

2003 [7]. Nevertheless, in light of the findings described Ida-Eto et al. and despite this progressive cautionary market withdrawal, the proper approach to how to formulate the question of causation merits analysis before addressing causation *per se*. It will be helpful to consider that no knowledge exists in complete independence of the original question that led to that knowledge. Thus, the quality of an observation is, to an often very relevant degree, determined by the question that prompted it [6].

First, it remains to be determined whether the discrete serotonin neuronal proliferation found is persistent, functionally relevant or detrimental. Attribution of function by virtue of proximity or similarity to other neighboring neurons seems premature. Second, human pathological evidence regarding increased cerebral serotonergic innervation in autistic brains, while very intriguing, can also be subject to similar systematic inquiry [3,4]. Third, more importantly, the extrapolation of nervous system structure and function findings from rodents to man rests upon generalizing assumptions of neural equivalence or parallelism that are weakened when the object of study is autism. Such correspondences are often uncritically accepted by the neuroscientific community. In the case of vertebrates, restraint is encouraged:

"Looking at the brains of many animals, one has the feeling of being in a room, on the floor of which are closed boxes of many shapes and sizes. Opening any box, large or small, reveals something like an immensely intricate and exquisite assembly of components and circuits. The contents of each box resemble the contents of the others; yet each has a distinct identity and the assemblies are obviously functioning, but not according to any known paradigm." [10] cited by [11]

Further, it will be difficult to safely ground any similarities between the autistic mind and animals used to model autism, just as the similarities between normal human consciousness and animal consciousness are inexorably constrained by the absence of language, which is prerequisite for thinking about thoughts, an exclusive capacity of man [5]. Thus, it would be ungrounded in reality if we spoke of an animal model of the normal human mind. No such model exists because the only legitimate model of the mind is the mind itself. Only selected aspects of animal neural performance can be approached and, among these, only certain aspects of behavior can be observed in the experimental, minimally perturbed setting, which differs in many ways from the environment where autistic subjects are typically diagnosed, studied and cared for. What would we infer of the human mind if only this limited set of behaviors could be observed among all the sporadic and sustained interactions that arise from all human beings that surround us?

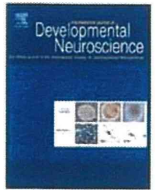
In conclusion, models can mimic the observed and offer new unsuspected observations, but are not necessarily informative about mechanism, such that disparate mechanisms can lead to indiscernible observations. Arguing that what characterizes behavior is only that which is observable is to not explain anything. And causality can be erroneously simplified or misattributed when a behavior is associated with an intervention, simply because many facets of neural performance, identified with increasing frequency, are silent from a behavioral point of view. What a person is in terms of actions, potential, reflection or relation to his entire body will have to await the rediscovery that man is the measure of all things.

## Acknowledgments

Supported in part by the Billingsley Fund and by NIH 2P41RR002584-24.

## References

- [1] B.S. Abrahams, D.H. Geschwind, Advances in autism genetics: on the threshold of a new neurobiology, *Nat. Rev. Genet.* 9 (2008) 341–355.
- [2] T.D. Albright, T.M. Jessell, E.R. Kandel, M.I. Posner, Neural science: a century of progress and the mysteries that remain, *Neuron* 25 (Suppl.) (2000) S1–S55.
- [3] E.C. Azmitia, J.S. Singh, X.P. Hou, J. Wegiel, Dystrophic serotonin axons in post-mortem brains from young autism patients, *Anat. Rec. (Hoboken)* 294 (2011) 1653–1662.
- [4] E.C. Azmitia, J.S. Singh, P.M. Whitaker-Azmitia, Increased serotonin axons (immunoreactive to 5-HT transporter) in postmortem brains from young autism donors, *Neuropharmacology* 60 (2011) 1347–1354.
- [5] J.L. Bermúdez, *Thinking Without Words*, Oxford University Press, New York, 2003, 225 pp.
- [6] R.G. Collingwood, *An Autobiography*, Oxford University Press, Oxford, 1939, 192 pp.
- [7] Division of Communication and Consumer Affairs. Office of Communication, Outreach and Development. Food and Drug Administration (FDA). Resource available online at <http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/Vaccines/QuestionsaboutVaccines/UCM070430> Accessed October 1, (2011).
- [8] P.M.S. Hacker, Is there anything it is like to be a bat? *Philosophy* 77 (2002) 157–174.
- [9] M. Ida-Eto, A. Oyabu, T. Ohkawara, Y. Tashiro, N. Narita, M. Narita, Embryonic exposure to thimerosal, an organomercury compound, causes abnormal early development of serotonergic neurons, *Neurosci. Lett.* 505 (2011) 61–64.
- [10] R. Nieuwenhuys, H.J.T. Donkelaar, C. Nicholson, *The Central Nervous System of Vertebrates*, Springer, Berlin, 1998, 2219 pp.
- [11] G.F. Striedter, *Principles of Brain Evolution*, Sinauer, Sunderland, 2005, 363 pp.
- [12] W.W. Thompson, C. Price, B. Goodson, D.K. Shay, P. Benson, V.L. Hinrichsen, E. Lewis, E. Eriksen, P. Ray, S.M. Marcy, J. Dunn, L.A. Jackson, T.A. Lieu, S. Black, G. Stewart, E.S. Weintraub, R.L. Davis, F. DeStefano, Early thimerosal exposure and neuropsychological outcomes at 7 to 10 years, *N. Engl. J. Med.* 357 (2007) 1281–1292.
- [13] A.E. Tozzi, P. Bisiacchi, V. Tarantino, B. De Mei, L. D'Elia, F. Chiarotti, S. Salmaso, Neuropsychological performance 10 years after immunization in infancy with thimerosal-containing vaccines, *Pediatrics* 123 (2009) 475–482.



# Morphological abnormalities of embryonic cranial nerves after in utero exposure to valproic acid: implications for the pathogenesis of autism with multiple developmental anomalies

Yasura Tashiro<sup>a,\*</sup>, Akiko Oyabu<sup>a</sup>, Yoshio Imura<sup>a</sup>, Atsuko Uchida<sup>a</sup>, Naoko Narita<sup>b</sup>, Masaaki Narita<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Anatomy II, Graduate School of Medicine, Mie University, 2-174 Edobashi, Tsu-city, Mie, Japan

<sup>b</sup> Department of Education, Bunkyo University, Mie, Japan

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 17 November 2010

Received in revised form 25 March 2011

Accepted 25 March 2011

### Key words:

Autism

Cranial nerve

Facial motor nerve

Valproic acid

Rat embryo

Whole mount immunostaining

## ABSTRACT

Autism is often associated with multiple developmental anomalies including asymmetric facial palsy. In order to establish the etiology of autism with facial palsy, research into developmental abnormalities of the peripheral facial nerves is necessary. In the present study, to investigate the development of peripheral cranial nerves for use in an animal model of autism, rat embryos were treated with valproic acid (VPA) in utero and their cranial nerves were visualized by immunostaining. Treatment with VPA after embryonic day 9 had a significant effect on the peripheral fibers of several cranial nerves. Following VPA treatment, immunoreactivity within the trigeminal, facial, glossopharyngeal and vagus nerves was significantly reduced. Additionally, abnormal axonal pathways were observed in the peripheral facial nerves. Thus, the morphology of several cranial nerves, including the facial nerve, can be affected by prenatal VPA exposure as early as E13. Our findings indicate that disruption of early facial nerve development is involved in the etiology of asymmetric facial palsy, and may suggest a link to the etiology of autism.

© 2011 ISDN. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Autism spectrum disorders (ASD) are neurodevelopmental disorders characterized by impairment in social interaction and communication, and are associated with repetitive behaviors and interests (Charman et al., 2000; Filipek et al., 1999). ASD is sometimes associated with multiple developmental anomalies, including asymmetric facial palsy. The association of autism with facial nerve (7th cranial nerve) palsy is described in several cases of thalidomide embryopathy, Möbius sequence, CHARGE association and Goldenhar syndrome (Ornitz et al., 1977; Gillberg and Winnergard, 1984; Miller et al., 2005). The ability to make a facial expression plays one of the most pivotal roles in emotional communication. Therefore, a more complete understanding of the development of the facial nerve and subsequently the innervation of the facial muscles in ASD patients will be indispensable for establishing the pathogenesis of autism and its correlation with developmental anomalies including facial palsy.

To examine the association between autism and embryonic development of the nervous system, a rodent model of autism can be utilized. Epidemiological studies revealed that thalidomide

(THAL) or valproic acid (VPA) exposure during the first trimester in humans causes higher incidence of autism in offspring (Stromland et al., 1994; Williams et al., 2001), thus rat models of autism can be generated by prenatal THAL or VPA exposure (Narita et al., 2002). Prior studies have established the behavioral, biochemical and neuroanatomic similarities between human cases of autism and rats exposed to VPA in utero (Narita et al., 2010, 2002; Miyazaki et al., 2005; Rodier et al., 1996, 1997; Ingram et al., 2000).

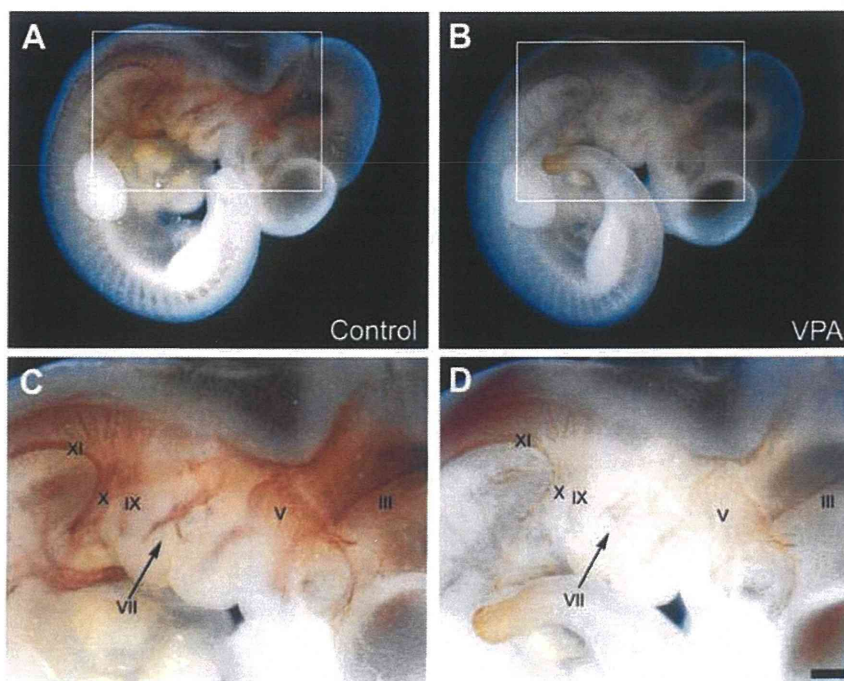
Peripheral fibers of several cranial nerves and ganglia are altered after in vitro exposure of mouse embryos to VPA (Gofflot et al., 1996). Although oral administration of drugs for delivery via the placenta is a well known procedure for in vivo study of the effects of treatments, the effects of in utero VPA exposure on the peripheral fibers of cranial nerves have not been well characterized and detailed statistical analysis of these effects is lacking.

The central regions of the cranial motor nerves form into nuclei within the brainstem. Exposure to a single intraperitoneal dose of 350 mg/kg VPA after E11.5 results in a significant reduction in the size of the trigeminal and hypoglossal nuclei in adults (Rodier et al., 1996). Defects in the facial nucleus have not been reported, despite the presence of abnormalities in this nucleus in some human cases of autism (Rodier et al., 1996). Moreover, it is unknown if earlier exposure to VPA can also affect the facial nucleus.

We have previously established a rat autism model by prenatal exposure to VPA at E9 (Narita et al., 2002; Miyazaki et al., 2005). Human VPA-induced autism is the result of fetal exposure to this

\* Corresponding author. Tel.: +81 059 232 1111x6327; fax: +81 059 232 8031.  
E-mail address: [ytashiro@doc.medic.mie-u.ac.jp](mailto:ytashiro@doc.medic.mie-u.ac.jp) (Y. Tashiro).





