

条体ドーパミン量の増加が見られ、チメロサルバルばく露の影響は胎生期から生後にわたってセロトニンおよびドーパミンの神経発達に影響を及ぼすことが示された。

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 |

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

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 21~23 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

本分担研究では、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、化学物質の胎内ばく露による情動・認知行動への影響を明らかにするとともに、より客観的な発達障害診断法の開発を目的とした。全期間を通して、(1) 評価用遺伝子の実験的選定と独自のマイクロアレイへの応用、(2) 独自アレイを用いた胎生期化学物質ばく露動物の脳における発達異常の検出、(3) 注意欠陥多動性障害 (ADHD) 様行動異常を示すマウスでの原因究明、(4) 培養細胞を用いたより簡便な評価系の検討、を行った。

(1)では、脳の機能的発達に必須の甲状腺ホルモンに制御される遺伝子群および脳の特徴である神経活動依存性遺伝子群に注目し、新たな遺伝子を抽出した。(2)では、胎生期サリドマイドばく露による自閉症モデルラットおよび胎生期・生後初期トリブチルスズ(TBT)ばく露ラット、の二種類の動物を用いた。前者では大脳皮質および海馬におけるセロトニン受容体の発現変化など、セロトニン神経伝達システムの発達異常と、生後 20 日を中心とする遺伝子発現プログラムのずれを検出した。後者では、大脳皮質に比較して中脳での発現変化が大きく、TBT ばく露を止めても中脳では持続的な影響が残ること、発達期のばく露が成熟後の TBT 感受性を高めることなどを見出した。(3)では、ADHD 様行動異常と脳における甲状腺ホルモン代謝との関連を示す結果を得た。(4)では E18 ラット大脳皮質由来の初代培養神経細胞系を用いて、細胞死には至らない低濃度 TBT のばく露による樹状突起形成やシナプス形成の抑制を示すことができた。

これらの研究を通して、発達期脳における異常を検出するための新たな評価遺伝子を提案した。

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、解析効率、コストなどに課題が残り、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) に応用してその有効性を実証している。

本分担研究では、海馬切片培養を用いた評価用遺伝子の実験的選定を続けるとともに、新たに見出した数種類の神経活動依存性遺伝子を追加してバージョンアップしたオリジナル DNA マイクロアレイを作成して使用する。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」およびトリブチルスズ (TBT) を胎生期 - 哺乳期にばく露したラットの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独自のマイクロアレイを用いて解析し、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。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法を確立する。また、ヒトへの応用を目指し、血液あるいは脳脊髄液を材料に、脳で起きている変化を反映して変動するバイオマーカーを探索する。

A. 研究方法

1. 化学物質胎生期ばく露ラットの作成: サリドマイド誘発自閉症モデルラットおよび胎生期 - 生後初期トリブチルスズばく露ラットを作成し、使用した。

(a) サリドマイド誘発自閉症モデルラットは、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。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。

(b) 胎生期 - 生後初期トリブチルスズ (TBT) ばく露ラットは、妊娠 2 日目から出産後 3 週まで、母ラットに 25ppm または 125 ppm の TBT クロライドを混餌投与して作成した。TBT を含まない通常餌を与えた親から生まれた仔を対照群とした。生後 3 週間で離乳後は、TBT を含まない通常餌に切り替えて生後 6 週まで飼育した。さらに、生後 6 週~9 週まで TBT を含む餌を直接投与することにより、成熟後ばく露群と再びばく露群を作成した。3、6、9 週の各時点で各群の仔ラット (♂) から、大脳皮質、中脳、および海馬を採取した。

2. オリジナル DNA マイクロアレイ「シナプトアレイ ver.7」の作製: 神経突起やシナプスの構造と機能、神経伝達、細胞周期と細胞死、ミトコンドリア機能、などに関与する遺伝子約 500 を選び、それぞれに特異的かつ 56-67% の GC 含量を持つ 45 塩基長のプローブ配列を選定し、合成を依頼した (日本 EGT 社)。高精度アレイヤーを用いて、これらのプローブを特殊コーティングされたスライドガラス (日清紡、Carbostation) 上にスポットティングした。一枚のスライドガラス上に各プローブは場所を変えて 6 回スポットされている (図 1)。

3. アレイ用標識 cRNA の作製とハイブリダイゼーション: 胎生期曝露動物の各個体より採取した脳組織から Trizol 試薬を用いて total RNA を抽出し、キャピラリー電気泳動で品質検定を行った。各 total RNA 標

品は、T7 RNA ポリメラーゼのプロモーター配列を含む oligo dT プライマーを用いて逆転写し、cDNA を調製した。この cDNA を鋳型とし、アミノアシル UTP を基質に添加して、アミノアシル U を含む cRNA を増幅した (タカラバイオ社、SureLABEL core kit)。増幅したアミノアシル cRNA に、蛍光色素 Cy3 または Cy5 を反応させ、蛍光標識 cRNA を作製した。アレイにハイブリダイズする直前に、混合した標識 RNA を断片化した (Ambion 社、断片化試薬)。

実験ごとに、使用する各時点の対照群の Cy5 標識 RNA を等量混合し、標準 RNA とした。ハイブリダイゼーション・チャンバー (Agilent Technologies 社) にセットした一枚のシナプトアレイに対し、Cy5 標識標準 RNA 1 μ g と比較する Cy3 標識 RNA 1 μ g を混合して 500 μ l としたものを注入し、55°C、16 時間、ゆっくりと回転しながら反応させた。反応後、アレイを取り出して、順次、濃度を下げた SSC で洗浄した後、窒素ガスを噴射して乾燥させた。

大集積アレイとしては Agilent 社のラット用アレイ (44,000 プローブ) を使用し、上記と同様に cRNA を作成後、Cy3 のみで標識し、各サンプル単独で上記と同様にハイブリダイゼーションを行った。

4. アレイ・データの取得と解析 : 「シナプトアレイ」の場合は、反応後のマイクロアレイを DNA Scope IV (Gene Focus 社) を用いて Cy3、Cy5 両波長域で蛍光スキャンし、得られた蛍光強度データを ImaGene ソフトウェア (Biodiscovery 社) で定量化した。データは、アレイ上の 6 種類の標準遺伝子 (*rpL3*, *rpL13a*, *rpL22*, *rpL23*, *Ppia*, *ubiquitin1e*) の値を用いて標準化した。

市販の大集積アレイの場合は、Agilent 社の専用スキャナーで読み取り、global

standardization 法で標準化した。

5. 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ラーター 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 β -actin を内部標準遺伝子としてデータを標準化した。

6. 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。

7. 行動評価 : 明暗箱を用いた受動回避テスト およびオープンフィールド・テストを行った。

(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な最低限の頭数を使用して行った。

C. 研究結果

1. 評価用遺伝子の実験的追加選定とアレイの作成 : 分散培養に比べ、より生体内の状況に近いラット海馬切片培養を用いて、興奮性神経伝達物質グルタミン酸の繰り返し投与による超長期増強現象に関わる遺伝子を探索した。これは、24 時間おきに 3 回グルタミン酸刺激することにより、シナプスの伝達効率が 3 週間以上にわたって増強される現象で、記憶・学習の素過程として注目されている。はじめに独自アレイを用いて刺激後の遺伝子発現変化のタイムコースを調べ、神経活動による差がもっとも大きく現れる時点を 48 時間後と確認した。次いで 48 時間後の時点で、刺激なし、2 回刺激、3 回刺激の各サンプル間の遺伝子発現の差を市販の大集積アレイで網羅的に解析し、候補遺伝子を抽出、リアルタイム

