

Developmental Neuroscience 31(2)
138-144, 2013

(3) Prenatal exposure to organomercury, thimerosal, persistently impairs the serotonergic and dopaminergic systems in the rat brain: Implications for association with developmental disorders. Michiru Ida-Eto, Akiko Oyabu, Takeshi Ohkawara, Yasura Tashiro, Naoko Narita, Masaaki Narita. Brain and Development *in press*

(4) Subtype-specific parafollicular localization of the neuropeptide manserin in the rat thyroid gland. Takeshi Ohkawara, Akiko Oyabu, Michiru Ida-Eto, Yasura Tashiro, Naoko Narita, Masaaki Narita Acta Histochemica *in press*

(5) Prefrontal cortical hemodynamic change due to facial expression switching task in autism spectrum disorders. Higuchi H, Narita M, Sakatani K, Narita N. Shonan Journal 3: 41-55, 2012

学会発表

(1) Abnormalities in cerebellar Purkinje cells in autism model rats induced by thalidomide. Takeshi Ohkawara, Akiko Oyabu, Takashi Katsuyama, Arata Sakuramoto, Michiru Ida-Eto, Yasura Tashiro, Masaaki Narita 北米神経科学会 2012年11月15日ニューオーリンズ

(2) Developmental Expression of a Novel Neuropeptide, Manserin, in the

Rat Cochlea

Michiru Ida-Eto, Akiko Oyabu, Arata Sakuramoto, Takashi Katsuyama, Takeshi Ohkawara, Yasura Tashiro, Masaaki Narita

14th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry 2012年8月26-29日京都

(3) 投影法による発達障害児の経時的評価の意義について 成田奈緒子¹⁾、成田正明、田副真美 第30回日本小児心身医学会学術集会

2012年9月7-9日、名古屋

(4) 体験活動を用いた発達障害児と保護者への支援(1)～児における前頭葉機能の変化とストレスマーカー、気分との関連～小澤有希、小関英里圭、今泉奈津季、岡戸奈都子、田副真美、成田正明、成田奈緒子 日本発達障害学会 2012年8月11,12日 横浜

(3) 体験活動を用いた発達障害児と保護者への支援(2)～PARSから見た保護者の捉えの変化に影響を及ぼす要因～今泉奈津季、岡戸奈都子、小澤有希、小関英里圭、田副真美、成田正明、成田奈緒子

日本発達障害学会 2012年8月11-12日 横浜

(4) 前頭葉賦活化課題を遂行中の脳機能の可視化—近赤外線分光法による解析

櫻本新、葛山貴士、江藤みちる、大河原剛、成田正明 第16回活性アミンに関するワークショップ 2012年8月24日札幌

(5) 解剖学的領域とそれに対応する領域の脳機能の可視化—近赤外線分光法による解析 櫻本新、葛山貴士、江藤みちる、大河原剛、成田正明 第72回日本解剖学会中部支部会 2012年10月13-14日 岐阜

(6) 妊娠中のウイルス感染におけるセロトニン神経系の発生異常—ウイルス感染モデル動物を使った実験 葛山貴士、大河原剛、櫻本新、大藪明子、江藤みちる、成田正明 第72回日本解剖学会中部支部会 2012年10月13-14日 岐阜

(7) 妊娠中の有機水銀ばく露が胎仔セロトニン神経の初期発生に及ぼす影響—ばく露時期依存性の影響 江藤みちる、櫻本新、大藪明子、葛山貴士、大河原剛、太城康良、成田正明 第72回日本解剖学会中部支部会 2012年10月13-14日 岐阜

(8) 妊娠中の有機水銀ばく露と生後の脳発達—厚生労働省研究班の成果より 三重メディカル研究会・第7回環境健康学研究会 江藤みちる (=研究協力者) 2013年1月25日 三重大学社会連携研究センター伊賀研究拠

(9) 胎生期の化学物質ばく露による情

動認知行動異常に関する基礎的研究—厚生労働省研究班の研究より 成田正明 (=オーガナイザー) 日本解剖学会総会学術集会シンポジウム 2013年3月28日香川

報道発表等

(1) クジラやイルカの食習慣ある和歌山県太地町における住民の有機水銀摂取の不安、とくに妊婦や子どもに対する懸念について、研究代表者の成田正明が厚生労働省研究班として紙上で論評した(2012年6月1日読売新聞)。