**Fig. 1.** 2H3-immunostained E13 embryo treated with VPA. (A and C) Control E13 embryo without in vivo VPA treatment. (B and D) E13 embryo treated in vivo with VPA. There was no obvious difference in size and shape between the two groups. (C and D) Higher magnification views of the boxed regions in A and B, respectively. Cranial nerves were observed in the branchial arches and around the optic cup. Scale bar: 50  $\mu$ m.

teratogen during a critical period of development that corresponds to rat stage E9. In the present study, to identify the initial period in which VPA affects peripheral fiber development of the cranial nerves in utero, VPA was administered to pregnant rats at various stages and delivered to the embryos via the placenta. VPA-exposed whole embryos were immunostained to visualize any effects on their cranial nerves.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals and teratogen exposure

All experiments involving animals were approved by the Community of Laboratory Animal Research Center at the University of Mie, Japan. Details of the teratogen administration have been previously described (Narita et al., 2002, 2010; Miyazaki et al., 2005). In brief, female Wistar rats (7–10 weeks old) were mated overnight and the day of insemination was designated as E1. VPA was administered once during the period spanning E8 through E11. On E8–10 or 11 at 3:00 p.m., 800 mg/kg VPA was administered orally without sedation to dams in each group using an infant feeding tube (Atom Medical, Tokyo, Japan) attached to a 2.5 ml disposable syringe. We referred to prior animal experiments using these teratogens to determine the doses of VPA (Ingram et al., 2000; Matsubara and Mikami, 1985). VPA was prepared by dissolving 2-propylpentanoic acid (Sigma, St. Louis, MO, USA) in distilled water adjusted to pH 9.6 with sodium hydroxide. The dams were then housed individually and allowed to continue their pregnancy or to raise their own litters.

### 2.2. Whole embryo immunostaining

Immunostaining on whole mount embryos was performed according to the methods previously described (Lee et al., 1995) with some modification. At embryonic day 13 (E13) embryos were removed from the dams, fixed in 4% PFA overnight and then stored in 100% methanol. For whole-embryo immunostaining, embryos were incubated for 7 h at room temperature with the primary antibody, mouse 2H3 monoclonal anti-165 kDa neurofilament (Developmental Studies Hybridoma Bank); the secondary antibody, Goat HRP-conjugated anti-mouse IgG (Jackson Immuno), was then applied followed by a diaminobenzidine-tetrahydrochloride (DAB) reaction.

### 2.3. Statistical analysis

At least three different dams were analyzed for each condition and the number of embryos is referred to in the text as "n = ". Digital images were captured by a light

microscope equipped with a CCD camera. The intensity of the 2H3 immunostaining and the size of the area covered by 2H3-positive fibers were measured with the aid of Image J software. The relative level of immunoreactivity was determined by comparison with the intensity of staining in the oculomotor nerves, which showed a similar intensity in all samples. The mean and standard deviation (S.D.) was calculated, and differences among the developmental stages were evaluated with a one-way ANOVA test.

## 3. Results

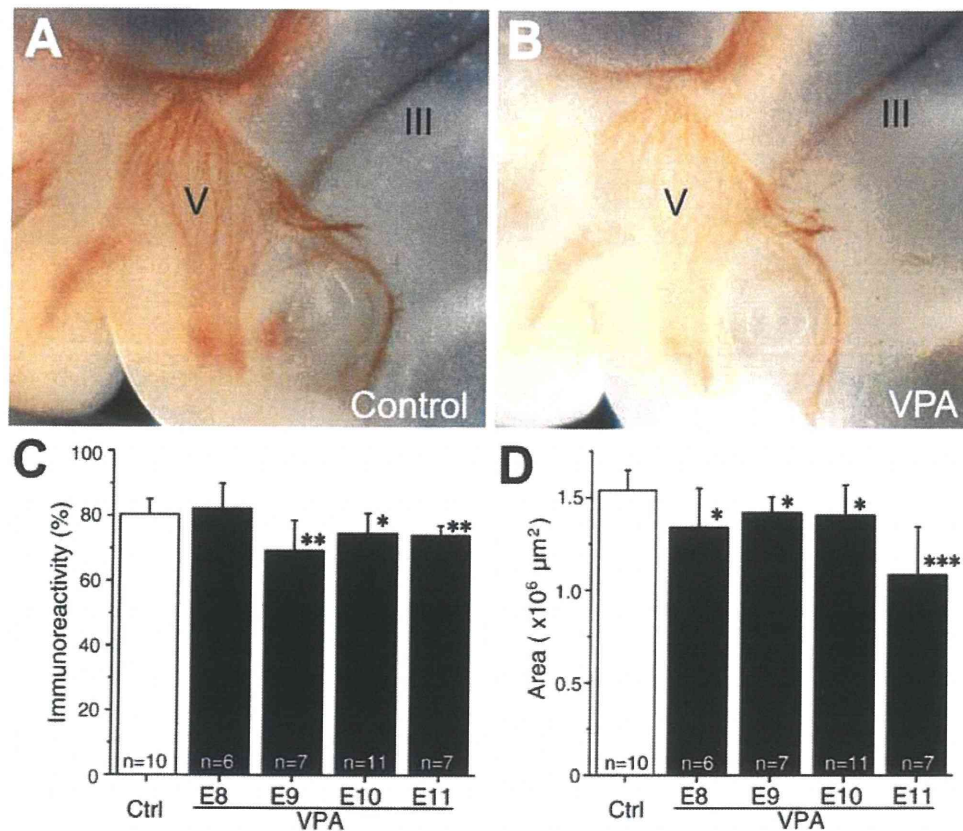
VPA was administered once during the period spanning E8 through E11. After in vivo treatment with VPA at E8, E9, E10 or E11, no major malformations were observed during a gross survey of the E13 embryos (Fig. 1). The number of somites between the upper and lower limbs was 14–16, although the crown-to-tail lengths of the embryos treated with VPA at E11 were shorter than those treated at other stages.

To examine the early development of cranial nerves, E13 embryos were immunostained with a 2H3 antibody. As this antibody recognizes all axons containing neurofilament 165 kD, most peripheral nerves, including both spinal and cranial nerves, could be visualized (Fig. 1). Each cranial nerve was identified based on its position relative to the optic cup and branchial arches (Fig. 1C and D). 2H3-positive fibers extending from the mesencephalon to the optic cup are the oculomotor nerves (III). 2H3-positive fibers that have three branches, with the two most anterior branches located around the optic cup and the most posterior branch located in the 1st branchial arch are trigeminal nerves (V). 2H3-positive fibers in the 2nd branchial arch are the facial nerves (VII). 2H3-positive fibers in the 4th, 5th and 6th branchial arch are the glossopharyngeal (IX), vagus (X) and accessory (XI) nerves, respectively.

### 3.1. Trigeminal nerves

2H3-positive populations and their locations within the embryos were similar in control and VPA-treated groups, although the immunoreactivity of some cranial nerves in the VPA-treated





**Fig. 2.** Trigeminal and oculomotor nerves of E13 embryos. (A and B) Typical 2H3-immunostained nerves around the optic cup, maxillary and mandibular regions and the 1st branchial arch. Although immunoreactivity of the oculomotor nerves (III) appears similar in the control and VPA-treated embryo, immunoreactivity of the trigeminal nerves (V) in the VPA-treated specimen appears slightly weaker than that in control. (C and D) Summary of immunoreactivity and the size of the immunostained area. Open bars indicate the embryo treated without VPA and the filled bars indicate the embryo treated with VPA. Means  $\pm$  SD; \* $p$  < 0.05, \*\* $p$  < 0.01, \*\*\* $p$  < 0.001.

embryos was slightly weakened (Fig. 1C and D). Almost no difference was observed in the immunoreactivity of the oculomotor nerves (III) in the control and VPA-treated embryos (Figs. 1 and 2); this allowed us to compare the immunoreactivity among groups and for each cranial nerve by normalizing them to the immunoreactivity of the oculomotor nerves which were designated as 100% immunoreactive.

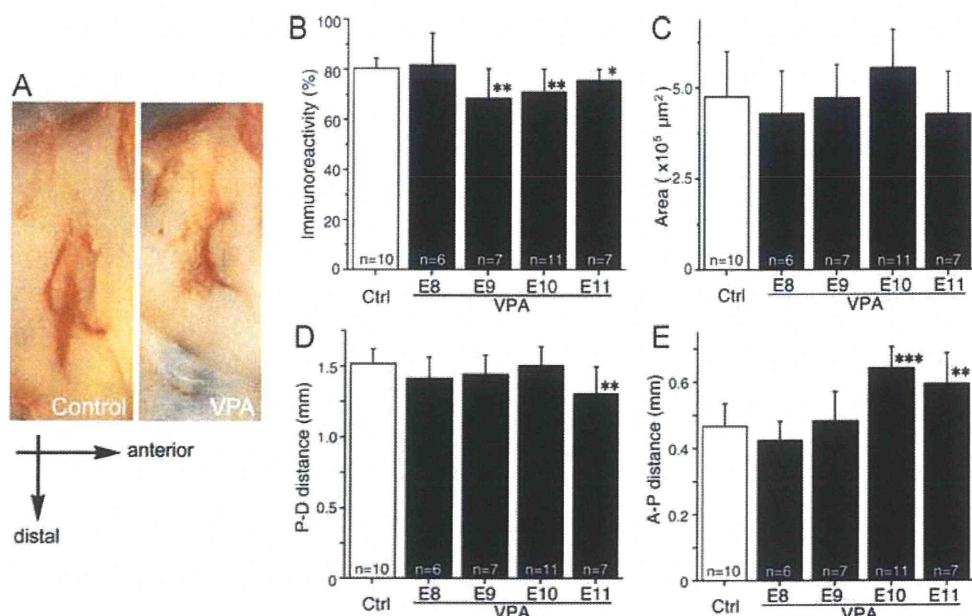
Trigeminal nerves from the flexuous pons have three branches which extend to the optic cup, maxillary and mandibular areas (Fig. 2). Although the axonal pathways and distribution of nerves to the target areas were almost identical in both groups, immunoreactivity in the E10 VPA-treated embryos was significantly reduced compared to that of controls (Fig. 2A and B). Immunoreactivity (%) was  $80.3 \pm 4.6$  in the control group ( $n = 10$ );  $82.2 \pm 7.7$  in the E8 VPA group ( $n = 6$ );  $69.2 \pm 9.3$  in the E9 VPA group ( $n = 7$ );  $74.6 \pm 6.1$  in the E10 VPA group ( $n = 11$ ); and  $73.8 \pm 3.0$  in the E11 VPA group ( $n = 7$ ). The difference between the control and E8 VPA group was not significant. The immunoreactivity of the trigeminal nerves in the E9–11 VPA groups was significantly lower than that of the control group ( $p < 0.05$ ). The area of immunostained trigeminal nerves ( $\times 10^6 \mu\text{m}^2$ ) was  $1.53 \pm 0.10$  in the control group ( $n = 10$ );  $1.34 \pm 0.20$  in the E8 VPA group ( $n = 6$ );  $1.41 \pm 0.08$  in the E9 VPA group ( $n = 7$ );  $1.40 \pm 0.16$  in the E10 VPA group ( $n = 11$ ); and  $1.08 \pm 0.25$  in the E11 VPA group ( $n = 7$ ; Fig. 2D). The area covered by the immunostained trigeminal nerves in the E8–10 VPA groups was significantly smaller than that of the control ( $p < 0.05$ ) and this difference was even more pronounced in the E11 VPA group compared to the control ( $p < 0.001$ ).

### 3.2. Facial nerves

Facial nerves are located in the 2nd branchial arch (Fig. 3). Axonal pathways in the VPA treated groups were truncated and more defasciculated than those in the control group (Fig. 3A). Immunoreactivity in E9–11 VPA-treated embryos was lower than that of control embryos (Fig. 3B). Immunoreactivity (%) was  $80.3 \pm 4.0$  in the control group ( $n = 10$ );  $81.6 \pm 12.7$  in the E8 VPA group ( $n = 6$ );  $68.2 \pm 11.9$  in the E9 VPA group ( $n = 7$ );  $70.7 \pm 9.2$  in the E10 VPA group ( $n = 11$ ); and  $75.4 \pm 4.5$  in the E11 VPA group ( $n = 7$ ; Fig. 3B). There was no significant difference between the control and E8 VPA group. The immunoreactivity of the facial nerves in the E9–11 VPA groups was significantly lower than that of the control group ( $p < 0.01$ ). The area circumscribed by the immunostained facial nerves ( $\times 10^5 \mu\text{m}^2$ ) was  $4.74 \pm 1.24$  in controls ( $n = 10$ );  $4.28 \pm 1.17$  in the E8 VPA group ( $n = 6$ );  $4.71 \pm 0.91$  in the E9 VPA group ( $n = 7$ );  $5.54 \pm 1.05$  in the E10 VPA group ( $n = 11$ ); and  $4.27 \pm 1.16$  in the E11 VPA group ( $n = 7$ ; Fig. 3C). There was no significant difference between the control group and any of the VPA groups.

To evaluate the morphological differences, the maximum lengths along the proximal–distal or anterior–posterior axes within the immunostained area were measured (Fig. 3D and E). The maximum length along the proximal–distal axis (mm) was  $1.52 \pm 0.10$  in the control group ( $n = 10$ );  $1.41 \pm 0.15$  in the E8 VPA group ( $n = 6$ );  $1.44 \pm 0.14$  in the E9 VPA group ( $n = 7$ );  $1.50 \pm 0.13$  in the E10 VPA group ( $n = 11$ ); and  $1.30 \pm 0.19$  in the E11 VPA group ( $n = 7$ ; Fig. 3D). While there was no significant difference between the control and





**Fig. 3.** Facial nerves of E13 embryos. (A) Typical 2H3-immunostained nerves in the 2nd branchial arch. Facial nerves appear to be misrouted and defasciculated in the VPA-treated embryo (right), compared to control (left). (B and C) Summary of immunoreactivity and the size of the immunostained area. (D and E) Summary of the maximum length along the proximal–distal or anterior–posterior axes of the immunostained area.