PCR法で確認した。その結果、神経活動や癲癇発作によって誘導されると報告されている遺伝子群 (*bdnf*, *grm5*, *rgs2*, *syt4*, *ania4/carp/dclk*) と、アクチン・ダイナミクスの制御タンパクの遺伝子群 (*ywhaz*, *ssh1l*, *pak4*, *limk1*, *cfl*) が同定された。これらを独自アレイに加えるとともに、結果を *J. Neurosci. Res.* (2010) に発表した。

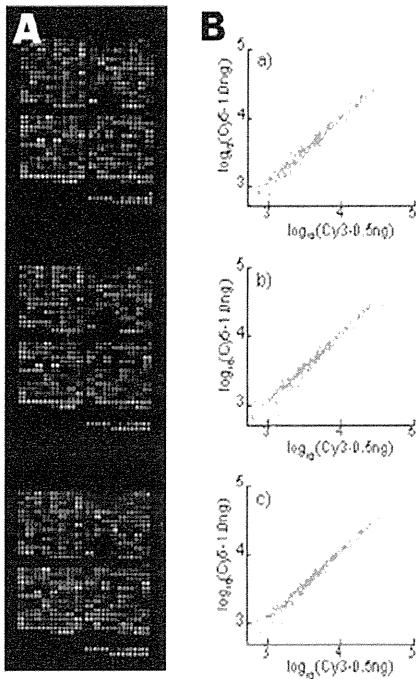


図1. 独自アレイとその性能評価。A) 1種類のプローブオリゴを2回ずつスタンプして1グリッドを作成、スライドガラスに同じグリッドを3回繰り返している。ラット小脳由来cDNAを二等分し、Cy3およびCy5でそれぞれ蛍光標識した後、等量ずつ混合してハイブリダイズした。B) 左の三つのグリッドに対して計測したCy3とCy5の蛍光強度の対応とグリッドごとの再現性。

2. 独自アレイを用いた胎生期化学物質ばく露動物の脳における発達異常の検出

(a) サリドマイド誘発自閉症モデルラット：生後20日(P20)、30日(P30)、40日(P40)の各時点で、大脳皮質4部位(前頭葉、側頭葉、頭頂葉、後頭葉)と海馬のセロトニンおよびHIAA含量を測定した。5部位のすべてにおいて、P20の時点でTHA群ではCTL群と比較してセロトニン含量(組織湿重量あたり)が30~40%上昇しており、P40でも上昇傾向がみられた(図2)。セロトニンと代謝産物HIAAとの比には両群で有意な差はなかった。

P7、P14、P20、P40の4時点で、THA、CTL両群のそれぞれ3個体の大脳皮質および海馬から個別に抽出したRNAを用いて、「シナプトアレイ」による遺伝子発現解析を行った。各時点での3個体間の再現性は良く、海馬よりも大脳皮質においてTHA群とCTL群の発現プロファイルに顕著な差が見られたため(表1)、以後の実験は大脳皮質サンプルに集中して行った。

大脳皮質では、P20でもっとも両群の差が大きかった(表1)。P20はCTL群では遺伝子発現の転換期であり、多くの遺伝子がreference RNA(すべての時点の平均値)

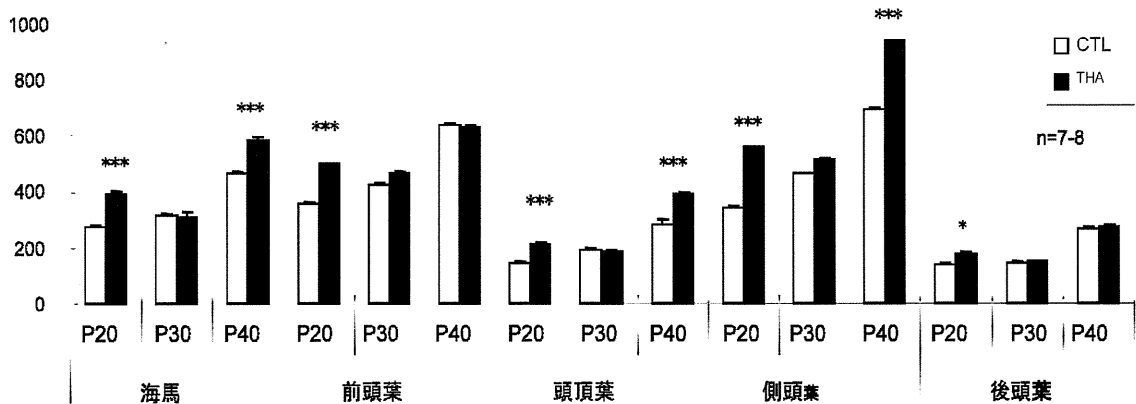


図2. 胎生期サリドマイド曝露 (THA) 群および対照 (CTL) 群における脳内セロトニン含量 (ng/g tissue)

	P7	P14	P20	P40
海馬				
THA/CTL> 1.5	7	1	1	3
THA/CTL< 0.5	5	3	0	2
大脳皮質				
THA/CTL> 1.5	7	2	31	6
THA/CTL< 0.5	5	0	34	13

表 1. 胎生期サリドマイドばく露により 50% 以上発現上昇 (THA/CTL>1.5) または低下 (THA/CTL<1.5)する遺伝子数。(全 489 遺伝子)

に対して発現上昇または低下したが、THA 群ではこのような発達期特有の変化が見られなかったためである。

P20 の時点で、シナプトアレイで発現変化のみられた主な遺伝子は、(a) ミエリン構成タンパクの遺伝子、(b) ポストシナプス足場タンパクの遺伝子、(c) 細胞骨格およびその調節タンパクの遺伝子、であった。

これらの遺伝子の発現変化はリアルタイム PCR 法で確認した。なかでもミエリン構成タンパクの遺伝子 *mbp*、*plp*、*cnp*、

mag は THA 群で協調した発現上昇を示した。また、セロトニン受容体サブタイプについては、THA 群は CTL 群に比べて、生後初期 (P7、P14) に低く、P20 以降は高くなるという共通した傾向がみられた (図 3)。唯一のイオンチャネル型受容体である *htr3* は例外で CTL 群との差がみられなかった。

さらに、生後 14 日の時点で市販のラット用大集積アレイ (44,000 プローブ、Agilent 社) を用いて大脳皮質における THA 群と CTL 群の遺伝子発現を比較した結果、CTL 群に比べて THA 群で 1.3 倍以上発現上昇した遺伝子中に *fkbp5*、*igfbp3*、*ucp2* が含まれていた。これらは Rett 症候群の原因遺伝子である *mecp2* (methyl CpG binding protein 2) により発現制御を受けることが報告されている。MeCP2 はプロモーター領域にあるメチル化 DNA 部位に特異的に結合し、その遺伝子の転写を抑制するメチル化 DNA 結合タンパクの一種である。そこで、マイクロアレイ法で検出された *fkbp5*、*igfbp3*、*ucp2* の三種類に

