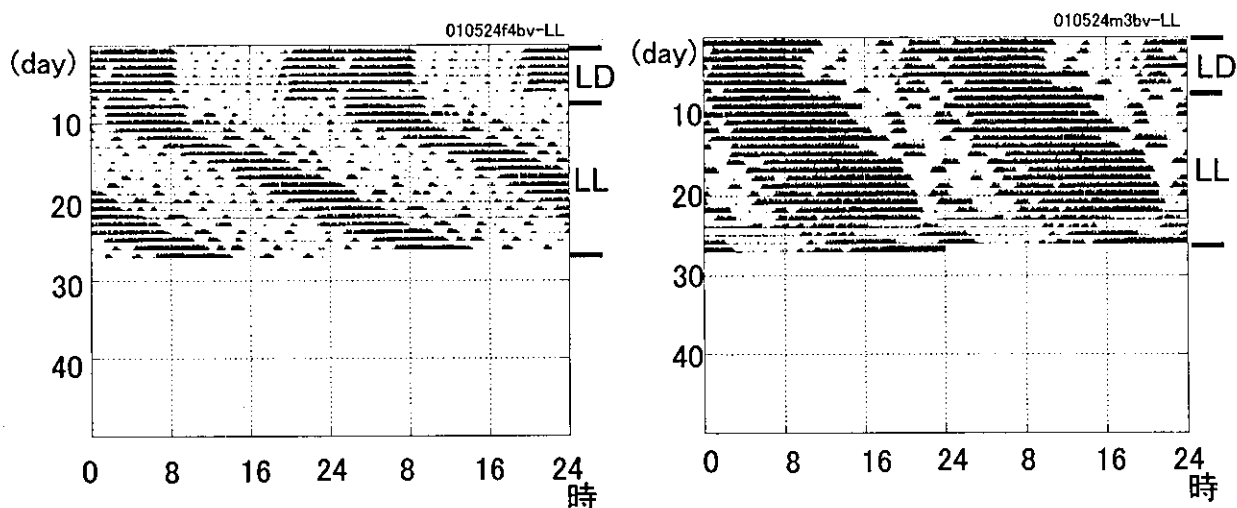


図5 bv多動群における恒明条件下でのサーカディアンリズム

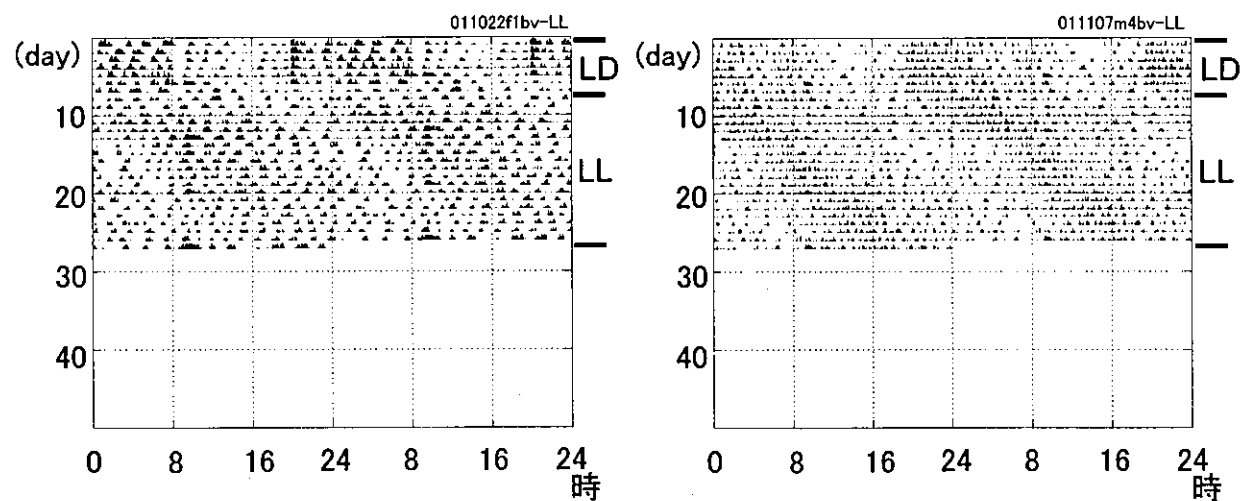


図6 bv寡動群における恒明条件下でのサーカディアンリズム