E8–10 VPA groups, the maximum length along the proximal–distal axis in the E11 VPA group was significantly shorter than that of control. The maximum length along the anterior–posterior axis (mm) was  $0.467 \pm 0.068$  in the control group ( $n = 10$ );  $0.424 \pm 0.058$  in the E8 VPA group ( $n = 6$ );  $0.482 \pm 0.089$  in the E9 VPA group ( $n = 7$ );  $0.643 \pm 0.064$  in the E10 VPA group ( $n = 11$ ); and  $0.595 \pm 0.093$  in the E11 VPA group ( $n = 7$ ; Fig. 3D). While there was no significant difference between the control and E8–9 VPA groups, the maximum length along the anterior–posterior axis in the E10–11 VPA groups was significantly longer than that of control and it appears that the axon bundles in these VPA groups became truncated and defasciculated.

### 3.3. Glossopharyngeal nerves

The glossopharyngeal nerves are located in the most anterior parts of the 4th through 6th branchial arches (Fig. 4A and IX). Although the axonal pathways were almost identical in both the control and VPA-treated groups, immunoreactivity in the E9–11 VPA-treated embryos had reduced immunoreactivity compared to that of controls (Fig. 4). Immunoreactivity (%) was  $85.1 \pm 4.2$  in the control group ( $n = 10$ );  $87.2 \pm 12.6$  in the E8 VPA group ( $n = 6$ );  $75.3 \pm 12.2$  in the E9 VPA group ( $n = 7$ );  $74.8 \pm 9.3$  in the E10 VPA group ( $n = 11$ ); and  $79.0 \pm 4.5$  in the E11 VPA group ( $n = 7$ ; Fig. 4B). The difference between the control and E8 VPA group was not significant. The immunoreactivity of the glossopharyngeal nerves in the E9–11 VPA groups was significantly lower than that of the control group ( $p < 0.05$ ). The area circumscribed by the immunostained glossopharyngeal nerves ( $\times 10^5 \mu m^2$ ) was  $3.50 \pm 0.83$  in the control group ( $n = 10$ );  $3.54 \pm 0.78$  in the E8 VPA group ( $n = 6$ );  $3.82 \pm 0.69$  in the E9 VPA group ( $n = 7$ );  $4.13 \pm 0.92$  in the E10 VPA group ( $n = 11$ ); and  $3.03 \pm 0.56$  in the E11 VPA group ( $n = 7$ ; Fig. 4C). There was no significant difference between the control and any of the VPA groups.

### 3.4. Vagus nerves

Vagus nerves are located in the middle part of 4th through 6th branchial arches (Fig. 4A and X). Although the axonal path-

ways were almost identical in both groups, immunoreactivity in the E9–11 VPA-treated embryos was lower than that of control (Fig. 4A). Immunoreactivity (%) was  $88.7 \pm 3.9$  in the control group ( $n = 10$ );  $92.1 \pm 14.1$  in the E8 VPA group ( $n = 6$ );  $81.5 \pm 8.5$  in the E9 VPA group ( $n = 7$ );  $79.0 \pm 10.5$  in the E10 VPA group ( $n = 11$ ); and  $81.5 \pm 4.4$  in the E11 VPA group ( $n = 7$ ; Fig. 4D). The difference between the control and E8 VPA group was not significant. The immunoreactivity of the vagus nerves in the E9–11 VPA groups was significantly lower than in the control group ( $p < 0.01$ ). The area of the immunostained vagus nerves ( $\times 10^5 \mu m^2$ ) was  $3.89 \pm 0.71$  in the control group ( $n = 10$ );  $3.38 \pm 0.86$  in the E8 VPA group ( $n = 6$ );  $3.52 \pm 0.45$  in the E9 VPA group ( $n = 7$ );  $4.04 \pm 0.56$  in the E10 VPA group ( $n = 11$ ); and  $2.80 \pm 0.31$  in the E11 VPA group ( $n = 7$ ; Fig. 4E). There was no significant difference between the control and the E8–10 VPA groups. The area of the immunostained vagus nerves in the E11 VPA group was significantly smaller than that of control ( $p < 0.01$ ).

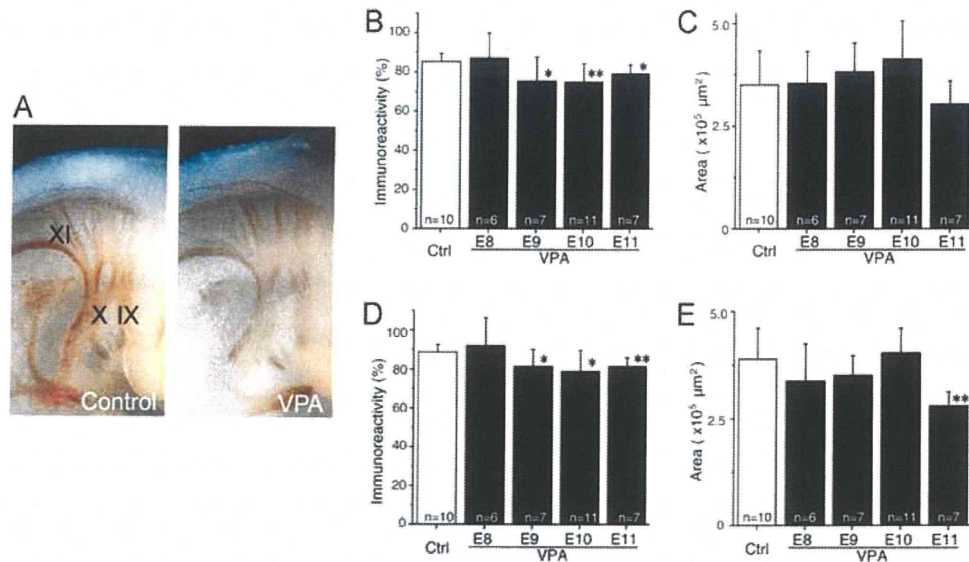
## 4. Discussion

In the present study, in utero treatment with VPA after embryonic day 9 was shown to affect the development of the trigeminal, facial, glossopharyngeal and vagus nerves. Immunoreactivity of the trigeminal, facial, glossopharyngeal and vagus nerves was significantly decreased following treatment with VPA. Facial nerves in VPA-treated embryos also showed abnormal axonal pathways thus demonstrating that by E13 the morphology of several cranial nerves can be affected by prenatal VPA exposure. Our findings obtained with an animal model of autism demonstrate the progression of multiple developmental abnormalities induced by VPA exposure, and suggest research into further links between such developmental anomalies and ASD.

### 4.1. Technical considerations

Our identification of the cranial nerves was based on the immunoreactivity of the 2H3 antibody and the location of the nerves in relation to the optic cup and branchial arches. During whole-embryo immunostaining, penetration of the antibody into





**Fig. 4.** Glossopharyngeal and vagus nerves of E13 embryos. (A) Typical 2H3-immunostained nerves in the region of the 4–6th branchial arch. Although immunoreactivity of the accessory nerves (XI) appears similar in the control (left) and VPA-treated embryo (right), immunoreactivity of the glossopharyngeal (IX) and vagus (X) nerves in the VPA-treated embryo appears to be slightly weaker than that of the control. (B and C) Summary of immunoreactivity and size of the immunostained area of the glossopharyngeal nerves. (D and E) Summary of immunoreactivity and size of the immunostained area of the vagus nerves.

the tissue is critical for proper antigen recognition. In addition to peripheral, cranial and spinal nerves, some mesencephalic nerves were also visible (data not shown); these corresponded to the medial longitudinal fasciculus nerves (Easter et al., 1993) which are located in the neural tube and are deeper than the peripheral nerves. The ability to visualize these deeper nerves indicates that penetration of the antibody was sufficient to visualize all of the peripheral nerves. Since the 2H3 antibody recognizes only those axons containing neurofilament 165 kD, it was impossible to observe immature axons or the most distal parts of the axons which contain little neurofilament (Tang and Goldberg, 2000).

Additionally, since the 2H3 antibody recognizes all axons containing neurofilament, it was not possible to distinguish facial nerves from vestibulocochlear nerves in the 2nd branchial arch. However, while vestibulocochlear nerves terminate at the otic vesicle located in the proximal region between the 2nd and 3rd branchial arches, the facial nerves terminate in the distal muscle targets (Noden, 1993). Therefore most of the 2H3-positive fibers that we observed in the 2nd branchial arches must be components of the facial nerves.

Use of the 2H3 antibody did enable us to compare all cranial populations among the different experimental groups, including those from previous studies in which 2H3 was used for in vitro analysis. Thus 2H3 immunostaining is an appropriate tool for evaluating the development of cranial nerves after in vivo treatments.

The quantification of immunoreactivity was based on relative values equilibrated to the immunoreactivity of the oculomotor nerves. Our observation that oculomotor nerve immunoreactivity is similar between control and VPA-treated groups is consistent with previously reported in vitro data (Gofflot et al., 1996). In the present study, we have provided the first description based on numerical quantification of axonal neurofilament intensity after in vivo VPA treatment.

#### 4.2. Morphological abnormalities of the cranial nerves

VPA-treatment at E8 affected few cranial nerves, while VPA-treatment after E9 affected several cranial nerves. The short pharmacokinetic half life of VPA in rodents (Nau et al., 1981) suggests that the effects of VPA would be limited to a narrow temporal

window. Thus VPA treatment at E8 was likely too early to affect the progenitor cells of cranial nerves which are born after E9. Consistent with this, the ratio of progenitor cells that are influenced by VPA increases as development progresses. Thus the differences in neuropathy observed by varying the dosing date appear to correspond to the presence of cranial nerve progenitor cells, suggesting that VPA affects the environment in which cranial nerves differentiate.

Following VPA-treatment after E9, immunostaining in the trigeminal, facial, glossopharyngeal and vagus nerves became faint (Figs. 2–4). This result may be due to the decreased number of axons and the number of cells in their ganglia or nuclei, since the birth dates of most of these nuclei and ganglia correspond with this stage of VPA administration (Altman and Bayer, 1982). VPA is known to affect cell division and the cell cycle by disturbing histone deacetylation and thus may diminish cell numbers within the ganglia and nuclei (Phiel et al., 2001; Chen et al., 2007). Further analysis of ganglion cell formation or nucleogenesis would clarify this possibility. Cranial nerves that contained populations with placodal origins (Noden, 1993) showed weak immunoreactivity; this suggests that VPA may also have an effect on the cell migration and aggregation that is necessary for formation of peripheral cranial ganglia.

Facial nerves in VPA-treated embryos showed abnormal axonal pathways (Figs. 2 and 3) suggesting that the expression of axon guidance or cell adhesion molecules were disturbed by VPA treatment. To examine this possibility, systematic expression analysis or subtraction assays between control and VPA-treated animals could be used to elucidate these molecular mechanisms.

Another possible explanation for the abnormal axonal pathways observed in the facial nerves is that VPA exposure may have changed the identity of the rhombomeres. Various combinations of Hox gene expression are used to specify individual rhombomeres as well as regulate the differentiation of cranial neurons (Yamamoto and Schwarting, 1991; Noden, 1993; Erzurumlu et al., 2010). Retinoic acid contributes to the caudalization of the rhombencephalon (Altmann and Brivanlou, 2001; Yamada, 1994) and VPA has been associated with retinoic acid responsive elements as well as alteration of Hox gene expression (Conlon and Rossant, 1992; Langston and Gudas, 1992). Animals exposed to retinoic acid in utero have similar patterns of craniofacial, limb, and heart defects



as those exposed to VPA (Ehlers et al., 1992). These reports indicate that VPA-exposure affects development in the rhombencephalon.

Oculomotor nerves in the mesencephalon were not affected by VPA exposure (Fig. 2) and our observation is consistent with previously reported *in vitro* data (Gofflot et al., 1996). Ocular motility is regulated by the oculomotor, trochlear and abducens nerves (Yamamoto and Schwarting, 1991). While the oculomotor and trochlear nerves originate from the mesencephalon, the abducens nerves originate from the rhombencephalon (Yamamoto and Schwarting, 1991). In autism patients, abduction defects in ocular motility are most commonly observed (Miller et al., 2005). These findings also support the idea that VPA-exposure has a greater effect on development in the rhombencephalon than the mesencephalon.