(2) 「化学物質ホルムアルデヒドと健康」 NHKテレビ “視点論点” 2012年6月15日。

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

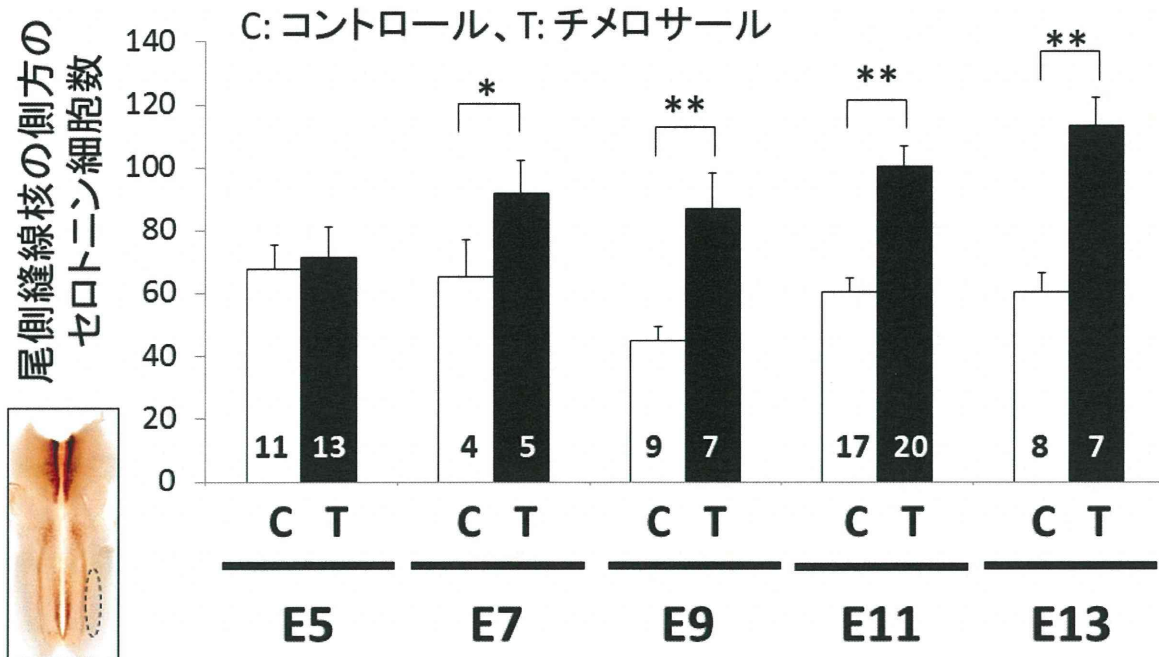


図 尾側縫線核側方のセロトニン細胞数のチメロサール投与時期による比較
 左下の写真は胎生15日展開標本のセロトニン免疫染色像。点線で囲んだ部分に存在する尾側縫線核側方セロトニン細胞の数を計測した。バーの中の数字は胎仔の個体数。C: コントロール群、T: チメロサール投与群。* $p < 0.05$ vs. コントロール; ** $p < 0.01$ vs. コントロール。

平成 24 年度 分担研究課題：. 動物実験（ばく露に有無を知るバイオマーカー検索）

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

妊娠中の化学物質による子どもの行動・情動への影響を科学的に評価する方法を確立し、障害の早期発見を目指すとともに、化学物質の安全性に対する基準設定を目的とする研究の中で、本分担研究は、動物モデルを用いた網羅的遺伝子発現解析によってばく露のバイオマーカー候補を探索するとともに、その妥当性を生化学的、形態学的に裏付けることを目的とする。本年度は、(1) 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(2) 若齢期に注意欠陥多動性障害(ADHD) 様の多動・低不安を呈する SAMP8 マウス、の二つの動物モデルについて研究を進めた。(1) では、これまでの遺伝子発現解析の結果に基づいてタンパク質レベルでの発現解析を行った。その結果、サリドマイドばく露群では生後 14 日を中心に主要なシナプス局在タンパクの有意な減少がみられることが分かった。生後 40 日には正常群と同じレベルまで増加することから、シナプス形成開始時期の遅れを示すと考えられる。(2) 老化促進モデルマウスである SAMP8 の若齢期の行動異常に脳内甲状腺ホルモン代謝の異常による局所的な活性型甲状腺ホルモンの低下が関与することを確認し、発達期脳における新たな化学物質作用点として、II 型脱ヨード化酵素を考える必要性を示した。

A. 研究目的

脳の発達に対する胎生期化学物質ばく露の影響を調べるには、ばく露によって強く影響を受ける脳内部位やプロセスを特定するとともに、効率的かつ高感度に異常を検出する方法の確立が急務である。

分担研究者・田代は、生後初期のシナプス形成期に何らかの異常が生じた場合、できあがる神経回路が変化し、情動・行動などの高次機能に永続的な影響が生じると考え、シナプスの構造と機能に関与する遺伝子群を中心に独自の 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。平成 21 年度より三年間の研究では、研究代表者・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とともに、バイオマーカー候補となる遺伝子の探索を行ってきた。本年度から始まった第二相研究では、タンパク質レベルの発現や局在の変化を確認し、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。最終的にはさまざま

まな化学物質の胎生期ばく露による脳への影響を効率的に評価できるバイオマーカーの発見を目的とする。

B. 研究方法

(1) 動物モデル

サリドマイド誘発自閉症モデルラット：

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たものを対照群とした。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使い、後半部で HPLC によるセロトニンの定量を行った。

老化促進モデルマウス SAMP8, SAMR1：SAM (Senescence accelerated mouse) は京都大学で確立された促進老化を示す動物で、様々な老化病態を発症して促進老化を示す SAMP 系統と正常老化を示す SAMR 系統の 2 系統がある。SAMP 系統のなかでも SAMP8 は、身体的老化は緩やかであるが、5 カ月齢以降、進行性の学習・記憶障害など、主として中枢神経系の病態を示し、脳の加齢変化を調べるモデルとして使用されてきた。田代らは最近、SAMP8 と対照群である SAMR1 (正常老化を示す) を生後初期から比較解析し、学習・記憶障害の顕れる以前の若齢期 (1~5 ヶ月齢) の SAMP8 に顕著な多動や低不安などの行動異常が見られること、海馬において甲状腺ホルモン活性化酵素 (II 型脱ヨード化酵素) が減少

し、甲状腺ホルモン・シグナルが減弱していることを見出した (Sawano et al., *J. Neurosci. Res.*, 2013)。このように SAMP8 は、胎生期~周産期の脳の発達に必須のホルモンである甲状腺ホルモンの脳内での代謝異常から発達障害を引き起こす最初のモデルとして本研究で活用する。

(2) 行動解析

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。

(3) 遺伝子発現解析

今年度は、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 β -actin を内部標準遺伝子としてデータを標準化した。

(4) ウェスタン・ブロッティング

各個体、各組織を SDS サンプルバッファーに溶解し、SDS 電気泳動後、PVDF 膜に転写し、目的タンパク質に特異的な抗体を用いて ECL 法により定量した。内部標準として β アクチンを用いた。

(倫理面への配慮)

動物実験はすべて青山学院大学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：

平成 23 年度までの研究で、網羅的遺伝子発現解析により、胎生期サリドマイドばく露群 (THA 群) と非ばく露正常群 (CTL 群) の大脳皮質および海馬における生後発

達過程を比較した結果、両群の遺伝子発現の差異は大脳皮質の方が海馬より大きく、また生後 20 日頃にその差が最も顕著であることが分かった。正常群でこの時期を中心にみられる遺伝子発現のスイッチングが THA 群では見られないことがその主な理由である。生後 20 日頃は初期のシナプス形成がほぼ完了し、活動依存的な発達が始まる時期であることから、両群でシナプス形成に違いがあるのではないかと考え、本年度はシナプスに局在するタンパク質の量的変化を大脳皮質で調べることにした。

グルタミン酸作動性シナプスのプレ側に局在する vGLUT1 (vesicular glutamate transporter 1) およびポスト側の足場タンパクである PSD95 (postsynaptic density protein 95)、ならびに GABA 作動性シナプスのプレ側に局在する GAD65、GAD67 (glutamic acid decarboxylase) およびポスト側の足場タンパクである Gephyrin、のそれぞれに対する特異抗体を用いてウェスタンブロッティングを行ったところ、図 1 に示すように、生後 14 日で PSD95 と GAD67 のタンパク量が THA 群では CTL 群の 40~50% に減少していた。vGLUT1 および Gephyrin については両群で全く差がみられなかったが、GAD65 については THA 群で同時期に減少傾向がみられた。