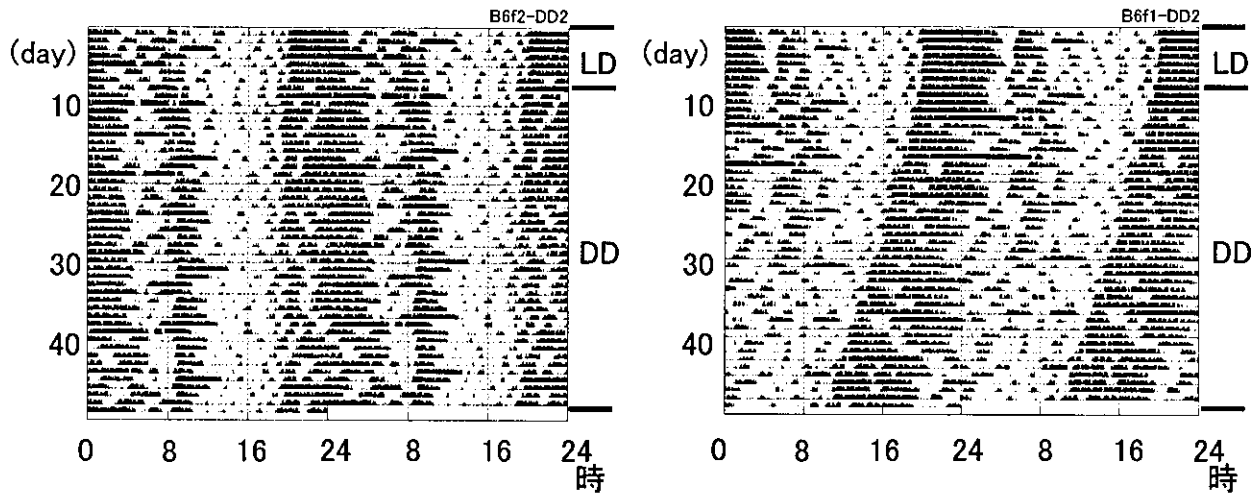


図7 対照群における恒暗条件下でのサーカディアンリズム

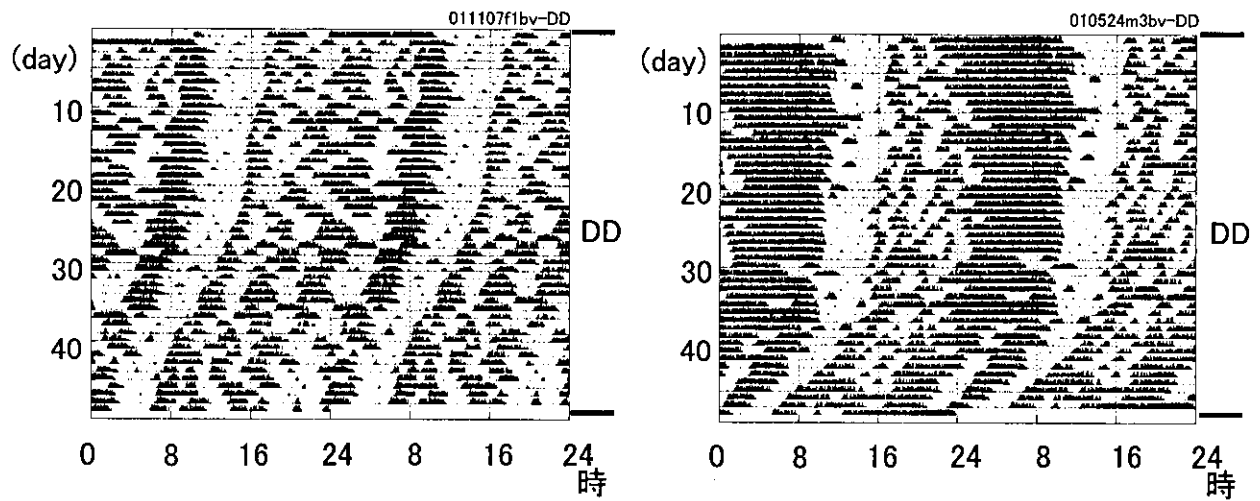


図8 bv多動群における恒暗条件下でのサーカディアンリズム

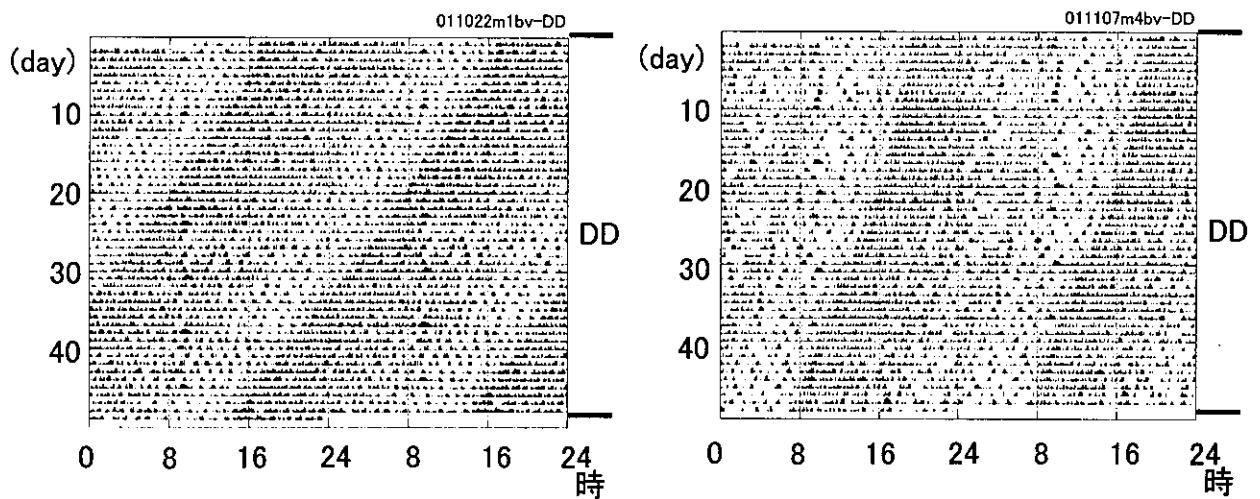