### 4.3. Clinical significance

The embryonic stage E9–11 in rat, when VPA treatment begins to affect the initial development of cranial nerves (Yamamoto and Schwarting, 1991; Altman and Bayer, 1982; Noden, 1993; Erzurumlu et al., 2010), corresponds to the 3rd week in human gestation. Pregnant women administered VPA during these stages sometimes give birth to children with fatal valproate syndrome (Miller et al., 2005; Ornoy, 2009). The pharmacokinetic half life of VPA in humans is ten fold longer than in rodents (Nau et al., 1981), suggesting that the effects of VPA-treatment on the development of cranial nerves that we observed in the rat would be more pronounced in humans. The combination of observation and statistical analysis we presented here will contribute to the overall understanding of cranial nerve development and may be used to determine more appropriate conditions for drug administration during pregnancy.

Currently, it is unknown if abnormal morphogenesis during these early stages causes postnatal physiological dysfunction. During development of the facial nerve nuclei in autism patients, disordered caudal migration was shown to cause facial disease (Rodier et al., 1996). Analysis of eyeblink in VPA-exposed rat models of autism may help to determine the level of function of the facial nerve. Furthermore, given that the glossopharyngeal and vagus nerves contribute to the regulation of circulation and respiration (Dampney, 1994; Chan and Sawchenko, 1998), the observed anomalous development of these nerves suggests that physiological functions such as baroreflex should also be examined. These and further findings may aid in the elucidation of the mechanisms underlying multiple inherent diseases.

### Acknowledgements

We thank Tomomi Yokoyama for assistance with the animal experiments. We also thank Thaddeus Dryja for useful comments on revising the manuscript.

The 2H3 monoclonal antibody developed by Thomas M. Jessell and Jane Dodd was obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank developed under the auspices of the NICHD and maintained by The University of Iowa, Department of Biology, Iowa City, IA 52242. This study was supported by a Grant-in-Aid for Young Scientists (B) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, Japan. KAKENHI (19700323) and a Grand-in-Aid from the School of Medicine, Mie University.

### References

- Altman, J., Bayer, S.A., 1982. Development of the cranial nerve ganglia and related nuclei in the rat. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.* 74, 1–90.
- Altmann, C.R., Brivanlou, A.H., 2001. Neural patterning in the vertebrate embryo. *Int. Rev. Cytol.* 203, 447–482.
- Chan, R.K., Sawchenko, P.E., 1998. Organization and transmitter specificity of medullary neurons activated by sustained hypertension: implications for understanding baroreceptor reflex circuitry. *J. Neurosci.* 18, 371–387.
- Charman, C.R., Morris, A.D., Williams, H.C., 2000. Topical corticosteroid phobia in patients with atopic eczema. *Br. J. Dermatol.* 142, 931–936.
- Chen, P.S., Wang, C.C., Bortner, C.D., Peng, G.S., Wu, X., Pang, H., Lu, R.B., Gean, P.W., Chuang, D.M., Hong, J.S., 2007. Valproic acid and other histone deacetylase inhibitors induce microglial apoptosis and attenuate lipopolysaccharide-induced dopaminergic neurotoxicity. *Neuroscience* 149, 203–212.
- Conlon, R.A., Rossant, J., 1992. Exogenous retinoic acid rapidly induces anterior ectopic expression of murine Hox-2 genes *in vivo*. *Development* 116, 357–368.
- Dampney, R.A., 1994. Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system. *Physiol. Rev.* 74, 323–364.
- Easter Jr., S.S., Ross, L.S., Frankfurter, A., 1993. Initial tract formation in the mouse brain. *J. Neurosci.* 13, 285–299.
- Ehlers, K., Sturje, H., Merker, H.J., Nau, H., 1992. Valproic acid-induced spina bifida: a mouse model. *Teratology* 45, 145–154.
- Erzurumlu, R.S., Murakami, Y., Rijli, F.M., 2010. Mapping the face in the somatosensory brainstem. *Nat. Rev. Neurosci.* 11, 252–263.
- Filipek, P.A., Accardo, P.J., Baranek, G.T., Cook Jr., E.H., Dawson, G., Gordon, B., Gravel, J.S., Johnson, C.P., Kallen, R.J., Levy, S.E., Minshew, N.J., Ozonoff, S., Prizant, B.M., Rapin, I., Rogers, S.J., Stone, W.L., Teplin, S., Tuchman, R.F., Volkmar, F.R., 1999. The screening and diagnosis of autistic spectrum disorders. *J. Autism Dev. Disord.* 29, 439–484.
- Gillberg, C., Winerdgar, I., 1984. Childhood psychosis in a case of Moebius syndrome. *Neuropediatrics* 15, 147–149.
- Gofflot, F., van Maele-Fabry, G., Picard, J.J., 1996. Cranial nerves and ganglia are altered after *in vitro* treatment of mouse embryos with valproic acid (VPA) and 4-en-VPA. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 93, 62–69.
- Ingram, J.L., Peckham, S.M., Tisdale, B., Rodier, P.M., 2000. Prenatal exposure of rats to valproic acid reproduces the cerebellar anomalies associated with autism. *Neurotoxicol. Teratol.* 22, 319–324.
- Langston, A.W., Gudas, L.J., 1992. Identification of a retinoic acid responsive enhancer 3' of the murine homeobox gene Hox-1.6. *Mech. Dev.* 38, 217–227.
- Lee, Y.M., Osumi-Yamashita, N., Ninomiya, Y., Moon, C.K., Eriksson, U., Eto, K., 1995. Retinoic acid stage-dependently alters the migration pattern and identity of hindbrain neural crest cells. *Development* 121, 825–837.
- Matsubara, Y., Mikami, T., 1985. Teratogenic Potentiality of Single Dose of Thalidomide in JW-NIBS Rabbits Jikken Dobutsu, vol. 34, pp. 295–302.
- Miller, M.T., Stromland, K., Ventura, L., Johansson, M., Bandim, J.M., Gillberg, C., 2005. Autism associated with conditions characterized by developmental errors in early embryogenesis: a mini review. *Int. J. Dev. Neurosci.* 23, 201–219.
- Miyazaki, K., Narita, N., Narita, M., 2005. Maternal administration of thalidomide or valproic acid causes abnormal serotonergic neurons in the offspring: implication for pathogenesis of autism. *Int. J. Dev. Neurosci.* 23, 287–297.
- Narita, N., Kato, M., Tazoe, M., Miyazaki, K., Narita, M., Okado, N., 2002. Increased monoamine concentration in the brain and blood of fetal thalidomide- and valproic acid-exposed rat: putative animal models for autism. *Pediatr. Res.* 52, 576–579.
- Narita, M., Oyabu, A., Imura, Y., Kamada, N., Yokoyama, T., Tano, K., Uchida, A., Narita, N., 2010. Nonexploratory movement and behavioral alterations in a thalidomide or valproic acid-induced autism model rat. *Neurosci. Res.* 66, 2–6.
- Nau, H., Zierler, R., Spielmann, H., Neubert, D., Gansau, C., 1981. A new model for embryotoxicity testing: teratogenicity and pharmacokinetics of valproic acid following constant-rate administration in the mouse using human therapeutic drug and metabolite concentrations. *Life Sci.* 29, 2803–2814.
- Noden, D.M., 1993. Spatial integration among cells forming the cranial peripheral nervous system. *J. Neurobiol.* 24, 248–261.
- Ornitz, E.M., Guthrie, D., Farley, A.H., 1977. The early development of autistic children. *J. Autism Child. Schizophr.* 7, 207–229.
- Ornoy, A., 2009. Valproic acid in pregnancy: how much are we endangering the embryo and fetus? *Reprod. Toxicol.* 28, 1–10.
- Phiel, C.J., Zhang, F., Huang, E.Y., Guenther, M.G., Lazar, M.A., Klein, P.S., 2001. Histone deacetylase is a direct target of valproic acid, a potent anticonvulsant, mood stabilizer, and teratogen. *J. Biol. Chem.* 276, 36734–36741.
- Rodier, P.M., Ingram, J.L., Tisdale, B., Nelson, S., Romano, J., 1996. Embryological origin for autism: developmental anomalies of the cranial nerve motor nuclei. *J. Comp. Neurol.* 370, 247–261.
- Rodier, P.M., Bryson, S.E., Welch, J.P., 1997. Minor malformations and physical measurements in autism: data from Nova Scotia. *Teratology* 55, 319–325.
- Stromland, K., Nordin, V., Miller, M., Akerstrom, B., Gillberg, C., 1994. Autism in thalidomide embryopathy: a population study. *Dev. Med. Child Neurol.* 36, 351–356.
- Tang, D., Goldberg, D.J., 2000. Bundling of microtubules in the growth cone induced by laminin. *Mol. Cell. Neurosci.* 15, 303–313.
- Williams, G., King, J., Cunningham, M., Stephan, M., Kerr, B., Hersh, J.H., 2001. Fetal valproate syndrome and autism: additional evidence of an association. *Dev. Med. Child Neurol.* 43, 202–206.
- Yamada, T., 1994. Caudalization by the amphibian organizer: brachyury, convergent extension and retinoic acid. *Development* 120, 3051–3062.
- Yamamoto, M., Schwarting, G., 1991. The formation of axonal pathways in developing cranial nerves. *Neurosci. Res.* 11, 229–260.

## じゃれつき遊びによる前頭葉抑制機能の変化

成田 奈緒子\*・原田 ゆかり\*\*・樋口 大樹\*\*\*・田副 真美\*\*\*\*・成田 正明\*\*\*\*\*

### Improvement of prefrontal inhibition by physical play application

Naoko NARITA, Yukari HARADA, Hiroki HIGUCHI, Mami TAZOE, Masaaki NARITA

**要旨** 前頭葉の実行機能のひとつである抑制機能は、生後発達する高度な脳機能として知られている。今回、この抑制機能の向上に有効であるとされるじゃれつき遊びを、特別支援学級児童、及び成人ボランティアを対象として行った。その前後で抑制機能を要するストループ課題を施行し、その得点の変化により、じゃれつき遊びの前頭葉抑制機能への影響を検証したところ、児童、成人いずれにおいてもじゃれつき遊び刺激により、ストループ課題得点の増加が認められた。さらに成人においては、じゃれつき遊び特異的な増加も認められ、これらの結果より、じゃれつき遊びは前頭葉抑制機能の賦活に寄与することが示唆された。

**キーワード**：実行機能 生活リズム ADHD 脳

#### はじめに

前頭葉機能のひとつに、実行機能がある。実行機能とは、目標に到達するために行動や思考の計画、調整、コントロールなどを行う機能の総称である。実行機能は前頭葉にその基盤を持つとされており、単一的能力であるというよりも、複数の下位機能から構成された制御過程の総称であると考えられている。下位機能のひとつに抑制機能がある。これは不適切な情報を抑制したり、衝動的な反応を抑制したりする機能とされる。この抑制機能をコントロールすることで、集中力や落ち着きを維持することができる。抑制機能の測定には、GO/NO-GO 課題や、ストループ課題が用いられる<sup>1,2)</sup>。

GO/NO-GO 課題とは、形成実験、分化実験、逆転分化実験の3種からなり、指示された規則に従って光刺激を弁別させる。分化実験から逆転分化実験に移る際に規則が逆転するが、逆転した際には、元の規則を抑制し、規則が変化に応じて正しく反応ができる能力を測定することで、抑制機能の程度を測定する<sup>3)</sup>。

一方ストループ課題は、1935年にStroopによって提唱された色と色名単語の刺激から構成される前頭葉抑制機能測定検査法である<sup>4)</sup>。Cattellにより報告された色の命名はその色名単語の読みと比較して時間を要する<sup>5)</sup>、という事実に基づき考案されたもので、先に入ってくる色名単語の情報を一旦抑制し、その後に入ってくる色の識別に基づいた情報を正確に認識しなければいけないことから、GO/NO-GO 課題と同様に、抑制機能を測定する<sup>6)</sup>。

日本体育大学の正木らの研究室では、健常児童にGO/NO-GO 課題を行った研究を経時的に行った。それによると、児童のGO/NO-GO 課題に対する反応は、発達段階により異なり、低年齢では抑制機能が未熟である「興奮型」が多いのに対し、

\*なりた なおこ 文教大学教育学部学校教育課程特別支援教育専修

\*\*はらだ ゆかり 東京都豊島区立富工見台小学校

\*\*\*ひぐち ひろき 筑波大学大学院人間総合科学研究科感性認知脳科学専攻

\*\*\*\*たぞえ まみ ルーテル学院大学総合人間学部臨床心理学科

\*\*\*\*\*なりた まさあき 三重大学大学院医学系研究科発生再生医学講座



小学校高学年になると抑制機能が発達し課題に正しく反応できる「抑制型」の割合が多くなるとされる。しかし、近年抑制型の出現割合が低下しており、1969年では小学5年生の児童の65%が「抑制型」であったのに対し、1979年には41.7%に減少した<sup>7)</sup>。さらにその後の継続調査において、1984年、1998年と年代が進むにつれ、小学校高学年においてなお抑制機能が十分ではないと考えられる「興奮型」の反応を示す児童の割合が増加していくことが明らかになっている<sup>8)</sup>。