(2) SAMP8 マウスにみられる注意欠陥多動性障害 (ADHD) 様症状と甲状腺ホルモン: SAMP8、SAMR1 とともに血中甲状腺ホルモン濃度は、輸送型であるサイロキシン (T4)、活性型である 3, 5, 3'-トリヨードサイロニン (T3) とともに正常であるが、平成 23 年度までの研究で、SAMP8 海馬では甲

状腺ホルモン活性化酵素である II 型脱ヨード化酵素 (DIO2) が 1 カ月齢から大幅に減少していることが判明した。脳内 T3 の 80% は DIO2 が触媒する T4 の脱ヨード化により局所的に産生されることが近年、明らかになっているため、SAMP8 海馬では T3 が減少している可能性が考えられる。そこで本年度は、T3 に依存して発現が増減する典型的な甲状腺ホルモン応答遺伝子のいくつかについて SAMP8 および SAMR1 の海馬で比較したところ、図 2 に示すように、SAMP8 での発現低下が確認され、実際に T3 濃度が低下していることを裏付ける結果となった。ポストシナプスのタンパクである RC3 については、図に示した時期より早い生後 2~3 週の時点で、SAMP8 海馬における有意な発現低下が確認されている。

代表的な T3 依存遺伝子であるミエリン塩基性タンパク (MBP) については、さらに免疫組織化学的にも海馬における減少を確認することができた (図 3)。SAMR1 では MBP タンパクは 1 カ月齢から 8 カ月齢にかけて大幅に増加し、その後一定となるが、SAMP8 では十分に増加しないだけでなく、8 カ月齢から 10 ヶ月齢にかけて減少に転じていた。これらの結果から、SAMP8 海馬では、発達期のミエリン形成不全に続いて、加齢によるミエリン消失が早期に始まると考えられる。

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、生後 50 日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)。我々の網羅的遺伝子発現解析でも、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、シナプス形成の異常を示唆する結果を得ていたが、今回のタンパク・レベルでの解析からそれが裏づけられることになった。有意な減少のみられた PSD95 および GAD67 は、生後 7 日ではほとんど検出されず、PSD95 では 14 日から 40 日にかけて、GAD67 では 7 日から 20 日にかけて、ほぼ直線的に増加するが、THA 群では 14 日での量が CTL 群の約 1/2 に低下していた。どちらも 40 日齢では CTL 群と同等まで増加しているため、シナプス形成が持続的に阻害されたのではなく、THA ばく露によってシナプス形成開始が一時的に遅れたことを意味している。

(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：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、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を我々は見出している (Sawano et al., 2013)。代表

的な甲状腺ホルモン応答遺伝子の発現も低下していることから、局所的な T3 欠乏が裏付けられた。

ヒトでも胎児の甲状腺ホルモン産生能は低く、母親からの供給に依存するため、早産で生まれた新生児では一過性の甲状腺ホルモン欠乏に陥り、その結果、ADHD を高率に発症することが報告されている。また、 β 型甲状腺ホルモン受容体の変異による「甲状腺ホルモン不応症」の児童の多くに ADHD が認められている。SAMP8 の例にみられるように、DIO2 の変動による局所的甲状腺ホルモン・シグナルの低下がヒト発達障害に関わる可能性について、SAMP8 のケースは新たな知見を与えるものと期待される。

甲状腺ホルモンに構造的に類似した水酸化 PCB やビスフェノール A など、これまで受容体を中心にこのシステムをかく乱する可能性のある化学物質が調べられてきたが、脳内 T3 濃度の制御に関わる DIO2 に作用する化学物質についても今後、調べる必要がある。

E. 結論

全く異なる要因で行動異常を呈する二つの動物モデルの解析から得られた結果は、脳の発達過程における異常はシナプス形成のほぼ完了する時期に顕在化する可能性を示唆している。今後、この時期を中心にさらに調べることで、異常の早期発見につながるバイオマーカーの特定を進める。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Sawano E., Negishi T., Aoki T., Murakami M., Tashiro T. “Alterations in local thyroid hormone signaling in the hippocampus of the SAMP8 mouse at younger ages: association with delayed myelination and behavioral abnormalities”, *J. Neurosci. Res.*, 91, 382-392 (2013)

2) Negishi T., Takahashi M., Matsunaga Y., Hirano S., Tashiro T. “Diphenylarsinic acid increased the synthesis and release of neuroactive and vasoactive peptides in rat cerebellar astrocytes.” *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 71, 468-479 (2012)

2. 学会発表

(1) 国際学会

1) Mouri M., Negishi, T., Tashiro, T. “Alterations in neuronal maturation in arat model of autism induced by fetal thalidomide exposure.” (The 11th Biennial Meeting of the Asian-Pacific Society for Neurochemistry/ 55th Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry, Kobe, Sept. 29 – Oct. 2, 2012)

2) Sawano E., Negishi, T., Tashiro, T. “Alterations in local thyroid hormone

metabolism in the hippocampus of the senescence-accelerated SAMP8 mice at younger ages.” (The 11th Biennial Meeting of the Asian-Pacific Society for Neurochemistry/ 55th Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry, Kobe, Sept. 29 – Oct. 2, 2012)

3) Mtsunaga Y., Kudo T., Kojima H., Negishi T., Tashiro T. “Early vascular impairment in the hippocampus leads to synaptic and cognitive dysfunction in diabetic Goto-Kakizaki rats.” (The 11th Biennial Meeting of the Asian-Pacific Society for Neurochemistry/ 55th Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry, Kobe, Sept. 29 – Oct. 2, 2012)

(2) 国内学会

1) 澤野 恵梨香、根岸 隆之、田代 朋子
「老化促進モデルマウス (SAMP8) における若齢期の脳内甲状腺ホルモン代謝の変化」(第 27 回 老化促進モデルマウス (SAM)研究協議会・東京、2012 年 7 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

