

サリドマイド / バルプロ酸ナトリウム投与ラットを用いた

自閉症の病態の解明

課題番号 14570720

平成 14 年度～平成 15 年度科学研究費補助金（基盤研究 C）研究成果報告書

平成 16 年 3 月

研究代表者 成田 奈緒子
（筑波大学基礎医学系解剖学講師）

はしがき

研究組織

研究代表者：成田奈緒子（筑波大学基礎医学系解剖学）

交付決定額（配分額）

（金額単位：千円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 14 年度	2,200	0	2,200
平成 15 年度	1,300	0	1,300
総計	3,500	0	3,500

研究発表

(1) 学会誌など

1. Narita N, Kato M, Tazoe M, Miyazaki K, Narita M, and Okado N. Increased monoamine concentration in the brain and the blood of fetal thalidomide and valproic acid exposed rat ; putative animal models for autism. *Pediatric Research*, 2002 52 (4): 576-579

2. Miyazaki K, Narita N, Sakuta R, Miyahara T, Naruse H, Okado N, Narita M. Serum neurotrophin concentrations in autism and mental retardation ; a pilot study. *Brain and Development*, 2004, in press

3. Aika Yajima, Mariko Ikeda, Kaoru Miyazaki, Toru Maeshima, Naoko Narita, Masaaki Narita Manserin, a novel peptide from secretogranin II in the neuroendocrine system. *NeuroReport*, 2004, *in press*

4. Kaoru Miyazaki, Naoko Narita, and Masaaki Narita. Maternal administration of thalidomide or valproic acid causes abnormal serotonergic neurons in the offspring : implication for pathogenesis of autism. *International Journal of Developmental Neuroscience*, *in press*

5. 成田正明、成田奈緒子、サリドマイドと自閉症モデル動物、*Clinical Neuroscience*, 21 巻 10 号、1208, 2003

6. 成田正明、成田奈緒子、発達障害のモデル動物研究の研究と現状
精神保健研究、印刷中

7. 作田亮一，田副眞美，成田奈緒子，村上信行，永井敏郎 不定愁訴を有する不登校児のかかえる「不安感」：State-Trait anxiety Inventoryによる心理学的評価およびSSRIの有効性 脳と発達2003 35(5):394-400

(2)口頭発表

1. Lasting Change in the Monoaminergic System in the Fetal Thalidomide and Valproic Acid Exposed Rat ; putative animal models for autism

Miyazaki K, Kato M, Narita N, Narita M, Okado N

The 32nd Society for Neuroscience Annual Meeting, 2002, November 1-7, Orlando, Florida, USA

2. Autism model rat : Part2 Marked behavioral changes in the embryonal thalidomide/valproic acid exposed rats.

Miyahara T, Miyazaki K, Mugishima G, Narita M, Narita N.

The 33rd Society for Neuroscience Annual Meeting, 2003, November 8-12, New Orleans, Georgia, USA

3. Autism model rat : Part1 Expression and functional analysis of serotonin transporter in teh embryonal thalidomide/valproic acid exposed rats.

Nishigami N, Miyazaki K, Narita N, Narita M.

The 33rd Society for Neuroscience Annual Meeting, 2003, November 8-12, New Orleans, Georgia, USA

4. 自閉症、精神発達遅滞患者における血清中神経栄養因子の検討

宮崎郁、成田奈緒子、成田正明、田副眞美、作田亮一、永井敏郎、岡戸信男 第44回 日本小児神経学会総会 2002，6月27-29日、仙台

5. 血小板膜局在セロトニントランスポーターのフローサイトメーターを用いた測定法の開発 心理疾患、診断、治療への応用

西上奈緒子、成田奈緒子、田副眞美、成田正明

第44回日本心身医学会総会 2003，5月8-9日、沖縄

6. 自閉症モデルラットにおける記憶・学習障害の検討

宮原朋子、宮崎郁、成田奈緒子、成田正明、麦島剛、岡戸信男

第45回日本小児神経学会総会 2003、5月22-24日、福岡

研究成果による工業所有権の出願・取得状況

なし

自閉症モデルラットにおける
行動学的異常

成田 奈緒子

目次

概要.....	1
序論.....	3
実験方法.....	6
自閉症モデルラットの作成.....	6
八方向放射状迷路実験.....	6
オープンフィールドテスト.....	7
社会相互作用テスト.....	8
RNA 定量.....	8
統計処理.....	10
結果.....	11
八方向放射状迷路実験.....	11
オープンフィールドテスト.....	12
社会相互作用テスト(Social Interaction テスト).....	13
自閉症モデルラット群及びコントロール群での海馬、小脳セロト ニン受容体 mRNA 発現.....	14
考察.....	16
八方向放射状迷路実験.....	16
オープンフィールドテスト.....	18
社会相互作用テスト(SI テスト).....	19
mRNA 定量.....	20
結語.....	22
引用文献.....	24
付図.....	31

概要

自閉症とは、対人関係の障害、コミュニケーションの障害、こだわり、限局された興味の範囲を主症状とする広汎性発達障害である。神経伝達物質セロトニンがその発症に関与しているとされるが、詳細は不明である。私たちの研究室では、自閉症モデルラットを作成した。これは、1960年代のサリドマイド薬害禍で自閉症発症が高率に増多したという疫学的事実にヒントを得たもので、血中及び脳内のセロトニン・ドパミンの上昇、セロトニン神経系の起始核形成異常などの脳の形態変化など、ヒト自閉症でも一部観察される所見がみられることを明らかにしてきた。しかしながら本モデルラットが真の「自閉症モデルラット」といえるためには行動学的検討を加える必要がある。そこで本研究では、この自閉症モデルラット、即ちサリドマイド又はバルプロ酸を妊娠ラットに投与して出生した仔ラットにおける新規探索能力、空間認知能力、社会的行動を行動学的実験法によって解析し、さらにその行動異常のもととなると思われる物質、即ちセロトニン系の受容体発現について検討することで自閉症の病態を解明することを目的とした。

八方向放射状迷路実験では、自閉症モデルラットは学習達成能力がコントロール群と比較して劣っており、非探索的行動が見られ、オープンフィールドテストでは、新しい環境下でのみ自閉症モデルラットで活動性（行動量）が増加していること、そして社会相互作用テストでは、社会相互作用が低下していた。さらに、これら行動変化をもたらすと思われる分子基盤の解明のために、脳内セロトニン機能を調節しているセロトニン2A受容体と5A受容体のmRNA発現量を、今回は特に海馬と小脳で定量したところ、自閉症モデルラットにおいて海馬のセロトニン2A、5A受容体mRNA発現量の低下、一方小脳では、VPA投与で作成した自閉症モデルラットでセロトニン2A、5A受容体mRNA発現量の上昇が見られた。

私たちの研究室で作成した自閉症モデルラットは、サリドマイド

薬害禍でヒトで起こった疫学的事実を動物実験でできる限り忠実に再現したものである。これまでわかった生化学的所見、形態学的異常に加え、今回ヒト自閉症患者の行動とも一部共通する行動学的異常を見出したことは本自閉症モデルラットがヒト自閉症病態をかなり正確に反映している可能性があり、自閉症の病態解明、治療法の模索に有用であると考えらる。

序論

自閉症は、社会的相互関係の障害、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、を主症状とする広汎性発達障害である (Filipek et al. 1999; Volkmar and Pauls 2003; Dalton and Forman 2000)。自閉症の病因については未だはっきり分っていないが、いわゆる「心因論」は否定され、なんらかの器質的な脳の生物学的異常に基づくとされる。自閉症は、遺伝子異常、フェニルケトン尿症のような先天性代謝異常症、ダウン症候群のような染色体異常、ウイルス胎内感染などに合併することが知られており (Shastri 2003; Shi et al. 2003)、このような脳の生物学的異常は固有のものではなく、しかもその発症起源は胎生のごく初期にあるという説が有力である (Rice and Barone 2000)。

以前より、神経伝達物質セロトニンが自閉症発症への関与が示唆されてきた (Cook and Leventhal 1996)。その根拠として自閉症患者の約 1/3 に血中セロトニン値の上昇が見られること (Anderson et al. 1990)、体内セロトニン活性を高める薬剤投与で症状が改善する症例があること (McDougle et al. 1996; Gordon et al. 1993)、行動異常の一部はセロトニン系の異常で説明がつくこと (瀬川 2003)、などが挙げられるが、セロトニン系の異常がどのように自閉症発症に関与しているかは不明のままである。最近私たちの研究室及び他の研究室で、脳セロトニン神経系の栄養発育に影響を与える栄養因子として知られる脳由来神経栄養因子 (Brain-derived Neurotrophic Factor, BDNF) 測定が自閉症診断に有用であることを報告した (Nelson et al. 2001; Miyazaki et al. in press)。

発達障害に限らず疾患病態の正確な把握と治療法の模索には基礎研究、特にモデル動物の作成が欠かせない。一般的にモデル動物の作成には、遺伝子改変法、自然発症モデルの樹立、薬剤投与や物理的手段による標的破壊など様々な手法が考えられるが、モデル動物作成のためには対象となる疾患の原因が遺伝子であれ環境因子で

