

15. あなたは妊娠中、週に何回くらい魚を食べていましたか？

週 ( ) 回

16. あなたは妊娠中タバコを吸っていましたか？

1. いいえ                      2. はい

17. あなたは妊娠中、食事制限をしていましたか？

1. いいえ                      2. はい → 制限していた食べ物はなんですか？  
( )

18. あなたは妊娠中、一般的なつわり以外に医学的な異常を医師に指摘されましたか？

1. ない      2. あった → 医師の診断は何でしたか。  
( )

19. あなたは貧血のための鉄剤の内服治療を受けましたか？

1. 受けない                      2. 受けた → 妊娠何週目ですか？  
( ) 週  
( ) 日間服用

20. あなたは妊娠中、鉄剤以外の薬を飲んでいましたか？

1. いいえ  
2. はい → どのような薬ですか？  
① ( ) 妊娠 ( ) 週目  
② ( ) 妊娠 ( ) 週目  
③ ( ) 妊娠 ( ) 週目

21. あなたは妊娠中、栄養剤やサプリメントを飲んでいましたか？

1. いいえ      2. はい → どのようなサプリメントですか？  
( )

**現在のお母さん自身のことについておたずねします。**

22. 子どものことでどうしたらよいか分からないときがある。

1. よくある      2. ときどきある      3. ほとんどない      4. まったくない

23. 子育てに失敗するのではないかと思うことがある。

1. よくある      2. ときどきある      3. ほとんどない      4. まったくない

24. この子がうまく育つのかどうか不安になる。

1. よくある      2. ときどきある      3. ほとんどない      4. まったくない

25. 子育てに自信がないと思う。

1. よくある      2. ときどきある      3. ほとんどない      4. まったくない

26. 子どもをどう育てたらよいかわからないことがある。

1. よくある      2. ときどきある      3. ほとんどない      4. まったくない

27. 子どものことでイライラすることがある。

1. よくある      2. ときどきある      3. ほとんどない      4. まったくない

28. 子どものことをうまく育てていると思う。

1. よくある      2. ときどきある      3. ほとんどない      4. まったくない

29. 自分一人で子どもを育てているのだという圧迫感がある。

1. よくある      2. ときどきある      3. ほとんどない      4. まったくない

30. 子育てのために、毎日毎日同じことの繰り返ししかしていないと思う。

1. よくある      2. ときどきある      3. ほとんどない      4. まったくない

31. こどもを育てるのに我慢ばかりはしていると思う。

1. よくある      2. ときどきある      3. ほとんどない      4. まったくない

**以下は、今回乳歯・毛髪をご提供いただくお子さんについてお答え下さい。**

32. 外遊びを好みますか？

1. はい                      2. いいえ

33. チックがあるとされたことがありますか？

1. はい                      2. いいえ

34. バイバイをするとき、手の甲（手のひらでなく）を向こうに向けてバイバイすることがよくありますか？

1. はい                      2. いいえ

35. 身体の症状を訴えることがよく（1週間に1回以上）ある。

1. はい                      2. いいえ

↓

「はい」と答えた方のみお答え下さい。どのような症状ですか？

1. 頭痛      2. 腹痛      3. 吐き気      4. その他（                      ）

36. テレビを見る時間は1日どのくらいですか？

- 平日（              ）時間くらい      休日（              ）時間くらい

37. お子さんはいままでに視線(目)が合いにくいことがありましたか？（怒られているときに目を合わせないのは除く。）

1. 視線(目)はよくあっていた。 2. 多少(時々)視線が合いにくかった。 3. かなり視線が合わなかった。

→ 上記の質問で2.または3.と答えた方のみお答え下さい。現在は視線(目)は合いますか？

1. 視線(目)はよくあう。 2. 多少(時々)視線が合いにくい。 3. かなり合いにくい。

38. お子さんはいままでに他の子どもに興味(他の子どものすることに関心を持ったり、まねをする)を示さないことがありましたか？

1. 他の子どもに興味があった。  
2. 多少他の子どもに興味があった。  
3. 他の子どもに興味がなかった。(他の子どもに無関心、他の子どもがいないところで遊びたがる)

→ 上記の質問で2.または3.と答えた方のみお答え下さい。

現在は他の子どもに関心がありますか？

1. 他の子どもに興味がある。  
2. 多少他の子どもに興味がある。  
3. 他の子どもに興味がない。

39. お子さんはいままでに名前を呼んでも振り向かないことがありましたか？

1. 名前を呼べば振り向いた。  
2. 時々名前を呼んでも振り向かないことがあった。(いつも確実に振り向くとは限らない)  
3. 名前を呼んでも振り向かなかった。

→ 上記の質問で 2.または 3.と答えた方のみお答え下さい。

現在は名前を呼べば振り向きますか？

1. 名前を呼べば振り向く。
2. 時々、名前を呼んでも振り向かないことがある。
3. 名前を呼んでも振り向かない。

40. お子さんはいままでに興味あるものを指さしてお母さんの顔を見て知らせましたか？ (大人が指さしの模倣をさせてできたものは含まない)

1. よく指さして母親の顔を見て興味あるものを知らせた。
2. 時々、そのような指さしをした。(一人で指さしをして、母親の顔を見ることはない)
3. そのような指さしはしなかった。