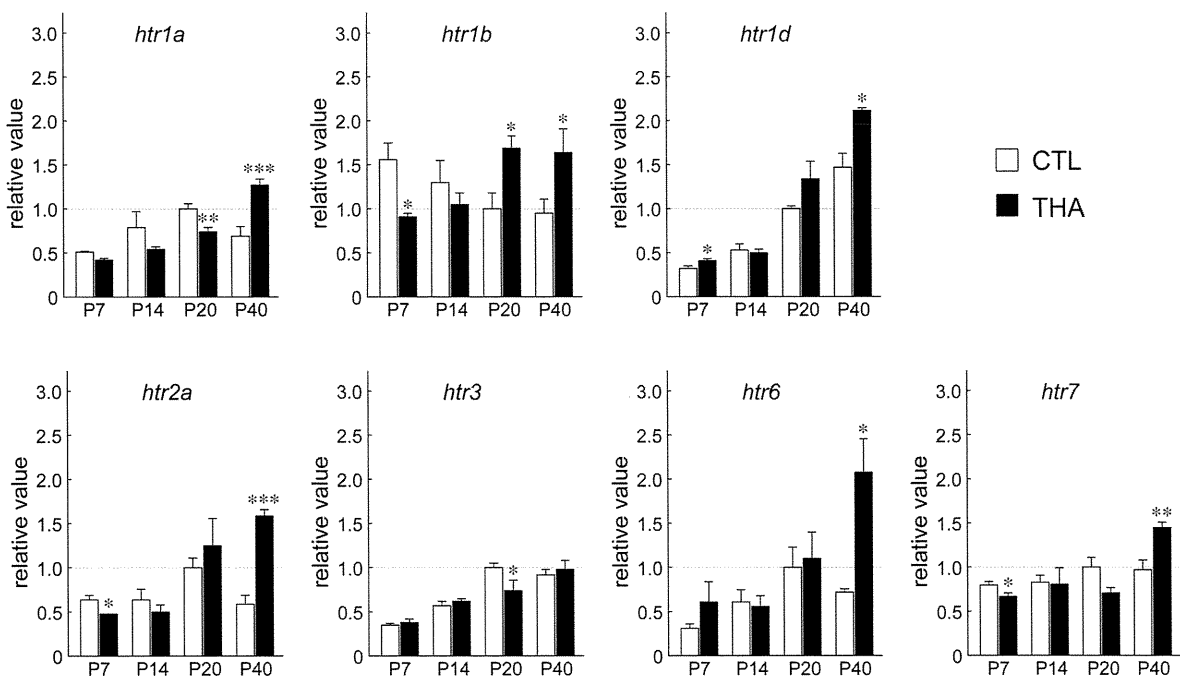


図 3. THA群および対照群(CTL)におけるセロトニン受容体の発現プロファイル。

加えて *bdnf*, *mobp* の二種類の MeCP2 標的遺伝子および *mecp2* 自身の発現プロファイルをリアルタイム PCR 法で調べたところ、*mecp2* 自身の発現変化はみられなかったが、*ucp2*, *mobp* で有意な発現上昇が、*fkbp5*, *bdnf* では一部の時点で上昇傾向がみられた。*fkbp5* については海馬でも上昇傾向があった。また MeCP2 と複合体を形成するヒストン脱アセチル化酵素 *hdac1* が生後 20 日で有意に上昇していた。

(2) 胎生期・生後初期 TBT ばく露ラット：

妊娠 2 日目から 6 週間にわたって継続的に TBT を投与する今回の実験条件で、母ラットの体重および産仔の数、性比、離乳までの生存率に影響はなかった。仔ラット(雄)の体重、肝臓、腎臓の重量についても、25ppm TBT 投与群では対照群と有意差はなかったが、125ppm 投与群では生後 3 週の時点で対照群の約 60%に減少しており、その後 TBT 投与を止めると 3 週間後(生後 6 週)に対照群の約 73%まで回復した。1、2、3、6 週の 4 時点で TBT 低用量群、TBT 高用量群、対照群の脳皮質および中脳から個別に抽出した RNA を用いて、「シナプトアレイ」による遺伝子発現解析を行った。低用量群、高用量群のいずれかで、上記 4 時点のうち 1 時点以上で対照群に対して有意な遺伝子発現変化(1.5 倍以上または 1/1.5 倍以下)を示した遺伝子は、脳皮質で 32、中脳で 33 であったが(489 遺伝子中)、中脳の方が変化率が大きく、かつ多時点で変化しており、TBT の影響は中脳でより強いことが明らかになった。発現変化したのは、脳皮質ではミトコンドリア電子伝達複合体の構成サブユニット、細胞内 Ca^{2+} ホメオスタシスに関与するタンパク、アクチン制御タンパク、などの遺伝子、中脳ではこれらに加えてドパミン神

経伝達に関与する遺伝子であった。

リアルタイム PCR 法で確認した結果、TBT の累積摂取量が最大となる生後 3 週齢の時点で、ミトコンドリア・シトクロム酸化酵素複合体を構成する *cox6c*, *cox7a3* が脳皮質ではともに発現低下、中脳では発現上昇すること、いずれも TBT 摂取停止 3 週間後(生後 6 週齢)には対照群と同レベルに復していること、が分かった。一方、中脳では Ca^{2+} ホメオスタシスに関与する二つの遺伝子、すなわち IP3 受容体 Ca^{2+} チャネルの活性を調節するクロモグラニン B(*chgb*)および細胞膜の交換輸送体である Na^{+}/Ca^{2+} exchanger 2 (*slc8a2*)、の発現が 6 週齢を含むすべての時点で上昇していた。ドパミン産生細胞のマーカーである tyrosine hydroxylase (*th*)の遺伝子発現には有意な変化はみられなかった。

これらの結果を受けて、中脳でさらに、発達期のばく露と成長後のばく露を比較するため、生後 6 週~9 週に直接ばく露する群を加えた 4 群で実験を行った(図 4)。

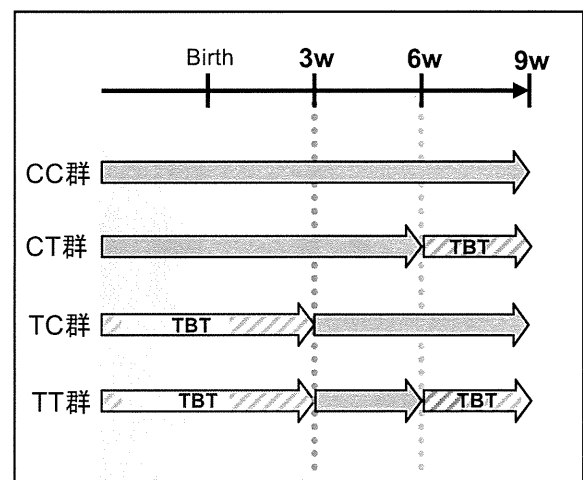


図 4. TBT ばく露の有無とばく露時期による 4 群の作成。CC；非ばく露対照群、CT；成熟後ばく露群、TC；発達期ばく露群、TT；再びばく露群

9 週齢における 4 群の体重および肝臓、腎臓の組織重量を比較すると、成熟後ばく

露 (CT 群) では非ばく露対照群 (CC 群) と差がなく、発達期にばく露をうけた二群 (TC 群; 発達期のみばく露、と TT 群; 再ばく露) で約 25%減少した。一方、胸腺の組織重量は、発達期、成熟期を問わず、直前までばく露された群 (CT 群、TT 群) で有意に低下しており、免疫系に対する影響が TBT ばく露を止めると回復しやすいことと一致する。