図9 bv寡動群における恒明条件下でのサーカディアンリズム

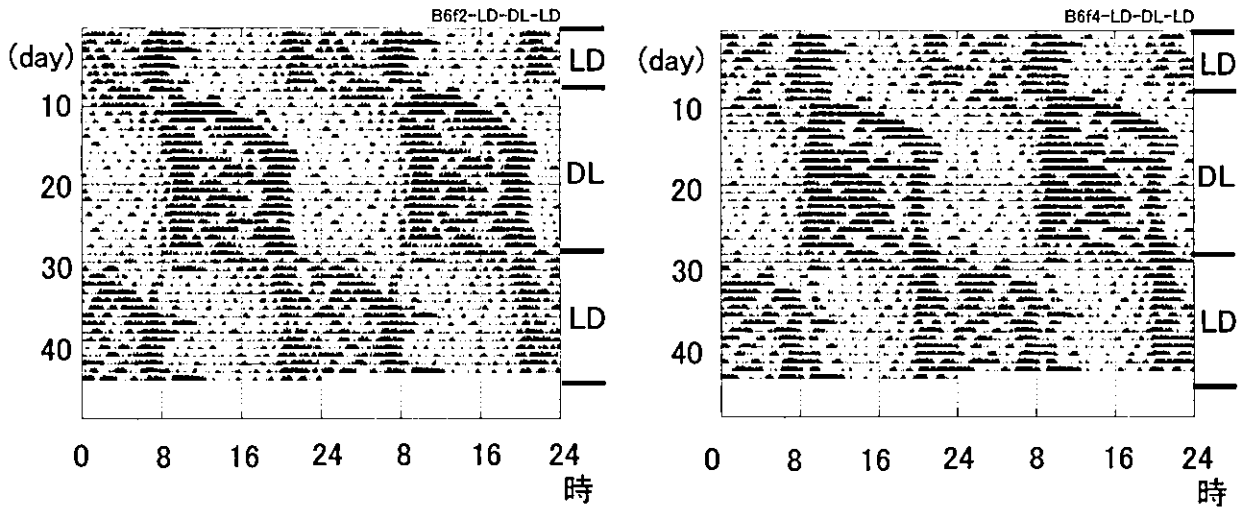


図10 対照群における暗明条件下でのサーカディアンリズム

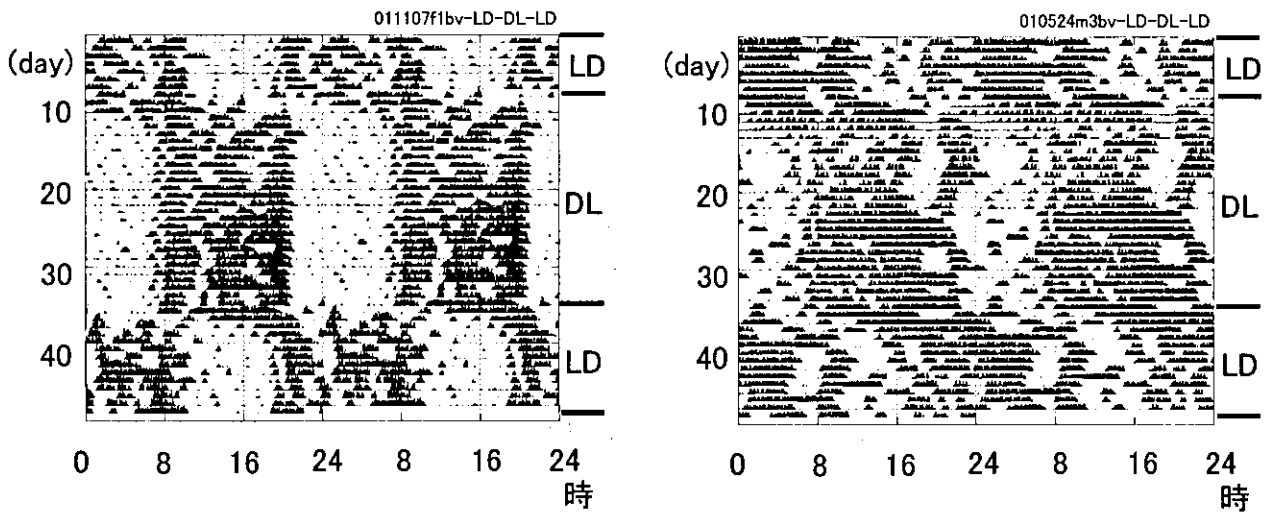