→ 上記の質問で 2.または 3.と答えた方のみお答え下さい。

現在はそのような指さしをしますか？

1. よく指さして母親の顔を見て興味あるものを知らせる。
2. 時々、そのような指さしをする。
3. そのような指さしはしない。

41. お子さんはいままでに言葉の遅れはありましたか？

1. 言葉の遅れはなかった。
2. 多少言葉が遅れていた。
3. かなり言葉が遅れていた。

→ 上記の質問で 2.または 3.と答えた方のみお答え下さい。

現在は言葉の遅れはありますか？

1. 言葉は遅れていない。
2. 多少言葉が遅れている。
3. かなり言葉が遅れている。

42. お子さんはいままでに会話は年齢相応にできましたか？

1. 会話は年齢相応にできた。
2. 会話は多少できるが年齢相応にはできなかった。
3. 会話はできなかった。

→ 上記の質問で 2.または 3.と答えた方のみお答え下さい。

現在は年齢相応に会話はできますか？

1. 会話は年齢相応にできる。
2. 会話は多少できるが、年齢相応にはできない。
3. 会話はできない。

43. お子さんはいままでに自分の言いたいことだけを一步通的に言うことがありましたか？

1. そのようなこと(一方通行に言いたいことを言う)はなかった。
2. 多少(時々)そのようなことがあった。
3. よくそのようなことがあった。

→ 上記の質問で2.または3.と答えた方のみお答え下さい。現在はどうですか？

1. そのようなこと(一方通行に言いたいことを言う)はない。
2. 多少(時々)そのようなことがある。
3. よくそのようなことがある。

4.4. お子さんはいままでに友達とごっこ遊び(ままごと、電車ごっこ、など)をよくしましたか？

1. 友達とごっこ遊びをよくした。
2. 多少(時々)友達とごっこ遊びをした。(やれるごっこ遊びがとても限られていた)
3. 友達とごっこ遊びはしなかった。

→ 上記の質問で2.または3.と答えた方のみお答え下さい。

現在は友達とごっこ遊びをしますか？

1. 友達とごっこ遊びをよくする。
2. 多少(時々)友達とごっこ遊びをする。
3. 友達とごっこ遊びはしない。

4.5. お子さんはいままでにオウム返しが目立ったことがありましたか？

1. オウム返しはなかった。
2. 多少(時々)オウム返しがあった。
3. オウム返しが多かった。

→ 上記の質問で2.または3.と答えた方のみお答え下さい。現在はどうですか？

1. オウム返しはない。
2. 多少(時々)オウム返しがある。
3. オウム返しが多い。

4.6. お子さんはいままでに CM などそのまの言葉で繰り返し言うことがありましたか？

1. そのようなこと(CMなどをそのまの言葉で繰り返し言う)はなかった。
2. 多少(時々)そのようなことがあった。
3. よくそのようなことがあった。

→ 上記の質問で2.または3.と答えた方のみお答え下さい。現在はどうですか？

1. そのようなこと(CMなどをそのまの言葉で繰り返し言う)はない。
2. 時々そのようなことがある。
3. よくそのようなことがある。

47. お子さんはいままでに同じ質問をしつこくする(同じ質問を繰り返す)ことがありましたか？

1. そのようなこと(同じ質問をしつこくする)はなかった。
2. 多少(時々)そのようなことをした。
3. よくそのようなことをした。

→ 上記の質問で2.または3.と答えた方のみお答え下さい。

現在は同じ質問をしつこくすることがありますか？

1. そのようなこと(同じ質問をしつこくする)はしない。
2. 多少(時々)そのようなことをする。
3. よくそのようなことをする。

48. お子さんはいままでに普段通りの状況や手順が急に変わる(予定・習慣の変更、慣れた道順の変更、行事の準備で園の日課が変わる)と混乱することがありましたか？

1. そのようなこと(普段通りの状況や手順が変わると混乱する)はなかった。
2. 多少(時々)そのようなことがあった。
3. よくそのようなことがあった。

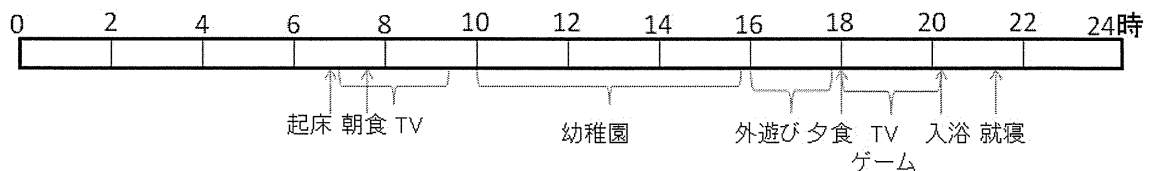
→ 上記の質問で2.または3.と答えた方のみお答え下さい。

現在は同じ普段通りの状況や手順が急に変わると混乱することがありますか？

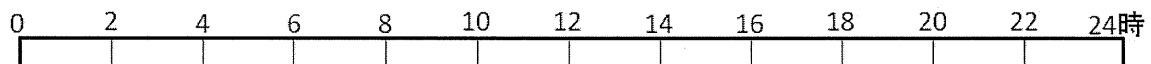
1. そのようなこと(普段通りの状況や手順が変わると混乱する)はない。
2. 多少(時々)そのようなことがある。
3. よくそのようなことがある。

49. お子さんの大体の生活リズムを記入例にならってご記入ください。

記入例



お子さんのおおよその生活のリズム(平日)を上例に習ってご記入ください



50. 朝食は毎日食べますか？

1. 必ず      2. 必ずではない

51. 睡眠は(1. ほとんど目を覚まさずに朝まで眠る。    2. 一晩に一回以上目を覚ます。)

52. 朝の寝起きの機嫌は (1. 良い    2. 悪い )