この 4 群を用いて、中脳の遺伝子発現をリアルタイム PCR 法で比較した。ドパミン神経細胞のマーカーとなるチロシン水酸化酵素 (*th*) の発現は、発達期ばく露が終了した 3 週齢の時点では、TBT ばく露群で有意に上昇していたが、6 週齢では非ばく露群と同レベルに戻っていた。しかしながら、6 週～9 週での再ばく露により、図 5 に示すように、発達期ばく露群は *th* の大幅な発現低下を示した。一方、成長後ばく露 (CT 群) での発現低下は発達期ばく露に比べて緩やかであった。

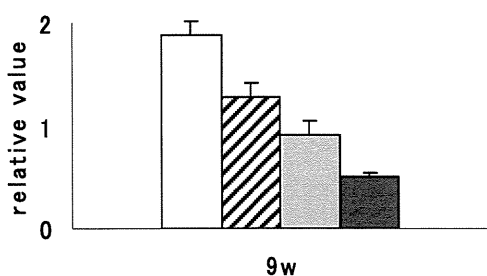


図 5. 9 週齢・中脳でのチロシン水酸化酵素 (*th*) の発現比較。左から CC 群: 白、CT 群: 斜線、TC 群: グレー、TT 群: 黒。CC 群に比較して他の 3 群で有意に発現が低下。

ドパミン輸体 (*dat*) については、3 週齢、6 週齢では TBT ばく露による変化がなく、9 週齢では再ばく露群 (TT 群) のみ、有意に発現が低下していた (図 6)。

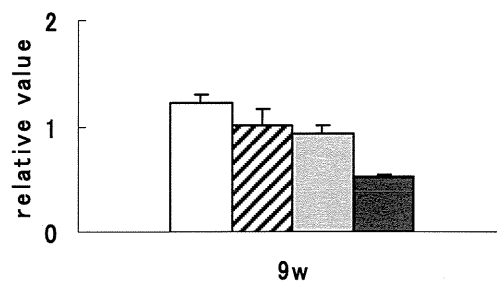


図 6. 9 週齢中脳における 4 群のドパミン輸体 (*dat*) の発現比較。左から CC 群: 白、CT 群: 斜線、TC 群: グレー、TT 群: 黒。TT 群のみ CC 群、CT 群と比較して有意に発現が低下。

ドパミン分解酵素 *comt* およびドパミン受容体の一種である *drd2* については、9 週齢の時点で 4 群の間に発現差はみられなかった。

オープンフィールド・テストにおいても、成熟後に TBT にばく露した群 (CT 群) では非ばく露群 (CC 群) に比べて差はなかったが、発達期ばく露を受けた 2 群 (TC 群、TT 群) では行動量に低下傾向がみられた。

(3) 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: 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 (図 7)、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。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 で明らかなる多

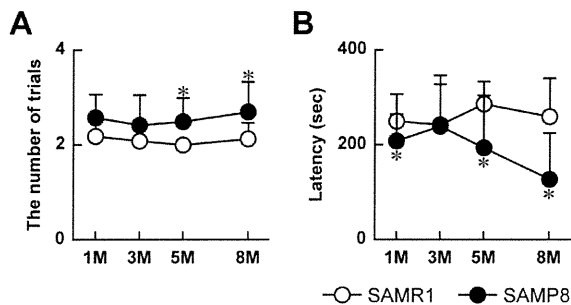


図7. 受動的回避テストによる学習・記憶能力の評価。A. 第一日目の学習；暗室に入らなくなるまでの試行回数。B. 第二日目；暗室に入るまでの時間（秒）。

動と低不安がみられた。

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9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*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。

