

図2 顔面神経の移動経路(上、矢印)と神経核(下、\*)の面積

の細胞体群の面積が増大すれば、顔面神経核の面積が減少する」という負の相関がみられた ( $R=-0.74$ ; 図3、C)。

以上の結果をまとめると、VPA群においても、対照群と同様な顔面神経核の移動パターンが見られるが、細胞移動が阻害されていることが明らかとなった。

#### D. 考察

以上の結果をまとめると、VPA群においても、対照群と同様な顔面神経核の移動パターンが見られるが、顔面神経核の面積が減少していることが明らかとなっ

た。顔面神経核の面積は約30%減少した。顔面神経核が球状であると仮定すると、体積は面積の $3/2$ 乗になるので、顔面神経核の体積の減少率は約40%となり、VPA曝露の顔面神経核の縮小に対する影響は見かけよりも大きいと考えられる。

顔面神経核が縮小した理由について、以下の3つの可能性が挙げられる。まず、移動経路上の顔面神経細胞群の面積が増加し、顔面神経核の面積が減少していることから、尾側への細胞移動の異常が顔面神経核の縮小に関与している可能性がある。細胞移動の異常の一つに、顔面神経細胞と移動経路上の基質との相互作用が减弱し、細胞移動が不完全で顔面神経細胞が顔面神経核に到達しない可能性がある。今後、後脳領域における細胞接着分子の発現量を網羅的に解析すれば、分子レベルでの解明につながる。

VPAがヒストンの脱アセチル化を阻害し、細胞分裂に関与するという報告を考慮すると、発生する顔面神経細胞数が減少した可能性がある。今後、顔面神経核の細胞数を計測する必要もある。しかし、発生する細胞数が減少すれば、移動経路

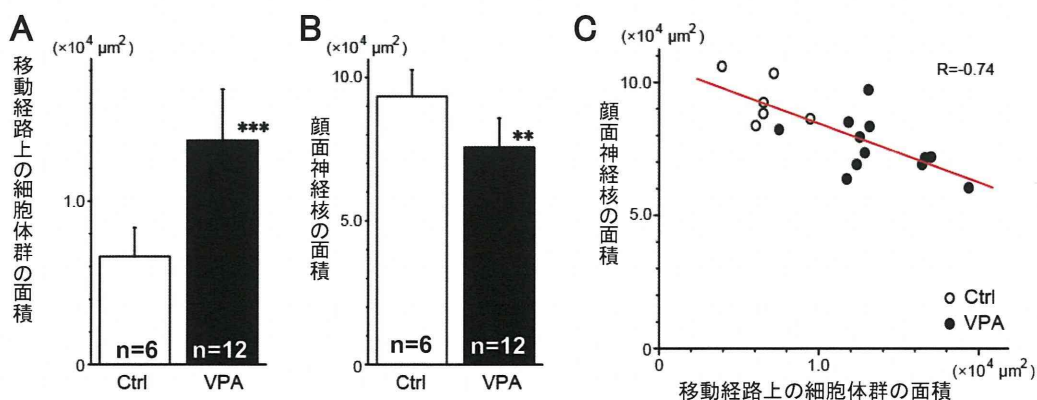


図3 薬剤ばく露動物における顔面神経の移動経路上の細胞体群の面積の増大と顔面神経核の大きさの減少

上の顔面神経細胞数も比例して減少し、経路上のシグナル面積は減少すると予測されるが、本研究では増加しているため、この可能性は低いと考えられる。

VPA の投与時期は E9.5 で神経系の発生初期であることから、ロンボメアの形成に影響を与えた結果、顔面神経細胞の分化とその周囲の環境が変化した可能性がある。各ロンボメアの独自性を決め、ロンボメアに由来する構造を特徴付ける HOX 遺伝子の発現パターンが菱脳の頭尾方向の位置価を与えている。実際、VPA ばく露により HOXa1 の発現が変化するという報告も存在ことから、VPA が HOX 遺伝子群に作用し、ロンボメアの形成異常を引き起こした結果、顔面神経核の形態が異常となった可能性がある。今回は顔面神経に焦点を当てたが、今後は r2 に存在する三叉神経などの形態異常を観察することによって、顔面神経核の形態異常の原因がロンボメアの広範囲な環境変化に付随するものかを理解するための手掛かりになる。

今回の報告で認められた VPA の胎内ばく露による顔面神経核の縮小により、生後の生理機能にどの程度影響するかは不明である。顔面神経が支配する眼輪筋が担う閉眼運動を指標に、モデル動物の単位時間当たりの瞬きの回数を計測することで評価できると考えられる。

#### E. 結論

ラット E9.5 胎仔へのバルプロ酸ばく露は顔面神経の後方への細胞移動を阻害し、顔面神経核の大きさを有意に縮小させる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 論文発表

- (1) Ohkawara T, Oyabu A, Ida-Eto M, Tashiro Y, Tano K, Nasu F, Narita N, Narita M. Secretogranin II and its derivative peptide, manserin, are differentially localized in Purkinje cells and unipolar brush cells in the rat cerebellum. *Int J Pept Res Ther.* *in press*
- (2) Narita N, Saotome A, Higuchi H, Narita M, Tazoe M, Sakatani K. Impaired prefrontal cortical response by swithing stimuli in autism spectrum disorders *Pediatr Neurol.* *in press*
- (3) Narita N, Tazoe M, Narita M. Obsessive Eating In: The Handbook of Behavior, Diet and Nutrition. Springer, editor, Victor R. Preedy, *in press*
- (4) Ida-Eto M, Oyabu A, Ohkawara T, Tashiro Y, Narita N, Narita M. Existence of manserin, a secretogranin II-derived neuropeptide, in the rat inner ear; relevance to modulation of auditory and vestibular system. *J. Histochem Cytochem.* 60(1), 69-75, 2012
- (5) Ida-Eto M, Oyabu A, Ohkawara T, Tashiro Y, Narita N, Narita M. Embryonic exposure to thimerosal, an organomercury compound, causes abnormal early development of serotonergic neurons. *Neurosci Lett.* 505, 61-64, 2011
- (6) Narita N, Tazoe M, Narita M. Hyperkalemia and hyperdopaminemia along with psychological modification induced by an obsessive eating of banana in an anorexia nervosa adolescent. In: Bananas; Nutrition, Diseases and Trade Issues