\*\*\*\*\*以上です。ご協力ありがとうございました\*\*\*\*\*

ご質問などお問い合わせ

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

研究代表者：三重大学大学院医学系研究科 成田正明

〒514-8507 三重県津市江戸橋 2-174

三重大学大学院医学系研究科・発生再生医学

TEL 059-232-1111（内線 6326）

FAX 059-232-8031

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 25 年度分担研究報告書

平成 25 年度分担研究課題；疫学的アプローチ（子どもの発達・行動異常の疫学）  
有害化学物質の地域分布と情動・認知行動異常発症との関連

研究分担者	笠島 茂	三重大学大学院医学系研究科	教授
研究協力者	神田 浩路	三重大学医学部附属病院	助教

研究要旨：

広汎性発達障害 (PDD)、高機能広汎性発達障害 (HFPDD)、注意欠格／多動性障害 (ADHD)、学習障害 (LD) ならびにそれらの関連要因の疫学調査（平成 25 年 1 月～3 月）を実施した。A 町に居住する 20 歳以上 60 歳未満の全人口 7,590 人 (男性 3,773 人、女性 3,817 人) に自記式質問票を配布した。回収率は 65.6% である。同意が得られた 4,525 人 (59.6%) を解析の対象とした。回答者本人が各障害を 15 歳までに医師から指摘された割合 (本人有病率)、回答者の児が各障害を医師から指摘された割合 (児有病率)、および回答者の人口学的特性、社会経済的地位 (SES)、および居住地区との関連性を検討した。20 歳以上 40 歳未満の 1,927 人における本人有病率は、PDD で男性千人対 9.9、女性千人対 3.9、以下同様に HFPDD で 4.4、2.0、ADHD で 3.3、0.98、LD で 3.3、3.0 であった。年齢が 20 歳以上 60 歳未満である親 4,378 人における各障害の児有病率 (障害児を持つ親の割合) は、父親では、PDD で有業者千人対 13.4、無業者千人対 147.1、以下同様に、HFPDD で 2.4、62.5、ADHD で 5.5、31.3、LD で 6.3、93.8 であった。母親では、PDD で有業者千人対 10.9、無業者千人対 25.3、以下同様に、HFPDD で 2.5、2.5、ADHD で 5.0、5.1、LD で 6.3、2.5 であった。いずれかの児に PDD の病歴があるかを、父親の PDD の病歴、職業の有無、年齢による多重ロジスティックモデルで回帰したところ、児の PDD の病歴に関する父親の PDD の病歴のオッズ比は 33.2 (95% 信頼区間 : 2.84-388、 $p=0.005$ )、父親の職業 (無業) のオッズ比は 10.0 (2.51-40.3、 $p=0.001$ ) であった。一方、母親についての同様のモデルでは関連性は認められなかった。児の PDD と父親の PDD の病歴、職業の有無、および居住地区との間に関連性が示された。今後、これらの関連性の再現性ならびに既知の要因との交絡の有無を検討する必要がある。



## A. 序論

広汎性発達障害(PDD)、高機能広汎性発達障害(HFPDD)、注意欠格／多動性障害(ADHD)、学習障害(LD)ならびにそれらの関連要因の疫学調査(平成25年1月～3月)を実施した。

## B. 方法

A町に居住する20歳以上60歳未満の全人口7,590人(男性3,773人、女性3,817人)に自記式質問票を配布した。回収数は4,979であり(65.6%)、同意が得られた4,525人(59.6%)を解析の対象とした。研究デザインは横断研究である。回答者本人が、PDD、HFPDD、ADHD、またはLDの各障害を15歳までに医師から指摘された割合(本人有病率)、回答者の児が各障害を医師から指摘された割合(児有病率)、および回答者の人口学的特性、社会経済的地位(SES)との関連性を検討した。なお、本研究は三重大学医学部倫理委員会の承認のもとで実施された。

## C. 結果

20歳以上40歳未満の1,927人における本人有病率は、PDDで男性千人対9.9、女性千人対3.9、以下同様にHFPDDで4.4、2.0、ADHDで3.3、0.98、LDで3.3、3.0であった。年齢が20歳以上60歳未満である親4,378人における各障害の児有病率(障害児を持つ親の割合)は、父親では、PDDで有業者千人対13.4、無業者千人対147.1、以下同様に、HFPDDで

2.4、62.5、ADHDで5.5、31.3、LDで6.3、93.8であった。母親では、PDDで有業者千人対10.9、無業者千人対25.3、以下同様に、HFPDDで2.5、2.5、ADHDで5.0、5.1、LDで6.3、2.5であった。

児のPDDの病歴について、父親のPDDの病歴、職業の有無(回答時)、年齢(回答時)による多重ロジスティックモデル(1)で回帰したところ、児のPDDの病歴に関する父親のPDDの病歴のオッズ比は33.2(95%信頼区間:2.84-388、 $p=0.005$ )、父親の職業(無業)のオッズ比は10.0(2.51-40.3、 $p=0.001$ )であった。父親の年齢に関連性は認められなかった。従事している業種(産業)によるモデル(2)で児のPDDの病歴と父の従事している業種との間に関連性は認められなかった。一方、母親についての同様のモデル(3)ないし(4)では何れの間に関連性も認められなかった。

児のPDDの病歴について、父親の居住地区(4地区)と年齢による多重ロジスティックモデル(5)で回帰したところ、居住地区は児のPDDの病歴に関連し( $p=0.046$ )、地区間のオッズ比は最大で6.62(1.45-30.1、 $p=0.015$ )であった。母親についての同様のモデル(5)では関連性は認められなかった。

## D. 考察と結論

児のPDDと父親のPDDの病歴、職業の有無、および居住地区との間に関連性が示された。今後、これらの関連性の再

現性、ならびに既知の要因との交絡による可能性を検討する必要性がある。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

論文発表 なし

学会発表

神田浩路. 大学病院における「疫学センター」の役割と地域連携. 科学的根拠に基づいた公衆衛生政策の推進—精神保健

版一. シンポジウム. 第 72 回日本公衆衛生学会総会. 三重県津市. 2013 年 10 月 24 日.

島田晃秀、神田浩路、毛利一平、笠島茂. ソーシャルキャピタルの信頼の力が健康関連 QOL に与える影響についての調査研究. 第 62 回三重県公衆衛生学会総会. 三重県津市. 2014 年 1 月 10 日

#### 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

### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

雑 誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Akiko Oyabu, Yasura Tashiro, Takahiro Oyama, Kensaku Ujihara, Takeshi Ohkawara, Michiru Ida-Eto, Masaaki Narita	Morphology of the facial motor nuclei in a rat model of autism during early development	International Journal of Developmental Neuroscience	31(2)	138-144	2013
Michiru Ida-Eto, Akiko Oyabu, Takeshi Ohkawara, Yasura Tashiro, Naoko Narita, Masaaki Narita	Prenatal exposure to organomercury, thimerosal, persistently impairs the serotonergic and dopaminergic systems in the rat brain: Implications for association with developmental disorders.	Brain and Development	35	261-264	2013
Takeshi Ohkawara, Akiko Oyabu, Michiru Ida-Eto, Yasura Tashiro, Naoko Narita, Masaaki Narita.	Subtype-specific parafollicular localization of the neuropeptide manserin in the rat thyroid gland	Acta Histochemica	115(2)	190-194	2013
Sawano E, Takahashi M, Negishi T, <u>Tashiro T.</u>	Thyroid hormone-dependent development of the GABAergic pre- and post-synaptic components in the rat hippocampus	International Journal of Developmental Neuroscience	31	751-761	2013