あれ明確になっていることが肝要である。しかるに「自閉症」とひとまとめにしても上述のようにその原因は非常に多岐にわたっていることと、ヒトにおける社会的言語的な異常を動物で再現するのは困難であることから、明確な自閉症モデル動物はこれまで存在しなかった。

ところで、1960年代に起きたサリドマイド (thalidomide, THAL) 禍で生まれた犠牲者の中に自閉症発症率が極めて高いことが報告された (Stromland et al. 1994) が、これはその奇形の出現パターンから時期特異的であり、胎生の 20-24 日での THAL への暴露が自閉症合併の原因であることが解明された (Rodier 2000; Rodier et al. 1997; Rodier et al. 1996)。同様に抗けいれん剤であるバルプロ酸ナトリウム (valproic acid, VPA) においても妊娠初期の服用により、生まれてくる子における自閉症発症の頻度が増加すること (Williams et al. 2001) から、私たちは最近、この二つの薬剤がそれぞれラットの妊娠初期に投与されることによって仔におこる変化を、セロトニン神経系に着目して観察した。その結果、妊娠初期の投与のうち、胎生 9 日 (E9) 投与群においてのみ、海馬セロトニン濃度の上昇、前頭葉皮質でのドーパミン濃度の上昇、血中セロトニン濃度の上昇が THAL、VPA 投与群それぞれで観察された。ラットの妊娠 9 日目はヒトでは受精後 20-21 日目に当たり、ヒトでもっとも多く自閉症児が生まれたとされる時期に一致することを発見し、自閉症モデルラットとして報告した (Narita et al. 2002; 成田他 2003; 成田他 印刷中)。この、E9 THAL、VPA 投与両群の成体において行った形態学的観察の結果、セロトニン神経の起始核である縫線核の形態が自閉症モデルラットでは正常コントロールと比較して明らかに変化しており、またこの変化が THAL、VPA 両群において共通することから、E9 に投与された二つの薬剤がセロトニン神経系の発生段階での共通した遊走異常を引き起こし、これが成体でのモノアミン濃度異常の原因となっていることが予測された (宮崎 2003)。

私たちはこの二種類の薬剤が共通してセロトニン神経系の初期

発生に与える影響そのものが、自閉症の病態の原因である可能性が高いと考えた。先に述べたように、ヒトとラットの差はあるものの、自閉症が症候学的に診断される疾患であることから、このラットにおける行動学的実験は不可欠である。そこで今回の私の研究では、二つの薬剤投与群とコントロール群における行動評価を行い、またその行動異常の基盤となる分子異常についても検討することを目的とした。

実験方法

動物実験は、筑波大学動物実験委員会の承認を受けており(「自閉症モデルラットにおける行動解析」承認番号 162)、その内容に沿って行った。

自閉症モデルラットの作成

自閉症モデルラットの作成は、これまでに私たちが報告してきた通りに行った(Narita et al. 2002)。簡潔には以下のとおりである。即ち用いた動物は Wistar 系ラット(クレア、東京)で、12時間の明暗サイクルが保たれた 24 の恒温室で、自由にえさや水を摂取できる状態で飼育した。受精日を胎生1日(E1)とし、E9の14:00~15:00に THAL 500 mg/kg 体重(Tocris, USA)、または VPA 800 mg/kg 体重(Sigma, USA)を 5%アラビアゴム 2 ml に溶かし、栄養カテーテル(アトムメディカル、東京)を用いて一回経口強制投与した。また、コントロール群には 5%アラビアゴム 2 ml を同様に投与した。投与後は再び飼育室に戻し妊娠を継続させ、出産させ飼育させた。この仔ラットについて、実験目的に応じた週齢にて実験を行った。序論にも述べた如く自閉症発症にはセロトニン系の異常が関与しているとされる。セロトニンはエストロゲンを介し性周期との関連が指摘されているため、特に行動実験では雄ラットのみ実験に用いた。

八方向放射状迷路実験

実験は、生後53日齢のラット雄(各群 n=12)を用い、14日間かけ、ラットは夜行性であることを考慮し夜間に行った。実験前の処理として、生後45日齢のラットを8日間の食餌制限により標準体重の85%(±5%)となるようにした。この体重は、実験中も保たれるように食餌制限を続けた。水は自由に摂取できる状態で飼育した。また、実験初日の前3日間は、一日一頭5分間ずつ、ハンドリング(手慣らし)を行った。実験初日の前日には、実験装置内にえさ

を適量置き、同群のラットを 12 個体ずつ 30 分間放した。

実験装置として、直径 20 cm の正八角形型のプラットホームから、8 本のそれぞれ 50 cm の長さのアームが放射状にのびた形のアクリル樹脂製の迷路（ニューロサイエンス、京都）を用いた。それぞれのアームの先端に報酬としてのえさ 60mg（ラットがえさ入れに近づかないと見えない）を置き、ラットをプラットホームに置いてからすべてのエサを取り終わるまでの行動を、一日一試行最長 14 日間、10 分を上限として観察し、ビデオに記録した。測定項目としてラットが実験装置のアームに入る行動を「選択」とし、実験開始から数えて延べ 8 選択において重複せずに進入できたアームの数を「正選択数」と定義した。また、1 試行間を通じて一度訪れたアームに再び進入してしまった回数を「誤選択数」と定義した。さらに全てのえさを取り終えるまでの時間を「所要時間」とし、一つのアームに費やした時間を「アーム平均滞在時間(秒/アーム)」として測定した。

また、一試行間で連続 7 回正選択をする試行が 3 試行続いた個体を「学習達成」個体とした

オープンフィールドテスト

15 週齢のラット雄（各群 $n=7\sim 8$ ）に対し、一試行 20 分間、4 試行のオープンフィールドテストを夜間に行った。即ち 15 週齢の雄の各群ラットを用い、一試行 20 分間、4 試行（day1, 2, 3, 10）の自発的自由運動の観察を行った。通常オープンフィールドテストでは歩行の距離や移動方向、立ち上がり回数、脱糞・排尿回数、洗顔・毛づくろいの回数など様々な観察すべき項目があるが、今回は総移動距離（総活動量）の計測、常同行動の観察、および観察容器内の滞在位置の定量を行った。滞在位置の定量では、箱の底面を 16 の正方形に分割し、隅の 4 マス（領域 a）、中央の 4 マス（領域 c）およびそれ以外の領域（領域 b）に区分し（図 6）、それぞれの領域に滞在していた時間を計測した。体重統制は八方向放射状迷路と同様に行った。

観察容器は縦 80 cm 横 80 cm 高さ 60 cm の木製の箱を用い、ラットを箱の中に放してから 20 分間の行動を観察し、ビデオに記録した。1、2、3 試行は連続した 3 日間 (day1, 2, 3) で行い、4 試行目は第 3 試行目から 7 日後 (day 10) に行った。

社会相互作用テスト

社会相互作用テストは 14 週齢の雄ラット (n=7~8) を用いて赤色光のみの暗室で行った。観察容器は縦 50 cm 横 50 cm 高さ 30 cm の透明の亚克力樹脂製の箱を用いた。個別飼育された各群 (コントロール群、THAL 群、VPA 群) のラットから、体重差があまりないようにして同群同士のパートナーを選び、2 個体を一組にして観察容器の中に入れ、10 分間放置し、ビデオに録画し、それら 2 個体間の相互作用即ち sniffing (臭いを嗅ぐ), grooming (毛づくろいをする), genital investigation (生殖器を探る), following (後ろから追いかける), climbing (上から乗りかかる), crawling under (下にもぐる), boxing, sniffing each (お互いに嗅ぎあう) の 8 つの評価項目、及びこれらの相互作用の総延べ時間を、記録したビデオより定量した (表 1)。

RNA 定量

生後 35 日齢のラットを断頭後、海馬および小脳の total RNA をキット (RNAagents, Promega, USA) を用いて抽出した。抽出した total RNA 2 μ g に、random primer (Invitrogen, USA) 1 μ l、RNase free 水を混合した計 9.5 μ l を 70 °C で 10 分間インキュベートし、そこに 5xPCR Buffer (Takara、滋賀) 4 μ l、25 mM MgCl₂ 2 μ l、10 mM deoxy-nucleotide triphosphate (dNTP) Mix (Invitrogen) 1 μ l、0.1M dithiothreitol (DTT) (GIBCO BRL, USA) 2 μ l を混合した液を加え、計 18.5 μ l を 25 °C で 5 分間インキュベートし、Superscript reverse transcriptase (Invitrogen) を 0.5 μ l (100 U) 加えて 42 °C で 50 分、続けて 72 °C で 15 分インキュベートした後、Rnase

H (Invitrogen)を 1 μ l (2 U) 加え 37 で 20 分間インキュベートし、合計 20 μ l の cDNA を得た。

セロトニン 2A 受容体のプライマーとして、Forward 5' -GCTGCAGAATGCCACCAACTA-3'、Reverse 5' -ACAGGCATGAC AAGGAAACCC-3'、を使用し、プローブ (TaqMan Probe^R; PE Applied Biosystems, USA) として、5' -FAM-TCCTGATGTCACTTGCCATAG CTGATATGC-TAMRA-3' (FAM(蛍光色素); 6-carboxy-fluorescein、TAMRA(クエンチャー); 6-carboxy-tetramethyl-rho-damine) を使用した。また、セロトニン 5A 受容体のプライマーとして、Forward 5' -GCATCCATGGCTATCTCGGAT-3'、Reverse 5' -CCCAGACAGT TCATGTACCAGG-3'、を使用し、プローブ (TaqMan Probe^R) として、5' -FAM-TGCTAGTAGCTGTGCTGGTTATGCC TCTGA-TAMRA-3' (PE Applied Biosystems) を使用した。内部標準として、ハウスキーピング遺伝子である glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (Rodent GAPDH Control reagents; Applied Biosystems) を使用した。また、スタンダード曲線を描くため、4 週齢ラットの海馬 cDNA を使用した。