- (Editor: Alisha E.Cohen) Nova Science Publishers, 289-304, 2011.
- (7) Tashiro Y, Oyabu A, Imura Y, Uchida A, Narita N, Narita M. Morphological abnormalities of embryonic cranial nerves after in utero exposure to valproic acid: implications for the pathogenesis of autism with multiple developmental anomalies. *Int J Dev Neurosci.* 29(4); 359-364:2011.
- (8) 成田正明 自閉症の動物モデル-胎生期の化学物質ばく露による情動・認知行動への影響解明のための動物モデル *認知神経科学* 1(1), 54-58, 2011
- (9) 成田奈緒子、原田ゆかり、樋口大樹、田副真美、成田正明 じゃれつき遊びによる前頭 抑制機能の変化 *文教大学教育学部紀要* 45; 81-89: 2011
- (10) 成田正明、江藤 (伊田) みちる、成田奈緒子  
胎児にとって大事なことー胎児の成長と化学物質、それと放射線も *食べ物文化* 2011年9月号 6-11
- 学会発表
- (1) 松川岳久、横山和仁、鷹屋光俊、黒澤美智子、宇野洋太、内山登紀夫、成田奈緒子、成田正明：小児の毛髪中微量元素濃度と情動・認知行動への影響 第 82 回日本衛生学会学術総会, 京都, 3/24-26, 2012 (予定)
- (2) 松川岳久、横山和仁、黒澤美智子、宇野洋太、内山登紀夫、成田奈緒子、成田正明：本邦における小児の毛髪中微量元素濃度とその情動・認知行動への影響 第 76 回日本民族衛生学会総会, 福岡, 11/23-24, 2011
- (3) Eto-Ida M, Oyabu A, Ohkawara T, Tashiro Y, Narita N, Narita M. Maternal exposure to thimerosal, an organomercury, affects early serotonergic development in the fetal rat brain. 10th International Meeting for Autism Research (IMFAR) 国際自閉症学会 May 12-14, 2011, SanDiego, USA
- (4) Eto-Ida M, Oyabu A, Ohkawara T, Tashiro Y, Narita N, Narita M : Maternal administration of thimerosal, an organomercury compound, causes abnormal serotonergic neurons in the offspring. Society for Neuroscience meeting, Washington DC, USA, 2011 Nov 12-16,
- (5) Ohkawara T, Oyabu A, Eto-Ida M, Tashiro Y, Narita N, Narita M : The influence of maternal immune activation by injection of poly I:C in the developing serotonergic neuron Society for Neuroscience meeting, Washington DC, USA, 2011 Nov 12-16
- (6) Eto-Ida M, Oyabu A, Ohkawara T, Tashiro Y, Narita N, Narita M : Maternal exposure to thimerosal, an organomercury, affects early serotonergic development in the fetal rat brain. 10<sup>th</sup> International Meeting for Autism Research (IMFAR) 国際自閉症学会, SanDiego, USA, May 12-14, 2011,
- (7) 雄山隆弘、大藪明子、大河原剛、江藤みちる、太城康良、成田正明：バルプロ酸曝露ラット胎仔における顔面神経核の形態発達 第 71 回日本解剖学会 中部支部会 2011年10月15-16日 名古屋
- (8) 江藤みちる、大藪明子、大河原剛、太城康、成田奈緒子、成田正明 胎生期有機水銀ばく露によるセロトニン神経異常 第 14 回環境ホルモン学会研究発表会 2011. 12. 1-2 東京大学山上会館
- (9) 大藪明子、雄山隆弘、氏原健作、江藤みちる、大河原剛、太城康良、成田正明：バルプロ酸を用いた自閉症モデルラットにおけるセロトニン神経系背側縫線核の形態変化 第34回日本神経科学学会 2011年9月14-16日 横浜
- (10) 大河原剛、大藪明子、江藤みちる、太城康良、田野かおり、成田正明：ラット小脳顆粒層に局在する神経ペプチド

マンセリンの小脳での役割考察

第34回日本神経科学会 2011年9月

14-16日 横浜

- (11) 江藤みちる、大藪明子、大河原剛、太城康良、成田正明：セロトニン神経の初期発生の異常は妊娠中の有機水銀ばく露によっても引き起こされる  
第34回日本神経科学会 2011年9月  
14-16日 横浜
- (12) 成田奈緒子、田副真美、成田正明：  
自閉症スペクトラムにおけるタスクスイッチングへの呼応の遅延  
—近赤外線酸素モニターを用いた検討  
第29回日本小児心身医学会学術集会  
2011年9月16-18日、大阪
- (13) 松川岳久、黒澤美智子、横山和仁、篠原光代、宇野洋太、内山登紀夫、柚木泰弘、山城正司、天笠光雄、成田正明：  
環境中の微量元素による小児の情動・認知行動への影響 第81回日本衛生学会学術総会，東京，3/25-28（誌上発表），2011
- (14) 大藪明子、田野かおり、江藤みちる、大河原剛、太城康良、成田正明：胎生期におけるサリドマイド・バルプロ酸ばく露によるセロトニン神経の

形態異常 第116回日本解剖学会学術集会2011（誌上開催）

- (15) 大藪明子、田野かおり、江藤みちる、太城康良、成田正明：ラット小脳における新規神経ペプチドマンセリンの役割 大河原剛、第116回日本解剖学会学術集会2011（誌上開催）
- (16) 江藤みちる、大藪明子、大河原剛、田野かおり、太城康良、成田正明：聴覚系と前庭系に局在する新規神経ペプチドマンセリン 第116回日本解剖学会学術集会2011（誌上開催）

報道発表等

- (1) 公明党化学物質問題対策プロジェクトチーム衆参議員合同会議（政策提言）  
2011年7月1日参議院議員会館
- (2) 妊娠中の有機水銀ばく露の記事  
2011年9月17日中日新聞

#### H. 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

厚生労働科学研究費補助金  
化学物質リスク研究事業 分担研究報告書

平成 23 年度研究課題：「化学物質ばく露モデル動物解析」

その2 胎生期チメロサルバく露によるセロトニン神経の初期発生に関する研究

研究代表者 成田 正明 三重大学大学院医学系研究科 教授  
研究協力者 江藤 みちる 三重大学大学院医学系研究科 助教

**研究要旨**

有機水銀の一種であるチメロサルバは、予防接種の防腐剤として広く一般に使用されているが、人体、特に妊婦の母体を介した胎児に対する悪影響が懸念されている。平成 22 年度の研究において、妊娠ラットを用いて胎生期のチメロサルバく露が胎仔のセロトニン神経初期発生異常を引き起こすことを明らかにし、論文報告した。この胎仔セロトニン神経の異常が一時的か継続的か、また他のモノアミンについても異常が見られるかを調べるため、平成 23 年度は胎生 9 日目のラットにチメロサルバく露を行った後、生後 50 日目に仔の脳を採取し、海馬および線条体のモノアミン量の HPLC 分析を行った。その結果、コントロール群と比較してチメロサルバく露群では海馬セロトニンおよび線条体ドーパミンが増加していた。以上から、胎生期チメロサルバく露はセロトニンだけでなくドーパミンの神経発生異常を引き起こし、その影響は胎生期から生後まで継続していることが示された。

**A.研究目的**

有機水銀は水俣病の原因として有名なメチル水銀に代表される有機化学物質であり、神経障害を引き起こす。メチル水銀やエチル水銀は、血液脳関門を通り抜け、神経毒性を示す。また、胎児期でのばく露は、胎盤を通じて妊婦から容易に胎児へ移行し、胎児性水俣病としてより重篤な神経障害を引き起こす。

有機水銀の一種であるチメロサルバは、

体内に取り込まれるとチオサリチル酸とエチル水銀に分解される。チメロサルバには殺菌作用があることから防腐剤として古くから知られており、現在でもワクチンの開封後細菌汚染防止に広く用いられている。なかでも特に小児における頻回投与による体内への蓄積や、妊娠期における胎児への影響について懸念されている。

チメロサルバの生体に対する影響については生後幼若期のばく露で痛みに対する感

受性の変化、海馬における神経変性、ドーパミン神経系の変化と行動異常についての報告があるが、胎生期ばく露での報告はこれまでされていなかった。我々は平成 22 年度の研究で、胎生期にチメロサルをばく露するとその後の胎仔セロトニン神経の発達に異常が見られることを明らかにし、論文報告した。

平成 23 年度は、この胎生期チメロサルばく露による神経発達異常が、一時的に胎生期のみに見られるのか、あるいは生後にわたって長期的に見られるのかを明らかにすることを目的とした。

## B.研究方法

本研究は三重大学動物実験委員会の承認のもとで行われた。チメロサル/生理食塩水溶液 (1 mgHg/kg、0.1 mgHg/kg、0.01 mgHg/kg) を妊娠 9 日目の Wistar ラット (臍栓確認日を胎齢 0 日とした) の大臀筋に筋肉注射により投与した。コントロールは生理食塩水のみを同様に投与した。そのまま妊娠を継続させ、生まれてきた仔(♂)の海馬および線条体を生後 50 日目で採取し、液体窒素で凍結させた。海馬及び線条体は重量を測定した後、5 倍容の 0.2 M 過塩素酸、100  $\mu$ M EDTA、200 ng イソプロテレノール塩酸塩中でソニケーションし除タンパクを行ってモノアミンを抽出し、SC-5 ODS カラム (エイコム) を用いて HPLC によりモノアミン量を測定した。