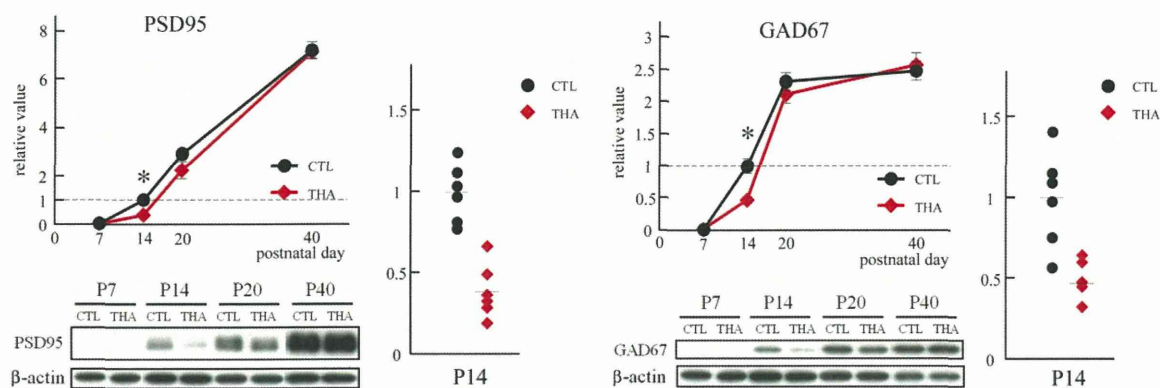


図1. 生後の大脳皮質のシナプス形成に対する胎生期サリドマイドばく露の影響: PSD95(左)およびGAD67(右)に対する特異抗体を用いた生後発達期のタンパク量の変化をウェスタンブロットング法で定量。グラフの下に各プロットの例を示す。グラフ右の散布図は、THA群とCTL群で有意差のみられた生後14日時点での各個体の値を示す。

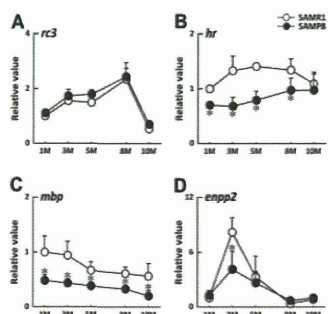


図2. SAMP8 およびSAMR1の海馬における4種の甲状腺ホルモン応答遺伝子の発現

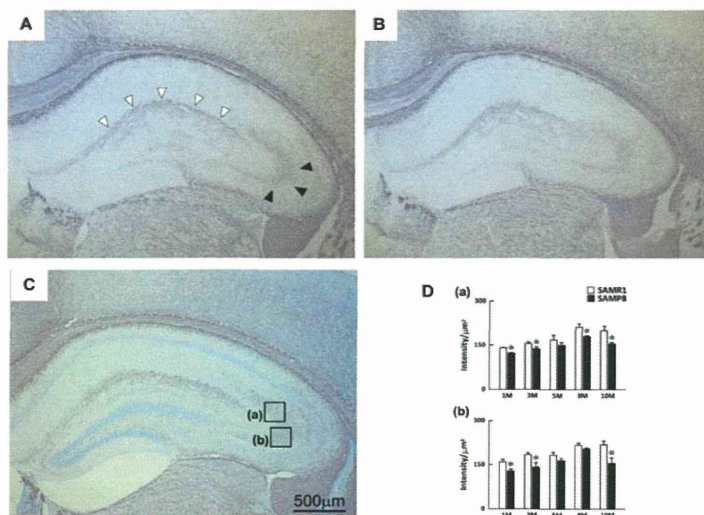


図3. 抗MBP抗体染色による1ヶ月齢SAMR1(A)およびSAMP8(B)海馬のミエリン分布 (A)では、▽で perforant path、▼で Schaffer collateral のミエリン化繊維を示す。(C)ではHE対比染色により神経細胞層を示す。(C)の図中口で囲んだ二部位の染色強度を(D)に示す。

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 24 年度分担研究課題：内分泌かく乱物質と子どもの情動認知行動異常

研究分担者 定松 美幸 金城学院大学人間科学部 教授
研究協力者 金井 裕彦 滋賀医科大学医学部精神医学講座 講師

研究要旨：内分泌かく乱物質のようなホルモンはと子どもの情動認知行動に影響を与えることが指摘されている。甲状腺ホルモンは胎生期中枢神経系の発達に多大な影響を及ぼすことは古くから知られている。人間では、甲状腺ホルモン不足の結果、精神発達遅滞をきたすクレチン症としてよく知られている。研究分担者は甲状腺ホルモン受容体ノックアウトマウス (TRKO) を入手することができたので、行動や組織について、PTU ラットと比較検討することとした。5 種類の strain (TR- $\alpha^{-/-}$, TR- $\alpha^{+/-}$, TR- $\beta^{+/-}$, TR- $\beta^{-/-}$, ワイルドタイプ) の雌雄各 5-6 個体を 3 か月齢時に行動実験に供した。行動観察では TR- $\alpha^{0/0}$ マウスは探索行動、立ち上がりなどでワイルドタイプと比較して有意な差を認めなかったが、新規環境における行動潜時についてのみ若干潜時が長い傾向が認められた。TR- $\alpha^{0/0}$ マウスとは対照的に、TR- $\beta^{+/-}$ 、TR- $\beta^{-/-}$ マウスはワイルドタイプに対して有意に行動量の増加を認めた。脳内ドーパミン、セロトニン濃度について検討した結果、セロトニンは線条体、海馬いずれでも、また TRKO の 4 系列すべてにおいてワイルドタイプと有意な差は認められなかった。ドーパミンについては、海馬ではいずれも有意な差は認められなかったが、線条体において TR- $\beta^{+/-}$ 、TR- $\beta^{-/-}$ マウスでは有意に上昇していることが明らかになった。

A. 序論

甲状腺ホルモンは胎生期中枢神経系の発達に多大な影響を及ぼすことは古くから知られている。人間では、甲状腺ホルモン不足の結果、精神発達遅滞をきたすクレチン症としてよく知られており、我が国では新生児スクリーニングテストの項目に甲状腺ホルモン刺激ホルモン

(TSH) が含まれている。分担者は以前から出生直後に一定期間低甲状腺ホルモン状態においたラット (PTU ラット) について行動異常、組織変化などについて検討してきた。PTU ラットにおいては、多動、学習障害、こだわり、社会性の障害などを認め報告している。