Real-time PCR には、ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (PE Applied Biosystems) を使用した。サンプルとして、TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) 12.5 μ l、セロトニン 2A 受容体 TaqMan Probe^R 5 p mol、Forward プライマー 10 p mol、Reverse プライマー 10 p mol、cDNA 1.0 μ g、水を混合して合計 25 μ l にしたものを 1 サンプルにつき各 2 本準備した。同様に、セロトニン 5A 受容体については、TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) 12.5 μ l、セロトニン 5A 受容体 TaqMan Probe^R 5.3 p mol、Forward プライマー 60 p mol、Reverse プライマー 60 p mol、cDNA 2.0 μ g、水を混合して合計 25 μ l にしたものを各サンプル 2 本準備した。Thermal Cycler Condition は、50 で 2 分、95 で 10 分、[95 で 15 秒 60 で 1 分] をセロトニン 2A 受容体では 45 サイクル、セロトニン 5A 受容体については 50 サイクル

で行った。解析は Sequence Detector Software version 1.6.3 (PE Applied Biosystems)で行った。

統計処理

各行動実験については、一元配置分散分析法、二元配置分散分析法 (2-way ANOVA) を用いて検定を行った。定量的 PCR の各サンプルは各個体の GAPDH の値で補正し、t 検定 (t-test)、一元配置分散分析法 (1-way ANOVA) を用いて検定した。検定結果は、危険率 5 % 未満 ($p < 0.05$) で有意差ありとした。

結果

げっ歯類以下の動物では母体サリドマイド投与による仔への四肢短縮などの外表奇形は少ないとされる(松原他 1985)が、今回の実験においても、薬剤投与の親ラットから生まれた仔ラットには、体形、外表奇形、肉眼で容易に認識しうる内臓奇形等は見られなかった。

八方向放射状迷路実験

この実験方法では、臭いや触覚など複数の情報に基づく、高次な空間学習能力の観察を行うことができる。正選択数(実験開始から数えて延べ8選択において重複せずに進入できたアームの数)及び誤選択数(一試行間を通じて一度訪れたアームに再び進入してしまった回数)では自閉症モデルラット群とコントロール群との差は認められなかった(図1)。所要時間(全てのえさを取り終えるまでの時間)は、1試行目で各モデルラット群において短く(コントロール群: 403.750 ± 44.638 秒、THAL群: 235.083 ± 37.772 秒、VPA群: 284.083 ± 41.334 秒、mean \pm SEM、図2A)、コントロール群と各自閉症モデルラット群とで有意だった($p < 0.05$: コントロール群 vs THAL群、 $p < 0.05$: コントロール群 vs VPA群、t-testによる、図2A)。また1試行目から6試行目まで、コントロール群では試行数が増えるに従って所要時間が減少する傾向が見られたが、各モデルラット群ではそのような傾向は見られず、統計学的に有意だった($p < 0.05$: コントロール群 vs THAL群、 $p < 0.01$: コントロール群 vs VPA群、2-way ANOVAによる、図2A)。さらに、アーム平均滞在時間(一つのアームに費やした秒数(秒/アーム))はコントロール群では1試行目で長く、2試行目以降で短くなる傾向が見られたが、各自閉症モデルラット群では試行日を通して変化はなかった($p < 0.05$: コントロール群 vs THAL群、 $p < 0.05$: コントロール群 vs VPA群、2-way ANOVAによる、図2B)。また、学習達成(一試行間で連続7回正選択をする試行が3試行続いた個体)は、自閉症モデルラット群では低

かった。即ち最終日でコントロール群は 75.0%のラットが学習達成したのに対し、THAL 群では 41.67%、VPA 群では 58.33%のラットが学習達成したにとどまった（図 3）。

さらに私たちはこの実験において各群ラットの行動様式の観察を行い、自閉症モデルラット群で興味深い行動を見出した。即ち自閉症モデルラット群において、えさをとるといった目的以外の行動が著明に多く見られた。この行動は「非探索的行動」と呼ばれ、無目的に「走り回る」ものである。今回の実験ではこの「非探索的行動」量の定量はできなかったが、この行動はヒト自閉症においてもやはり観察される行動 (Pierce and Courchesne 2001) で興味深い。

オープンフィールドテスト

ヒト自閉症では、これまでの環境への「こだわり」が強く、新しい環境への適応能力が乏しい。そこで THAL や VPA を用いた本モデルラット群において新しい環境下においたときの行動変化の有無を調べるために、オープンフィールドテストを行った。即ち 15 週齢の雄の各群ラットを用い、一試行 20 分間、4 試行 (day1, 2, 3, 10) の総移動距離 (総活動性) 及び滞在位置の評価を行った。

1 試行目、即ち実験初日の総移動距離は、THAL 及び VPA 両モデルラット群でコントロール群よりも多かった (コントロール群 : 23.45 ± 1.16 m、THAL 群 : 36.83 ± 3.68 m、VPA 群 : 34.40 ± 3.14 m、mean \pm SEM, 図 4)。特に THAL 群では総移動距離は統計学的に有意に多かった ($p < 0.05$: コントロール群 vs THAL 群、t-test と 1-way ANOVA による、図 4)。自閉症モデルラット群におけるこの初日の総移動距離の増多は次第に減少していったのに対し、コントロール群では 3 日連続の実験を通じて総移動距離はほとんど変化がなく、特にコントロール群と比較して THAL 群では統計学的に有意だった ($p < 0.05$: コントロール群 vs THAL 群、2-way ANOVA による、図 5)。また、これまでの 3 日間の試行による「慣れ」を忘れさせるために十分な休息期間と思われる 7 日間の休息期間をおいた後 (day 10) に実験を行

うと、THAL 群では再び総移動距離は増加している傾向にあった(図 5)。VPA 群及びコントロール群では変化はなかった。

ラットの情動性、即ち不安感が強い場合は観察容器中の隅、あるいは周辺部に好んで滞在するとされる(山田 1994)。ヒト自閉症でも不安感を持つ場合が多いとされ、本モデルラット群でも不安感が強い可能性があり、前述の活動性の増多は強い不安感に基づく可能性がある。そこで本モデルラットで不安感がどの程度存在するかを調べるため、観察容器中でのラットが好んで滞在する位置を定量した。即ち観察容器の箱の底面を 16 の正方形に分割し、隅の 4 マス(領域 a)、中央の 4 マス(領域 c)およびそれ以外の領域(領域 b)に区分し、それぞれの領域に入っていた時間を計測した(図 6)。自閉症モデルラット群とコントロール群とでは各領域の滞在時間差は見られなかった(図 6)。このことは、活動性の増多は単に不安感の増多によるものではないことを示唆する。また、この実験において目立った常同行動は観察されなかった。

社会相互作用テスト(Social Interaction テスト)

前述の如く著者らが作成した自閉症モデルラットは生化学的、形態学的、及び実験行動学的にヒト自閉症のよいモデルとなりうる。しかし本モデルラットが真の自閉症モデルラットとなるためにはヒト自閉症症状の根幹となる症状、即ち対人関係、コミュニケーションの障害の有無を調べる必要がある。ヒトとラットでは種の違いから当然高次脳機能の違いがありヒトの症状がラットで 100%反映されることは期待できないが、社会相互作用を自閉症モデルラット群とコントロール群とで比較検討することは可能であると思われる。そこで同群のラットを 2 個体ずつ 10 分間同じケージに入れ、相互作用即ち sniffing, grooming, genital investigation, following, climbing, crawling under, boxing, sniffing each の 8 つの評価項目を観察し、コントロール群と比較した。その結果、これら 8 種類の評価項目のうち、sniffing each の項目でのみ VPA 群で減少し

ており(コントロール群:11.57 ± 2.08 秒、THAL 群:7.13 ± 1.65 秒、VPA 群: 5.86 ± 0.94 秒、mean±SEM、表 1)、統計学的に有意だった($p < 0.05$:コントロール群 vs VPA 群、t-test と 1-way ANOVA による、表 1)。しかし、その他の項目ではモデルラット群とコントロール群で有意な差は見られなかった(表 1)。また、10 分間のテストを通じての総相互作用の延べ時間(総相互作用時間)は、コントロール群と比較してモデルラット群で少なく(コントロール群:195.14 ± 49.90 秒、THAL 群:179.25 ± 49.64 秒、VPA 群:144.86 ± 33.42 秒、mean±SEM、図 7)、VPA 群においては、コントロール群と比較して有意に少なかった($p < 0.05$:コントロール群 vs VPA 群、t-test と 1-way ANOVA による、図 7)。このことはモデルラット群、特に VPA 群では社会相互作用が低下している、即ちヒト自閉症の主幹となる症状を反映している可能性があることを示唆する。