## C.研究結果

胎生期チメロサルばく露による生後の

影響を調べるために、1 mg Hg/kg、0.1 mg Hg/kg、0.01 mg Hg/kg の異なる濃度のチメロサルを妊娠 9 日目のラットに投与した。1 mg Hg/kg チメロサルを妊娠ラットに投与したところ、産仔数はコントロールと同程度であったが、生後直後に死んでしまう仔が多く見られた。チメロサル 0.1 mg Hg/kg、0.01 mg Hg/kg 投与では、産仔数や仔の行動についてはコントロールと同様で、一見異常は見られなかった。そこで、生後 50 日の仔の脳組織から海馬および線条体を採取し、HPLC でセロトニン量を測定したところ、チメロサル投与群の海馬セロトニン量は生理食塩水投与群と比較して有意な増加が認められた (結果を表に示す: チメロサル 0.01 mg Hg/kg 投与群,  $275.0 \pm 18.5$  ng/g 海馬重量,  $p < 0.05$  vs. コントロール; チメロサル 0.1 mg Hg/kg 投与群,  $267.6 \pm 5.4$  ng/g 海馬重量,  $p < 0.01$  vs. コントロール; コントロール群,  $220.4 \pm 9.6$  ng/g 海馬重量)。また、線条体のモノアミンについても同様に分析したところ、チメロサル投与群でドーパミン量の増加が見られた (結果を表に示す: チメロサル 0.01 mg Hg/kg 投与群,  $6842 \pm 457$  ng/g 線条体重量,  $p < 0.05$  vs. コントロール; チメロサル 0.1 mg Hg/kg 投与群,  $6781 \pm 974$  ng/g 線条体重量,  $p < 0.01$  vs. コントロール; コントロール群,  $5559 \pm 304$  ng/g 線条体重量)。線条体セロトニンおよび海馬ドーパミンについては変化が見られなかった。

モノアミン	組織	コントロール	チメロサル	
			0.01 mg Hg/kg	0.1 mg Hg/kg
セロトニン	海馬	220.4 ± 9.6	275.0 ± 18.5*	267.6 ± 5.4**
	線条体	185.0 ± 11.3	244.2 ± 30.0	225.1 ± 36.5
ドーパミン	海馬	87.9 ± 14.3	82.3 ± 4.5	97.5 ± 11.2
	線条体	5559 ± 304	6842 ± 457*	6781 ± 974**

表. 胎生期チメロサルばく露ラットのモノアミン量.

単位は ng/g 組織重量。それぞれの値は平均値 ± SEM で示した。

\* $p < 0.05$  vs. コントロール; \*\* $p < 0.01$  vs. コントロール.

#### D. 考察

チメロサルは有機水銀の一種であり、その神経毒性について懸念されていたが、詳細は明らかにされていなかった。平成 22 年度は、妊娠ラットにチメロサルをばく露したのちに胎仔のセロトニン系神経の形態学的解析を行い、胎生期チメロサルばく露がセロトニン神経細胞の増加を引き起こし、セロトニン神経の初期発生に影響を及ぼすことを初めて示した。平成 23 年度は、胎生期に見られたセロトニン神経の異常が生後にまで見られるかどうか、また他のモノアミンについて異常が見られるかについて検討した。

胎生 9 日目にチメロサルばく露を受けた生後 50 日のラット海馬のセロトニン濃度を測定したところ、コントロールと比較して約 1.2 倍のセロトニン量の増加が見られた。このことは、胎生期チメロサルばく露による胎生 15 日縫線核セロトニン神経細胞の増加（平成 22 年度の成果）と矛

盾しない結果であった。さらに他のモノアミンについて分析したところ、線条体ドーパミン量もまたチメロサルばく露群で約 1.2 倍に増加していた。セロトニン神経およびドーパミン神経はいずれも共通の幹細胞である神経上皮細胞が Shh および FGF8 の刺激を受けてそれぞれの前駆細胞から分化・成熟することが知られている。本研究ではセロトニンだけでなくドーパミンの異常も見られたことから、神経上皮細胞や Shh、FGF8 などのセロトニン神経およびドーパミン神経の初期発生に共通した細胞・分子にチメロサルが作用したと考えられる。これを明らかにするために、胎生期におけるドーパミン神経の発生や、Shh、FGF8 などの誘導物質の発現についてより詳細に調べる必要がある。

#### E. 結論

胎生期のラットにチメロサルをばく露することで、生後の海馬セロトニン量およ

び線条体ドーパミン量の増加が見られ、チメロサールの胎生期ばく露の影響は胎生期から生後にわたって続いていることが示された。

#### G.研究発表

「その1」にまとめて記載

#### H.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 |



化学物質の胎内ばく露による情動・認知行動に対する影響の評価方法に関する研究

平成 23 年度研究課題：「DNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析」

研究分担者 田代朋子 青山学院大学・理工学部 教授

#### 研究要旨

本分担研究は、化学物質の胎内ばく露による影響を明らかにし、より客観的な発達障害診断法を開発することを目的とする研究の中で、DNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を基盤に、化学物質の影響を強く受ける脳内部位とタイミングを効率的に検討し、バイオマーカーの発見を目指すものである。本年度は、(1)胎生期サリドマイド(THA)ばく露による自閉症モデルラットを用いた研究をまとめるとともに、(2)新たに見出したマウスの注意欠陥多動性障害(ADHD)様症状と脳内甲状腺ホルモン代謝についての研究を進めた。また、(3)トリブチルスズ(TBT)を用いて、培養神経細胞による毒性評価を試みた。(1)では、大脳皮質と並んでセロトニン濃度の上昇が認められる海馬で、THA 群での発現変化の一因とみられるヒストン脱アセチル化酵素の発現上昇を確認した。また、GABA 作動性神経細胞の成熟過程に対する THA 曝露の影響を検討した。(2)老化促進モデルマウスとして確立された SAMP 系統のうち、加齢による学習・記憶障害を示す P8 系統が若齢期には ADHD 様行動異常を示すこと、その原因として 2 型脱ヨード化酵素の発現低下による脳内活性型甲状腺ホルモンの低下が考えられることを見出した。(3)では初代培養細胞の生存率には影響を与えない濃度でも、突起やシナプスに対する影響は大きいことを示した。さらに、これまでの結果をまとめ、いくつかのマーカー遺伝子候補を特定した。

#### A. 研究目的

複雑な構造と機能を持ち、部位により異なる発達経過を示す脳に対する化学物質の影響を調べるには、効率的かつ高感度な方法の確立が急務である。

化学物質による遺伝子発現の変化を調べることにより、その影響および作用メカニズムを特定するトキシコゲノミクスは、感度の良いリスク評価法として注目されている。多数の遺伝子の発現を網羅的に解析できる DNA マイクロアレイは、この方法の有力な道具であるが、感度、定量性、コスト、膨大なデータの処理などに課題が残り、現状では一般的なリスク評価方法とはなり

得ていない。分担研究者・田代は、シナプスの構造と機能に関与し、発達に伴って大きく発現変化する遺伝子群に焦点を絞ることで、効率よく脳の発達過程をモニターする独自の DNA マイクロアレイ「シナプトアレイ」を作成し、実際に発達期小脳 (Takahashi et al., *J. Neurosci. Res.*, 2005; *J. Neurochem.*, 2008) や培養神経細胞 (Kitamura et al., *J. Neurosci. Res.*, 2007)、海馬切片培養 (Kawaai et al., *J. Neurosci. Res.*, 2010) に応用してその有効性を実証している。

本分担研究ではまず、成田らが確立した「サリドマイド誘発自閉症モデルラット」

および TBT に胎生期ばく露したラットを用いて、発達過程における脳内各部位の遺伝子発現プロファイルを「シナプトアレイ」により解析し、それぞれの化学物質が影響を与える部位とタイミングを明らかにする。次いで遺伝子発現から推察される毒性メカニズムを生化学的、形態学的方法で確認する。今年度はさらに、行動解析から若齢期の ADHD 様症状が見つかった SAMP8 系統のマウスについて、遺伝子発現およびタンパク発現からその原因を探求した。