これら抑制機能の向上と発達に、じゃれつき遊びが効果的であると正木らは提唱している。じゃれつき遊びとは、スキンシップを主としており、運動量を確保しながら、コミュニケーションを図る体育的遊びのことである<sup>9)</sup>。正木らの報告によると、幼稚園児を対象に、継続的にじゃれつき遊びを行い、GO/NO-GO課題を施行したところ、1983年9月には10.3%が「抑制型」、つまり抑制機能が十分であると測定されたのに対し、じゃれつき遊び継続施行後1984年3月には、同じ被験者において「抑制型」が47.5%と増加していた<sup>10)</sup>。

従前より、抑制機能を含む前頭葉における実行機能の異常とされる注意欠陥/多動性障害 (attention deficit hyperactivity disorder: 以下 ADHD と略す) 児者においては、GO/NO-GO課題やストループ課題において、抑制機能の低下が報告されている<sup>11-14)</sup>。一方で、ADHDと同様に先天性の脳機能の発達障害であるとされ、社会性やコミュニケーションの障害と常同性が特徴である自閉症スペクトラム (Autism Spectrum Disorders: 以下 ASD と略す) 児においてもストループ課題やGO/NO-GO課題による抑制機能の測定がしばしば試みられている。しかしその結果は報告により様々であり<sup>15)</sup>、BramhamらはASD児においては、必ずしも抑制機能そのものが一律に低下しているわけではなく、注意を喚起するまでの時間の遅延や指示の内容の論理的な組み立ての理解の遅延などが関わる複雑な高次脳機能の

障害がADHDより著明である可能性を論じている<sup>16)</sup>。

特別支援学級には、様々な障害のある児童が在籍するが、その多くはASDやADHD、ダウン症候群など、先天性の脳機能障害のある児である<sup>17,18)</sup>。すなわち、特別支援学級在籍児童の大多数は、抑制機能を含めた何らかの実行機能又は高次脳機能の障害が存在すると考えられる。

そこで本研究では、特別支援学級に在籍する児童において、学級活動の一環としてじゃれつき遊びを行うことの意義について、特別支援学級在籍児童におけるじゃれつき遊び前後での抑制機能の変化を、ストループ課題を用いて測定することを試みた。さらにこの実験を一般化するために、健常成人においても、じゃれつき遊びの有無による、ストループ課題前後での成績の差異を測定し、じゃれつき遊びが即時的に脳機能に与える影響につき検証することとした。

## 対象と方法

### 1. 対象

対象は、茨城県某市立A小学校特別支援学級在籍の児童5名(7~11歳、男子5名)、及び健常ボランティア成人20名(18~21歳、男子4名、女子16名)である。

児童の実験を行う際には、保護者に詳細な説明を行った上で書面による承諾と実験場所である文教大学に來所する協力を得た上で行った。成人については、文教大学特別支援教育専修に在籍する学生のうち、口頭での説明後、承諾を得た者に行った。同実験の内容については文教大学教育学研究科研究倫理委員会の承認を得ている。

### 2. 方法

実験は文教大学において、平成22年5月から平成22年9月にかけて行った。タスク(8分間)の前後にストループ課題(約1分間)を行う実験を児童では一回行った。成人の実験では、順序による実験結果の影響を検討するため実験日を2日

設け、2回の実験を行った。そして被験者を2つのグループに分けてそれぞれタスクにおける刺激の有無の順序を変えて施行した。

〈タスク〉

今回の実験では、正木らの研究と同様に、刺激としてじゃれつき遊びを用いた。児童のじゃれつき遊びは、縦17.4m×横5.8mの教室にスポンジ製のジョイントマットを32枚敷きつめ、その上で行った。成人のじゃれつき遊びは、屋外の十分広い場所で行った。タスクの施行時間は、児童、成人共8分間である。

児童の刺激では、まず、実験者が児童に「くすぐり」を4分間行った。次に、実験者が誘導しながら「レスリング遊び」に移行し、3分間行った。最後に児童の周りを大人が囲み、「おしくらまんじゅう」を1分間行った。

成人の刺激では、まず、しっぽに見立てたポリエチレン製の綴り紐（すずらんテープ）を洋服の腰に挟み、そのしっぽを追いかけて取り合う「しっぽとりゲーム」を7分間行った。この刺激で運動量を確保し、自由に手足を動かしながら遊ぶことをねらいとして設定した。次に、成人全員が背中をつけて腕を組み、「おしくらまんじゅう」を1分間行い、これにより児童での刺激と同等のじゃれつき遊び刺激と設定した。さらに成人の実験においては、室内で座位を保ち安静を同じ時間保つ「刺激なし」の測定の回も設定し、同一被験者で実験日を変えて行った。これらを合わせ、タスクとした。

〈ストループ課題〉

今回の実験で用いた児童用ストループ課題の例を図1に示した。今回は鈴木（2003）の方法を用いて同様に行った<sup>19)</sup>。課題1では、色名单語の読字の能力を確かめるために、被験者にスクリーンに表示された黒インクで書かれた色名单語を提示されると同時に読み上げさせた。課題2では、色の識別能力を確かめるために、スクリーンに表示された長方形が提示されると同時にその長方形の色が何色であるか色名を答えさせた。課題3は

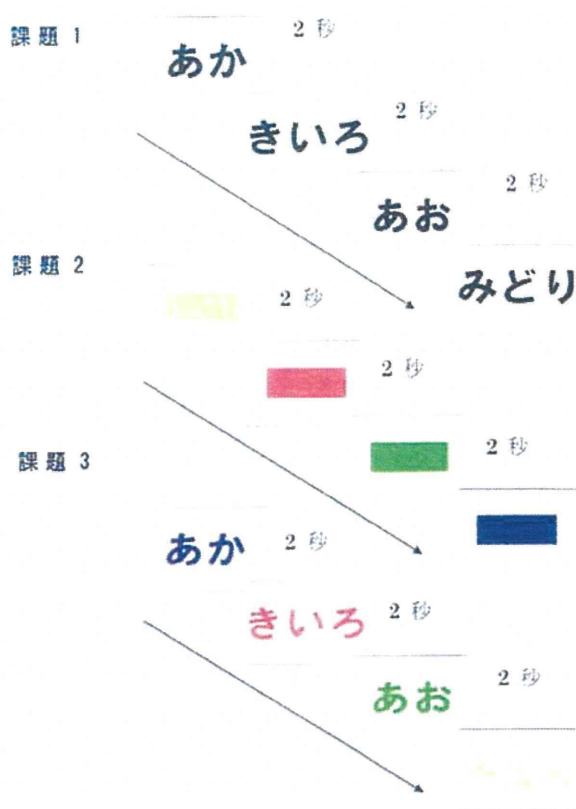


図1 児童用ストループ課題

児童被験者の刺激に用いたストループ課題の例を図示する。課題はPowerPointソフトウェアを用いてパーソナルコンピューターからスクリーンに映し、2秒ごとに計12問を提示した。

不一致課題であり、スクリーンに表示された色名单語が、その色とは異なる色のインクでかかっている。被験者には、色名单語が提示されると同時に、その単語が書かれているインクの色を答えさせた。

提示資料（図1）は、パーソナルコンピューターとスクリーン、プロジェクターを用いて表示して、原稿はPowerPointを用いて、中央に250ポイントの大きさで色名单語をのせた。使う色、色名单語は赤、青、黄色、緑の4色を用いた。

児童1名に対して実験者1名が付き、ジョイントマットの上に、隣り合って座った。実験者は、児童が正しく答えられているか、正しい答えの書かれた記録用紙に○、×を記入し、最後に採点を行った。それぞれの課題において、正解（○）は1点、誤答（×）は0点として12問の合計得点（満12点）を算出した。



次に、今回の実験で用いた成人用ストループ課題の例を図2に示した。今回はSchoroeterらの方法を日本語に変換して行った<sup>20)</sup>。1つのスクリーンに文字が2段で表示される。下の段には色名単語が黒で表示され、指示語となっている。課題1は、色の識別能力を確かめるための課題である。上の段にXXXXが表示され、XXXXの色が下の指示語の色のインクで書かれている場合が正解となり、異なる色のインクで書かれている場合は不正解となる。課題2は、色名単語の文字と実際の色が正しく一致して認識できているか確かめるための課題である。上の段に表示される色名単語と下の指示語として表示される色名単語が同じである。上段の色名単語が指示語の色のインクで書かれていれば正解である。つまり、色名単語とインクの色が同じであれば正解である。課題3は、不一致課題であり、上段の色名単語と下の指

示語の色名単語が異なる。指示語の色のインクで上段の色名単語が書かれていれば正解となる。

提示資料(図2)は、パーソナルコンピューターとスクリーン、プロジェクターを用いて表示して、原稿はPowerPointを用いて、中央に150ポイントの大きさで、2段に色名単語、あるいはXをのせた、使う色、色名単語は児童の実験と同様に赤、青、黄色、緑の4色を用いた。

成人被験者はスクリーンを正面とし、教室の椅子に横4列に座った。そして手を顔の横にあげ、指のサインで回答した。問題が正解の時は人差し指を上げ、不正解の時は人差し指と中指を上げるよう指示した。実験者は、この様子をビデオに録画し、実験後に再生して採点を行った。採点は、児童と同様に正解は1点、誤答は0点で12問の合計得点(満12点)を算出した。

#### 〈結果の解析方法〉

実験を通して得られた結果は、エクセルで集計後、SPSSソフトを使って統計解析を行い検討した。

### 3. 結果

#### 〈児童におけるじゃれつき遊び刺激前後のストループ課題得点の変化〉

児童被験者5名のうち、課題1、3には5名全員が、課題2には4名の児童が参加し、有効なデータが得られた。図3に、児童におけるじゃれつき遊びによる刺激の前後に行ったストループ課題の平均得点を課題ごとにグラフとして示した。また、同じグラフ上に児童全5名のストループ課題得点の平均値(点)をプロットした。課題1では、刺激後に得点が減少したのは被験者Dのみであり、増加したのはEのみであった。全被験者5名の平均得点は刺激前が $11.8 \pm 0.2$ 点(平均値 $\pm$ 標準偏差、以下同じ)であり、これが刺激後では $11.6 \pm 0.4$ 点となった。課題2では、被験者Eの得点が欠損しているため、全被験者は4名であるが、この平均得点は刺激前が、 $12.0 \pm 0.0$ 点であり、刺激後も $12.0 \pm 0.0$ 点と変化はなかった。課題3では、刺激後に得点が減少する被験者はお

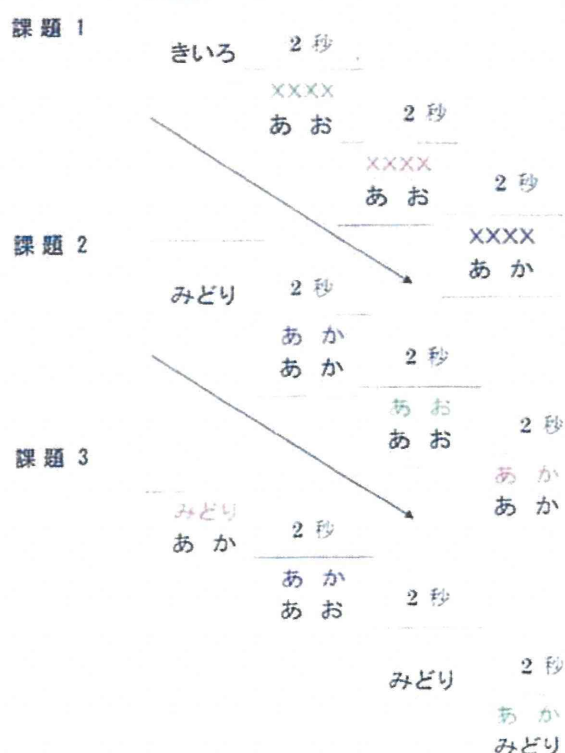


図2 成人用ストループ課題

成人被験者の刺激に用いたストループ課題の例を図示する。課題はPowerPointソフトウェアを用いてパーソナルコンピューターからスクリーンに映し、2秒ごとに計12問を提示した。