その他

発表者氏名	タイトル名		出版年
成田正明	研究代表者は、本厚生労働科学研究を率いつつ、小児科の専門医として、子ども情動・認知行動異常についての診療にも従事している。記事は厚生労働科学研究費補助金研究の概要を一般のひとにわかりやすく紹介したもの	中日新聞	2013年1月6日 掲載  次項「IV. 研究成果の刊行物・別刷」－2
成田正明	研究代表者が中心となって推進している三重県紀南3市町村（熊野市・御浜町・紀宝町）での取り組み；本厚生労働科学研究の成果に基づき、情動・認知行動の異常の早期発見法、及び基礎研究に裏付けられた「療育法」について紹介されたもの	中日新聞	2013年5月20日 掲載  次項「IV. 研究成果の刊行物・別刷」－3
江藤みちる （＝研究協力者＝研究代表者の研究室所属教員）	本厚生労働科学研究費補助金による研究遂行は若手研究者の人材育成面でも貢献してきている。この記事は研究代表者の研究室に所属する女性教員（＝研究協力者）の紹介記事で、理系の女性研究者であるとして、今話題の「リケジョ」として紹介されている。	中日新聞	2013年5月20日 掲載  次項「IV. 研究成果の刊行物・別刷」－4

#### IV. 研究成果の刊行物・別刷

Original article

# 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<sup>a,\*</sup>, Akiko Oyabu<sup>a</sup>, Takeshi Ohkawara<sup>a</sup>, Yasura Tashiro<sup>a</sup>,  
Naoko Narita<sup>b</sup>, Masaaki Narita<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Anatomy II, Mie University Graduate School of Medicine, Tsu, Mie 514-8507, Japan

<sup>b</sup> Department of Education, Bunkyo University, Koshigaya, Saitama 343-8511, Japan

Received 8 November 2011; received in revised form 2 May 2012; accepted 3 May 2012

## Abstract

Thimerosal, an organomercury compound, has been widely used as a preservative. Therefore, concerns have been raised about its neurotoxicity. We recently demonstrated perturbation of early serotonergic development by prenatal exposure to thimerosal (Ida-Eto et al. (2011) [11]). Here, we investigated whether prenatal thimerosal exposure causes persistent impairment after birth. Analysis on postnatal day 50 showed significant increase in hippocampal serotonin following thimerosal administration on embryonic day 9. Furthermore, not only serotonin, striatal dopamine was significantly increased. These results indicate that embryonic exposure to thimerosal produces lasting impairment of brain monoaminergic system, and thus every effort should be made to avoid the use of thimerosal.

© 2012 The Japanese Society of Child Neurology. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Thimerosal; Serotonin; Dopamine; Embryonic exposure; Developmental disorders; Rat

## 1. Introduction

Thimerosal, an organomercury compound, has been widely used as a preservative [1]. Thimerosal is metabolized first to ethylmercury and further to inorganic mercury, both of which accumulate in the brain and other organs and have neurotoxic activity [2,3]. Accordingly, use of thimerosal such as vaccines is of great concern, particularly on infants and fetuses [4,5], and therefore, efforts have been made to reduce thimerosal from vaccines [6].

The adverse effects of thimerosal after neonatal administration include impaired pain sensitivity [7],

hippocampal neurodegeneration [8], and changes in the dopamine system with subsequent behavioral disorders [9]. In addition, thimerosal was shown to affect neurite extension of neuroblastoma cells *in vitro*, therefore, it is evident that thimerosal leads to neurological abnormalities [10]. However, little is known regarding the prenatal effects of thimerosal. We recently reported that exposure of pregnant rats at gestational day 9 (E9) to thimerosal increased the number of serotonergic neurons in the lateral portion of the caudal raphe in E15 rat hindbrain and thus prenatal thimerosal exposure impaired early serotonergic development [11]. We have also demonstrated that prenatal exposure at E9 to thalidomide or valproic acid (VPA) specifically caused long-term effects on the normal development of serotonergic neuronal systems [12,13], accompanied with behavioral abnormalities that mimicked human

\* Corresponding author. Address: Department of Anatomy II, Mie University Graduate School of Medicine, 2-174 Edobashi, Tsu, Mie 514-8507, Japan. Tel.: +81 59 232 1111x6326; fax: +81 59 232 8031.

E-mail address: etom@doc.medic.mie-u.ac.jp (M. Ida-Eto).

autism [14]. Although a relationship between autism and thimerosal has not been confirmed yet [15,16], we need to know whether prenatal thimerosal exposure effects can persist into adulthood. Here, we investigated serotonin and dopamine content in the brains of postnatal day 50 (P50) adult rats following prenatal treatment of thimerosal.

## 2. Materials and methods

Pregnant Wistar rats were purchased from CLEA Japan, Inc. (Tokyo, Japan). Thimerosal (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO) was dissolved in saline, and was administered to pregnant rats on E9 in volume of 50  $\mu$ l by intramuscular injection into the *glutei maximi*. Thimerosal doses per injection were: 1, 0.1 and 0.01 mg Hg/kg. For the control group, saline was administered in the same manner. Three dams for each group were examined. All animal experiments were authorized by the Animal Research Committee of Mie University.

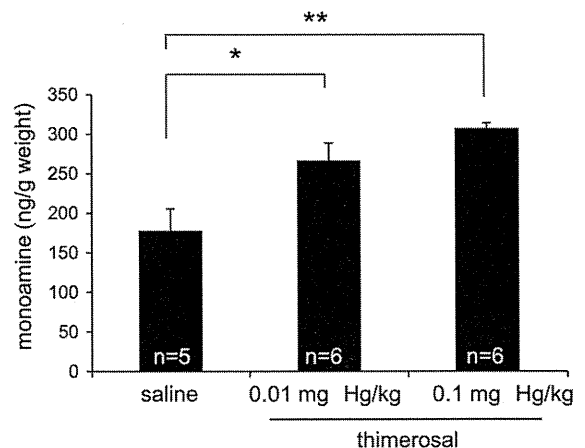
Measurement of concentration of serotonin (5-HT), dopamine (DA) and their metabolites 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA), 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) and homovanillic acid (HVA) were performed as described previously [12]. Because brain 5-HT levels are influenced by estrus cycle in females, we used the tissues only from male animals. Each offspring was deeply anesthetized on P50 and then decapitated. The hippocampus and striatum were immediately removed on ice, collected into a tube, frozen with liquid nitrogen, and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until assay. The tissues were homogenized using an ultrasonic homogenizer (NR-50M; Microtec, Chiba, Japan) in 5 volumes of a mixture of 0.2 M perchloric acid, 100  $\mu$ M EDTA, and 200 ng of isoproterenol hydrochloride as an internal standard and incubated on ice for 30 min. After centrifugation (20,000g, 20 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ), the supernatant was adjusted to pH 3 with 1 M sodium acetate and filtered through a 0.45- $\mu$ m pore size membrane filter (Millex-LH; Millipore, Billerica, MA). A part of the aliquot was separated by high performance liquid chromatography (HPLC) with an electrochemical detector (HTEC-500; Eicom, Kyoto, Japan) and an Eicompak SC-5 ODS column (3.0 mm  $\times$  150 mm, Eicom). The mobile phase (0.1 M sodium acetate–citrate acid buffer, pH 3.5, 17% methanol, 190 mg/L sodium 1-octanesulfonate, and 5 mg/L EDTA) allowed for the separation of 5-HT and DA, and their metabolites. Consistent results were obtained from three independent experiments. Statistical evaluation was carried out by grouped *t*-test.