さらに、最終年度の本年度は、これまでの実験から得られた結果を総合し、異なる毒性メカニズムを反映する遺伝子群を特定して、より効率的な発達期神経毒性評価用マーカー遺伝子候補を提案する。

#### A. 研究方法

サリドマイド誘発自閉症モデルラットの作成：成田らの方法 (Narita et al., *Int. J. Dev. Neurosci.*, 2005) に従い、妊娠 9 日目ラットにサリドマイド (500mg/kg) を単回強制経口投与することで作成した。また、溶媒に用いたアラビアガム水のみを投与し、対照群を作成した。生後 7、14、20、40 日の各時点で、生まれた仔ラット(♂)の頸動脈から PBS を灌流した後、大脳皮質および海馬を採取した。大脳皮質は左右それぞれの前半部を RNA 抽出用とタンパク質抽出用に用い、後半部で HPLC によるセロトニンの定量を行った。

学習・行動解析：老化促進マウス SAM (Senescence accelerated mouse) は老化度評点の急速な加齢依存的増加を指標として確立されたもので、促進老化を示す SAMP 系統と正常老化を示す SAMR 系統の 2 系統に分けられ、老化関連病態により SAMP 系統はさらに 9 つに分類されてい

る。その一つである SAMP8 は加齢に伴い顕著な学習・記憶障害を示し、脳の加齢変化を調べる有効なモデルとして使用されている。本研究では、1~10 カ月齢の SAMP8 と、対照群となる同月齢の SAMR1 (正常老化を示す) でオープンフィールド・テストおよび明暗箱による受動的回避テストを行った。

リアルタイム PCR 解析：各個体、各組織の total RNA から逆転写によって cDNA を作製し、各遺伝子に特異的なプライマーと蛍光インターカレーター Sybr Green I を用いてリアルタイム PCR を行った (ABI 社、StepOne)。Ppia または  $\beta$ -actin を内部標準遺伝子としてデータを標準化した。セロトニンおよび代謝産物の測定：脳組織を過塩素酸抽出し、逆層 HPLC 法により、セロトニン、ドーパミン、および HIAA 含量を測定した。

(倫理面への配慮)

動物実験はすべて青山学院大学理工学部動物実験委員会の承認を得、獣医師の指導のもとに必要最低限の頭数を使用して行った。

#### C. 研究結果

(1) サリドマイド誘発自閉症モデルラット：前年度解析した大脳皮質と同様に、胎生期サリドマイド曝露による生後のセロトニン濃度の上昇が確認されている海馬で、マイクロアレイ法で検出された *fkbp5*、*igfbp3*、*ucp2* を含む 5 種類の MeCP2 標的遺伝子、MeCP2 と複合体を形成して転写抑制に働く *sin3a* と *hdac1*、および *mecp2* 自身の発現プロファイルをリアルタイム PCR 法で解析した。その結果、生後 20 日でのヒストン脱アセチル化酵素 *hdac1* の有意な発現上昇が確認された。また、MeCP2 標的遺伝子のうち、*fkbp5* (FK506 binding

protein 5) については、生後 14 日以降、THA 群で上昇傾向が見られた。

(2) SAMP8 マウスにみられる注意欠陥多動性障害(ADHD) 様症状と脳内甲状腺ホルモン代謝: SAMP8 は、短寿命の上、図 1 に示すように、加齢に伴う顕著な学習・記憶障害を呈し(図 1)、老化モデルとして研究されている。今回、1~10 カ月齢の SAMP8 と対照群である正常老化を示す SAMR1 をオープンフィールド・テストにより比較したところ、若齢期の SAMP8 で

明らかな多動と低不安が認められた(図 2)。

海馬における遺伝子発現をシナプトアレイで解析した結果、*mbp*、*hairless*、*enpp1* など、甲状腺ホルモン依存性遺伝子が 1~8 カ月齢を通して SAMP8 では持続的に発現低下していることが分かった。しかしながら、血中甲状腺ホルモン濃度については、輸送型であるチロキシン(T4)、活性型であるトリヨードサイロニン(T3)のいずれでも SAMP8 と SAMR1 の差はなく、正常範囲であった。

T3 は血液から供給されるだけでなく、T4 の脱ヨード化により脳内でも局所的に産生されることが近年、明らかになってきているため、これを触媒する II 型脱ヨード化酵素 Dio2、および T3 を不活性化する III 型脱ヨード化酵素 Dio3 の発現を各月齢の SAMP8 と SAMR1 で比較した。その結果、図 3 に示すように、SAMP8 では *dio2* の mRNA 発現が SAMR1 に比べて若齢期から持続的に約 40%低下している反面、*dio3*

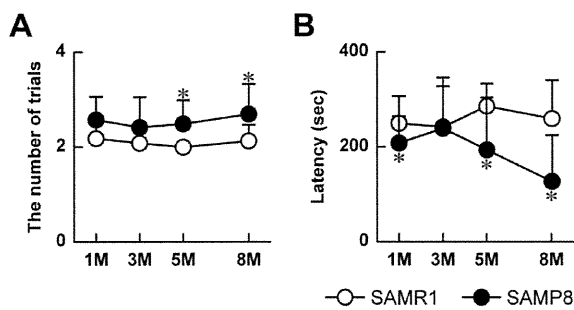


図 1. 受動的回避テストによる学習・記憶能力の評価。A. 第一日目の学習; 暗室に入らなくなるまでの試行回数。B. 第二日目; 暗室に入るまでの時間 (秒)。

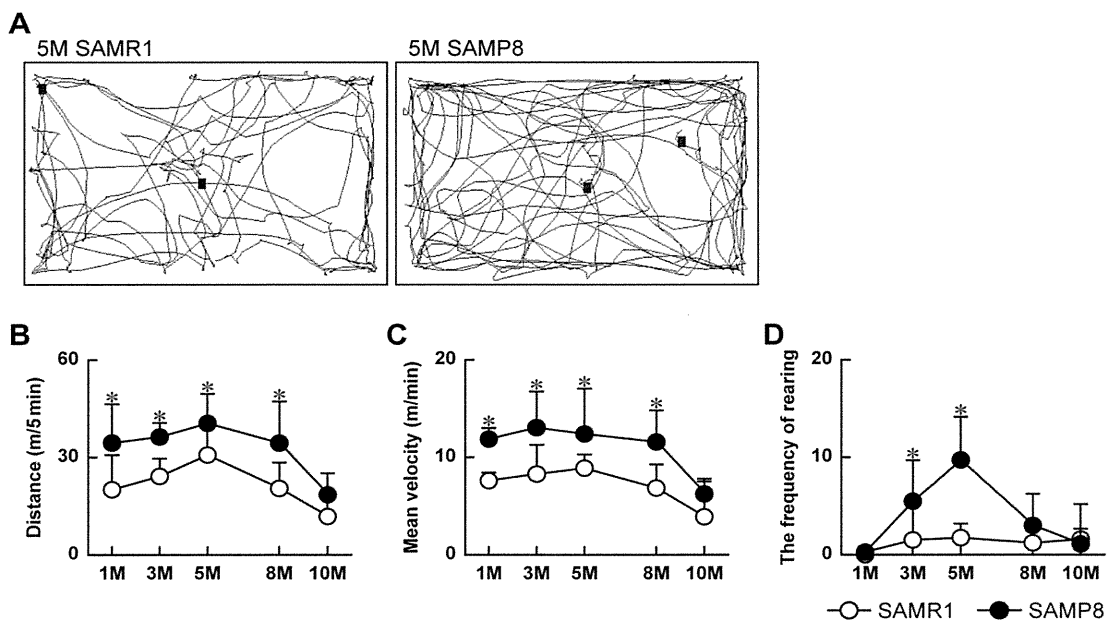


図 2. オープンフィールド・テストによる SAMP8 と SAMR1 の行動比較。A; 30 分間の歩行記録、

B; 30 分間の総移動距離、 C; 平均移動速度、 D; 中央部での立ち上がり回数

の発現は上昇傾向にあることが明らかとなった。Dio2 はタンパク・レベルでも有意に減少が認められた。これらの結果から、若齢期の SAMP8 では、海馬における T3 濃度が局所的に低下していることが示唆された。