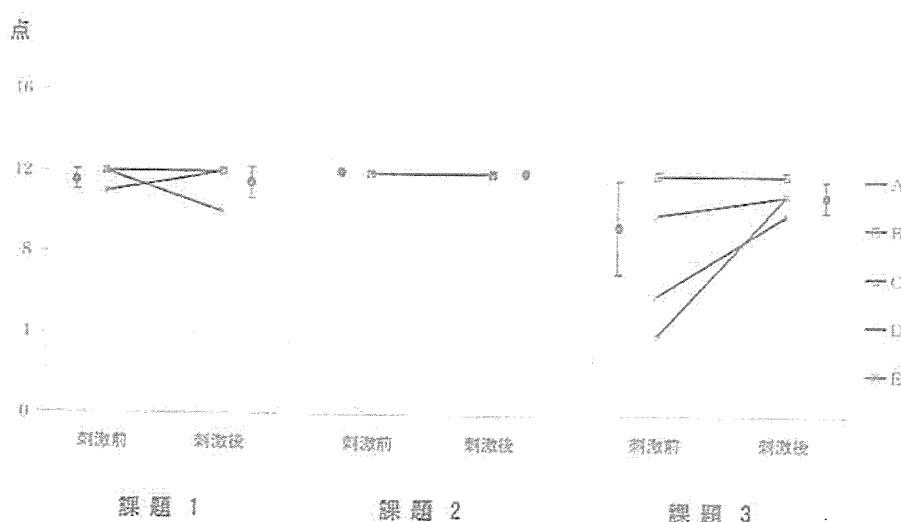


図3 児童における刺激前後のストループ課題得点の変化（個別）  
被験者児童5名のじゃれつき遊び刺激の前後におけるストループ課題（左より課題1, 2, 3）の得点（粗点）の結果を、被験者ごとの折れ線グラフで示した。グラフ内に5名の平均値（●）と標準偏差（I）も示した。

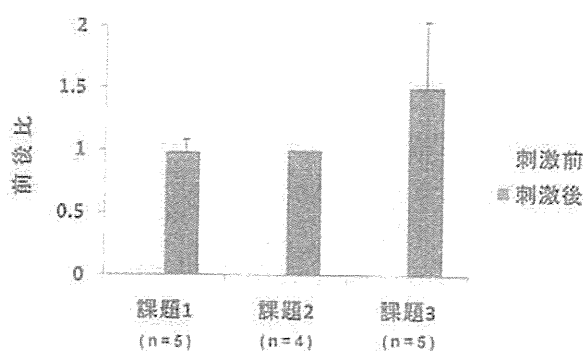


図4 児童における刺激前後のストループ課題得点の変化（前後比）

被験者児童5名のストループ課題1, 2, 3, における得点を、刺激の前後比として算出し、その平均の変化をグラフで表した。後のエラーバーは標準偏差を表す。

らず、全被験者5名が変化なし、あるいは増加した。全被験者5名の平均得点は刺激前が  $8.8 \pm 1.6$  点であり、これが刺激後では  $11.2 \pm 0.37$  点と増加していた。

さらに正確に比較するため、じゃれつき遊び刺激によるストループ課題得点の変化を前後比で表したものが図4である。

ストループ課題1において、全被験者児童5名の前後比平均は、 $0.98 \pm 0.04$  であった。課題2においては、全被験者児童4名の前後比平均は、 $1.00 \pm 0.00$  と変化は見られなかった。課題3においては、全被験者児童5名の前後比は、 $1.5 \pm 0.33$

と上昇した。ただし、いずれにおいても統計学的有意差は認められなかった。

〈成人におけるじゃれつき遊び刺激有無による前後ストループ課題得点の変化〉

被験者成人20名のうち、すべての実験に参加しかつ有効なストループ課題のデータを得られたのは12名であった。

図5に、成人被験者12名におけるじゃれつき遊び刺激あり及び刺激なしのタスクの前後で行ったストループ課題の得点粗点を被験者全員の平均値として課題ごとにグラフとして示した。課題1における刺激ありのタスクの結果、全被験者12名の平均得点はタスク前  $10.7 \pm 0.3$  点、タスク後  $11.3 \pm 0.2$  点（平均値  $\pm$  標準誤差、以下同じ）と増加していた。一方刺激なしのタスクにおいても同様に、前  $11.0 \pm 0.4$  点、後  $11.5 \pm 0.2$  点と増加していた。課題2においても、刺激ありのタスク前後で全被験者12名の平均得点は、前  $10.9 \pm 0.3$  点、後  $11.0 \pm 0.2$  点と増加していた。刺激なしタスクの課題2においても同様に、前  $11.0 \pm 0.3$  点、後  $11.1 \pm 0.3$  点増加していた。課題3では、全被験者12名の平均得点は、刺激前が  $10.75 \pm 0.33$  点であり、これが刺激後では  $11.25 \pm 0.13$  点と増加していた。また、刺激なしでは、前が  $11 \pm 0.27$



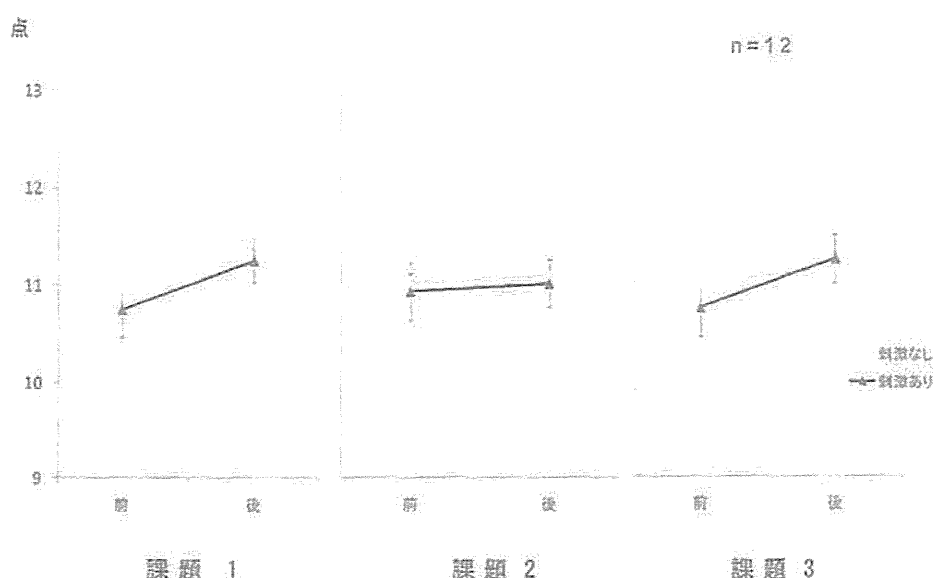


図5 成人におけるストループ課題得点の変化 (タスク間比較)

成人被験者12名におけるタスクの前後でのストループ課題の得点粗点の平均値の変化を示す。エラーバーは標準誤差を表す。  
「刺激なし」とはじゃれつき遊び刺激を行わなかったタスクでの結果を表し、「刺激あり」とはじゃれつき遊び刺激を行ったタスクでの結果を表す。

点であり、後では  $11.16 \pm 0.21$  点と増加していた。いずれにおいても群間の有意な差は認められなかった。

この被験者12名の平均得点を、タスク前を1として前後比で表したものが図6である。

ストループ課題1における、刺激なしのタスクでの前後比は  $1.05 \pm 0.28$  であり、じゃれつき遊び刺激ありでは、 $1.05 \pm 0.26$  であった。これはいずれも Wilcoxon の符号付き順位検定により前後で有意差 (刺激あり  $z = -2.10$   $p = 0.03$ , 刺激なし  $z = -2.01$   $p = 0.04$ ) が認められた。ストループ課題2において、刺激なしの前後比は  $1.01 \pm 0.24$ 、刺激ありの前後比は  $1.01 \pm 0.33$  といずれも有意差は認められなかった。また、ストループ課題3においては、刺激なしタスクでの前後比が  $1.02 \pm 0.22$  と有意差を認めなかったのに対し、じゃれつき遊び刺激ありのタスクでは、前後比が  $1.06 \pm 0.29$  となり、これは Wilcoxon の符号付き順位検定で有意差 ( $z = -2.11$   $p = 0.03$ ) が認められた。

次に、実験順によるストループ課題の得点結果への影響について検討するため、タスクごとではなく、実験順に結果を分類して表1に示した。刺

激の種類に関わらず被験者が第1回目に行った実験でのタスク前のストループ課題1の全被験者12名の平均得点は  $10.58 \pm 0.31$  点 (平均値  $\pm$  標準誤差、以下同じ) であり、これが第2回目の実験では  $11.17 \pm 0.30$  点と増加しているものの、有意な差は認められなかった。一方、タスク後に行った実験でのストループ課題1の平均得点は、第1回目の実験では  $11.08 \pm 0.22$  点、第2回目では  $11.67 \pm 0.14$  点となり、これは Wilcoxon の符号付き順位検定により有意な差 ( $p = 0.04$ ) が認められた。一方課題2においては、前の第1回が  $10.83 \pm 0.32$  点、第2回  $11.08 \pm 0.26$  点となり、後では第1回が  $10.92 \pm 0.26$  点、第2回  $11.17 \pm 0.27$  点とやはりいずれも第2回で増加したが有意な差は認められなかった。さらに、ストループ課題3においても、前の第1回が  $10.67 \pm 0.36$  点であり、第2回  $11.08 \pm 0.23$  点、後では第1回が  $11.00 \pm 0.17$  点、第2回  $11.42 \pm 0.15$  点であった。こちらも第2回で増加したが有意な差は認められなかった。ストループ課題1のタスク後の結果のみが実験順による影響があると考えられた。

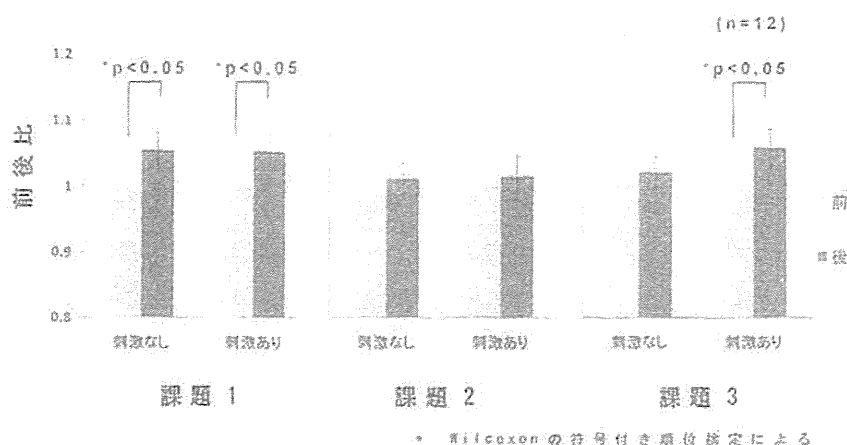


図6 成人におけるストループ課題得点の変化（前後比）

成人被験者12名のストループ課題1, 2, 3. における得点を、タスクの前後比として算出し、その平均の変化をグラフで表した。後のエラーバーは標準偏差を表す。有意差を検出した項目

表1 実験順がストループ課題得点に与える影響

実験順	課題1前	課題1後	課題2前	課題2後	課題3前	課題3後
第1回 (n=12)	10.58 ± 0.31	11.08 ± 0.23	10.83 ± 0.32	10.92 ± 0.26	10.67 ± 0.36	11.00 ± 0.17
第2回 (n=12)	11.17 ± 0.30	11.67 ± 0.14	11.08 ± 0.26	11.17 ± 0.27	11.08 ± 0.23	11.42 ± 0.15
*	p=0.190	p=0.042	p=0.551	p=0.512	p=0.334	p=0.082

(平均値 ± 標準偏差)

\*student t検定による

成人全被験者12名におけるストループ課題の得点結果を、実験順により分類し表に表した。「課題前」とは、タスクの種類に関わらず、タスク施行前に行った課題における全被験者の平均得点であり、「課題後」とはタスク施行後に行った課題における全被験者の平均得点である。

## 考 察

今回の実験では、タスクとして用いたじゃれつき遊びがストループ課題の成績へ与える影響について、特別支援学級に在籍する児童における実験と、成人を用いた刺激の有無を加えた詳細な実験の二種類から検証を行った。その結果、児童においても成人においても、ストループ課題3での得点の前後比がじゃれつき遊びが刺激として加わると大きく上昇することが示唆された（図4, 6）。特に成人においては、じゃれつき遊び刺激のあるタスクでは、ストループ課題3で前後に有意差が検出されたが、じゃれつき遊び刺激のないタスクでは認められなかった。この結果は、じゃれつき遊び刺激が、ストループ課題3を施行する際に要する脳機能、すなわち前頭葉抑制機能を賦活する

効果があることが示唆される。

ストループ課題において、課題1では、色名単語が正しく読むことができるかを確かめ、課題2では、色を正しく認識できているかを確かめる。この2つの課題で、色と色名を正しく判別することができるか、を確認した上で、課題3を行う。課題3においては先に入ってくる色名単語の情報を抑制し、色を命名するため、前頭葉に存在する抑制機能の程度が課題遂行に大きく影響するが、課題1と課題2では、抑制する情報は含まれないため、通常刺激の前後で成績が変化することはない<sup>21-23)</sup>。したがって、今回の実験において、児童・成人共に課題3で刺激の前後での課題得点が変わったことは、この刺激、すなわちじゃれつき遊びが、実行しやすい反応を抑制し、指示された課題の遂行を行うという抑制機能の賦活に寄与した可