## 3. Results

To evaluate the potential effects of embryonic exposure to thimerosal on postnatal brain monoamine content, different doses of thimerosal (1, 0.1, and

0.01 mg Hg/kg) were administered to E9 pregnant rats, and then allowed to have pups. When exposed to 1 mg Hg/kg thimerosal, most of the pups were dead soon after birth. On the other hand, in the 0.1 and 0.01 mg Hg/kg thimerosal-exposed groups, no major anomalies, growth retardation, or reduced number of delivered pups were observed in the two groups. Therefore, for monoamine content analysis, thimerosal doses of 0.1 and 0.01 mg Hg/kg were used. Concentrations of hippocampal 5-HT and striatal DA on P50 were measured by HPLC. As shown in the Fig. 1, a significant increase in hippocampal 5-HT levels was observed in the thimerosal-exposed groups (0.01 mg Hg/kg,  $266.2 \pm 22.2$  ng/g weight,  $p < 0.05$  vs. control; 0.1 mg Hg/kg,  $307.0 \pm 7.2$  ng/g weight,  $p < 0.01$  vs. control; control group,  $177.8 \pm 27.8$  ng/g weight). Striatal DA concentrations were also significantly increased in the exposed groups (0.01 mg Hg/kg,  $7039 \pm 448$  ng/g weight,

### (A) hippocampal serotonin



### (B) striatal dopamine

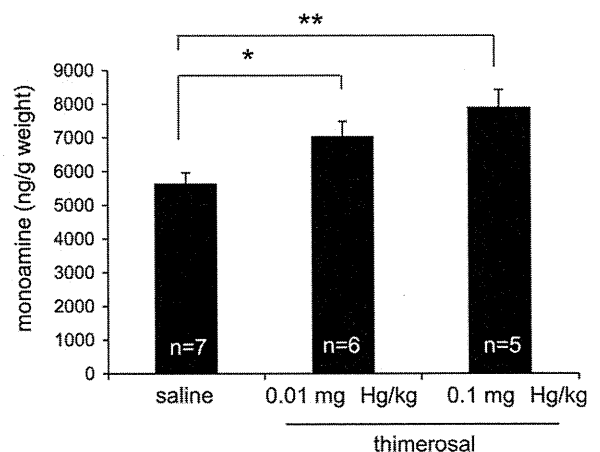


Fig. 1. Monoamine levels in control vs. thimerosal-exposed rats (ng/g weight). Different doses of thimerosal (0.1, and 0.01 mgHg/kg) were administered to E9 pregnant rats, and then allowed to have pups. On P50, concentrations of hippocampal serotonin and striatal dopamine were measured by HPLC. Values are mean  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  vs. control; \*\* $p < 0.01$  vs. control.



$p < 0.05$  vs. control; 0.1 mg Hg/kg,  $7905 \pm 520$  ng/g weight,  $p < 0.01$  vs. control; control group,  $5643 \pm 323$  ng/g weight). Hippocampal 5-HIAA, a metabolite of 5-HT, was also increased in thimerosal-exposed groups compared to control (0.01 mg Hg/kg,  $457.8 \pm 30.8$  ng/g weight, not significant to control; 0.1 mg Hg/kg,  $477.4 \pm 20.2$  ng/g weight,  $p < 0.05$  vs. control; control group,  $388.2 \pm 35.3$  ng/g weight), but its increase was not as much as that of 5-HT. Subsequently, the ratio 5-HIAA/5-HT was decreased (control,  $2.32 \pm 0.26$ ; 0.01 mg Hg/kg,  $1.75 \pm 0.11$ ,  $p < 0.05$  vs. control; 0.1 mg Hg/kg,  $1.56 \pm 0.06$ ,  $p < 0.01$  vs. control). Striatal DOPAC and HVA, a metabolite of DA, was not changed statistically in thimerosal-exposed groups compared to control (0.01 mg Hg/kg,  $2082 \pm 152$  ng/g weight, not significant to control; 0.1 mg Hg/kg,  $2225 \pm 100$  ng/g weight, not significant to control; control group,  $1997 \pm 103$  ng/g weight). The ratio (DOPAC + HVA)/DA was also decreased (control,  $0.356 \pm 0.011$ ; 0.01 mg Hg/kg,  $0.295 \pm 0.007$ ,  $p < 0.01$  vs. control; 0.1 mg Hg/kg,  $0.283 \pm 0.010$ ,  $p < 0.01$  vs. control). These results indicate that prenatal exposure to thimerosal on E9 affects levels of 5-HT and DA, and their metabolites in the adult brain.

#### 4. Discussion

In this study, we demonstrated that prenatal exposure to thimerosal on E9 caused a significant increase in 5-HT and DA content in the brains of adult rats. This finding indicates that prenatal thimerosal exposure may cause lasting neurochemical impairments to the serotonergic and dopaminergic systems.

Prenatal exposure to thimerosal has been shown to alter early embryonic development of 5-HT in our previous study [11]. These findings, together with those of the present study, suggest that a single prenatal exposure to thimerosal causes irreversible and critical effects to the brain serotonergic system. Persistent effects caused by a single prenatal exposure to chemicals are not, however, surprising because we have previously reported that prenatal exposure on E9 to thalidomide or VPA, chemicals known to induce autism when exposed at E9 [17,18], also induced increased hippocampal 5-HT in the adult brains of rats at P50 [12,13]. In thalidomide or VPA experiments, behavioral abnormalities in rats closely mimicked human autism [14]. Importantly, we also showed that abnormalities in 5-HT content caused by prenatal thalidomide exposure were time-specific (i.e., on E9). Therefore, the present result that exposure to thimerosal on E9 caused 5-HT abnormalities is consistent with previous findings. Because the possible link between thimerosal and autism is still controversial [15,16], further experiments are necessary to resolve this issue.