(4) 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の影響評価を試

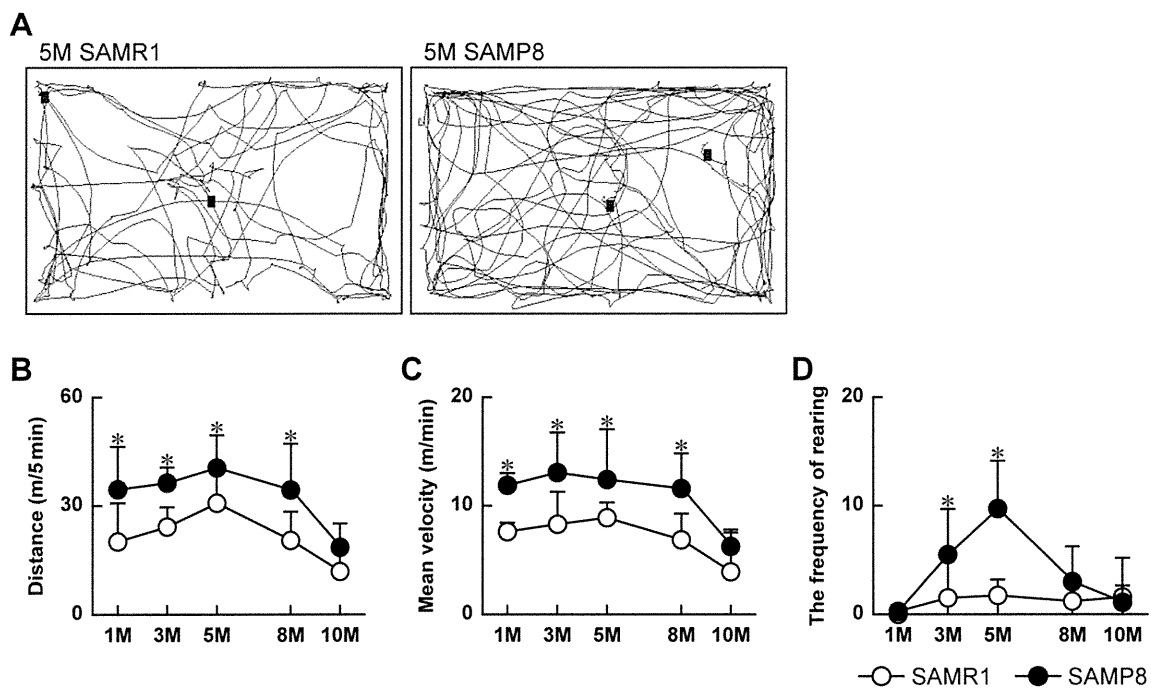


図8. オープンフィールド・テストによるSAMP8とSAMR1の行動比較。A；30分間の歩行記録、

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

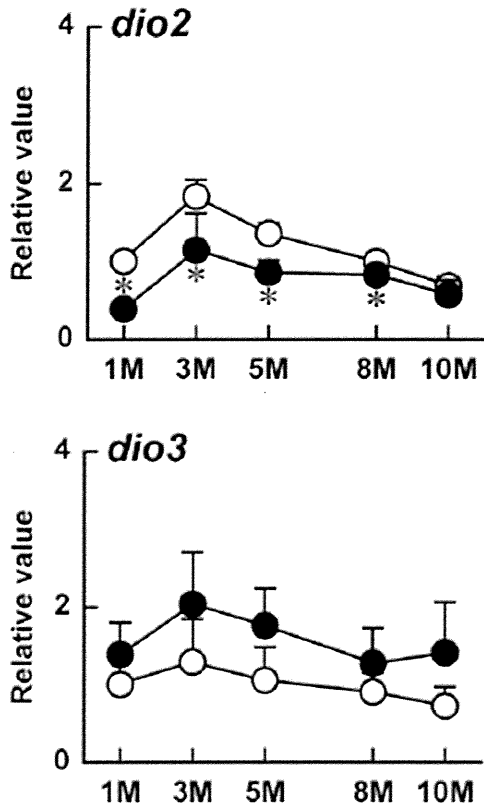


図9. SAMP8 (●)とSAMR1 (○)の海馬におけるdio2、dio3の遺伝子発現比較。

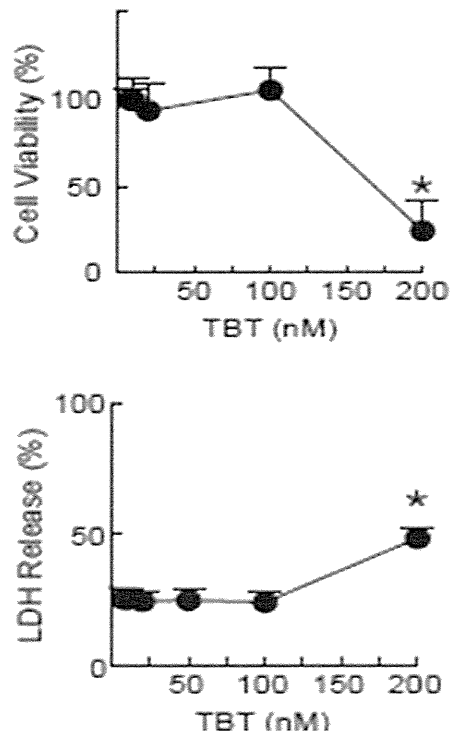


図10. 細胞生存に対するTBTの影響：TBT添加48時間後の細胞生存率と細胞死の評価。

みた。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 10 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 μM) でも、両者は有意に減少することが確認で

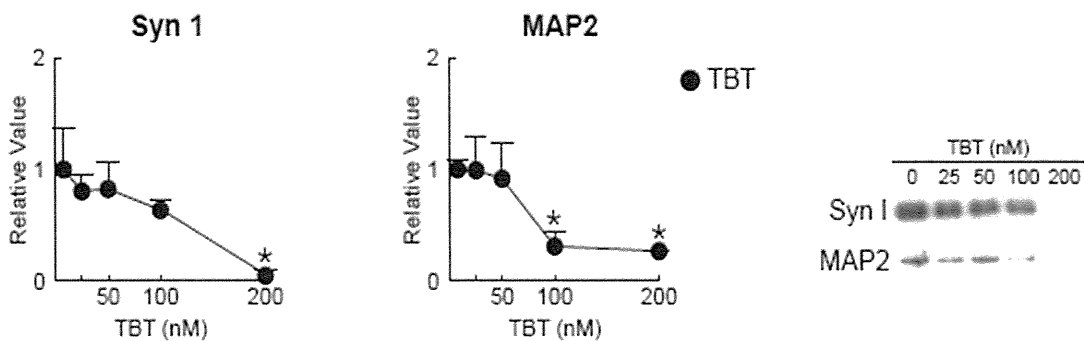


図11. シナプスおよび樹状突起に対する低濃度TBTの影響：各濃度のTBT添加後、48時間で、抗Syn 1抗体と抗MAP2抗体を用いて両者を定量した。

きた (図 11)。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)。今回の研究により、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、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。THA 群と対照群の遺伝子発現の差はシナプス形成の完了する生後 20 日でもっとも顕著であった。MeCP2 によるエピジェネティックな制御がどのように関与するかについては今後の課題である。

(2) 胎生期 - 生後初期における TBT 曝露の影響

TBT は当初、水生生物に対する内分泌かく乱物質として注目を集めた。これは TBT のアロマトラーゼ阻害作用によるものと考えられるが、その他に TBT はミトコンドリア・ATP 合成酵素を直接阻害することが *in vitro* の実験で示されている。さらに近年、TBT がごく低濃度で塩素イオンの細胞膜透過をひき起こす Cl⁻イオンフォアとなることが示され、神経細胞におい

ては GABA 神経伝達に直接影響を与える可能性が懸念される。マイクロアレイの結果は、TBT がミトコンドリアに影響を与え、酸化ストレスを誘発する可能性を示唆している。

また、今回の研究で、発達期の TBT ばく露の方が成熟後のばく露より影響が大きいこと、発達期にばく露を受けた動物が成熟後に再びばく露された場合はさらに影響が大きくなること、が確認できた。

E. 結論

このような一連の研究から、焦点を絞ったオリジナル DNA マイクロアレイは、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る道具とな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/dclx, ywhaz, ssh11, pak4, limk1, cfl

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kawaai K., Tominaga-Yoshino K., Urakubo T., Taniguchi N., Kondoh Y., Tashiro H., Ogura A., **Tashiro T.**
“Analysis of gene expression changes associated with long-lasting synaptic enhancement in hippocampal slice cultures after repetitive exposures to glutamate”, *J. Neurosci. Res.*, **88**, 2911-2922 (2010)
- 2) Asakawa H., Tsunoda M., Kaido T., Hosokawa M., Sugaya C., Inoue Y., Kudo Y., Satoh T., Katagiri H., Akita H., Saji M., Wakasa M., Negishi T., **Tashiro T.**, Aizawa Y. “
Enhanced inhibitory effects of TBT chloride on the development of F1 rats., *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **58**, 1065-1073 (2010)

2. 学会発表

(a) 国際学会

- 1) Uno T., Ishibashi Y., Takahashi M., Negishi T., **Tashiro T.**
“Analysis of gene expression profiles in the hippocampus and cerebellum of the Goto-Kakizaki rat, and animal model of type 2 diabetes” (10th Biennial Meeting of the Asia-Pacific Society for Neurochemistry, Phuket, October 2010)
- 2) Negishi T., Oyanagi K., Takahashi M., Imai N., Ihara T., **Tashiro T.**
“Investigation of cerebral development in cynomolgus monkey-histological and biochemical analyses” (10th Biennial Meeting of the Asia-Pacific Society for Neurochemistry, Phuket, October 2010)
- 3) Sawano E., Negishi T., **Tashiro T.**
“Local thyroid hormone metabolism in

the hippocampus of senescence-accelerated SAMP8 mice” (10th Biennial Meeting of the Asia-Pacific Society for Neurochemistry, Phuket, October 2010)