自閉症モデルラット群及びコントロール群での海馬、小脳セロトニン受容体 mRNA 発現

これまで述べてきたように自閉症モデルラットではヒト自閉症患者とも共通する様々な行動異常、即ち学習能力の低下、非探索的行動、行動量の増加を認めることを明らかにしてきたが、これらの行動異常がどのような分子メカニズムに基づいているかは不明のままである。これらの行動異常の解剖学的責任病巣もまた不明だが、海馬及び小脳が関わっている可能性がある。また序論で述べた如く自閉症発症には神経伝達物質セロトニンの関与が示唆されてきており、このセロトニンの働きは 15 種類以上もある受容体によって行われている(Kroeze et al. 2002)が、なかでもセロトニン 2A 受容体及び 5A 受容体は小脳と海馬に発現が見られ(Xu et al. 2000; Kinsey et al. 2001)、上述の行動異常に関連している可能性がある。特に 5A 受容体ノックアウトマウスでは著明な行動量の増多が見られることから関連が特に強く示唆される(Graibe et al. 1999)。そこでこれらの受容体の遺伝子発現を調べるため、THAL または VPA を用いた自

閉症モデルラット群及びコントロール群で海馬及び小脳でのセロトニン 2A 受容体、セロトニン 5A 受容体の mRNA の発現量を定量的 PCR 法を用いて調べ、内部標準である GAPDH mRNA 発現量で正規化した結果、海馬において 2A 受容体の mRNA 発現量はモデルラット群で低下していた(コントロール群： 0.896 ± 0.035 ng、THAL 群： 0.678 ± 0.027 ng、VPA 群： 0.808 ± 0.164 ng、相対的 mRNA 発現量(セロトニン 2A 受容体 mRNA 発現量 (ng) / GAPDH mRNA 発現量 (ng))、 $\text{mean} \pm \text{SEM}$ 、図 8A)。特に THAL 群ではコントロール群と比較して有意に低下していた($p < 0.05$: コントロール群 vs THAL 群、t-test と 1-way ANOVA による、図 8A)。また、5A 受容体の mRNA の発現量も同様に低下しており(コントロール群： 1.893 ± 0.718 ng、THAL 群： 1.419 ± 0.449 ng、VPA 群： 1.173 ± 0.371 ng、相対的 mRNA 発現量(セロトニン 5A 受容体 mRNA 発現量 (ng) / GAPDH mRNA 発現量 (ng))、 $\text{mean} \pm \text{SEM}$ 、図 8B)、各自閉症モデルラット群でコントロール群と比較して有意だった($p < 0.05$: コントロール群 vs THAL 群、 $p < 0.05$: コントロール群 vs VPA 群、t-test と 1-way ANOVA による、図 8B)。小脳においての 2A 受容体の mRNA 発現量は VPA 群で上昇しており(コントロール群： 0.951 ± 0.020 ng、THAL 群： 0.928 ± 0.0019 ng、VPA 群： 1.042 ± 0.015 ng、相対的 mRNA 発現量、 $\text{mean} \pm \text{SEM}$ 、図 9A)、統計学的に有意だった($p < 0.05$: コントロール群 vs VPA 群、t-test と 1-way ANOVA による、図 9A)。また、5A 受容体の mRNA の発現量も同様、VPA 群で上昇している傾向があったが(コントロール群： 3.553 ± 0.977 ng、THAL 群： 4.391 ± 1.457 ng、VPA 群： 10.317 ± 4.549 ng、相対的 mRNA 発現量、 $\text{mean} \pm \text{SEM}$ 、図 9B)、有意な差は見られなかった。

考察

序論で述べたように、本モデルラット、すなわち E9 に THAL または VPA に暴露された個体はセロトニン神経の初期発生と脳内血中セロトニン濃度にほぼ共通した変化をきたすことが私達のこれまでの研究から証明されている。今回、私は本研究でさらに、この二剤のラットへの E9 暴露が、出生後の共通した行動異常を引き起こすことを証明した。すなわち、(1) 学習能力の低下、(2) 非探索的行動、(3) 行動量の増加、(4) 社会相互作用の減少、であるが、行動学的異常はヒト自閉症でも高頻度で認められるものである。さらに、小脳・海馬でのセロトニン受容体発現量の変化を認め、これら行動異常との関連性も示唆された。

自閉症モデルラットにおける空間認知学習能力の低下と非探索的行動の増加

八方向放射状迷路実験において自閉症モデルラットでは、(1) 1 試行目（実験初日）での所要時間が短く、(2) 1 試行目（実験初日）でアーム平均滞在時間が短く、(3) 連続 7 回正選択が 3 日連続、とする「学習達成」が低かった。

この実験では、最初の 8 選択で重複せずに進入できたアームの数を「正選択数」とし、また一試行間を通じて一度訪れたアームに再び進入してしまった回数を「誤選択数」と定義したが、この「正選択数」「誤選択数」では自閉症モデルラット群とコントロール群では差は認められなかったにもかかわらず、一試行間で連続 7 回正選択をする試行が 3 試行続いた個体について「学習達成」としたところ、この「学習達成」という評価基準では自閉症モデルラット群で低下しているという、一見相反するデータが得られた。これは自閉症モデルラット群では非探索的行動が見られたことから、無目的に動き回っているうちに偶然正選択をしていた可能性がある。また、偶然高い正答率だったラットが翌日の試行で低い正答率に転じている可

能性もある。連続7回正選択をする試行が3試行続いた個体について「学習達成」とした場合は、偶然の正答、誤答はこの「学習達成」には反映されることはなく、真の意味での学習能力を評価したと言える。

私たちの研究室では以前、Morris水迷路を用いて空間学習能力の評価を行ったが、自閉症モデルラット群、コントロール群とで差を認めなかった(加藤 2002)。Morris水迷路試験では動物を強制的に泳がせ、視覚のみによる空間認知を学習させるものであるため、動物の自発行動や、臭いや触覚などの多数の感覚の統合による高次機能の学習が観察できない(Hodges 1996)。八方向放射状迷路実験では、動物が自発的に複数の感覚を使用して情報を集め、それらを統合して記憶を形成するため、動機づけに基づく学習をも反映するとされ、より高次機能の評価が可能であり、自閉症のような高次機能の障害の研究に適していると考えた(Hodges 1996; 藤原他 1994)。このように、動物が空間認知記憶を形成する過程はそれぞれの実験法によって異なるため、それを評価するための学習記憶実験における迷路課題は慎重に選択する必要がある。例えば抗コリン剤投与ラットでは、水迷路課題はコントロール群に比し問題なくクリアできるが、八方向放射状迷路では著明な空間学習能力の低下を認めることが知られている(Mishima et al. 2001)。私たちの自閉症モデルラットにおいても八方向放射状迷路試験で初めて学習能力の低下などの所見を得ることができたものであり、このことは記憶学習能力の評価のための実験法の選択は慎重に行わなければならないことを示している。

今回の実験では、コントロール群で2試行目以降、所要時間及びアーム平均滞在時間の短縮が見られた。これは、コントロール群では1試行目(初日)にdoor investigationなどの慎重な探索行動に要した時間のための可能性がある。このdoor investigationという探索行動はアームの入り口に対して進入前に行われる探索行動であり、試行内でアームの選択数が増加するにつれて頻度が上がる

探索行動である。これは一度訪れたアームに再び進入することを防ぐための行動で、この行動は1試行目で頻出し、試行経験の増加に伴って消失する傾向がある(芳賀 1997)。

またモデルラット群では1試行目から所要時間及びアーム平均滞在時間が短かったが、これは通常見られる慎重な探索行動の減少によるものと考えられる。その一方でモデルラット群では無目的に走り回る「非探索的行動」が見られた。「非探索的行動」は、ヒト自閉症患者での行動実験でも見られるもので、これは自閉症患者に見られる小脳の6小葉～7小葉の形成不全の大きさとの関連が示唆されている(Pierce and Courchesne 2001)。

自閉症モデルラットにおける新規環境下での行動量の増加

オープンフィールドテストにおいて自閉症モデルラット群では、(1)1試行目でのラットの歩行距離(総移動距離)が多く、それは翌日、翌々日の試行で徐々に減少していった、(2)3日間連続試行の後7日間の間隔をあけ再試行を行うと総移動距離は再び増加(THAL群)し、(3)観察容器の特定領域の滞在傾向は見られなかった。

(1)(2)の結果は、自閉症モデルラット群では不慣れな環境下で行動量が増多していることを示す。ヒト自閉症においても不慣れな環境下または日頃習慣化されていないことに直面するとパニック状態に陥ることはよく見られ、自閉症モデルラットで見られた不慣れな環境下での行動量の増多を連想させる。

さらにこのような変化を引き起こす原因として情動の変化、特に不安が考えられたため、実験装置の中央領域にラットが滞在していた時間について検討を行ったが、コントロール群とモデルラット群とで差は認められなかった。一般に、不安が大きいラットほど中央領域に滞在する時間は短いと言われ、この検討法は不安の指標としてよく知られているが、ここで観察される不安は新しい環境、すなわちストレスが大きく、元来不安の大きな環境における不安であ