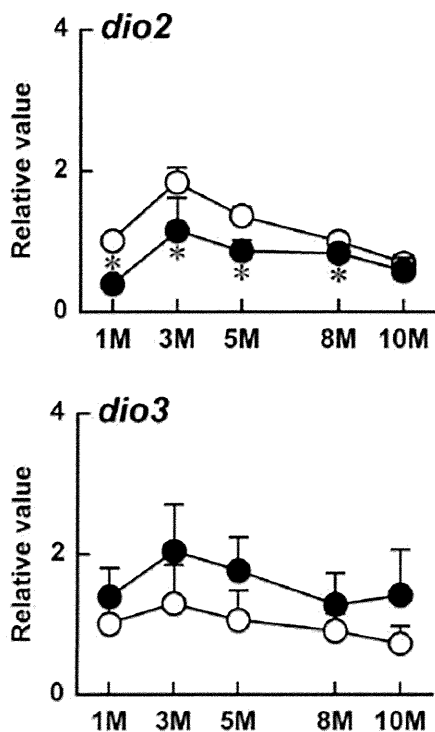


図3. SAMP8 (●)とSAMR1 (○)の海馬におけるdio2、dio3の遺伝子発現比較。

### (3) 培養細胞を用いた評価系：

胎齢 18 日ラット大脳皮質由来の初代培養神経細胞を用いて TBT の影響を評価した。当初 48 時間は血清入り培地で培養した後、無血清培地に交換すると同時に様々な濃度で TBT を添加し、さらに 48 時間培養した。細胞内の還元性を指標に細胞生存を評価する MTT 法および細胞質酵素 LDH の漏出により細胞死を評価する LDH 法のいずれでも、図 4 に示すように TBT 濃度 200nM 以上で細胞死が誘発されることが分かった。さらに、シナプス前終末に局在するシナプシン I (Syn1) および樹状突起

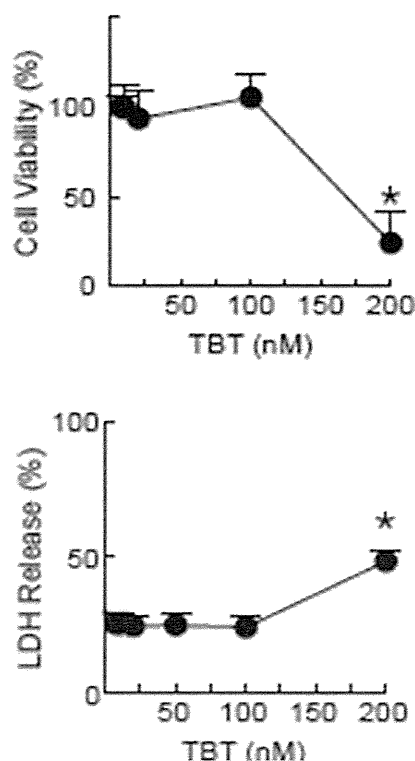


図4. 細胞生存に対するTBTの影響：TBT添加48時間後の細胞生存率と細胞死の評価。

に局在する微小管結合タンパク MAP2 の抗体を用いて、ウェスタンブロット法でそれぞれのタンパク発現量を調べたところ、細胞死を起こさない TBT 濃度 (100 μ M) でも、両者は有意に減少することが確認できた (図 5)。このように、細胞死に至らない低濃度で比較的長期間培養することにより、神経突起やシナプス形成に対する TBT の影響を評価できることが分かった。

## D. 考察

(1) サリドマイド誘発自閉症モデルラット： 成田らの研究により、胎生 9 日目サリドマイド曝露ラット (THA 群) では、成熟後 (P50) の時点で海馬セロトニン濃度が高値を示すこと、縫線核におけるセロトニン神経細胞・細胞体の分布に正常とは異

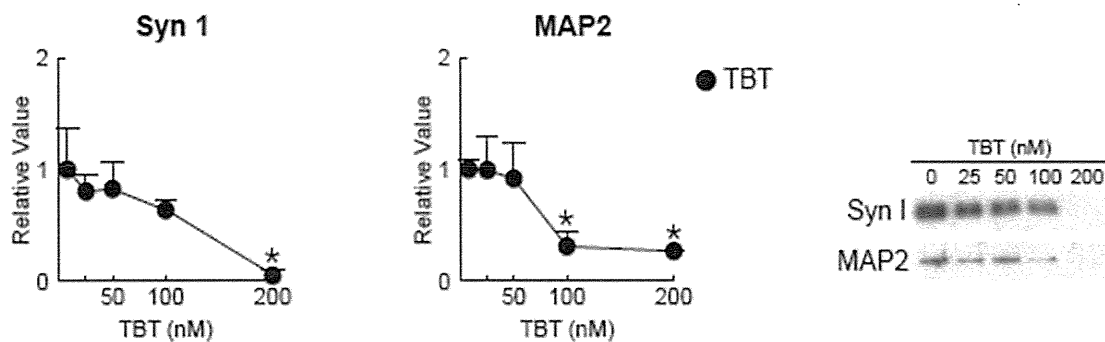


図5. シナプスおよび樹状突起に対する低濃度TBTの影響： 各濃度のTBT添加後、48時間で、抗Syn 1抗体と抗MAP2抗体を用いて両者を定量した。

なる偏りがみられること、からセロトニン神経系の発達異常が示唆されていた (Narita et al., *Pediatr. Res.*, 2002; Miyazaki et al., *Int. J. Dev. Neurosci.*, 2005)。2009年度、2010年度の我々の研究により、セロトニン神経の投射先である大脳皮質において、このモデル動物ではセロトニン受容体の発現プロファイルが正常と異なることをはじめ、独自マイクロアレイを用いた解析により、シナプス形成の時間的ずれや早期からのミエリン形成など、神経発達異常が生じていることを示す結果を得た。2010年度には、大集積アレイの解析結果から MeCP2 によるエピジェネティックな制御の低下がこのような発達異常の要因である可能性が示唆されたため、MeCP2 経路の因子に関して検討を開始した。Rett 症候群の原因遺伝子産物・MeCP2 タンパクにより発現が抑制される標的遺伝子には神経系の発達・成熟に関与するものが多いこと、MeCP2 と同じファミリーに属するメチル化 DNA 結合タンパク・MBD1 が自閉症に関連すること、などから、この経路には関心が高まっている。2011年度は海馬でも検討を進め、生後 20 日の THA 群で、様々な転写因子と協働して転写を抑制するヒストン脱アセチル化酵素

*hdac1* の有意な発現上昇を検出した。この結果は、THA 群と対照群の遺伝子発現の差が生後 20 日でもっとも顕著になるというシナプトアレイ解析の結果とも一致しており、シナプス形成の完了する生後 20 日頃から、セロトニン濃度上昇に伴う THA 群の異常が顕在化する可能性を示している。

大脳皮質と海馬の双方で THA ばく露群での発現上昇がみられた *fkbp5* については、近年その遺伝子多型と PTSD やうつ病との関連が疫学的に示唆されており、評価遺伝子の一つと考えられる。