甲状腺ホルモンについては最近の知見から、甲状腺ホルモン受容体異常を持つヒトの一部に注意欠陥・多動性障害 (ADHD) を発症するものがあることが報告され、発達障害と甲状腺ホルモンの関係について新たな知見が加わることが期待された。甲状腺ホルモン受容体 (TR) は α と β の 2 種類あり、おのおの 2 量体で構成されている。TR β の mutation を持つヒトは甲状腺ホルモンが産生されていても受容体が反応しないという甲状腺ホルモン不応症 (RTH) という病態を示す。RTH 患者の 40-70% に ADHD 合併がみられるという。一方、TR α が 2 量体とも欠落すると、致死的であるとされている。

分担者は信州大学大学院医学研究科加齢病態制御学分野の厚意により甲状腺ホルモン受容体ノックアウトマウス (TRKO) を入手することができたので、行動や組織について、PTU ラットと比較検討することとした。

B. 方法

本研究は滋賀医科大学動物実験委員会の承認のもとで行われた。5 種類の strain (TR- $\alpha^{-/-}$, TR- $\alpha^{+/+}$, TR- $\beta^{+/+}$, TR- $\beta^{-/-}$, ワイルドタイプ) の雌雄各 5-6 個体を 3 か月齢時に行動実験に供した。実験はビデオモニタリングオープンフィールド (室町機械) を用い、5 セッション行いそれぞれ行動指標を測定した。

また胎生期、出生直後に TR の発現が高度である線条体、海馬において ADHD に関連するドーパミン、セロトニン濃度の測定を HPLC (高速液体クロマトグラフィー high performance liquid

chromatography) を用いて行った。

C. 結果

TR- $\alpha^{-/-}$ マウスは探索行動、立ち上がりなどでワイルドタイプと比較して有意な差を認めなかった。新規環境における行動潜時についてのみ若干潜時が長い傾向が認められた。TR- $\alpha^{-/-}$ マウスとは対照的に、TR- $\beta^{+/+}$ 、TR- $\beta^{-/-}$ マウスはワイルドタイプに対して有意に行動量の増加を認めた (Fig 1)。

ドーパミン、セロトニン濃度について検討した結果、セロトニンは線条体、海馬いずれでも、また甲状腺ホルモン受容体ノックアウトマウスの 4 系列すべてにおいてワイルドタイプと有意な差は認められなかった (data not shown)。

ドーパミンについては、海馬ではいずれも有意な差は認められなかったが、線条体において TR- $\beta^{+/+}$ 、TR- $\beta^{-/-}$ マウスでは有意に上昇していることが明らかになった (Fig 2)。

D. 考察

行動実験の結果では、TR- $\beta^{+/+}$ 、TR- $\beta^{-/-}$ マウスにおいて多動傾向が明らかになった。ヒト甲状腺ホルモン不応症 (RTH) では TR- β 遺伝子の変異が認められており、多動を特徴とする ADHD 合併率が高いことと符合する。また TR- β ノックインマウスが RTH のモデルラットとして作成されているが、同様に多動、学習障害、「慣れない」傾向などを示すとされている。PTU ラット (出生直後に一定期間低甲状腺ホルモン状態においたラット) における甲状腺ホルモン受容体については検討して

いないが、PTU ラットにおける多動、学習障害などとも共通するものと考えられる。

ADHD（注意欠陥・多動性障害）の治療薬としては我が国でもメチルフェニデートが用いられるが、このことから、ADHDにおけるドーパミンの関与は以前から指摘されていた。上記の RTH モデルマウスである TR- β ノックインマウスの多動はメチルフェニデートで改善することが報告されている。今回、ドーパミン濃度が TR- $\beta^{+/+}$ 、TR- $\beta^{-/-}$ マウスにおいて有意に上昇していた。

生後の TR α KO は今回のオープンフィールドテストでは有意な差を認めなかったが、学習障害を示すという報告がある。TR α KO のドーパミン、セロトニン濃度についてもワイルドタイプと有意差を認めないことから、PTU ラットで観察された行動異常はおそらく TR β を経由して発現するものと予想される。ADHD モデルである TR β ノックインマウスの行動異常と TR β KO の多動はドーパミン過剰と合わせて共通する機序が存在するものと考えられよう。

E. 結論

出生直後に低甲状腺ホルモン状態においたラットの示す行動異常と甲状腺ホルモン受容体 β ノックアウトマウスの示す行動異常はいずれもドーパミンの関与を示すもので、ADHD の行動異常の発症機序に甲状腺ホルモンがかかわっている可能性を示唆するものである。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表 なし

学会発表 なし

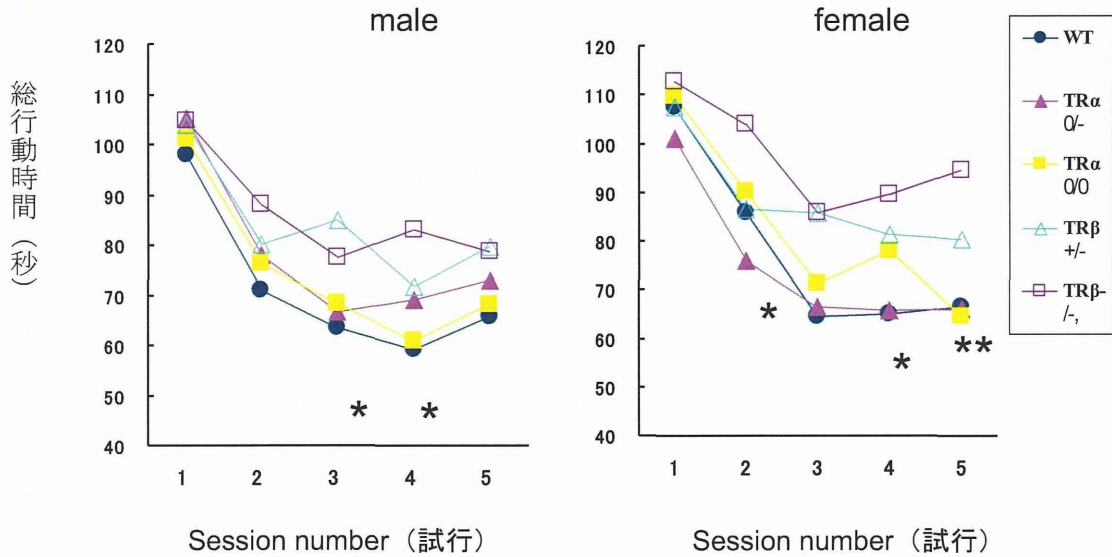
H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得 なし