り、通常の情動反応であるため、不安神経症のような異常な情動反応である不安は観察することはできないとされている (Prut and Belzung 2003)。従って、通常のラットでは起こらない、異常な情動反応が新しい環境においての行動変化をもたらした可能性がある。また、新しい環境でのみ観察された行動変化は、放射状迷路実験において、自閉症モデルラット群が1試行目で所要時間およびアーム平均滞在時間が短かったことと共通しており、探索行動の低下による無目的な行動の増加によると考えられる。

自閉症モデルラットにおける社会相互作用の低下

社会相互作用テスト(SIテスト)では、お互いのにおいを嗅ぎあう行動である sniffing each、および8項目の相互作用の総延べ時間(総相互作用時間)において、VPA群で相互作用時間が低下していた。

前述の如くヒト自閉症では社会性の障害が主たる症状のひとつであり、本自閉症モデルラットが生化学的異常、行動学的異常に加えて社会性の障害が存在するかどうかを調べることは極めて重要な課題である。今回の実験では sniffing, grooming, genital investigation, following, climbing, crawling under, boxing の相互作用7項目の頻度においてはモデルラット群とコントロール群で差が認められなかった。これは、ヒトとラットでは種の違いが大きいため当然高次脳機能の違いがあることに帰せられるかもしれない。即ち、ヒトもラットも THAL その他の原因で胎生期にセロトニン系の発生異常に端を発する「自閉症」といっても表現型、なかでも高次脳機能に基づく社会性の障害という点ではヒトとラットでは大きく異なる可能性がある。さらに本検査の特殊性として、今回私たちが採用したこの社会相互作用テストは元来2匹のラット間に見られる社会的関係の行動変容を利用して不安水準を評価しようとするもので不安に関係する薬物の作用評価として用いられるのが通常であり、私たちが研究対象としている 自閉症的な社会相互作用評価 を目的として確立された実験系でもない。にもかかわらず

sniffing each および相互作用時間の総延べ時間が VPA 群で有意に減少していたことは、胎生期の薬剤暴露による中枢神経系の異常が、その詳細な機序は不明であるが生後の社会相互作用に影響を及ぼしたものと考えられる。今後はラットにおける社会相互作用の評価方法について私たち自身の手でより詳細に開発し、自閉症モデルラットの行動評価に応用していきたい。

小脳と海馬における mRNA 発現量の相違点とその意義

海馬及び小脳の mRNA 定量の結果、(1)海馬セロトニン 2A 受容体 mRNA 発現量の低下 (THAL 群) 及び 5A 受容体 mRNA 発現量の低下 (THAL 群及び VPA 群)、(2)小脳セロトニン 2A 受容体 mRNA 発現量上昇 (VPA 群) 及び 5A 受容体 mRNA 発現量の上昇している傾向 (VPA 群)、が見られた。このように、THAL と VPA において小脳・海馬におけるセロトニン受容体の発現様式に差異が観察された理由としては、その薬理学的作用の相違点に関与していることも考えられる。THAL と VPA は共に tumor necrosis factor-alpha の抑制 (Calabrese et al, 2000; Ichiyama et al, 2000) に働くなど、共通する薬理作用も報告されている。両者は共に、(胎児暴露における) 催奇形因子であるが、基本的には、THAL は以前は鎮静剤として、現在は多発性骨髄腫の治療薬としての効能を持ち (Kakimoto et al. 2002)、また VPA は抗けいれん剤として広く使われている (Illig et al. 2000)、という全く異なる薬剤である。現在私たちのモデルラット作成は一律 THAL 500mg/kg、VPA 800mg/kg の投与量で行っているが、E9 において一回、この固定量を投与することによって、その後の胎児にどのような分子発生的変化が経時的におこるかはまだ不明である。縫線核の発生は E9 より開始されるが (Ye et al. 1998; Lauder 1990)、小脳の発生やセロトニン神経の投射の確立は E12 以降であり (Ingram et al. 2000; Zhou et al. 2001)、今回観察された小脳や海馬での変化はこの時期におけるそれぞれの薬剤に固有な作用機序に基づくものかもしれない。また、現実の受容体機能については、その発現量だけでは評価

はできないため、今後結合能やリガンドである細胞外セロトニンの濃度などについて、より詳細に検討して評価していきたいと考える。

セロトニンの働きを制御する 15 種類以上もある受容体のうちセロトニン 2A 受容体及び 5A 受容体は小脳と海馬に発現が見られ、これらの受容体の発現量の異常は上述の行動異常に関連している可能性がある。特に 5A 受容体は主に大脳皮質、海馬、小脳に分布し、5A 受容体ノックアウトマウスでは探索行動が増加したとの報告もあり興味深い(Kinsey et al. 2001; Graihe et al. 1999)。

また、ヒトの 5A 受容体の mRNA 発現は小脳で特に高いことが報告されており(Pasqualetti et al. 1998)、小脳は運動機能や空間認知能力に関わっているだけでなく、探索行動やモチベーションなどの情動にも深く関わっていることが報告されていることも今回私たちが見出した行動異常(非探索的行動)とも関連しているかもしれない(Caston et al. 1998)。自閉症患者における小脳の異常の中に 6 小葉 ~ 7 小葉が有意に小さくなっているとの報告があり(Carper and Courchesne 2000)、また前述したように、この小脳形成不全と非探索的行動の関連が magnetic resonance imaging (MRI)による研究で報告されており(Pierce and Courchesne 2001)、今後自閉症モデルラットにおける 2A、5A 受容体のみならずセロトニン関連蛋白質や神経ペプチドについて、その局在、機能を免疫組織学的検査や *in situ* hybridization 法などの方法で詳細に調べていく必要がある。

ヒト自閉症病態解明への応用

興味深いことに、1980 年代に人口 10000 人につき 4 ~ 5 人であると報告されていた自閉症の発症率は、この 20 年間ほどでその十倍近く増えている(Chakrabarti and Fombonne 2001; 橋本 2003)。この理由としては、概念の変遷、診断技術の向上や一般社会への知識の普及によるものも考えられるが、一方で、自閉症の発症にかかわるなんらかの環境催奇形因子が胎生ごく初期の胎児に暴露する頻度が増加した可能性も考えられる(Rice and Barone 2000)。私たちの考

案した方法で作成した自閉症モデルラットは、この不特定多数の環境因子が胎児に共通の変化、すなわちセロトニン神経の初期発生の障害を引き起こす、という仮説に基づいている。自閉症は、個体差や程度差はあれ、共通の特徴的な行動発達の異常を呈する多因子疾患であるが、今回の研究で得られた結果からは、まさに私たちの自閉症モデルラットはこの自閉症の病態像を再現していることが示唆され、今後このモデル動物をさらに詳細に解析することで自閉症全体像の解明への道が一気に開けることが期待された。

結語

本研究より、自閉症モデルラットにおいては、(1)学習能力の低下、(2)非探索的行動、(3)行動量の増加、(4)社会相互作用の減少、(5)小脳・海馬でのセロトニン受容体発現量の変化、を認めた。特に行動学的異常はヒト自閉症患者の行動とも一部共通するものであり、本自閉症モデルラットがヒト自閉症病態をかなり正確に反映している可能性があり、自閉症の病態解明、治療法の模索に有用であると期待される。

引用文献

Anderson GM, Horne WC, Chatterjee D, Cohen DJ. The hyperserotonemia of autism. *Ann NY Acad Sci.* 1990;600:331-340; discussion 341-342

Calabrese L, Fleischer AB. Thalidomide: current and potential clinical applications. *Am J Med.* 2000;108(6):487-95

Carper RA, Courchesne E. Inverse correlation between frontal lobe and cerebellum sizes in children with autism. *Brain.* 2000;123 (Pt 4):836-44

Caston J, Chianale C, Delhayé-Bouchaud N, Mariani J. Role of the cerebellum in exploration behavior. *Brain Res.* 1998;808(2):232-237

Chakrabarti S, Fombonne E. Pervasive developmental disorders in preschool children. *JAMA.* 2001;285(24):3093-9

Cook E H, Leventhal B. The serotonin system in autism. *Curr Opin Pediatr.* 1996;8:348-354

Dalton R, Forman A M. Chapter 27. Pervasive developmental disorders and childhood psychosis. In Behrman R E, Kliegman R M, Jenson H B. *Nelson Textbook of Pediatrics.* 2000;ed 16;87-89 WB Saunders. Philadelphia

Filipek PA, Accardo PJ, Baranek GT, Cook EH, Dawson G, Gordon B, Gravel JS, Johnson CP, Kallen RJ, Levy SE, Minshew NJ, Ozonoff S, Prizant BM, Rapin I, Rogers SJ, Stone WL, Teplin S, Tuchman RF,

Volkmar FR. The screening and diagnosis of autistic spectrum disorders. *J Autism Dev Disord.* 1999;29(6):439-484

Gordon CT, State RC, Nelson JE, Hamburger SD, Rapoport JL. A double-blind comparison of clomipramine, desipramine, and placebo in the treatment of autistic disorder. *Arch Gen Psychiatry.* 1993;50(6):441-447

Grailhe R, Waeber C, Dulawa SC, Hornung JP, Zhuang X, Brunner D, Geyer MA, Hen R. Increased exploratory activity and altered response to LSD in mice lacking the 5-HT(5A) receptor. *Neuron.* 1999;22(3):581-591