(2) 若齢期 SAMP8 にみられる ADHD 様症状と脳内甲状腺ホルモン代謝異常：甲状腺ホルモンは周産期の脳の発達に必須のホルモンであり、その欠乏は身体的発育を阻害するだけでなく、重度の知能障害を引き起こすことが古くから知られている。これまでの研究のほとんどは、実験的に甲状腺ホルモン産生を阻害するもので、血中ホルモン濃度が大幅に低下し、身体発育が阻害され、神経細胞の遊走や樹状突起伸展も大きく障害される。これに対して SAMP8 では、血中ホルモン濃度は正常で、身体的発育にもほとんど差はなく(体重差は 10%程度)、神経細胞の層形成異常などは見られない。然しながら、今回の研究で、明らかな

ADHD 様行動異常が認められ、脳内での活性型ホルモン T3 への変換機能が低下していることが判明した。ヒト・早産児を対象とした最近の調査では、母親からの甲状腺ホルモン供給が早産により絶える結果、児の ADHD 発症率が上昇する可能性が指摘されている。また、T4-T3 変換酵素 Dio2 については、感染や炎症による発現低下が報告されており、甲状腺ホルモン系の異常を検出する有力な評価遺伝子と考えられる。(3) 培養細胞を用いた評価系：今後、神経細胞だけでなく、培養アストロサイトについても評価系としての可能性を探索する必要がある。

#### E. 結論

このような一連の研究から、焦点を絞ったカスタム DNA マイクロアレイと市販の大集積アレイとを相互補完的に利用することで、発達期脳における化学物質の時期特異的、部位特異的影響を効率的に調べられることが確認できた。また、多様な化学物質をこのような方法で分類することで、その作用機序と障害に到る過程を解明し、バイオマーカーの探索に結びつけることができると考えられる。

これまでの結果を総合すると、以下の遺伝子が発達期の脳における異常を検出する評価遺伝子の候補として挙げられる。

- ・シナプス、神経突起、ミエリン構造：

*synaptophysin, syn1, homer 1, homer 2, mbp, plp*

- ・甲状腺ホルモン依存性遺伝子：

*dio2, dio3, hairless, enpp2, (mbp), sortilin 1, kcc2*

- ・神経活動依存性遺伝子：

*bdnf, synaptotagmin4, ania4/carp/dclk, ywhaz, ssh11, pak4, limk1, cfl*

F. 健康危険情報  
なし

#### G. 研究発表

学会発表

##### (1) 国際学会

1) Sawano, E., Negishi, T., Tashiro, T.  
“Alterations in local thyroid hormone metabolism and behavior in the senescence-accelerated SAMP8 mice” (23rd Biennial Meeting of the International Society for Neurochemistry, Athens, Aug.-Sept. 2011)

2) Oyanagi, K., Negishi, T., Tashiro, T.  
“Effects of thyroid hormones, T4 and T3, on the survival and neurite outgrowth of cerebellar granule cells in culture” (23rd Biennial Meeting of the International Society for Neurochemistry, Athens, Aug.-Sept. 2011)

##### (2) 国内学会

1) 澤野 恵梨香、菊間 慎平、中森 裕介、根岸 隆之、田代 朋子

「老化促進モデルマウス (SAMP8) における局所的な甲状腺ホルモン代謝の変化と行動異常」(第 26 回 老化促進モデルマウス (SAM) 研究協議会・岐阜市 じゅうろくプラザ、2011 年 7 月)

2) Sawano E., Kikuma S., Nishiki M., Negishi T., Tashiro T.

“Alterations in local thyroid hormone metabolism in the young senescence-accelerated SAMP8 mice: association with delayed myelination and behavioral abnormalities” (第 54 回日本神経化学会、加賀市、2011 年 9 月)

3) Kawaai K., Tominaga-Yoshino K.,  
Urakubo T., Taniguchi N., Kondoh Y.,  
Tashiro H., Ogura A., Tashiro T.  
“Coordinate gene expression changes of  
actin dynamics regulator associated  
with long-lasting synaptic enhancement  
in hippocampal slice cultures after  
repetitive exposures to glutamate” (第  
54 回日本神経化学会、加賀市、2011 年 9  
月)

4) Oyanagi K., Tashiro H., Negishi T.,  
Tashiro T.  
“Inhibitory effect of tributyltin on  
neurite formation and synaptogenesis  
in cultured cortical cells” (第 54 回日本神  
経化学会、加賀市、2011 年 9 月)

5) Matsunaga Y., Nishiki M., Uno T.,  
Negishi T., Tashiro T.  
“Decreased microvessel density and  
altered astrocyte morphology in the

hippocampus of diabetic Goto-Kakizaki  
rats” (第 54 回日本神経化学会、加賀市、  
2011 年 9 月)

6) Mouri M., Okishige A., Negishi T.,  
Tashiro T.  
“Possible involvement of  
MeCP2-dependent regulation of gene  
expression in the autism-like  
developmental disorder induced by fetal  
thalidomide exposure in rats” (第 54 回  
日本神経化学会、加賀市、2011 年 9 月)

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を  
含む）

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

研究課題名：近赤外線酸素モニターを用いた非侵襲的脳機能評価

研究分担者名：成田奈緒子

所属：文教大学教育学部特別支援教育専修教授

## 研究要旨

分担研究者は、化学物質の胎内ばく露による情動・認知行動に対する影響を、近赤外線酸素モニター近赤外線酸素モニター(Near Infrared spectroscopy; NIRS)を用いて評価する方法について検討してきた。

初年度の研究成果からは、①個体の不安レベルにより情動想起の際の前頭葉賦活の laterality が変化する。②この laterality の差異は計算やワーキングメモリなどの前頭葉実行機能に関連する可能性がある。③その本態として不安の高さ、前頭葉機能の先天的障害が示唆されている ASD 児者での前頭葉機能異常は、刺激に呼応する laterality の差に起因する可能性が高いと考えられる。という 3 点が示唆された。また、2 年目は、前頭葉の実行機能の一つであるワーキングメモリ機能を賦活／非賦活する顔表情刺激を用いた課題を交互に出現させ、難易度を上昇させるタスクで、課題のスイッチによる前頭葉血流内 O2Hb 濃度の変化を測定した。その結果、健常者 (n=22) においてタスク遂行率は大きく差異があり、成績上位群・中位群では平均的に左側優位の前頭葉 O2Hb 濃度上昇が認められたのに対し、下位群においては平均的に右側優位で推移しており、課題の難易度が上昇するにつれ O2Hb 濃度の相対値が低下する傾向が認められ、これまでに我々が用いた図形刺激課題よりも難易度が高く、個体による反応の違いが著明であった。

そこで今年度はこれまでの研究成果を基にして、①自閉症者における成績と O2Hb 濃度の相対値変化の対応がみられるかどうか ②図形タスクと顔表情タスクを施行する際の成績の相違の原因を多角的にみるために多チャンネル光トポグラフィーでの検討を行う の二点につき検索を行うこととした。まず、自閉症者 5 名に対し同じ顔表情刺激を用いたタスクスイッチ課題を施行し、その間の NIRS による O2Hb 濃度測定を試みた。その結果、タスク遂行による成績は、健常者と比較して極めて低く、図形刺激を用いたタスクと大きく異なっており、健常者にみられた成績と O2Hb 濃度変化との相関は見られなかった。さらに自閉症患者一名の協力を得られて行った多チャンネル光トポグラフィーを用いた図形刺激と顔表情刺激によるタスクスイッチングによる脳血流内 O2Hb 濃度変化の測定では、図形刺激の際に通常健常者でみられる前頭葉の賦活は著明には観察されなかった一方で、側頭葉の異所性活性化が観察された。顔刺激においてはこの傾向は観察されなかったことより、自閉症者においては、図形を用いた WM タスクを処理する際に、前頭葉ではなく側頭葉を用いて処理する異所性神経ネットワークが存在する可能性が示唆された。



## A. 研究目的

分担研究者・成田奈緒子は小児科専門医として長く発達障害児の診療に従事するだけでなく、発達障害者支援センターや児童相談所の嘱託医として、発達障害支援活動に従事している。