Prenatal exposure to thimerosal also seems to cause persistent changes in the striatal dopaminergic neuron of the brain. Faro et al. demonstrated that ethylmercury and methylmercury increased the *in vivo* release of DA from the striatum in free-moving adult rats [19]. Olczak et al. demonstrated that early postnatal administration of thimerosal caused persistent changes of the dopamine system in rats [9]. Therefore, mercury can cause short- and long-term effects on the dopaminergic system. However, to the best of our knowledge, our present report is the first to demonstrate that the effects from prenatal exposure to thimerosal persisted through the P50 dopaminergic and serotonergic systems. Because both dopaminergic and serotonergic neurons are known to be fated to develop from precursors starting from about E9, with help from the sonic hedgehog and fibroblast growth factor 8 genes [20], exposure to thimerosal at E9 is thought to cause irreversible effects on serotonergic and dopaminergic neurons. Further experiments are necessary to determine how thimerosal perturbs the normal development of both neurons.

Hippocampal 5-HIAA, a metabolite of 5-HT, were also increased in thimerosal-exposed groups compared to control, but its increase was not as much as that of 5-HT. Subsequently, the ratio 5-HIAA/5-HT was apparently decreased. Striatal (DOPAC + HVA)/DA ratio was decreased. We are not sure whether this decreased ratio means the true change of neurotransmitter metabolism, i.e., change of monoamine oxidase (MAO) level. However, in any case, the fact that thimerosal-dependent increase of 5-HT was more or less accompanied by 5-HIAA increase and that thimerosal-dependent increase of DA suggests that fetal exposure to thimerosal causes somehow lasting change of neurotransmitter metabolism. Further study to lead the conclusion of the effects of thimerosal on neurotransmitter metabolism such as by analyzing MAO activity will be published elsewhere.

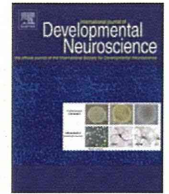
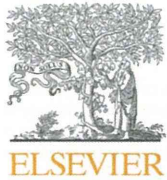
#### Acknowledgment

This study was supported in part by the Ministry of Health, Labour and Welfare of the Japanese Government.

#### References

- [1] Magos L. Review on the toxicity of ethylmercury, including its presence as a preservative in biological and pharmaceutical products. *J Appl Toxicol* 2001;21:1–5.
- [2] Clarkson TW, Magos L. The toxicology of mercury and its chemical compounds. *Crit Rev Toxicol* 2006;36:609–62.
- [3] Dórea JG. Integrating experimental (*in vitro* and *in vivo*) neurotoxicity studies of low-dose thimerosal relevant to vaccines. *Neurochem Res* 2011;36:927–38.

- [4] Ball LK, Ball R, Pratt RD. An assessment of thimerosal use in childhood vaccines. *Pediatrics* 2001;107:1147–54.
- [5] Young HA, Geier DA, Geier MR. Thimerosal exposure in infants and neurodevelopmental disorders: an assessment of computerized medical records in the Vaccine Safety Datalink. *J Neurol Sci* 2008;271:110–8.
- [6] Verstraeten T, Davis RL, DeStefano F, Lieu TA, Rhodes PH, Black SB, et al. Safety of thimerosal-containing vaccines: a two-phased study of computerized health maintenance organization databases. *Pediatrics* 2003;112:1039–48.
- [7] Olczak M, Duszczyk M, Mierzejewski P, Majewska MD. Neonatal administration of a vaccine preservative, thimerosal, produces lasting impairment of nociception and apparent activation of opioid system in rats. *Brain Res* 2009;1301:143–51.
- [8] Olczak M, Duszczyk M, Mierzejewski P, Bobrowicz T, Majewska MD. Neonatal administration of thimerosal causes persistent changes in mu opioid receptors in the rat brain. *Neurochem Res* 2010;35:1840–7.
- [9] Olczak M, Duszczyk M, Mierzejewski P, Meyza K, Majewska MD. Persistent behavioral impairments and alterations of brain dopamine system after early postnatal administration of thimerosal in rats. *Behav Brain Res* 2011;223:107–18.
- [10] Lawton M, Iqbal M, Kontovraki M, Lloyd Mills C, Hargreaves AJ. Reduced tubulin tyrosination as an early marker of mercury toxicity in differentiating N2a cells. *Toxicol In Vitro* 2007;21:1258–61.
- [11] Ida-Eto M, Oyabu A, Ohkawara T, Tashiro Y, Narita N, Narita M. Embryonic exposure to thimerosal, an organomercury compound, causes abnormal early development of serotonergic neurons. *Neurosci Lett* 2011;505:61–4.
- [12] Narita N, Kato M, Tazoe M, Miyazaki K, Narita M, Okado N. Increased monoamine concentration in the brain and blood of fetal thalidomide- and valproic acid-exposed rat: putative animal models for autism. *Pediatr Res* 2002;52:576–9.
- [13] 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* 2005;23:287–97.
- [14] Narita M, Oyabu A, Imura Y, Kamada N, Yokoyama T, Tano K, et al. Nonexploratory movement and behavioral alterations in a thalidomide or valproic acid-induced autism model rat. *Neurosci Res* 2010;66:2–6.
- [15] Thompson WW, Price C, Goodson B, Shay DK, Benson P, Hinrichsen VL, et al. Early thimerosal exposure and neuropsychological outcomes at 7 to 10 years. *N Engl J Med* 2007;357:1281–92.
- [16] Price CS, Thompson WW, Goodson B, Weintraub ES, Croen LA, Hinrichsen VL, et al. Prenatal and infant exposure to Thimerosal from vaccines and immunoglobulins and risk of autism. *Pediatrics* 2010;126:656–64.
- [17] Strömland K, Nordin V, Miller M, Akerström B, Gillberg C. Autism in thalidomide embryopathy: a population study. *Dev Med Child Neurol* 1994;36:351–6.
- [18] Williams G, King J, Cunningham M, Stephan M, Kerr B, Hersh JH. Fetal valproate syndrome and autism: additional evidence of an association. *Dev Med Child Neurol* 2001;43:202–6.
- [19] Faro LR, Rodrigues KJ, Santana MB, Vidal L, Alfonso M, Durán R. Comparative effects of organic and inorganic mercury on *in vivo* dopamine release in freely moving rats. *Braz J Med Biol Res* 2007;40:1361–5.
- [20] Ye W, Shimamura K, Rubenstein JLR, Hynes MA, Rosenthal A. FGF and Shh signals control dopaminergic and serotonergic cell fate in anterior neural plate. *Cell* 1998;93:755–66.