Hodges H, Maze procedures: the radial-arm and water maze compared. *Brain Res Cogn Brain Res.* 1996;(3)167-181

Ichiyama T, Okada K, Lipton JM, Matsubara T, Hayashi T, Furukawa S. Sodium valproate inhibits production of TNF-alpha and IL-6 and activation of NF-kappaB. *Brain Res.* 2000;857(1-2):246-51

Illig AM, Melia K, Snyder PJ, Badura LL. Sodium valproate alters GnRH-GABA interactions during development in seizure-prone mice. *Brain Res.* 2000;885(2):192-200

Ingram JL, Peckham SM, Tisdale B, Rodier PM. Prenatal exposure of rats to valproic acid reproduces the cerebellar anomalies associated with autism. *Neurotoxicol Teratol.* 2000 May-Jun;22(3):319-24

Kakimoto T, Hattori Y, Okamoto S, Sato N, Kamata T, Yamaguchi M, Morita K, Yamada T, Takayama N, Uchida H, Shimada N, Tanigawara Y,

Ikeda Y. Thalidomide for the treatment of refractory multiple myeloma: association of plasma concentrations of thalidomide and angiogenic growth factors with clinical outcome. *Jpn J Cancer Res.* 2002;93(9):1029-36

Kinsey AM, Wainwright A, Heavens R, Sirinathsinghji DJ, Oliver KR. Distribution of 5-HT(5A), 5-HT(5B), 5-HT(6) and 5-HT(7) receptor mRNAs in the rat brain. *Brain Res Mol Brain Res.* 2001;88(1-2):194-198

Kroeze WK, Kristiansen K, Roth BL. Molecular biology of serotonin receptors structure and function at the molecular level. *Curr Top Med Chem.* 2002;2:507-528

Lauder JM. Ontogeny of the serotonergic system in the rat: serotonin as a developmental signal. *Ann NY Acad Sci.* 1990;600:297-313

McDougle CJ, Naylor ST, Cohen DJ, Volkmar FR, Heninger GR, Price LH. A double-blind, placebo-controlled study of fluvoxamine in adults with autistic disorder. *Arch Gen Psychiatry.* 1996;53(11):1001-1008

Mishima K, Egashira N, Hirosawa N, Fujii M, Matsumoto Y, Iwasaki K, Fujiwara M. Characteristics of learning and memory impairment induced by delta9-tetrahydrocannabinol in rats. *Jpn J Pharmacol.* 2001;87(4):297-308

Miyazaki K, Narita N, Ryoichi S, Miyahara T, Naruse H, Okado N, Narita M. Serum neurotrophin concentrations in autism and mental retardation: a pilot study. *Brain Dev: in press*

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(4):576-579

Nelson KB, Grether JK, Croen LA, Dambrosia JM, Dickens BF, Jelliffe LL, Hansen RL, Phillips TM. Neuropeptides and neurotrophins in neonatal blood of children with autism or mental retardation. *Ann Neurol.* 2001;49(5):597-606

Pasqualetti M, Ori M, Nardi I, Castagna M, Cassano GB, Marazziti D. Distribution of the 5-HT_{5A} serotonin receptor mRNA in the human brain. *Brain Res Mol Brain Res.* 1998;56(1-2):1-8

Pierce K, Courchesne E. Evidence for a cerebellar role in reduced exploration and stereotyped behavior in autism. *Biol Psychiatry.* 2001;49(8):655-664

Prut L, Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *European J Pharmacology.* 2003;463:3-33

Rice D, Barone SJ. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. *Environ Health Perspect.* 2000;108:511-533

Rodier PM. The Early Origins of Autism. *Sci Am.* 2000;58-63

Rodier PM, Ingram JL, Tisdale B, Croog VJ. Linking etiologies in humans and animal models: studies of autism. *Reprod Toxicol.* 1997;11(2-3):417-422

Rodier PM, Ingram JL, Tisdale B, Nelson S, Romano J. Embryological origin for autism: developmental anomalies of the cranial nerve motor nuclei. *J Com Neurol*. 1996;370:247-361

Shastri BS. Molecular genetics of autism spectrum disorders. *J Hum Genet*. 2003;48(10):495-501.

Shi L, Fatemi SH, Sidwell RW, Patterson PH. Maternal influenza infection causes marked behavioral and pharmacological changes in the offspring. *J Neurosci*. 2003;23(1):297-302

Stromland K, Nordin V, Miller M, Akerstrom B, Gillberg C. Autism in thalidomide embryopathy: a population study. *Dev Med Child Neurol*. 1994;36(4):351-356

Volkmar F, Pauls D. Autism. *Lancet*. 2003;362:1133-1141

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(3):202-206

Xu T, Pandey SC. Cellular localization of serotonin(2A) (5HT(2A)) receptors in the rat brain. *Brain Res Bull*. 2000;51(6):499-505

Ye W, Shimamura K, Rubenstein JL, Hynes MA, Rosenthal A. FGF and Shh signals control dopaminergic and serotonergic cell fate in the anterior neural plate. *Cell*. 1998;93(5):755-66

Zhou FC, Sari Y, Zhang JK, Goodlett CR, Li T. Prenatal alcohol

exposure retards the migration and development of serotonin neurons in fetal C57BL mice. Brain Res Dev Brain Res. 2001;126(2):147-55