- 4) Oyanagi, K., Negishi, T., **Tashiro, T.**
“Effects of thyroid hormone on the survival and neurite outgrowth of cultured cerebellar granule cells” (10th Biennial Meeting of the Asia-Pacific Society for Neurochemistry, Phuket, October 2010)
 - 5) 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)
 - 6) 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)
- (b) 国内学会
- 1) 角田正史、若佐美香、浅川秀雄、高橋理貴、根岸隆之、峽戸孝也、細川まゆ子、菅谷ちえ美、井上葉子、相澤好治、田代朋子:「ラット脳の発達過程に対するトリブチルスズ曝露の影響に関する二世代トキシコジェノミック研究」、第52回日本神経化学学会大会 2009年6月21-24日(伊香保)
 - 2) 小柳洸志、高橋理貴、根岸隆之、田代朋

- 子:「培養小脳顆粒細胞における低カリウム誘発細胞死に対する甲状腺ホルモン T4 の保護作用」、第 52 回日本神経化学学会大会 2009 年 6 月 21-24 日(伊香保)
- 3) 根岸隆之、高橋理貴、小柳洸志、大西大空、平野靖史郎、田代朋子:「小脳顆粒細胞におけるジフェニルアルシン酸による酸化ストレスと細胞死」、第 52 回日本神経化学学会大会 2009 年 6 月 21-24 日(伊香保)
- 4) 河合克宏、富永 - 吉野恵子、谷口直子、御子柴克彦、小倉明彦、田代朋子:「繰り返しグルタミン酸刺激誘発性の長期神経可塑性に伴う遺伝子発現変化の解析」、第 52 回日本神経化学学会大会 2009 年 6 月 21-24 日(伊香保)
- 5) 澤野恵梨香、高橋理貴、船津尚子、木村洋人、根岸隆之、田代朋子:「GABA 神経伝達機構の発達における甲状腺ホルモンの役割」、第 52 回日本神経化学学会大会 2009 年 6 月 21-24 日(伊香保)
- 6) 宇野健史、石橋瑛、高橋理貴、根岸隆之、田代朋子:「2 型糖尿病モデル・GK ラットの脳におけるホモシステイン代謝の変化」、第 52 回日本神経化学学会大会 2009 年 6 月 21-24 日(伊香保)
- 7) 澤野 恵梨香、中森 裕介、根岸 隆之、田代 朋子
「学習記憶障害を特徴とする SAMP8 海馬における甲状腺ホルモン関連遺伝子の発現変化」(第 25 回 老化促進モデルマウス(SAM)研究協議会・金沢大学、2010 年 7 月)
- 8) Sawano E., Negishi T., Tashiro T.
“Alterations in local thyroid hormone metabolism in the hippocampus of senescence-accelerated SAMP8 mice” (第 53 回日本神経化学学会/第 33
- 回日本神経科学大会/第 20 回日本神経回路学会大会/合同大会、神戸、2010 年 9 月)
- 9) Oyanagi K., Negishi T., Tashiro T.
“Non-genomic action of Thyroxine (T4) on survival and neurite outgrowth of cerebellar granule cells in culture” (第 53 回日本神経化学学会/第 33 回日本神経科学大会/第 20 回日本神経回路学会大会/合同大会、神戸、2010 年 9 月)
- 10) Negishi T., Takahashi M., Oyanagi K., Ohnishi H., Hirano S., Tashiro T.
“Diphenylarsinic acid induced oxidative stress and expression of neuroactive and vasoactive peptides in cerebellar astrocytes” (第 53 回日本神経化学学会/第 33 回日本神経科学大会/第 20 回日本神経回路学会大会/合同大会、神戸、2010 年 9 月)
- 11) Tsunoda M., Takeuchi Y., Yoshioka R., Negishi N., Ikeuchi R., Kaido T., Hosokawa M., Sugaya C., Tashiro T., Aizawa Y.
“Perinatal exposure affects the sensitivity to TBT neurotoxicity after maturation: evaluation by gene expression and behavioral analyses” (第 53 回日本神経化学学会/第 33 回日本神経科学大会/第 20 回日本神経回路学会大会/合同大会、神戸、2010 年 9 月)
- 12) 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)
- 13) 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)

14) 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)

15) 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)

16) 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)

17) 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

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。

初年度は、自閉症者における不安への脆弱性を脳機能から測定する目的で、不安尺度 State-Trait Anxiety Inventory (STAI) を用いた特性不安レベルと、近赤外線酸素モニター(NIRS)を用いた情動想起時の前頭葉脳血流内酸素化ヘモグロビン (O₂Hb) 濃度の変化を測定し、健常者と自閉症者での比較を行った。健常被験者 19 名では平均的に左側優位の O₂Hb 濃度上昇が認められたのに対し、自閉症者及び高い特性不安を有した健常被験者では、右側優位の O₂Hb 濃度変化が多く観察され、これは情動処理機能の差異、及びストレス耐性の低下を示す所見と考えられた。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／非賦活する課題を交互に出現させ、難易度を上昇させる顔表情刺激を用いたタスクを用いてその際の前頭葉 O₂Hb 濃度変化を検討した。その結果、健常者 (n=22) においては成績上位群・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た。さらに 3 年目には、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。これらの研究成果からは、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。

以上より、自閉症者に情動想起刺激やワーキングメモリタスクなど複数のタスクを施行し、その際の NIRS による前頭葉血流内 O₂Hb 濃度測定を行うことで、補助診断ツールとしての有用性を期待できると考えられた。

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。

自閉症スペクトラム障害（Autism Spectrum Disorder：以下 ASD）とは、重度の自閉症から高機能自閉症、アスペルガー障害、そしてその周辺にあるどの定義も厳密には満たさない特定不能の広汎性発達障害を 1 つの連続した障害として捉えたもので¹⁾、社会的相互関係の障害（同調・集団行動の困難）、コミュニケーション能力の障害、反復常同的あるいは執着的行動（こだわり）の 3 領域に障害があることで定義される。イギリスのローナ・ウィングが提唱した概念で、スペクトラムとは連続体を意味する²⁾。

不安やストレスに対する脆弱性から起こるさまざまな心身症の発症には前頭葉が関与している。自律神経は視床下部に投射したセロトニン神経に制御されているが、セロトニン神経は脳内に広汎に投射しており、機能も多岐にわたる³⁾。セロトニンは神経伝達物質の一種であり、感情をコントロールし精神を安定させる働きを持つとされ⁴⁾、扁桃体を介して前頭葉に上行したセロトニン神経は、ドーパミン神経と連携しながら情動の制御、中でも特に不安の制御に関わると考えられている。この前頭葉における情動の処理に関しては、その賦活の程度に個体による左右差があることが知られている。

Rosenkranz らは、ポジティブな情動の想起刺激として極度の幸福や喜びの経験

を想起させ、ネガティブな情動の想起刺激として極度の恐れや怒りの経験を想起させる情動想起刺激を与えた結果、左右の脳波が非対称になり、一般的に健常者においては左側優位に活性化したことを認めたり⁵⁾。一方、強いストレス、すなわちネガティブな情動想起刺激を与えた際に、主に右側前頭葉を優位に賦活する個体は自律神経機能や免疫機能の相対的な低下がみられるとも報告されている⁶⁾。また、暗算タスク遂行時に右側前頭葉を優位に賦活する個体では、皮膚の炎症、湿疹が多く出現する傾向が報告されている⁷⁾。不安と不定愁訴の問題には、脳の前頭葉、及び自律神経とこれらを経由するセロトニン神経の働きが関わっていると考えられる。ASD 患者においてもセロトニン神経系の先天的な機能障害があると考えられており、このため健常者よりも情動処理を苦手とし、不安を感じやすく、自律神経に異常を来しやすいという特性があると考えられているため、これら前頭葉における情動処理機能や不安のレベル等にも大きな差異があることが推測される⁸⁾。