図11 bv多動群における暗明条件下でのサーカディアンリズム

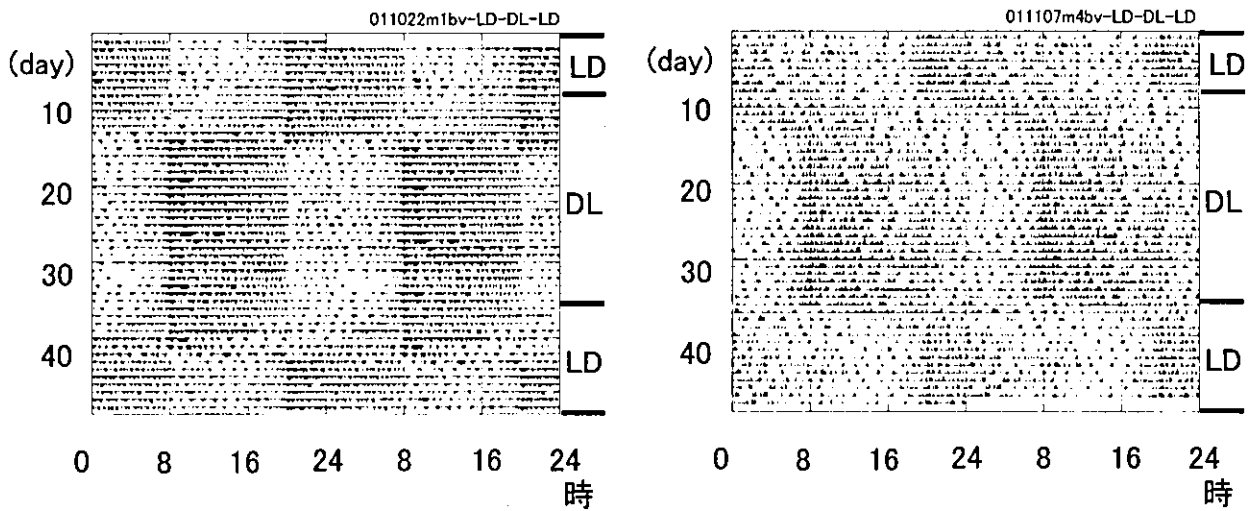


図12 bv寡動群における暗明条件下でのサーカディアンリズム

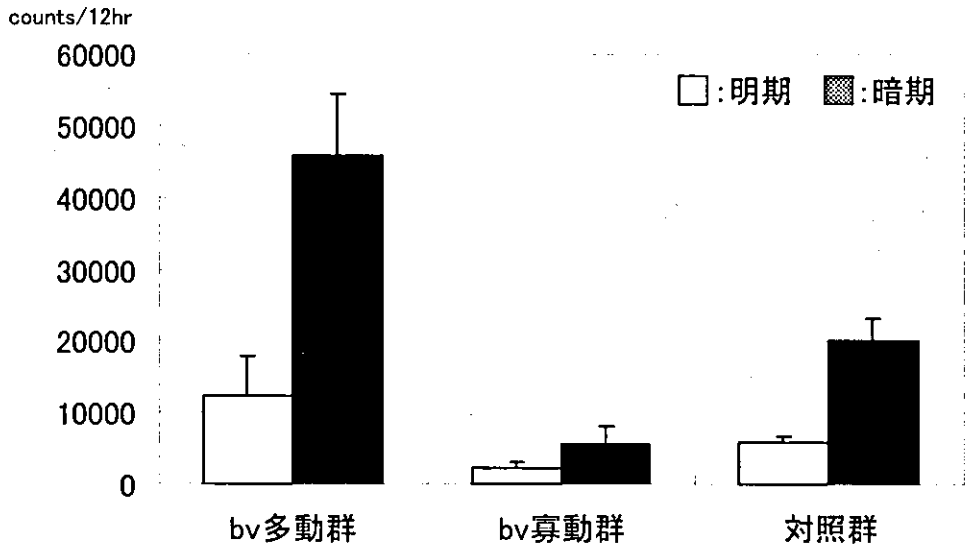