加藤美智子．サリドマイド/バルプロ酸ナトリウム投与ラットを用いた自閉症の病態解明．筑波大学大学院修士（医科学）学位論文（2002）

瀬川昌也．自閉症とセロトニン．クリニカルニューロサイエンス．2003;21(6):693-695

成田正明、岡戸信男．セロトニン神経の発達とシナプス形成．クリニカルニューロサイエンス．2003;21(6):622-625

成田正明、成田奈緒子．サリドマイドと自閉症モデル動物．クリニカルニューロサイエンス．2003;21(10):1208

成田正明、成田奈緒子．発達障害のモデル動物研究の現状と展望．精神保健研究．印刷中

成田正明、矢口雅江、成田奈緒子、田副真美、岡戸信男．自閉症モデルラット作成の試み．脳と発達．2001;(33)206

橋本俊顕．自閉症(自閉症スペクトラム)．有馬正高、加我牧子編．国立精神神経センター小児神経学講義．診断と治療社、東京．2003;220-232

藤原道弘、三島健一．8方向放射状迷路実験．生体の科学．1994;45(5):510-511

松原孝雄、見上孝．JW-NIBS ウサギ胎仔に対するサリドマイドの単回投与における催奇形作用．Exp.Anim.1985;34(3):295-302

宮崎郁．自閉症モデルラットにおけるモノアミン神経系初期発生の病態への関与．筑波大学大学院修士（医科学）学位論文（2003）

安松浩．抗不安薬のスクリーニング法(4)-Social Interaction 法．日本神経精神薬理学雑誌．1995;15:295-304

山田勝士．オープンフィールドテスト．生体の科学．1994;45(5):426-427

付図

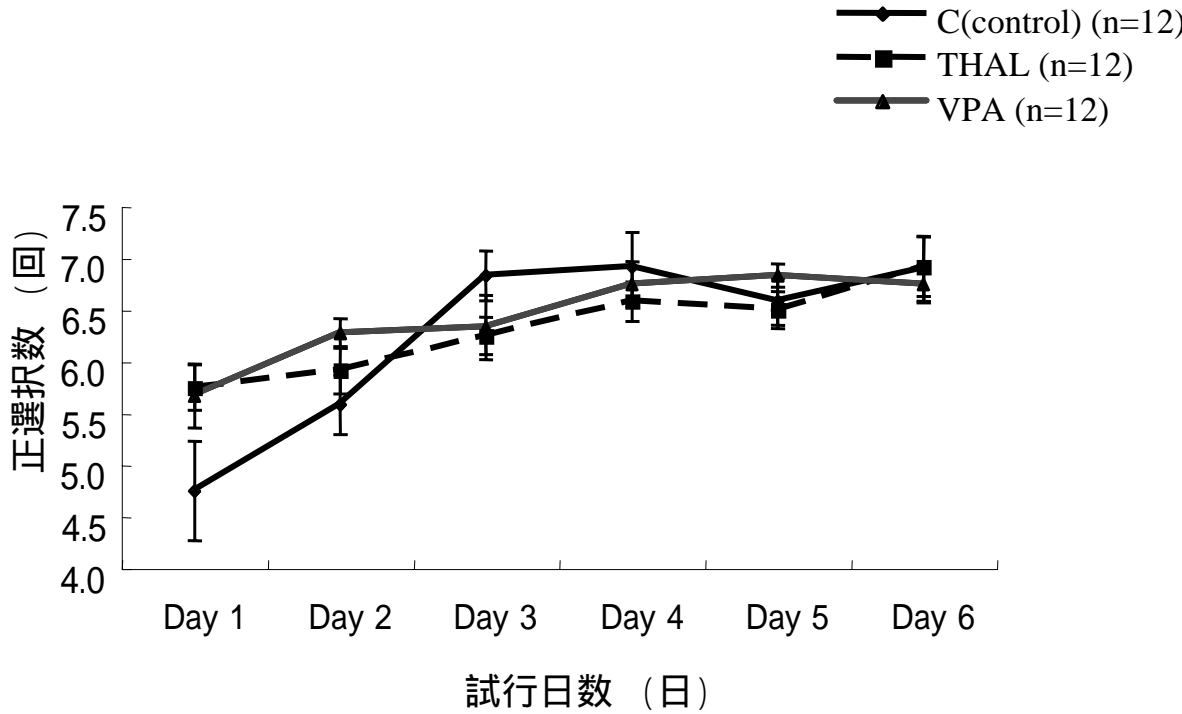
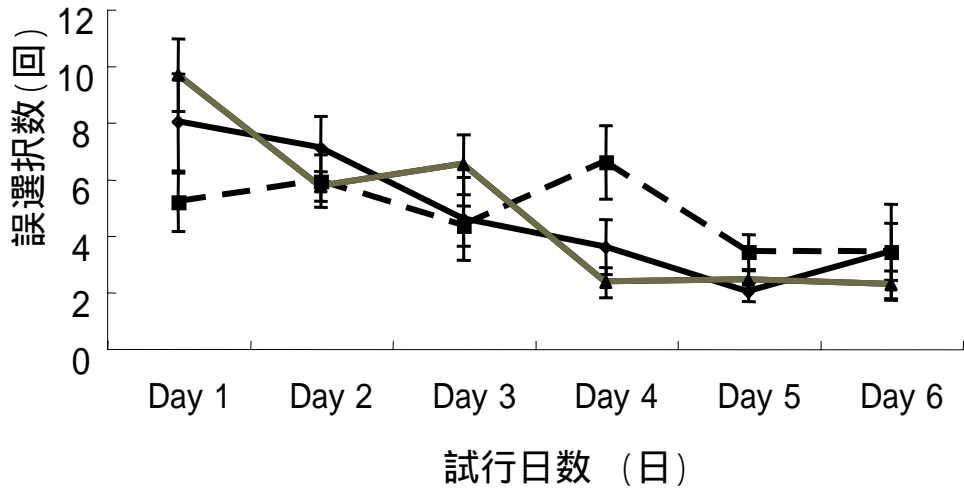
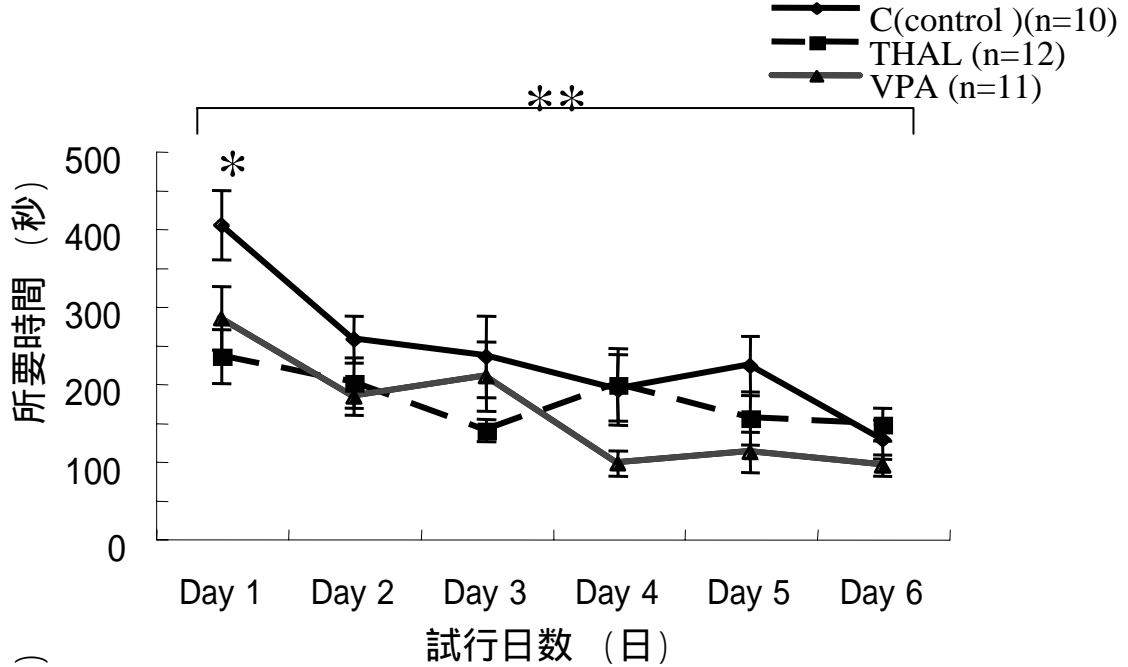
A**B**

図1 八方向放射状迷路実験における6試行日目までの正選択数(A)と誤選択数(B)

A



B

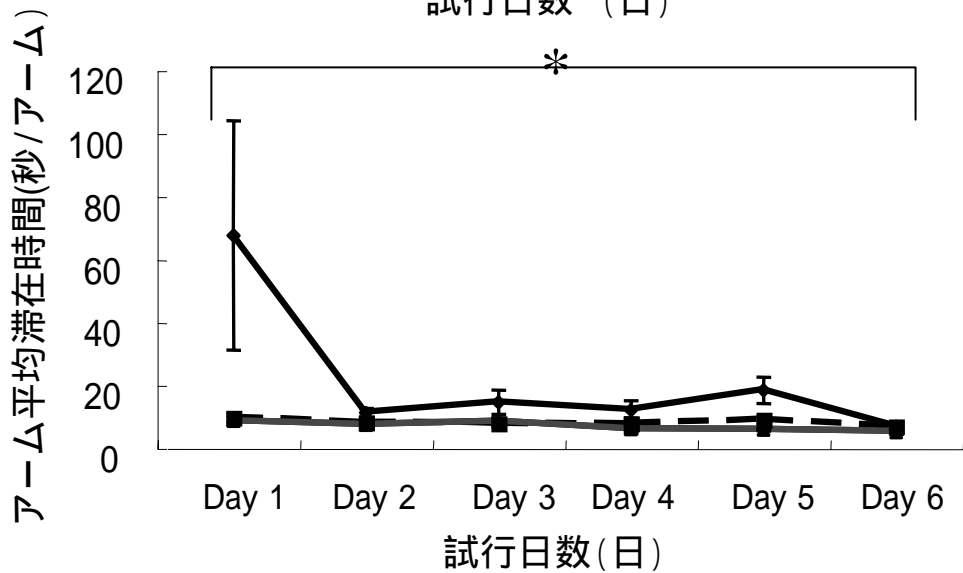


図2 八方向放射状迷路実験における6試行日目までの所要時間(A)とアーム平均滞在時間(B)

A. 一試行あたりの所要時間については以下のように有意差を検出した

第1試行のみの比較() * C vs THAL p < 0.05 by t-test
C vs VPA p < 0.05 by t-test

第1-第6試行を通しての比較() ** C vs THAL p < 0.05 by 2-way ANOVA
C vs VPA p < 0.01 by 2-way ANOVA

B. アーム平均滞在時間については以下のように有意差を検出した

第1-第6試行を通しての比較() * C vs THAL p < 0.05 by 2-way ANOVA
C vs VPA p < 0.05 by 2-way ANOVA

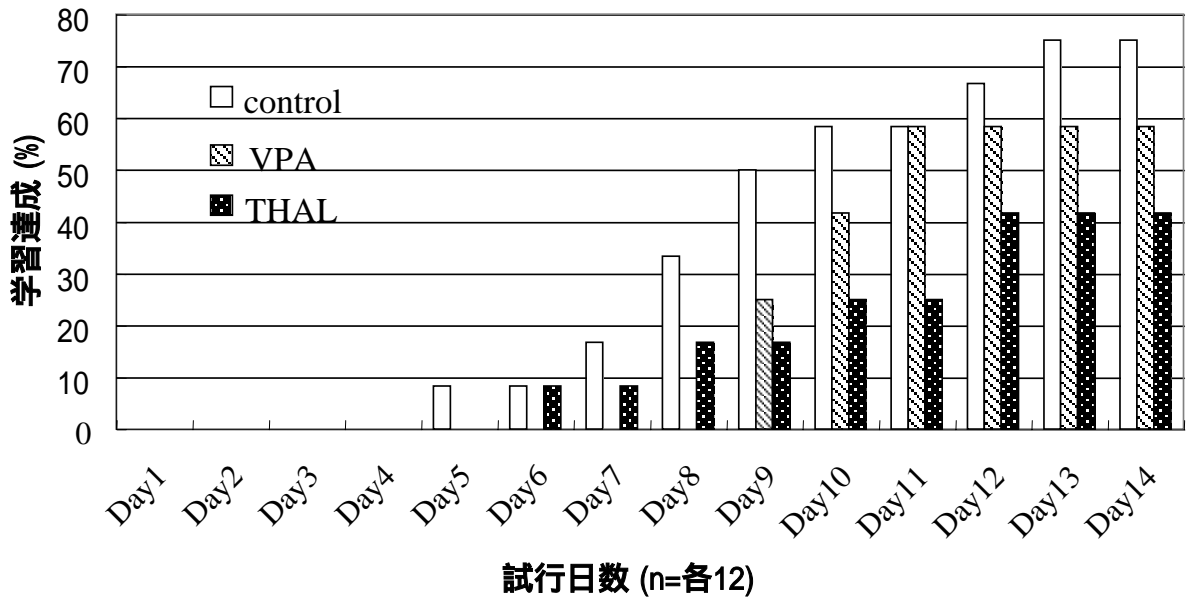


図3 八方向放射状迷路実験における学習達成 (学習達成個体数の割合)