そこで本研究初年度は、ASD 児者の脳機能の特性を、非侵襲的に観察しその診断の補助ツールとしての使用の可能性を探るために、健常者と ASD 者を用いて情動想起時の前頭葉内の酸素化ヘモグロビン（以下 O₂Hb と略す）濃度の変動を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て測定し、STAI を用いた不安レベルの傾向と合わせ考察することを目的とした。また、情動刺激による実行機能をはじめとする前頭葉機能の変化

を客観的に測定するために、情動刺激直後の計算タスクの正答数をポジティブな情動刺激とネガティブな情動刺激での比較検討も行った。

さらに次年度以降は、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／非賦活する課題を作成することとした。刺激として様々な顔の表情を用いて、情動の想起も期待した。これまでに我々の研究室では、色と形の異なる図形を刺激として用いた課題を作成し、ワーキングメモリを必要とするタスク（WM タスク）と必要としないタスク（NWM タスク）を交互に提示し、次第に難易度を上げることにより、前頭葉の賦活のスイッチング効果を観察した⁹⁾。

そこでこれを応用して、今回は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する。さらに、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し、協力を得られた自閉症患者には、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 濃度変化の測定をして、自閉症者における異所性の神経ネットワーク存在の可能性についても検討することにした。

B. 研究方法

<情動想起タスクによる実験>

1. 対象

情動想起時の前頭葉機能測定実験に際しては、21～44 歳の健常な男女 19 名（女性 15 名、男性 4 名：平均年齢 23.7 歳）

と ASD 患者 2 名（30 歳女性 1 名、22 歳男性 1 名）の計 21 名を対象とした。19 名の健常者を健常群と称した。また、情動想起直後の計算タスク実験においては 20～40 歳の健康な男女（女性 9 名、男性 4 名：平均 22.4 歳）の計 13 名を対象とした。いずれの被験者も実験当日の体調は良好であると答えた。

2. 方法

情動想起時の前頭葉機能測定実験に際しては、まず被験者に不安尺度の測定を行った。

不安の測定には既報に従い、1970 年に Spielberger, C. D. によって開発され、1991 年に水口らによって日本語版に翻訳された STAI を用いた¹⁰⁾。STAI は測定時点での不安の強さを示す状態不安と、性格特性としての不安になりやすさを示す特性不安を分けて評価することができる。質問は状態不安尺度・特性不安尺度がそれぞれ 20 項目、全 40 項目からなり、4 段階評定尺度による自己記入式で回答させ得点化する。両尺度の得点範囲は 20-80 点で、得点が高いほど状態不安や特性不安が高いことを示す。今回は、「不安傾向における比較的安定な個人差」とされる特性不安尺度を使用し被験者の生まれつきの不安の高さを測定した。

次に、近赤外線酸素モニターを被験者に装着し、二種類の情動想起タスク、すなわちポジティブな情動の想起とネガティブな情動の想起をそれぞれ 3 分間ずつ行った。以下前者をポジティブ情動想起、後者をネガティブ情動想起と称す。ポジティブ情動想起タスクではこれまでの人生で最も嬉しかったことを、ネガティブ

情動想起では最も悲しかったことを想起するよう指示した。これらのタスクを安静を間に挿みながら行い、その間継続的に、左右前頭葉の O₂Hb 濃度を近赤外線酸素モニター (Near-infrared spectroscopy, NIRS) (NIRO200、浜松ホトニクス社) を用いて測定した。NIRS は組織に近赤外線を照射し、反射した近赤外線の減衰を測定することによって計測される血管内の O₂Hb、脱酸素化ヘモグロビンの相対的濃度変化から、組織内の酸素状態の変化を経時的に知ることができる。今回は左右の前額部に照射プローブ及び検出プローブを装着し、左右前頭葉における O₂Hb 濃度の相対的な変化量を測定することによってタスク中の前頭葉の活性の変化を推測した。プローブは両面シールを用いて固定し、アーティファクトを避けるためにプローブの上から黒色布を巻いて太陽光を遮断した。基準値は安静時最終 30 秒間の平均値とし、タスクを行った際の前頭葉の血流変化を 1 秒ごとに測定した。

情動想起直後の計算タスク実験においては、それぞれ上記実験と同様に情動想起を 3 分間行った直後に、独自に作成した計算タスクをパソコンのモニター上に一問ずつ提示し、被験者は PC 画面に現れた問題を口頭で答え、次の問題をクリックして移ることを繰り返す。そして、単位時間 (20 秒間) に正答を出した問題の数を引被験者ごとに数えた。計算タスクは小学 1 年終了程度と同難易度の問題で構成されており、最大で 35 問が提示されるようになっている。

<顔表情刺激タスクによる実験>

対象者は高機能の ASD 患者 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 (図 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、ASD 患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 (図 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。

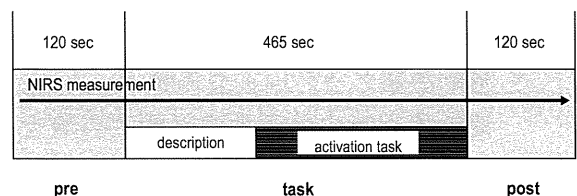


図 1 Task Design

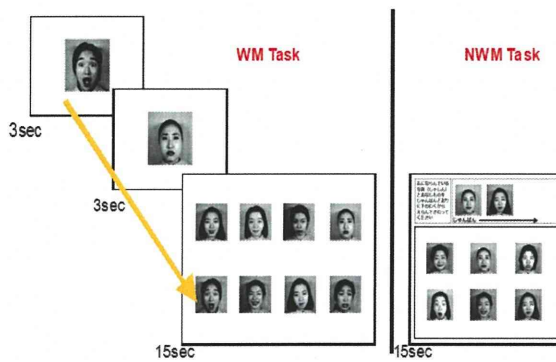


図.2 タスク概要

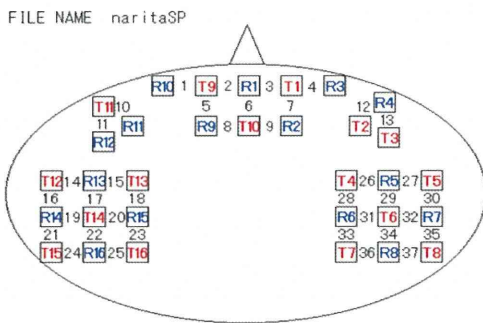


図 3. OMM-2000 のプローブ配置図
測定プローブ配置を示す。
T1-16: probes for irradiation
R1-19: probes for receiving light

(倫理面への配慮)