2. 実用新案登録 なし

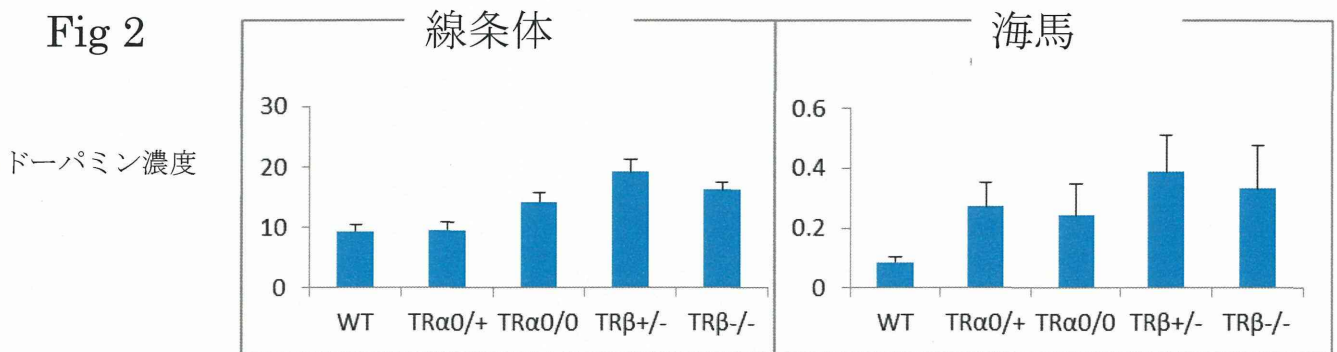
3. その他 なし

Fig 1



甲状腺ホルモン受容体ノックアウトマウス (TR- α ^{-/-}, TR- α ^{+/-}, TR- β ^{+/-}, TR- β ^{-/-})、及びワイルドタイプマウスにおけるオープンフィールド行動実験

Fig 2



甲状腺ホルモン受容体ノックアウトマウス (TR- α ^{-/-}, TR- α ^{+/-}, TR- β ^{+/-}, TR- β ^{-/-})、及びワイルドタイプマウスにおける線条体及び海馬のドーパミン濃度 (8週齢)

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 24 年度分担研究課題名：臨床的研究（非侵襲的脳機能評価）

研究分担者：成田 奈緒子 文教大学教育学部特別支援教育専修 教授
研究協力者：樋口 大樹 筑波大学大学院人間総合科学研究科 修士課程

研究要旨：

これまでの研究では、非侵襲的脳機能評価法である近赤外線酸素モニターを、自閉症スペクトラム（Autism spectrum disorders; ASD）者の評価に応用してきた。この結果、ASD 者においては、タスクの切り替えに呼応する前頭葉血流内酸素化ヘモグロビン濃度の速やかな変化が遅延する傾向が認められ、これを報告した。また、ASD 者の不安を始めとするネガティブな情動想起は、前頭葉処理遅延ともかかわっていると考えられる結果も得ており、これらは彼らの生活・教育・就労場面での困難さに大きく影響する要素である。そこで今年度は、彼らがこれらの困難さを軽減させるために最も有効な生活・教育場面での関わりの工夫を脳科学的に検討することとした。

近赤外線酸素モニターを用いて、ワーキングメモリを要するタスクを行い、タスク前にタスク内容を教示すること、あるいは事前にタスクで用いる操作方法を練習する条件を負荷した時に、何もない状況と比較して変化があるかどうかを、ASD 者 3 名と健常者 3 名を用いて予備実験として行った。その結果、ASD 者では、教示が事前に行われ、かつ事前練習を行ったときが最も安定してタスクに呼応した前頭前野機能の賦活が見られやすかった。一方健常者においては、この傾向は一定ではなかった。今後、例数を増やし、見通しが立てにくい場面で不安を高めやすい ASD 者での脳機能賦活の方策として確立したいと考える。

A. 序論

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。

自閉症スペクトラム（ASD）者においては、社会性の障害、コミュニケーションの障害、そして常同性の保持、という先天性の脳機能障害に基づく異常が様々な程度に存在する。これにより、ASD 者においては高い不安と高次脳機能の様々な程度の障害がその社会生活の困難さが

生じ、気分障害や人格各障害、種々の心身症といった二次障害を発症させる原因となっている。

この、ASD 者における様々な程度の脳機能障害を非侵襲的かつ的確に診断するための補助診断ツールとして用いられることを目的として、これまで NIRS を用いて ASD 者と健常者を被験者とした様々な実験を行ってきた。

その結果、以下の 2 点が示唆された。

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。特に不安の高い個体においては、右側有意の前頭葉賦活が起こりやすい。②ASD 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。また、タスクの切り替えに呼応した前頭葉賦活の切り替えが遅延する傾向が認められる。

以上より、ASD 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。

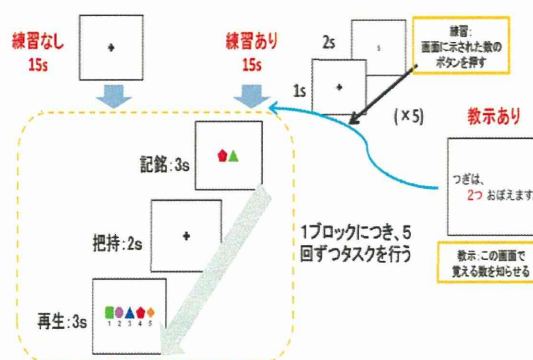
そこで今年度は、これまで得られた NIRS 上の特性を考慮して、ワーキングメモリタスクを処理する際に、どのような条件下で最も効率的に前頭葉を賦活することが可能なのかを、ASD 者と健常者で比較することにより、より支援的な応用の可能性を模索することとした。

B. 方法

対象は、ASD と診断されている男児 2 名 (A.12 歳、B.14 歳) と健常被験者 2 名 (C.51 歳男性、D.43 歳女性)。本研究は文教大学大学院教育学研究科研究倫理委員会の承認のもと、被験者とその保護者から書面での同意を得て行われた。

タスクは図 1 に示すように PC 画面上から提示されるよう独自に作成した。すなわち、画面に現れた色と形の異なる図形 1 個~3 個を覚えさせ (記録)、2 秒間の把持時間を取ったあと (把持)、最後に 5 個の図形の中から覚えた図形の番号をテンキーから選び押させる (再生)。

「教示あり」では、記録の前に「次は二つ覚えます」などと、記憶させる図形の数をあらかじめ伝える画面を出す。「教示なし」では出さない。また、「練習あり」ではタスク開始前に数字が書かれた画面を見せ、その数と同じテンキーボタンを押させるが「練習なし」ではその時間+が書かれた画面を見つめさせる。