図13 各群の行動量における明期及び暗期の比較

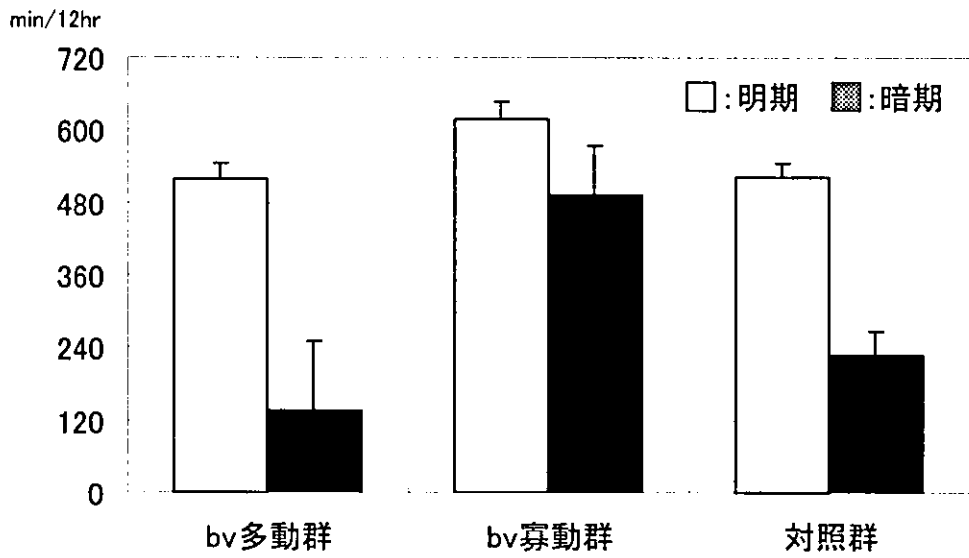


図14 各群における明期及び暗期での休息時間の比較

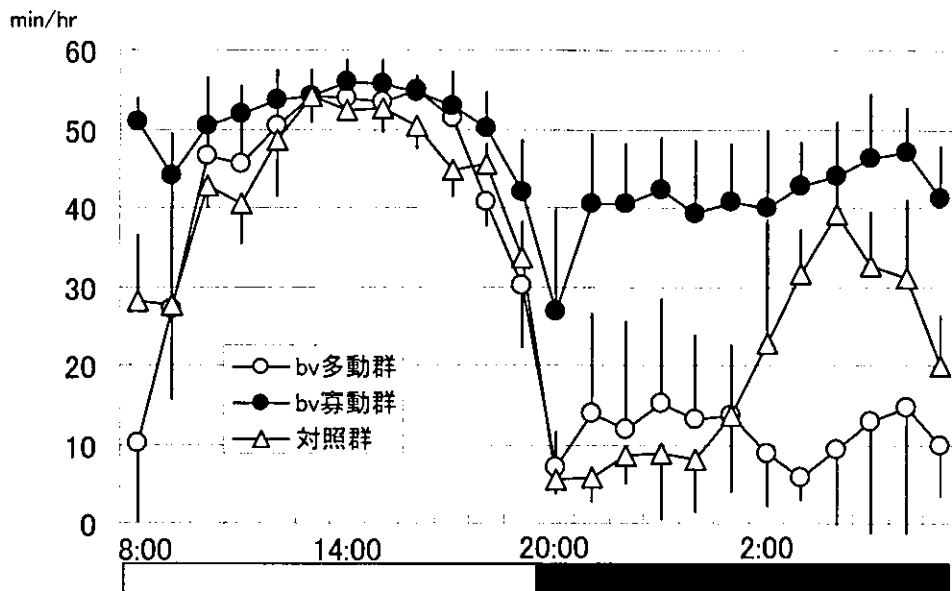


図15 各群における休息時間の日内変動