従来、発達障害の診断は、個々の医師の経験のみによるところが多く客観性に乏しかった。そこで分担研究者は今年度までに、非侵襲的脳機能評価法である近赤外線酸素モニターを用い、情動想起による前頭葉脳血流の変化を測定し、健常者では、左優位の前頭葉血流増加が認められたのに対し、自閉症者では右優位の活性化が認められた（文教大学教育学部紀要 2010, 44: 25-23）。この結果をもとにして、さらに様々な表情の写真を用いた顔刺激を使用したスイッチングタスクを作成し、これを施行している時の前頭葉酸素化ヘモグロビン濃度変化を健常者において施行した。その結果、健常者においてはタスクパフォーマンスに応じた前頭葉の賦活が認められた。そこでさらに今年度は自閉症者における同実験を行い、前頭葉機能のタスクによる変化を検討することにした。

## B. 研究方法

対象者は高機能の自閉症者 5 名（IQ>70, 14-46 歳, 2 名女性）と健常者 22 名（19-38 歳, 12 名女性）であった。タスクは、ワーキングメモリが要求される（WM）タスクとワーキングメモリが要求されない（NWM）タスクを交互に提示し、刺激提示数は 1 から順に 6 まで増加した。刺激として顔の表情写真データベース Japanese Female Facial Expression Database（JAFFE; <http://www.kasrl.org/jaffe.html>）の

写真を組み合わせて作成した顔刺激を利用した（Fig 1, 2）。安静時間を前後に挿入した全タスク施行時間中に継続的に近赤外線酸素モニター（NIRO200、浜松ホトニクス、浜松）を用いた前頭葉の酸素化ヘモグロビン濃度測定を行った。また、自閉症者のうち一名については、多チャンネル光トポグラフィー（OMM-2000、島津製作所、京都）を用い図形刺激と顔刺激の両方のタスクを施行して、その際の側頭葉の賦活の違いについても同時に検討した（Fig 3）。測定したデータは、酸素化ヘモグロビン値の推移として表した。さらにタスク遂行率とタスクの内探索活動を行っていた時間（WM、NWM 各 15 秒）の酸素化ヘモグロビン平均値の変化として表し、検討することとした。

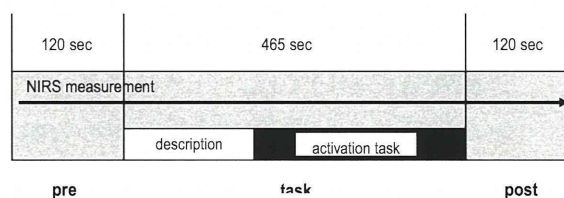


Fig.1 Task Design

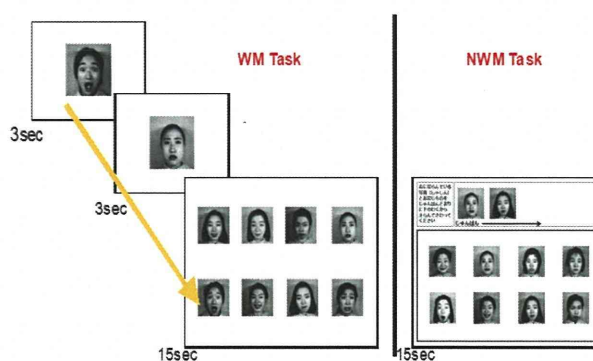


Fig.2 activation task

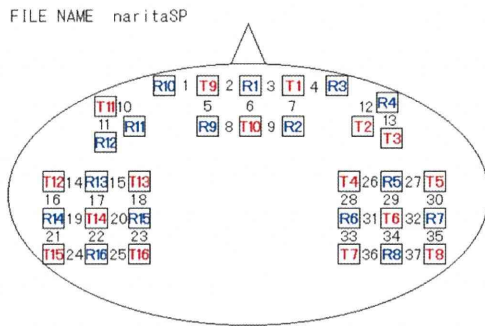


Fig.3 measuring points for OMM-2000

Measurement points were shown in this figure.

T1-16: probes for irradiation

R1-19: probes for receiving light

(倫理面への配慮)

研究対象者に対する人権擁護上の配慮を徹底するため、各研究施設において研究内容を十分に吟味し、文教大学研究倫理委員会の承認を得た。研究対象者には、十分なインフォームドコンセントを行い、文書で同意を得た。

### C. 研究結果

健常者においてはタスクパフォーマンスに応じた前頭葉の賦活が認められた(昨年度報告)が、自閉症者においてはタスクパフォーマンスに呼応する相関は見られなかった(Fig 4)

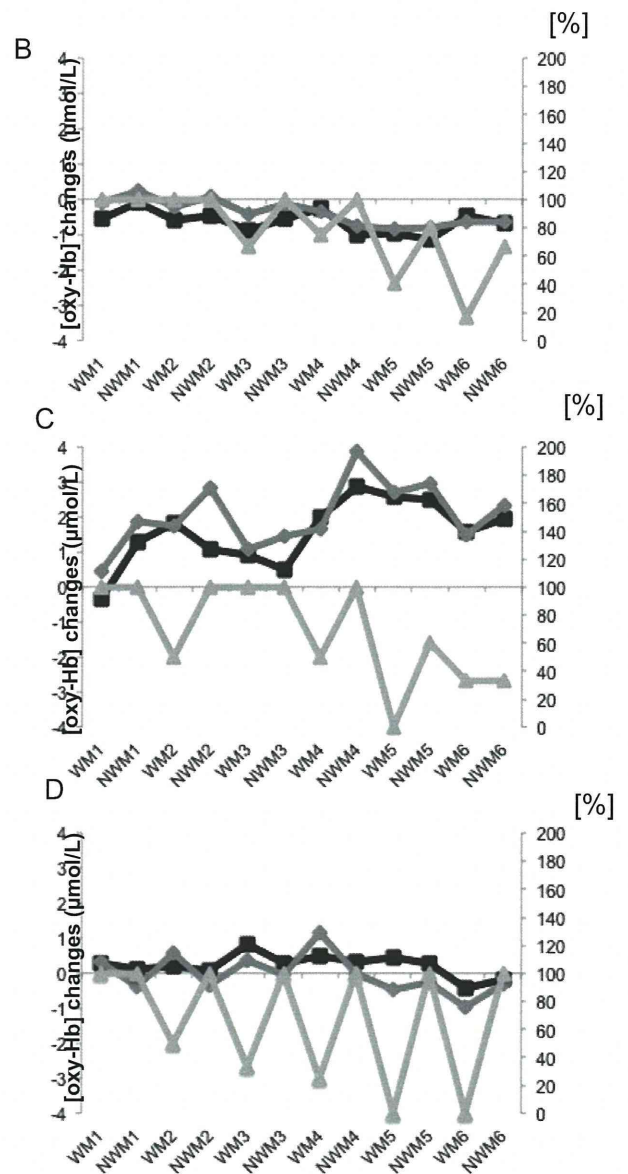
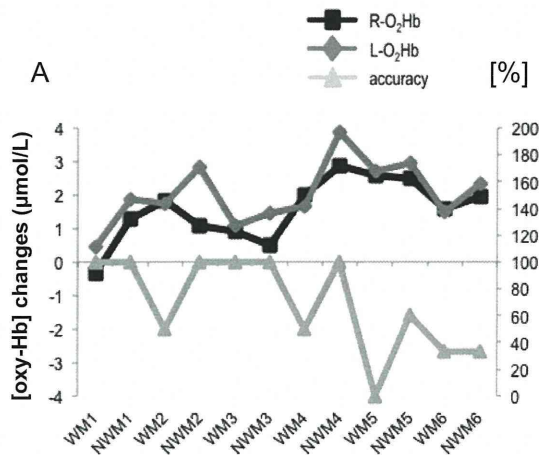


Fig.4 Relative O2Hb changes and accuracy in each ASD patients

These graphs indicate mean O2Hb changes during WM (exploring) and NWM task. The black line is for right O2Hb changes, the gray line is for left [oxy-Hb] changes, and the light gray line is for accuracy.