いずれの実験に際しても、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

<情動想起タスクによる実験>

情動想起時の前頭葉機能測定実験を行った際の、19名の健常被験者における前頭葉 O2Hb 濃度相対値の測定結果の平均値を図 4A, B に示した。

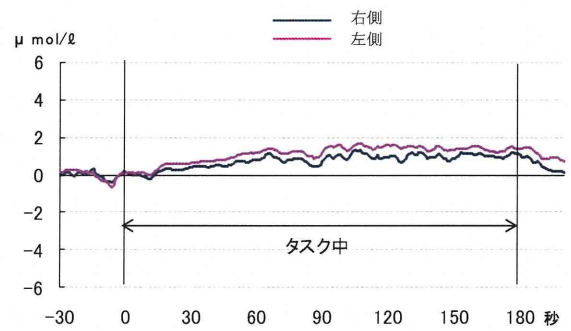


図 4A. 健常被験者 19 名におけるポジティブ情動刺激タスク下での前頭葉内酸素化ヘモグロビン濃度の変化の平均を表す。

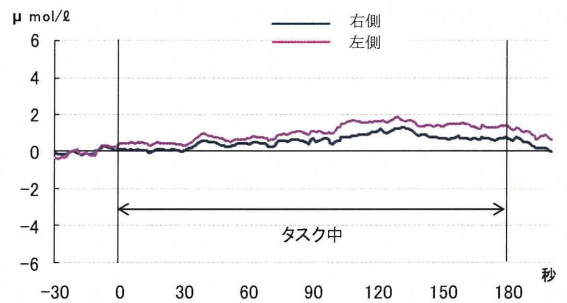


図 4B. 健常被験者 19 名におけるネガティブ情動刺激タスク下での前頭葉内酸素化ヘモグロビン濃度の変化の平均を表す。

その結果、ポジティブ情動想起(図 4A)・ネガティブ情動想起(図 4B)ともに、タスク開始から終了にかけて O2Hb 濃度の経時的な増大が見られた。これらはいずれも、やや左側優位に増加している傾向が見られ、この結果は Rosenkranz らの報告と矛盾しない⁵⁾。

一方、図 5A, B に、情動想起タスクを行った際の、ASD 患者 1 における前頭葉 O2Hb 濃度相対値の変化を示す。患者 1 では、いずれの情動想起タスクによっても前頭葉 O2Hb 濃度が右側優位に上昇する傾向が観察された(図 5A, B)。

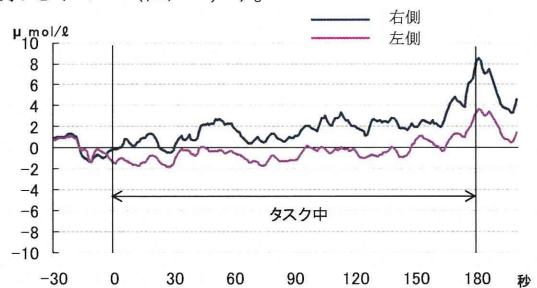


図 5A. ASD 患者 1 におけるポジティブ情動刺激タスク下での前頭葉内酸素化ヘモグロビン濃度の変化を表す。

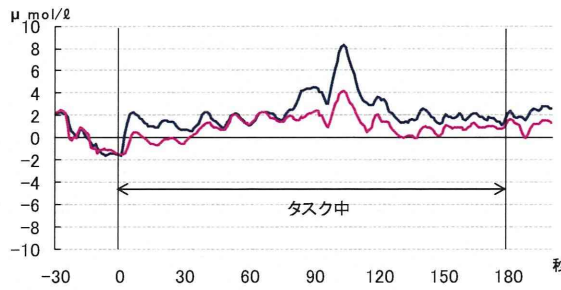


図 5B. ASD 患者 1 におけるネガティブ情動刺激タスク下での前頭葉内酸素化ヘモグロビン濃度の変化を表す。

一方患者 2 では特にネガティブ情動想起タスクにおいてタスク開始とともに前頭葉 O₂Hb 濃度の右側優位の上昇が観察された (図 6A, B)。

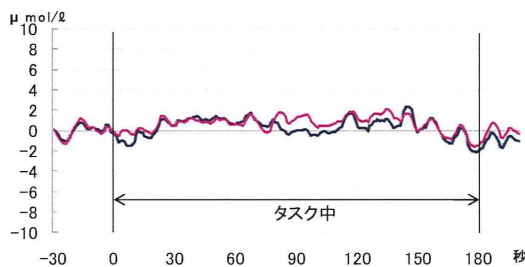


図 6A. ASD 患者 2 におけるポジティブ情動刺激タスク下での前頭葉内酸素化ヘモグロビン濃度の変化を表す。

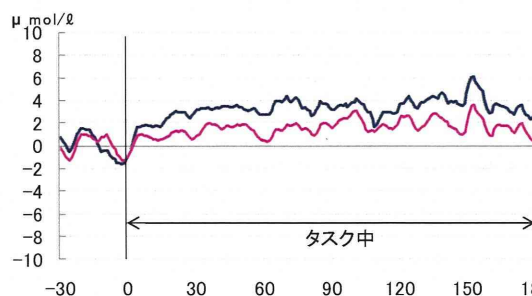


図 6B. ASD 患者 2 におけるネガティブ情動刺激タスク下での前頭葉内酸素化ヘモグロビン濃度の変化を表す。

また、情動想起時の前頭葉機能測定実験に参加した被験者 21 名中、STAI による特性不安測定を行った 18 名について、その得点を 3 群に分類し表 1 に示した。健常群 16 名の平均は 42.7 点であった。ASD 患者 A、B ではそれぞれ 61 点、53 点であり、STAI 評価基準によって特性不安が「非

常に高い」「高い」と判断され、健常群と比較して高い特性不安を有する傾向が見られた。

STAI 特性不安得点 評価段階規準	ASD 患者 (n=2)	特異的な前頭葉活動 を示した被験者 (n=2)	その他の健常群 (n=14)
I (男女 23 以下)	0	0	0
II (男性 24-32 女性 24-33)	0	0	1
III (男性 33-43 女性 34-44)	0	0	7
IV (男性 44-52 女性 45-54)	1	2 (うち流動経験者 1)	6
V (男性 53 以上 女性 55 以上)	1	0	0

表 1. 健常被験者 19 名及び ASD 患者 2 名に施行した STAI 不安尺度の結果を示す。

図 7 に、健常被験者 13 名に行った、情動想起直後の計算タスク実験における、各情動想起刺激 (ポジティブ情動刺激・ネガティブ情動刺激) の直後に実施した計算タスクの正答数結果を示した。

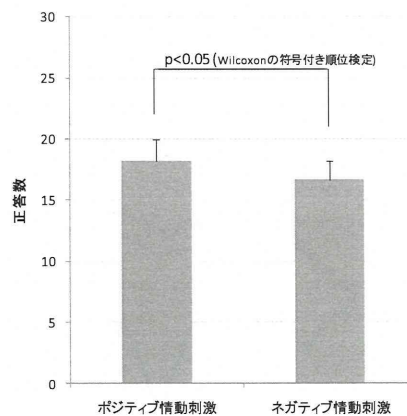


図 7. 健常被験者 13 名における、情動刺激タスク直後に行った計算タスクの正答数を表す。

健常被験者 13 名において、それぞれの平均正答数は静寂時が 16.9 ± 1.4 、ポジティブ情動刺激後が 18.2 ± 1.8 、ネガティブ情動刺激後が 16.6 ± 1.6 であった。また、