## Morphology of the facial motor nuclei in a rat model of autism during early development

Akiko Oyabu, Yasura Tashiro\*, Takahiro Oyama, Kensaku Ujihara, Takeshi Ohkawara, Michiru Ida-Eto, Masaaki Narita

Department of Anatomy II, Graduate School of Medicine, Mie University, Japan

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 9 October 2012  
Received in revised form  
22 November 2012  
Accepted 8 December 2012

#### Keywords:

Cranial motor nuclei  
Migration  
Autism  
Hindbrain  
Rat embryo

### ABSTRACT

The development of facial nuclei in animal models of disease is poorly understood, but autism is sometimes associated with facial palsy. In the present study, to investigate migration of facial neurons and initial facial nucleus formation in an animal model of autism, rat embryos were treated with valproic acid (VPA) *in utero* at embryonic day (E) 9.5 and their facial nuclei were analyzed by *in situ* hybridization at E13.5, E14.5 and E15.5. Signals for *Tbx20*, which is expressed in early motor neurons, appeared near the floor plate at the level of the vestibular ganglion and extended caudolaterally, where they became ovoid in shape. This pattern of development was similar between control and VPA-exposed embryos. However, measurements of the migratory pathway and the size of the facial nuclei revealed that exposure to VPA hindered the caudal migration of neurons to the facial nuclei. Signals for *cadherin 8*, which is expressed in mature facial nuclei, revealed that exposure to VPA caused a significant reduction in the size of the facial nuclei. Our findings provide the first quantitative description of tangential migration and nucleus formation in the developing hindbrain in a rat model of autism.

© 2012 ISDN. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Neural migration is one of the pivotal first steps in precisely establishing the neural network, and both radial and tangential migrations contribute to the organization of the cortex into layers and nucleus formation in the developing brain. Numerous recent studies comparing the time courses of neural migration in wild-type and transgenic animals have revealed that a combination of molecules regulates the direction of neural migration (Bloch-Gallego et al., 2005; Chédotal and Rijli, 2009; Chédotal, 2010; Hatten, 1999; Huang, 2009).

Developing facial nuclei migrate tangentially within the hindbrain. During early development, neurons that will eventually form the facial nuclei are generated in rhombomere 4 (r4) then migrate caudally to r6 to the site of the facial nuclei (Chandrasekhar, 2004; Hatten, 1999; Noden, 1993; Yamamoto and Schwarting, 1991). Studies using transgenic mice, both *in vivo* and *in vitro* with cells derived from these mice, have identified some of the molecules that are responsible for regulating tangential migration (Chédotal and Rijli, 2009; Huang, 2009). However, the development and migration

of neurons to the facial nuclei are poorly understood in animal models of disease.

Autism spectrum disorders (ASDs) are neurodevelopmental disorders characterized by impairments in social interaction and communication, and are associated with repetitive behaviors and interests (Charman and Baird, 2002; Filipek et al., 1999). An association of autism with facial nerve (7th cranial nerve) palsy has been described in several cases of thalidomide embryopathy, Möbius sequence, CHARGE association and Goldenhar syndrome (Gillberg and Winnergård, 1984; Miller et al., 2005; Ornitz et al., 1977). Given this association, a more precise understanding of the development of the facial nuclei, from which facial nerves originate, in ASD patients, could potentially be indispensable for elucidating the pathogenesis of autism with facial palsy.

Rodent models of autism have been particularly useful for elucidating the association of autism with embryonic development of the nervous system. Epidemiological studies had revealed that exposure to thalidomide (THAL) or valproic acid (VPA) during the first trimester of pregnancy causes a higher incidence of autism in human offspring (Strömland et al., 1994; Williams et al., 2001); based on this, a rat model of autism was generated by prenatal THAL or VPA exposure (Narita et al., 2002). In studies using this model, behavioral, biochemical and neuroanatomic similarities between human cases of autism and rats exposed to VPA *in utero* were observed (Ingram et al., 2000; Miyazaki et al., 2005; Narita Naoko et al., 2002; Narita Masaaki et al., 2010; Rodier et al., 1996, 1997).

\* Corresponding author at: Department of Anatomy II, Graduate School of Medicine, Mie University, 2-174 Edobashi, Tsu, Mie 514-8507, Japan. Tel.: +81 59 231 9938; fax: +81 59 231 9938.

E-mail address: ytashiro@doc.medic.mie-u.ac.jp (Y. Tashiro).

Thus, our rat models of autism are well suited for investigations of the embryonic development of the nervous system.

Although the embryonic development of facial nerves in our rat model of autism has not been fully characterized, embryonic VPA treatment has been shown to reduce the number of adult motor neurons, including those of the facial nuclei (Rodier et al., 1996), resulting in anatomical anomalies within the cranial motor nuclei. Moreover, we previously reported on morphological abnormalities in the peripheral facial nerves in an embryonic rat model of autism (Tashiro et al., 2011). In these rats, peripheral facial nerves became truncated and defasciculated (Tashiro et al., 2011). In addition, Ornoy (2009) reviewed the relationship between VPA and autism, including experiments using VPA to generate animal models of autism, and concluded that experimental animal models generally mimic the effects of VPA in man, although animals seem to be more resistant to VPA than humans. Taken together, these findings suggest that the development of facial neurons, not only in the peripheral nerves but also in the central hindbrain, including the facial nuclei, should be examined after VPA exposure.

In the present study, to examine the caudal migration of neurons and the initial formation of facial nuclei in a rat model of autism, VPA was administered to pregnant rats at E9.5. This enables delivery to the embryos *via* the placenta and subsequent distribution to the facial nuclei. We utilized a combination of flat whole-mount preparations and *in situ* hybridization for molecular markers expressed in the cranial motor neurons to allow us to clearly identify the facial nuclei and quantify their size for statistical analysis.