また、自閉症者のうち一名について、多チャンネル光トポグラフィーを用い図形刺激と顔刺激の両方のタスクを施行して、その際の側頭葉の賦活についても同時に検討したところ(Fig 5)、右紡錘状回に対応していると考えられるチャンネルにおいて、図形を用いた WM タスクでは賦活が認められたのに対し、顔刺激を用いた WM タスクでは賦活が認められなかった。

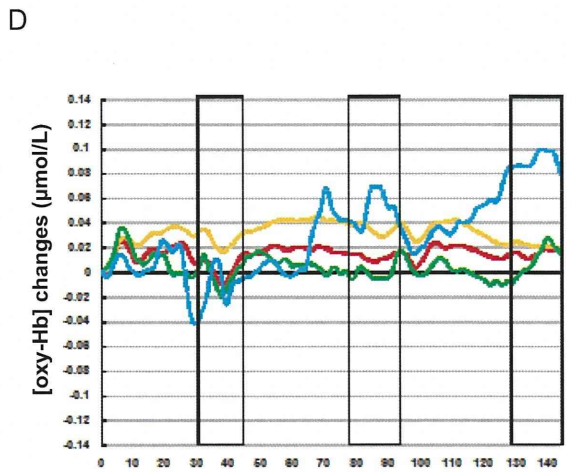
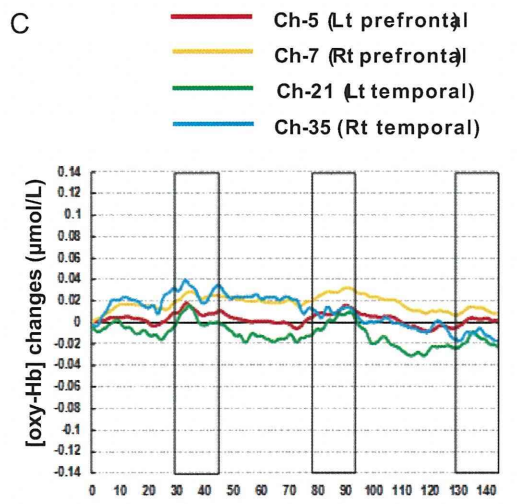
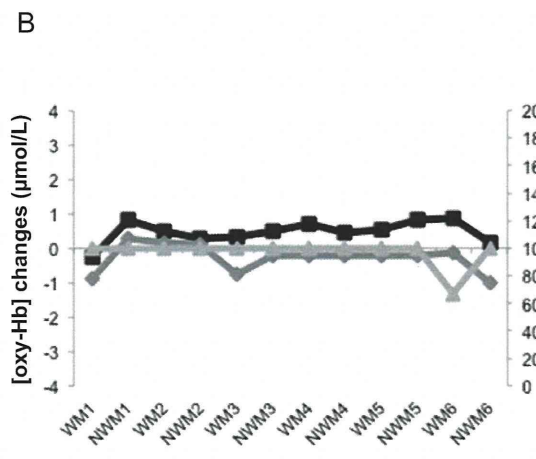
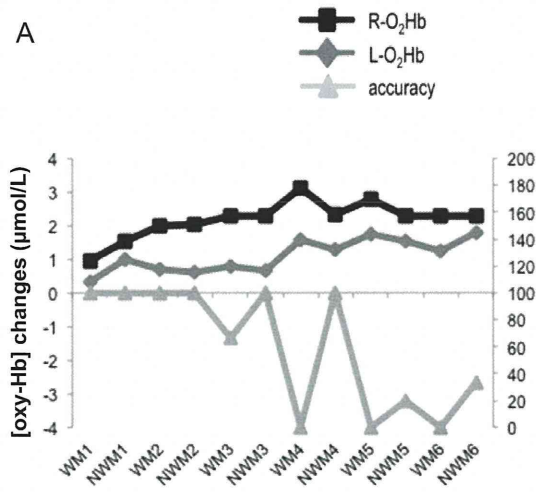


Fig.5 O<sub>2</sub>Hb changes of one ASD patient.

- A: face expression switching task using NIRO-200.
- B: geometric shape switching task using NIRO-200.
- C: face expression switching task using OMM-2000.
- D: geometric shape switching task using OMM-2000.

D. 研究考察

今回行った顔刺激を用いた WM/NWM タスク施行において、自閉症者では健常者にみられる、タスクパフォーマンスに応じてワーキングメモリ施行時に一致した前頭葉の脳血流量の増加が観察されなかった。

以前より我々は、図形をターゲットとした同様のスイッチングタスクを作成して同様に 2 チャンネル NIRS による前頭葉血流内 O<sub>2</sub>Hb 濃度の変化を測定する研究を行っており、その結果健常者においては WM タスクと NWM タスクのスイッチに呼応して O<sub>2</sub>Hb 濃度が推移することを示している。このことから、図形認知タスクにおいては、特に WM 処理時には前頭葉の背外側部を中心とした部位が賦活することが示唆される。一方、自閉症者では、健常者で見られる著明な O<sub>2</sub>Hb 濃度の変化が観察されなかった。しかしタスク遂行率は健常者と大きな差異はなく、自閉症者でのい書生の WM タスク処理神経ネットワークの存在が考えら

れた (Journal of Pediatric Neurology, 2012 in press)。

今回、この結果をベースとして、図形とは違い情動賦活も推測される顔表情刺激を用いて自閉症者で WM/NWM スイッチングタスクを行った。この結果、図形刺激とは異なり特に WM におけるタスク遂行率は、健常者と比べ極めて低下していた。この原因としては、健常者でも個体差が大きかったことより今回のタスクの難易度が高かったことにより、意欲の低下がみられたことがまず考えられる。また、顔表情刺激は扁桃体を中心とする情動に係る神経ネットワークを賦活することが知られており、自閉症者では元来大きく健常者と差異がみられることが報告されているため (Developmental Psychobiology 2002 ; 40: 213-225)、タスクの難易度の高さにより引き起こされた不安と情動想起神経ネットワークの不備の両者により、タスク遂行率の低下を引き起こしたと考えられる。

図形刺激と顔刺激のタスクパフォーマンスの差をさらに考察するために行った、多チャンネル光トポグラフィーを用いた自閉症者一名での検索においては、図形刺激の際に通常健常者でみられる前頭葉の賦活は著明には観察されなかった一方で、側頭葉の異所性活性化が観察された。顔刺激においてはこの傾向は観察されなかったことより、自閉症者においては、図形を用いた WM タスクを処理する際に、前頭葉ではなく側頭葉を用いて処理する異所性神経ネットワークが存在する可能性が示唆された。

## E. 結論

今回の結果、及びこれまでの研究結果より今後、自閉症者における情動想起タスク、図形および顔刺激タスクなどを施行した時の前頭葉および側頭葉の脳血流測定が、診断補助ツールとして用いることができる可能性が示唆された。

今後、さらに症例を増やし検討していく必要がある。

## F. 研究発表

### 英文論文

Narita N, Saotome S, Higuchi H, Narita M, Tazoe M, Sakatani K. Impaired prefrontal cortical response by switching stimuli in autism spectrum disorders. Journal of Pediatric Neurology, 2011, in press.

Higuchi H, Narita M, Sakatani K, Narita N. Prefrontal cortical hemodynamic change due to facial expression switching task. Shonan journal 2012, in press.

Ida-Eto M, Oyabu A, Ohkawara T, Tashiro Y, Narita N, Narita M. Existence of manserin, a secretogranin II-derived neuropeptide, in the rat inner ear; relevance to modulation of auditory and vestibular system. Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 60(1), 69-75, 2012

Ohkawara T, Oyabu A, Ida-Eto M, Tashiro Y, Tano K, Nasu F, Narita N,