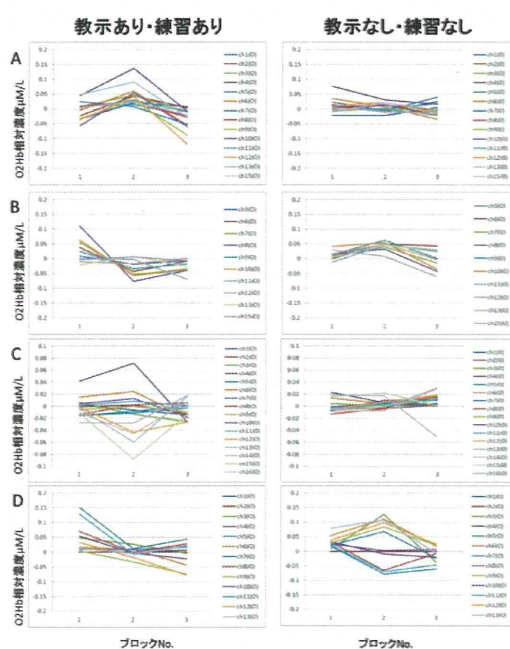
(図 1) タスクプロトコール

タスクブロックは記憶する図形の数 1 ~ 3 それぞれ 5 回ずつ行う。タスク施行中は NIRS (Spectratech OEG-16) を被験者前頭部に装着し、それぞれのタスクの「教示あり」「教示なし」「練習あり」「練習なし」のブロックごとの平均酸素化へ

モグロビン (O2Hb) 値を pre5s、recovery3s、post5s としてベースラインの補正をした上で求め、グラフに表した。

C. 結果

図 2 は、被験者 A~D のチャンネル別 O2Hb 濃度の相対値を、タスクの記憶図形数ごとにブロック平均値として求め、「教示あり・練習あり」と「教示なし・練習なし」の比較として表したものである。



(図 2) 被験者 4 名における O2Hb 相対濃度変化

被験者 A、B 共「教示なし・練習なし」と「教示あり・練習あり」の条件下の比較において、「教示あり・練習あり」で明らかに前頭前野の賦活が起こっていたことが共通していた。

しかし、被験者 A では、「教示あり・練習なし」のブロック 1 (1 個の図形記憶) で、「教示なし・練習なし」のブロック 1 と同程度の賦活が起こったがさらに「教示あり・練習あり」の条件下では、ブ

ック 2 (2 個の図形記憶) で大きく前頭前野が賦活する所見が得られた。しかし、ブロック 3 では再度活性が低下し、逆 V 字型の活性変化をほぼどのチャンネルにおいても認めた。

一方、被験者 B においては、「教示なし・練習なし」ではどのブロックでもほとんど前頭前野の賦活は起こらなかったが、「教示あり・練習あり」ではブロック 1 で最も前頭前野の賦活が認められた。しかしながら、ブロック 2 以降は再度活性が低下したままであった。

D. 考察

以上の結果から、ASD 者においては、ワーキングメモリ課題を遂行する際に事前の課題提示を行うこと、また遂行する課題の練習を行うことは有用であると考えられた。また、前頭前野の高い賦活を期待できるブロックは個人で異なっており、これは課題の難易度の個人的な捉えの差、すなわちモチベーションの差によると考えられた。

健常者 (被験者 C、D) においては、このような共通した傾向は認められず、「教示なし・練習なし」の条件下でも、個別の特徴を備えた賦活パターンが見られた。健常者においても、課題の難易度の個人的な捉えの差によると考えられる前頭前野の高い賦活が得られるブロックの差異は認められ、モチベーションの差が存在することが示唆された。

ASD 者においては、ワーキングメモリのみならず前頭葉における抑制機能を含む実行機能などの高次脳機能の障害が程度の個人差はあれ必ず存在するとされ、

また、病的に自律神経機能の不全や社会性の障害やコミュニケーション不全、新規の場面で高い緊張と不安を感じやすい。情動、特にネガティブな情動が前頭葉機能を障害することはこれまでも報告されており、また我々のこれまでの研究でも明らかであるため、ASD者において前頭葉機能を刺激し、賦活するための訓練、すなわち教育や療育を考える上で、最も効率的に前頭葉機能が賦活される環境要因を考慮することは極めて大切なことである。

今回の実験で得られた結果は、これまで経験的に教育・療育現場で試みられてきた「前もって手順を説明する」「繰り返し練習する」という方法論を脳科学的に裏付けるものである。ASD者にとって最適の環境を整えることで、最も効率良い前頭葉機能の賦活が得られることを支援者は把握しておくことが大切であろう。

今回の結果からは健常者ではむしろ教示や練習の有用性は認められず、主に個体差によりモチベーションの差が出現することが示唆された。しかし、例数が少ない予備実験であったため、今後例数を増やしてASD者における個人差の同定や、モチベーションの維持のためにさらに必要な関わりについて検討する必要があると考えられた。

E. 結論

ASD者において、課題の内容の事前の教示や練習は、前頭葉を効率的に賦活させるために有用であると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1) Higuchi H, Narita M, Sakatani K, Narita N. Prefrontal cortical hemodynamic change due to facial expression switching task. *Shonan Journal*, 3: 41-55, 2012.

2) 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*, 10:1-8, 2012.

3) 自閉症スペクトラムの前頭葉機能
成田奈緒子 「NIRSの基礎と臨床」酒谷薫 他編集 2012.1 新興医学出版社
(分担執筆)

4) 早寝早起き朝ごはん全国協議会 リーフレット 「早寝早起き朝ごはん」(幼児指导向き) 成田 奈緒子他 国立青少年教育振興機構 2012.3 (平成24年(2012)3月作成) (分担執筆)

学会発表

1) 小澤有希、小関英里圭、今泉奈津季、岡戸奈都子、樋口大樹、田副真美、成田正明、成田奈緒子
体験活動を用いた発達障害児と保護者への支援(1) ~児における前頭葉機能の変化とストレスマーカー、気分との関連~
第47回日本発達障害学会 2012.8.11-12 横

浜

2)今泉奈津季、岡戸奈都子、小澤有希、小関英里圭、樋口大樹、田副真美、成田正明、成田奈緒子、
体験活動を用いた発達障害児と保護者への支援(2) ～PARSから見た保護者の捉えの変化に影響を及ぼす要因～ 第47回
日本発達障害学会 2012.8.11-12 横浜