## 2. Material 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 (Miyazaki et al., 2005; Narita Naoko et al., 2002; Narita Masaaki et al., 2010). In brief, female Wistar rats (2–6 months old) were mated overnight and the day of insemination was designated as embryonic day (E) 0.5. On E9.5, at 1:00 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). Because our previous study showed that VPA exposure after E9.5 induced morphological abnormalities of facial nerves (Tashiro et al., 2011), we adopted E9.5 as the day of administration. VPA was prepared by dissolving the drug in 5% arabic gum in distilled water. No pregnant mothers died from the dose of VPA, and most embryos survived.

### 2.2. Flat whole-mount preparations of rat hindbrain

Embryos were removed from the dams at E13.5, E14.5 or E15.5, and the crown–rump length (CRL) was measured at each stage. The portion of the head containing the midbrain and hindbrain was dissected out in cold phosphate-buffered saline (PBS). To obtain flat whole-mount preparations of the hindbrain, the dorsal midline of the neural tube was completely cut and the 4th ventricle was opened. The isthmus of the midbrain–hindbrain boundary was cut, and the hindbrain was carefully freed from the meninges and surrounding tissue while keeping the trigeminal ganglion and vestibular ganglion, as well as their roots, intact.

Flat whole-mounted hindbrains were fixed in 4% paraformaldehyde in PBS for 7–10 h at 4 °C. Tissues were then washed twice with Tris-buffered saline (TBS), dehydrated through a graded methanol/TBS series at 4 °C, and stored in 100% methanol at –20 °C.

In observing tissues under a microscope, to ensure equal pressure across whole-mounted hindbrains, multiple layers of plastic tape were inserted as supports between the slide and coverslip. Because the layered plastic tape supports the load from the coverslip, the preparations received equal pressure in all locations and were not transformed by unequal pressure.

### 2.3. *In situ* hybridization

A DNA fragment corresponding to a portion of rat *Tbx20* (nucleotides 51–885, GenBank NM\_001108132) or *cdh8* (nucleotides 1909–2435, GenBank NM\_053393.2) cDNA was cloned into the pGEM-T Easy vector (Promega, La Jolla, CA). Using this plasmid as a template, sense and antisense single-strand RNA probes

were synthesized using a digoxigenin labeling kit (Roche Diagnostics, Tokyo, Japan). Whole-mount *in situ* hybridization using sense probes detected no signal except background noise, demonstrating specific hybridization to the target sequences.

*In situ* hybridization on flat whole-mounted hindbrains was performed according to the methods of Nieto et al. (1996), with minor modifications. Tissues were treated with 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/methanol for 30 min and rehydrated through a graded methanol/PBST series. The hindbrains were then treated with 10 µg/ml proteinase K/PBST and fixed in 0.2% glutaraldehyde/4% paraformaldehyde in PBS. After rinsing three times for 5 min in PBST, they were prehybridized in prehybridization solution (50% formamide; 5 × SSC; 50 µg/ml yeast RNA (Roche); 50 µg/ml heparin (Roche); 5 mM EDTA; 1% SDS). Tissue was then incubated in hybridization solution (prehybridization solution containing 1 mg/ml probe) overnight at 60 °C. After high-stringency washes, the tissues were blocked for 2 h in blocking reagent (Roche) and incubated in a 1/500 dilution of anti-digoxigenin-AP conjugate (Roche) in blocking reagent for 3 h. After an overnight wash with TBST, the signals were visualized in NTMT (0.1 M Tris-HCl, 0.1 M NaCl, 0.05 M MgCl<sub>2</sub>, and 0.1% Tween 20) containing nitroblue tetrazolium chloride/5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, toluidine salt (Roche).

### 2.4. Statistical analysis

Embryos from at least three different dams were analyzed for each condition. Bilateral facial nuclei were analyzed in each embryo and the number of analyzed facial nuclei pairs is referred to in the text as “*n*”. Digital images were captured using a light microscope equipped with a CCD camera (DXM1200F, Nikon, Tokyo, Japan). The intensities of *Tbx20* or *cdh8* signals and the sizes of the areas circumscribed by these signals were measured using Image J software. Signal intensity was defined such that complete white was scored as “0” and complete black as “255”. The relative level of signal intensity was determined by comparison with the signal intensity in the control group. The boundaries of these regions were determined based on the signal threshold, excluding background noise. The mean and standard deviation (SD) was calculated, and differences among developmental stages were evaluated using *t*-tests.

## 3. Results

### 3.1. Development of *Tbx20*-positive facial motor neurons

To elucidate the development of the cranial motor nuclei within the hindbrain, in relation to the rostrocaudal and dorsoventral axes, flat whole-mount preparations (Fig. 1) from E13.5, 14.5 and 15.5 embryos were analyzed. Flat whole-mount embryonic hindbrain preparations were subjected to *in situ* hybridization using an RNA probe for *Tbx20*, which is expressed in early cranial motor neurons (Figs. 2 and 3).

In whole-mount preparations from control embryos at E13.5, intense *Tbx20* signals were observed near the floor plate between the vestibular ganglia, corresponding to r4 at the rostrocaudal level (Fig. 2A). Weak *Tbx20* signals were observed in the ventral column lateral to the floor plate (data not shown). In whole-mount preparations from embryos exposed to VPA *in utero*, the pattern of *Tbx20* expression was similar (Fig. 2B).

At E14.5 in the control group, *Tbx20* signals extended from r4 through r5–6 in a caudolateral direction (Fig. 2C, arrows). Toward the caudal end of the *Tbx20* expression domain, the signal faded out (Fig. 2C, arrowheads). These signal patterns were similar to those observed in the VPA-exposed group (Fig. 2D).

Because flat whole-mount preparations are much thicker at E15.5 than they are at earlier stages, *Tbx20* signals could be observed more clearly from either the ventricular or pial sides (Fig. 3). In the control group, despite limited *Tbx20* expression near the floor plate on the ventricular side (Fig. 3A, arrows), the caudal end of the *Tbx20* signals was located on the pial side and had an ovoid appearance (Fig. 3C, asterisks). In addition, intense *Tbx20* signals were also observed between the trigeminal ganglia, corresponding to r2 at the rostrocaudal level on the pial side (Fig. 3C and D, arrowheads).

In the VPA-exposed group, the pattern of *Tbx20* expression was similar (Fig. 3B and D). However, the signals near the floor plate were more intense than those in the control