能性を示唆するものである。

じゃれつき遊びとは自由に四肢を動かして人と人が接触しながら運動することであるが、このような運動には興奮を高める効果がある。ここで高まった興奮を抑えるために、抑制機能が働かず、つまり、興奮が高まらなければ、抑制機能が発達しないことが報告されている<sup>24)</sup>。今回の実験からは、じゃれつき遊びがストループ課題で測定した抑制機能の成績を向上させる。すなわち行うことで脳機能を短時間で活性化することが期待される結果が得られた。さらに、じゃれつき遊びには人と人が直接接触することにより発生するコミュニケーション能力や社会性の向上への効果など複合的な効果も期待されることが考えられる。

今回の児童における実験では障害のある特別支援学級在籍の児童のみを対象とし、被験者の人数も5名と僅少であったため、児童の実験結果のみではその実験内容の正当性を証明することができなかった。そのため今回、成人の健常被験者を解析に耐えうる人数集めて、様々な条件を設定した実験を行い多面的な解析を行うこととした。その結果、成人のストループ課題の成績では、図6に示されるように課題3のみでなく、課題1においてもタスク後の得点の増加が認められ、これは刺激の有無いずれの実験においても有意な差を検出した。ストループ課題1と課題2は通常ベースライン測定の目的で行われる実験であり、読字と色の識別能力を測定するために行われ、刺激の前後で変化することがないと報告されている<sup>24)</sup>。しかし、今回の実験で課題1において前後での有意差が認められた理由としては、表1に示したように、実験順による影響が考えられる。ストループ課題1から3、すべてにおいて第1回に行った実験より第2回に行った実験での平均得点が上昇していた。この影響を排除するためグループを半数ずつに分け実験順を変えたが、課題1では、特に3種類の課題中最初に行われる課題であるため、実験順での影響が最も大きく、有意な差が検出された。このことが、前後での有意差の原因になっ

たと考えられる。一方課題2と課題3で第1回と第2回の得点において有意な差がみられなかった理由としては馴化が考えられ、課題2と課題3では、実験順の影響は課題1に比べ小さかったものと考えられる。その上で実験順により二群に分けたグループでの結果を刺激の有無によって合わせたものである。課題3での刺激による前後の有意差(図6)は、他の課題と比較して特異的な刺激の効果、すなわちじゃれつき遊びの影響であると考えることが妥当であると考えられる。以上より、今回の実験結果より、じゃれつき遊びには一定の効果があると推論することが可能である。

Benesse®教育開発センターが2008年に行った、小学生の「放課後の生活時間調査」では、小学生の遊び時間合計の平均が一日あたり43.9分であり、そのうち屋外での遊び時間はわずか14.0分、テレビゲームが16.8分、室内での遊びが13.1分という結果であったことが報告されている<sup>25)</sup>。この現状と今回得られた結果を踏まえれば、現代の児童期の生活は以前に比較して自発的なじゃれつき遊びの機会を減少させるものとして、その脳機能の発達に影響を与えることが憂慮される。特に、前頭葉抑制機能を初めとする実行機能の先天的な欠陥がその本態であるADHD児やASD児においては<sup>11-14)</sup>、とりわけ発達期での環境からの刺激がその将来像に大きく影響されるため、このような社会全体における遊びの減少傾向は、このような障害のある児の予後に影響する可能性がある<sup>25)</sup>。

従って、周囲の養育者や教育者は心構えとして、児童が自発的にじゃれつき遊びを始めるのを待つだけではなく、むしろ学級活動や日常生活の中で意識的、積極的にじゃれつき遊びを導入するように関わることで、児童における抑制機能を初めとする前頭葉機能を発達・向上させるために重要であることを意識したい。

## 謝 辞

本研究を実施するにあたりご協力いただいた被験

者、学校関係者、児童の皆様様に感謝しここに記す。

# 【引用・参考文献】

- 1) 小川純子 幼児期における心の理論と実行機能の発達. 京都大学大学院教育学研究科紀要, 53, (2007), 325-337.
- 2) Hill, EL. Executive dysfunction in autism. *TRENDS in Cognitive Sciences*, 8, (2004), 26-32.
- 3) 正木健雄・森山剛一 人間の高度神経活動の型に関する研究. 東京理科大学紀要(教養編), 4, 69-81 (1971)
- 4) Stroop, JR. Studies of interference in serial verbal reactions. *Journal of Experimental Psychology*, 18, (1935), 643-661.
- 5) Cattell, JM. The Time it Takes to See and Name Objects. *Mind*, 11, (886), 63-65.
- 6) 池田吉史・奥住秀之 健常児及び発達障害児におけるストロープ課題の干渉抑制能力に関する文献検討. 東京学芸大学紀要, 61, (2010), 237-249.
- 7) 西條修光・森山剛一・巖斗謙一他 子どもの大脳活動の変化に関する研究—高度神経活動の型から— 日本体育大学紀要, 10, (1981), 61-68.
- 8) 寺沢宏次・西條修光・柳沢秋孝 他 GO/NO-GO 実験による子どもの大脳発達パターンの調査—日本の'69-'79, '98と中国の子どもの'84の大脳活動の型から—, 生理人類学会誌, 5, (2000), 47-54.
- 9) 正木健雄 (2004) 脳を鍛えるじゃれつきあそび. 小学館
- 10) 西條修光・寺沢宏次・正木健雄 幼児における大脳活動の発達—高度神経活動の型から—, 日本体育大学紀要, 14, (1984), 25-30.
- 11) Rubia, K, Smith, AB, Brammer, MJ, et al. Abnormal Brain Activation During Inhibition and Error Detection in Medication-Naive Adolescents With ADHD. *American Journal of Psychiatry*, 162, (2005), 1067-1075.
- 12) Negoro H, Sawada M, Iida J, et al. Right prefrontal brain activation due to Stroop interference is altered in attention-deficit hyperactivity disorder - A functional near-infrared spectroscopy study. *Child Psychiatry and Human Development*, 41, (2010), 193-203.
- 13) Banaschewski T, Ruppert S, Tannock R, et al. Colour perception in ADHD. *Journal of Child Psychology and Psychiatry*, 47, (2006), 568-72.
- 14) 中山利美・眞田敏・柳原正文 他 注意欠陥/多動性障害および広汎性発達障害におけるストロープ効果の検討 岡山大学教育実践総合センター紀要, 7, (2007), 157-164.
- 15) Hill EL. *Trends in Cognitive Science*, 8, (2004), 26-32.
- 16) Bramham J, Ambery F, Young S, et al. Executive functioning differences between adults with attention deficit hyperactivity disorder and autistic spectrum disorder in initiation, planning and strategy formation. *Autism*, 13, (2009), 245-64.
- 17) 小沼和 特殊学級の現状と問題点 教育学研究, 36, (1969), 67-74.
- 18) 高橋智・前田博行・千賀愛 他 日本における特別なニーズ教育概念の検討—その理念, 領域, 対象, ケア・サービス—東京学芸大学紀要, 51, (2000), 199-218.
- 19) 鈴木美枝子 注意欠陥/多動性障害児の学齢期における認知処理過程 筑波大学大学院教育研究科障害児教育専攻修士論文 (2003)
- 20) Schoroeier ML, Zysset S, Wahl M et al. Prefrontal activation due to Stroop interference increases during development—an event-related fNIRS study. *Neuroimage*, 23, (2004), 1317-1325.
- 21) Kane MJ, Engel RW. Working-Memory Capacity and the Control of Attention: The Contributions of Goal Neglect, Response Competition, and Task Set to Stroop Interference. *Journal of Experimental Psychology*, 132, (2003), 47-70.
- 22) Kahneman, D, Chajczyk, D. Tests of the Automaticity of Reading: Dilution of Stroop Effects by Color-Irrelevant Stimuli. *Journal of Experimental Psychology. Human perception and performance*, 9, (1983), 497-509.
- 23) Adelman NE, Menon V, Blasey CM, et al. A Developmental fMRI Study of the Stroop Color-Word Task. *Neuroimage*, 16, (2003), 61-75.
- 24) 土田 宣明 抑制機能の分類に関する研究 立命館文学, 599, (2007), 100-109.
- 25) 第2回子ども生活実態基本調査 Benesse教育研究開発センター (2009) [http://benesse.jp/berd/center/open/report/kodomoseikatu\\_data/2009/index.html](http://benesse.jp/berd/center/open/report/kodomoseikatu_data/2009/index.html) (2011年6月21日現在)
- 26) 田中康雄 注意欠陥/多動性障害の現状と支援 精神保健研究, 50, (2004) 25-35.



## 2

自閉症スペクトラムの  
前頭葉機能

文教大学教育学部 特別支援教育専修 成田奈緒子

## Point

- 自閉症スペクトラムは、社会性の障害、コミュニケーションの障害、および反復常同性の3点を共通した臨床症状として示す障害群の総称である。
- 前頭葉機能を含む高次脳機能の先天性異常が存在すると考えられているが、必ずしも課題遂行率が低いわけではないことが報告されている。
- 特にワーキングメモリ課題遂行に際しては前頭葉を用いない神経ネットワークを用いた処理が自閉症スペクトラム者では報告されている。
- 著者らのNIRSを用いた実験においても、自閉症スペクトラム者におけるワーキングメモリタスクでの異所性の活性化、もしくはdefault mode networkingの抑制不全の可能性が示唆された。

## ① 自閉症スペクトラムの概念

1943年にアメリカのカナーが初めて報告した「早期自閉症（Early Infantile Autism）」の概念は、それまでの疾病カテゴリーにはなかった、新しい疾患の単位として世界的に認められるようになった<sup>1</sup>。その後1990年代後半になってイギリスのウィングが、特に認知や感覚に関する脳の先天的な機能障害という共通の発症機序に基づく一連の疾患群として自閉症スペクトラムという概念を提唱した<sup>2</sup>。これは、重度の自閉症から高機能自閉症、アスペルガー症候群、さらにその周辺にあるどちらの定義も厳密には満たさない一群までを一つの連続した障害として捉え、①社会的相互関係の障害、②コミュニケーション能力の障害、③反復常同的あるいは執着的行動の3領域に障害があることを共通の定義とする。自閉症スペクトラム者では知的障害がなくても同調や集団行動が難しく、独特な世界観を持つことで社会適応が困難である。また、コミュニケーションにおいても相手の言葉の裏にある本意を読み取ることや比喻など

の高度なスキルが身に付かないために生活場面での困難さがしばしば生じる。

② 脳機能イメージング法を用いた  
自閉症スペクトラムの脳機能解析

自閉症スペクトラムの成因は未だ不明である。その広汎な臨床像の初期発生に関与している要因としては、遺伝要因や胎生期の化学物質への暴露や感染など、現在までに多くの仮説が報告されている<sup>3-5</sup>。いずれにせよその結果として主に前頭葉がかかわる高次脳機能の発達の異常・遅延が引き起こされ、共通した臨床像がもたらされと考えられている。自閉症スペクトラム者においては前頭葉の高次機能のなかでも特に心の理論、統合的一貫性、そして実行機能の障害が程度の多寡はあれ共通して存在すると考えられている<sup>6</sup>。心の理論とは、文章の言外の意味を読み取り認知したうえで、行動や言動に反映させる能力のことである。たとえば同室の人物の「テレビの音がうるさいな」という言葉を聞いて自発的にテレビのボ



リュームを下げる行動を行う、というように、心の理論は円滑な人間同士の社会生活を行ううえでは必須の能力である。自閉症スペクトラム者においては、心の理論課題においてその課題遂行率は常に健常群と比して低下しており、fMRIを用いた検討においては、「心の理論」課題遂行中の自閉症スペクトラム者において責任部位とされる左側の前頭前野 (medial prefrontal cortex: mPFC) の活性が健常者に比較して低下していることが報告されている<sup>12</sup>。

一方、自閉症スペクトラム者ではしばしばみられる臨床症状である不注意や多動性・衝動性、そして場にそぐわない言動や行動には実行機能異常が大きくかかわっていると考えられている。実行機能とは、将来の目標を達成するために、適切に問題処理をこなしていく神経認知的な処理過程のことを指す。この実行機能にかかわっている脳の部位は視床や大脳基底核と前頭葉を含んで広く分布しており、現在の自分の状況を判断して、これまでの経験や近い過去の記憶、すなわちワーキングメモリ (WM) と統合することによって、自分にとってもっとも適切な行動、言動を導き出す働きを行う。

WMについては、古くから自閉症スペクトラム者では機能低下が認められるとされてきた<sup>9~11</sup>。WMの責任部位である背外側前頭前野 (dorsolateral prefrontal cortex: DLPFC) の賦活の低下も報告されたが<sup>12</sup>、その後詳細な検討が増えるにつれ、タスクの種類や難易度によっては健常者と同等の能力を有するとする報告も増えてきた<sup>13~15</sup>。この機序についてはごく最近、比較的難易度の低いWMタスクでは、視覚を用いた下位のネットワークの利用による課題の遂行が優位になり、自閉症スペクトラム者ではDLPFCとは異なる異所性の脳部位の活性化を伴い、機能を補っている可能性も示唆されている<sup>16,17</sup>。