3) 成田 奈緒子、成田 正明、田副 真

美 投影法による発達障害児の経時的評価の意義について 第30回日本小児心身医学会 2012.9.7-9 名古屋

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

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

平成 24 年度分担研究課題；疫学的アプローチ（乳歯や毛髪からの有害物質検出）

分担研究者 横山 和仁 順天堂大学医学部 教授

研究要旨

目的と方法：発達障害のリスク因子（化学物質、既往歴および社会・経済・心理因子等）を明らかにする目的で、発達障害児と健常児を対象とする疫学調査を開始した。本研究では小学校就学前検診のため受診会場に来院した児童や、既に小学校に入学した生徒から、後日非侵襲的に生体試料（毛髪、抜去歯）を収集し、重金属や微量元素などの含有濃度を測定する。同時に保護者に対象児童の発達状況、妊娠中の薬物摂取歴、妊娠中の異常などの妊娠経過、生後の発達発育歴などについての質問紙調査を行う。平成 21 年度より調査を開始し、本年度までに質問紙調査票を 916 例回収し、除外データをのぞく 914 例について集計・分析を行った。生体試料は、毛髪を 800 検体、歯牙を 725 検体収集した。毛髪の微量元素は、硝酸・過酸化水素によるマイクロウェーブ分解ののち誘導結合プラズマ質量分析計を用いて測定を行った。乳歯中の微量元素はエナメル質のみをレーザーアブレーション誘導結合プラズマ質量分析計で測定する方法の開発を行った。

結果；質問紙調査票の分析では、(1) 対象者の属性 (2) PARS (Pervasive Developmental Disorders Autism Society Japan Rating Scale 広汎性発達障害日本自閉症協会評定尺度) 短縮版の得点分布と短縮版構成各 12 項目の回答別人数(%)、(3) PARS ピーク時 5 点以上（広汎性発達障害が疑われる）の児童の特徴、を行い、生体試料の測定では、(1) 毛髪試料の ICP-MS（誘導結合プラズマ質量分析）による測定結果、(2) 毛髪試料の Hg 測定結果、(3) 歯牙試料の ICP-MS 測定結果、(4) 歯牙試料の LA（レーザーアブレーション）-ICP-MS 測定結果、を本文で詳述する。その他、興味深い結果としては PARS ピーク時 5 点以上の児童の母親は子育てに困難を感じていることや、また、PARS 5 点以上の児童は外遊びを好まず、身体の症状を訴えることが多く、朝の寝起きの機嫌が悪いという特徴なども浮き彫りになった。ほかにも興味深いデータが多くあり、こちらも本文で詳述する。

研究協力者

平田 岳史・京都大学 教授

林 英男・東京都立産業技術研究センター・
研究員

松川 岳久・順天堂大学 助教

黒澤美智子・同 准教授

篠原 光代・同 前任准教授

宇野 洋太・よこはま発達クリニック医師

内山 登紀夫・よこはま発達クリニック院
長(福島大学大学院教授)

天笠 光雄・東京医科歯科大学大学院教授

山城 正司・同 講師

柚木 泰広・同 医員

A. 本研究の目的

精神・知能的な障害や身体的な障害を伴う発達遅延は発達障害と呼ばれる。このうち、社会性やコミュニケーションの障害、ならびに常同的行動、興味、ある

いは活動の存在を特徴とする障害は広汎性発達障害と定義され、自閉性障害（自閉症）、レット障害、小児期崩壊性障害、アスペルガー障害、および特定不能の広汎性発達障害が含まれる。なお、知能指数が高いものは高機能広汎性発達障害と呼ばれることがある。

本研究の目的は、発達障害のリスク要因（化学物質および社会心理学的因子）を疫学調査により明らかにすることにある。

B. 方法

1. 発達に関する質問紙調査票の配布、歯や毛髪の収集

本研究は順天堂大学医学部倫理委員会（承認番号 2012155、平成 21 年 9 月 8 日承認）、及び三重大学研究倫理委員会（受付番号 1081、平成 21 年 8 月 25 日承認、）にて承認されてから実施した。実施にあたっては、対象者に研究目的、内容等を記した文書を配布し、これには、質問紙調査票あるいは抜けた乳歯・毛髪などの返送をもって同意とみなすと明記した。質問紙調査票、生体試料に個人情報記載は求めなかった。対象者は乳歯が抜ける時期にあたる保育園、幼稚園、または就学前健診の児童や小学生の保護者で、

本調査の主旨を理解し協力を申し出た者とした。

H21～24 年度に協力が得られた施設は以下の通りである。中富良野保育園（北海道）、水沢小学校、松代小学校、馬場小学校(以上新潟県)、メリーランド保育園、牧が丘幼稚園、萌丘幼稚園、にのみや幼稚園、久下田小学校、真岡西小学校、亀山小学校、真岡小学校(以上栃木県)、真壁保育園、みくに保育園、結城明照保育園、まつばら保育園、いしだ保育園、しろはと保育園、ちよかわ幼稚園、高道祖幼稚園、豊加美幼稚園、騰波ノ江幼稚園、上妻幼稚園、新利根つばさ幼稚園、絹西保育園、きぬふたば文化幼稚園、ふたば文化幼稚園、しらはね保育園、たちばな幼稚園、石下幼稚園、ケアーズ保育園、石下保育園、大宝保育園、あいの家、まつやま中央保育園、ひかり幼稚園、河和田幼稚園、もみの木保育園、川島第二保育園、八千代ひかり幼稚園、法泉寺保育園、ふたば保育園、明野保育園、はぐろ保育園、つくば保育園、白山保育所、みどりが丘保育園、梅ヶ丘小学校、古里小学校、川島小学校、新治小学校、大村小学校、関城東小学校、関城西小学校、小栗小学校、村田小学校、大田小学校、中小学校、下館小学校、高道祖小学校、総上小学校、東小学校、小田小学校、北条小学校、つくば養護学校、梅ヶ丘小学校、騰波ノ江小学校、取手小学校、豊加美小学校、宗道小学校、大宝小学校、大形小学校、下妻小学校、伊讚小学校、下結城小学校、上妻小学校、上辺見小学校、五所小学校、茨城県発達障害者支援センター（以上茨城県）、八幡幼稚園、東伊興小学校、保田