### ③ NIRSを用いた自閉症スペクトラム者の脳機能解析—ワーキングメモリ機能関連の connectivity の違いとは—

近年NIRSを用いた脳機能の知見が多く得られてきているが、自閉症スペクトラム者における研究はきわめて数が少ない。Kuwabaraらのグルー

プは、自閉症スペクトラム者における語彙流動性試験において健常者と比較して前頭葉の酸素化ヘモグロビン (Hb) 濃度の上昇が少なく、同胞で健常者との中間値を示すことを報告した<sup>18,19</sup>。WMタスクを施行している際のNIRSでの前頭葉の酸素化Hb濃度変化に関しては、統合失調症と健常者の比較の報告が最近になって散見されるが、一貫した結論は得られていない<sup>20,21</sup>。

著者らは、自閉症スペクトラム者における、特に異所性のWM処理の可能性や、実際に臨床や教育現場での自閉症スペクトラム者における課題間切り替えの苦手さに着目し、NIRSを用いて彼らのタスクの切り替えに伴う前頭葉血流変化の測定を試みるために、図1に示すようなタスクを作成した<sup>22</sup>。まず、異なる色と形の図形を3種類、3秒ごとに連続してコンピューター画面に刺激提示して記憶させ、その後8個の図形を表示した画面上から、先に提示された図形を探索し順番どおりに指で示す課題 (ワーキングメモリ課題: WM task) を行う。引き続いて8個の図形を表示した画面上から、同じ画面の上部枠内に示した図形を配置の順番どおりに探索し、指で示すという課題 (ノンワーキングメモリ課題: NWM task) を行う。この間NIRS (NIRO-200, 浜松ホトニクス) を装着し、前頭葉における酸素化Hb、脱酸素化Hb、総Hbの濃度変化を毎秒ごとに測定した。図2に、このタスクを連続して行った際の各パラメーター変化の代表例のグラフを示す。被験者は、健常46歳女性 (図中 control と示す)、および複数の専門医により自閉症スペクトラム (高機能自閉症) の診断を受けた46歳女性 (図中 ASD と示す) である。いずれの被験者も右利きである。健常女性においては、WMタスク探索時間に一致して酸素化Hb濃度の上昇と脱酸素化Hb濃度の下降を認め、WM賦活による前頭葉の血流増加が明らかであった。一方自閉症スペクトラム女性ではこの変化がまったく認められず、WMによる前頭葉の活性の障害が予測される。また、その後のNWMタスク開始に伴い健常女性においては酸素化Hb濃度の低下が認められるのに対し、自閉症スペクトラム女性においてはこの傾向も観察されなかった。このように明確なNIRS上での差異が認められたにもかかわらず、課題の正答率は両被験者ともWMタスク66.7%、NWMタスク100%と差異



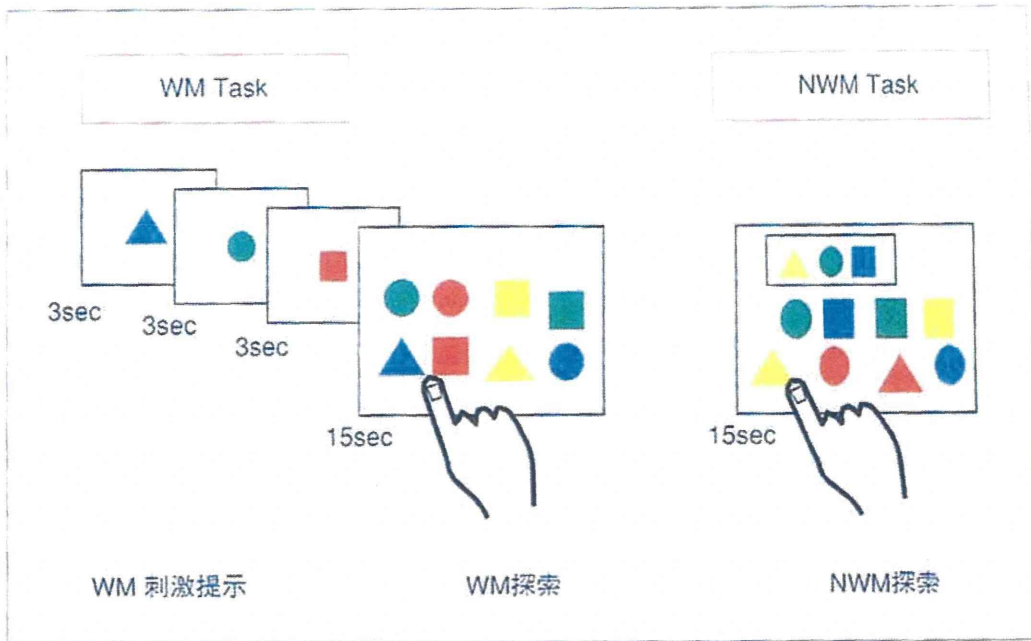


図1 タスク概要のシェーマ

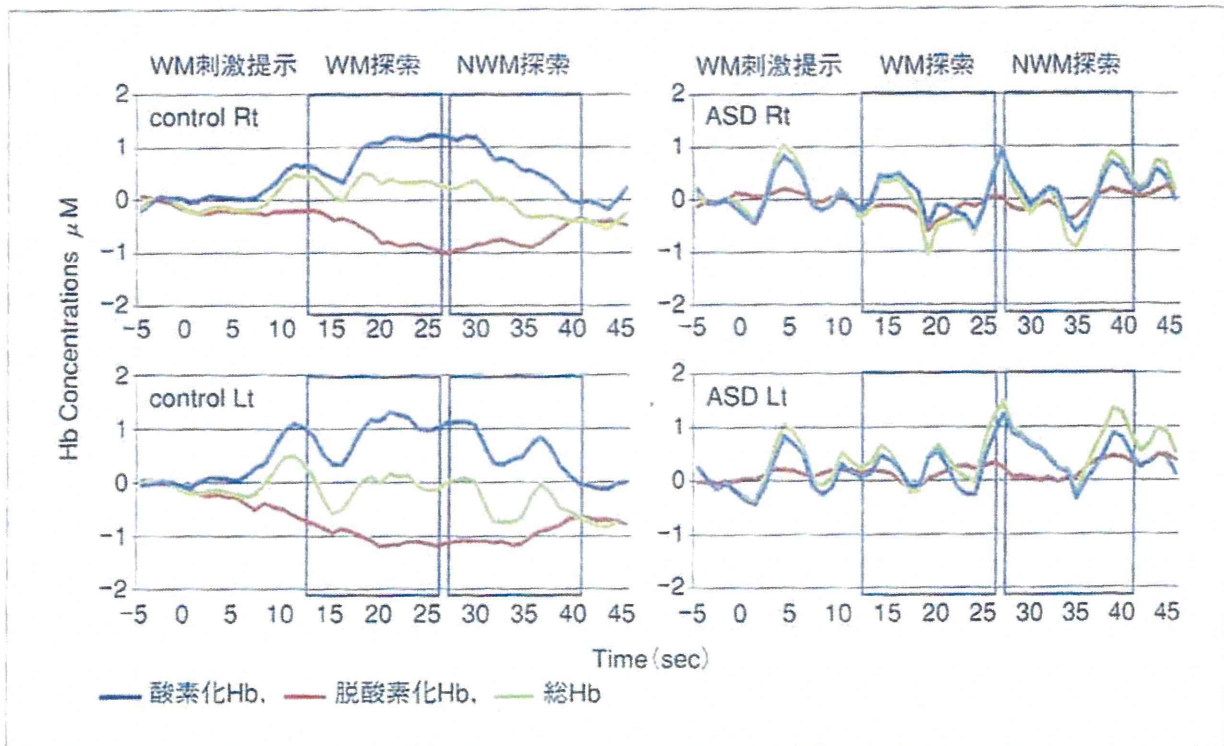


図2 46歳女性健常者(control)と46歳女性自閉症スペクトラム者(ASD)における、各タスク遂行時の右側(上段)および左側(下段)のNIRSパラメーターの変化

がなかった。このことは、WM遂行において前頭葉機能を賦活させていないがタスクそのものは遂行されている。すなわち前述の自閉症スペクトラム者における異所性のWM処理機能の存在を示

唆するものである。しかし、NIRSの連続測定から得られた自閉症スペクトラム女性における酸化Hbの濃度変化の波形はWM探索時間のみならず、WM課題提示時間とNWM探索時間でも同

様の周期性の波形変化を示しており、当該部位における継続的で不規則な活性化が起こっていることを示唆する。

近年、default mode network (DMN)、すなわち外部からの刺激を遮断している状態 (resting state) での脳内の神経ネットワークの活動が注目されている<sup>22,23</sup>。この際には主に mPFC を中心として superior frontal gyrus, parahippocampal gyrus の connectivity などが観察されるが、これらは外部からの刺激が入力されるとそれに応じて速やかに抑制され、刺激に応じた神経ネットワークが代わって賦活されることが特徴である。これまで、安静時とタスク刺激時での脳活動の差異を健常群と疾患群で比較検索する研究が主流であったが、近年 DMN を考慮に入れ、さまざまな精神神経心理疾患において、タスク刺激時に DMN 部位の抑制ないしは deactivation の障害が関連するとの研究報告が増加してきている<sup>24</sup>。たとえば PTSD 児において Daniels らは、WM タスクを施行し、安静状態からタスクをかけた際の fMRI による脳機能の「スイッチング」変化を測定した<sup>25</sup>。その結果、健常者においては DMN による mPFC の賦活はタスク開始とともに抑制され、本来の WM で賦活されるべき DLPFC などの部位の活性が観察されたのに対し、PTSD 者では DMN が抑制されないことによると考えられる superior frontal gyrus, parahippocampal gyrus へのネットワークが観察され、健常とは大きく異なる結果が得られた。

さらに、自閉症スペクトラムにおいても、Kennedy らはストループ課題施行時に、DMN 部位の deactivation が起こらないことを fMRI を用いた研究で報告している<sup>27</sup>。DMN で通常賦活化される mPFC は心の理論課題遂行における責任部位でもあることから、DMN の抑制障害によって自閉症スペクトラムの成因の一端を説明できる可能性もある。

ごく最近では、NIRS を用いた DMN の研究も行われはじめており<sup>28,29</sup>、安静時における酸素化 Hb、脱酸素化 Hb 変化の波形の存在を報告している。これらはまだ報告数が少なく、一致した結論はまだ出されていないが、著者らが観察した自閉症スペクトラム者における、WM 刺激提示時、WM 探索時、そして NWM 探索時に一貫した周期

性の波形は、Lu らの報告した NIRS を用いた sensorimotor 部位における resting state の波形ときわめて類似していることは興味深い<sup>28</sup>。

NIRS は非侵襲的であると同時に、非拘束的であることがその最大の特徴であるといえる。このため、連続的に長時間の測定を行うことが可能であり、繰り返し複数のタスクを施行してその時間的变化を測定することも可能である。著者らの研究は preliminary なものであり断定できるものではないが、タスクの切り替えに伴う DMN の抑制と局所の deactivation の遅延または欠如を反映した結果とも考えられるため、今後症例数を増やし、自閉症スペクトラム者において統括的に、タスクの切り替えに伴う NIRS 派形の変化の健常者との差異を検討していき、異所性の functional connectivity との可能性も含めて検索したいと考えている。

## 文 献

- 1) Kanner L. Autistic disturbances of affective contact. *Nervous Child* 2 : 217-250, 1943
- 2) Wing J. The autistic spectrum. *Lancet* 350 : 1761-1766, 1997
- 3) Rodier PM, Ingram JL, Tisdale B, et al. Linking etiologies in humans and animal models : studies of autism. *Reprod Toxicol* 11 : 417-422, 1997
- 4) Ingram JL, Peckham SM, Tisdale B, et al. Prenatal exposure of rats to valproic acid reproduces the cerebellar anomalies associated with autism. *Neurotoxicol Teratol* 22 : 319-324, 2000
- 5) Miyazaki K, Narita N, Narita M. Maternal administration of thalidomide or valproic acid causes abnormal serotonergic neurons in the offspring : implication for pathogenesis of autism. *Int J Dev Neurosci* 23 : 287-297, 2005
- 6) Deuel RK. Autism : a cognitive developmental riddle. *Pediatr Neurol* 26 : 349-357, 2002
- 7) Fletcher PC, Happe F, Frith U, et al. Other minds in the brain : a functional imaging study of "theory of mind" in story comprehension. *Cognition* 57 : 109-128, 1995
- 8) Happe F, Ehlers S, Fletcher P, et al. "Theory of mind" in the brain. Evidence from a PET scan study of Asperger syndrome. *Neuroreport* 8 : 197-201, 1996
- 9) Minschew NJ, Luna B, Sweeney JA. Oculomotor evidence for neocortical systems but not cerebellar