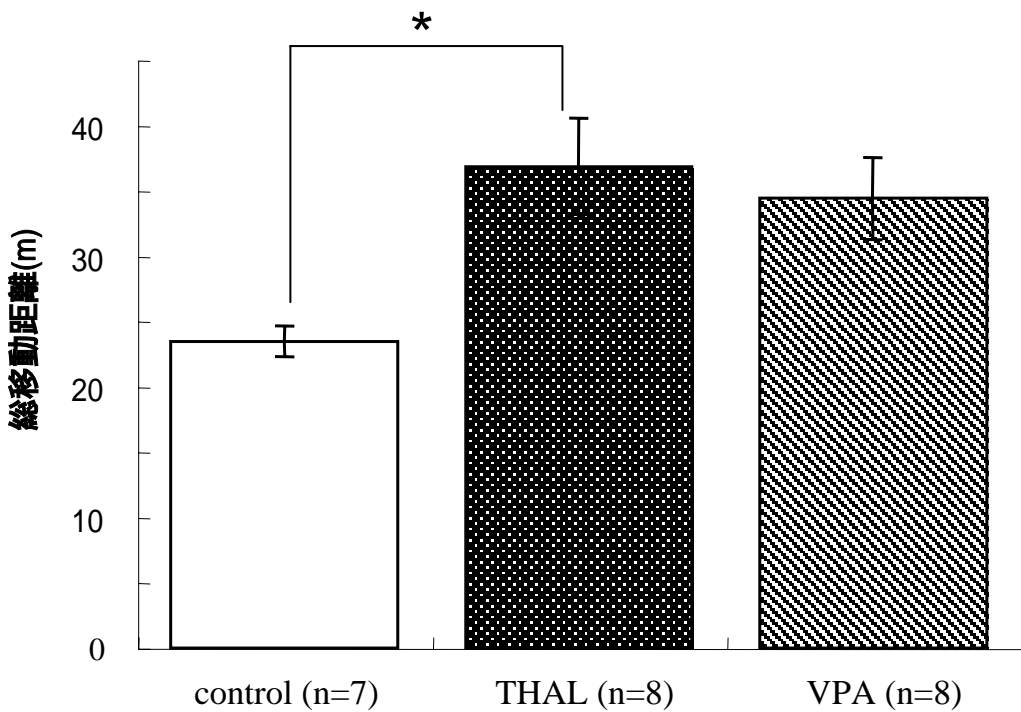


図4 オープンフィールドテスト1試行目における総移動距離

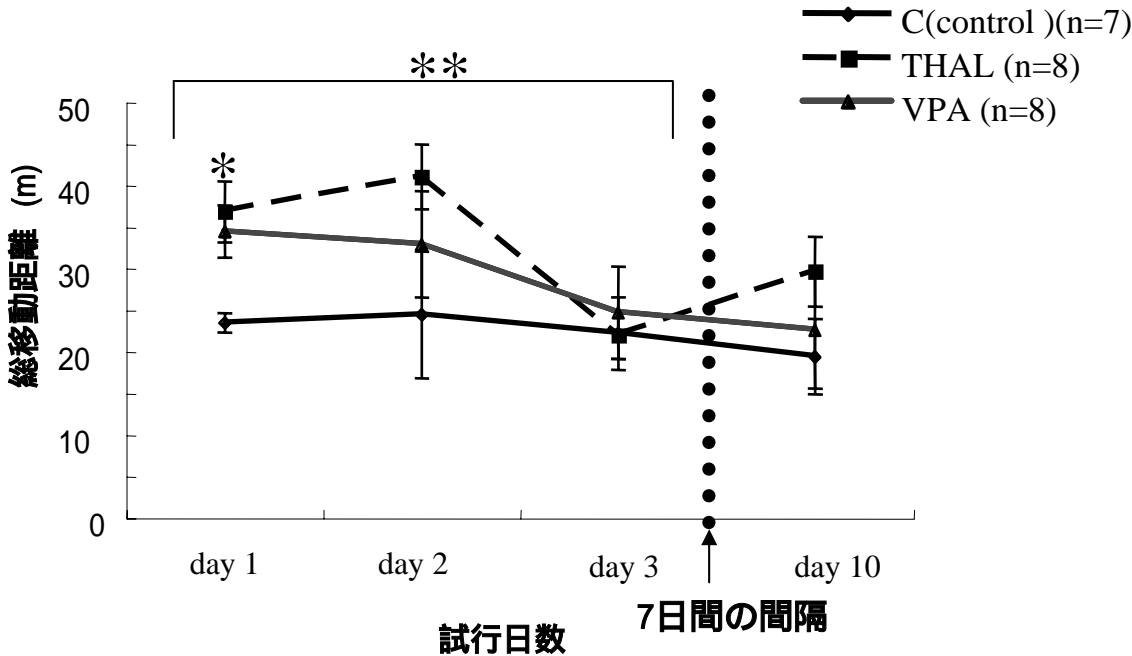


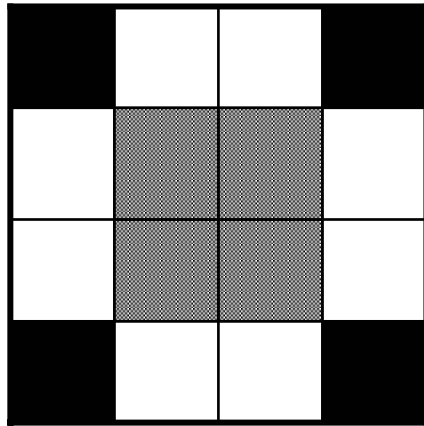
図5 オープンフィールドテスト4試行における総移動距離

総移動距離については以下のように有意差を検出した

第1試行のみの比較 () * C vs THAL $p < 0.05$ by t-test

第1試行-第3試行を通しての比較 () **

C vs THAL $p < 0.05$ by 2-way ANOVA



- a: 隅の領域
- b: 縁の領域
- c: 中央の領域

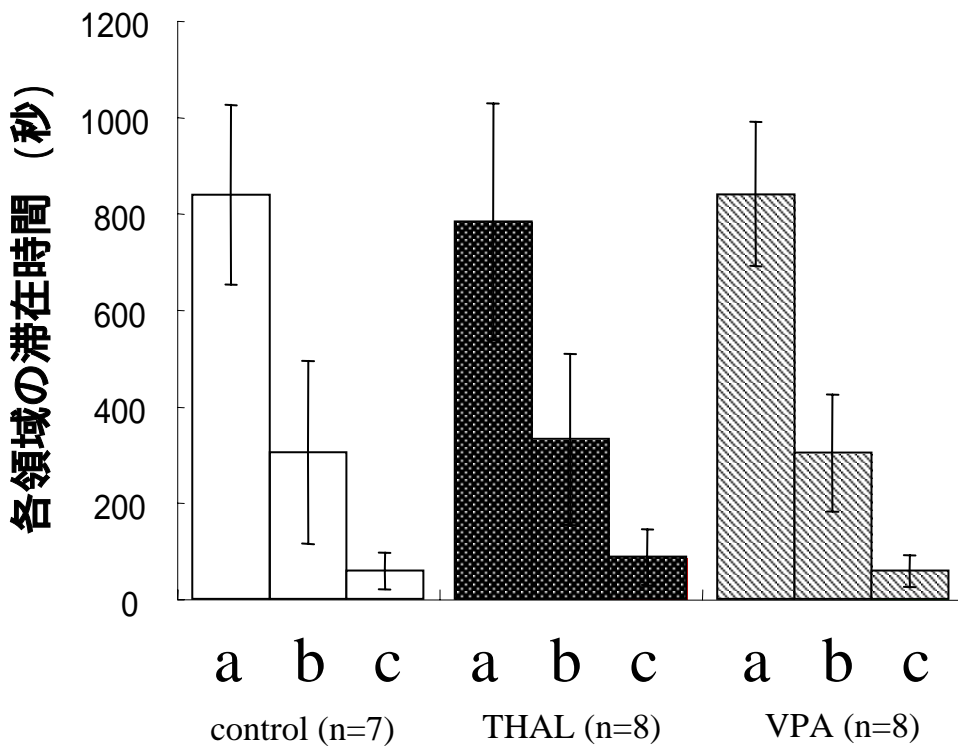


図6 オープンフィールドテストにおける情動に関する検討

表1: 社会相互作用テスト各評価項目の累計時間

	control (秒±SEM)	THAL (秒±SEM)	VPA (秒±SEM)	有意差 (by t-test)
sniffing	146.57 ± 16.47	134.25 ± 10.33	115.14 ± 7.96	ND
grooming	1.00 ± 0.66	2.63 ± 1.02	1.29 ± 0.97	ND
genital investigation	12.57 ± 2.97	11.50 ± 4.69	5.71 ± 1.67	ND
following	10.71 ± 1.73	10.75 ± 2.53	7.29 ± 2.02	ND
climbing	9.86 ± 2.40	10.63 ± 2.20	7.71 ± 1.77	ND
crawling under	2.57 ± 1.07	1.75 ± 1.08	1.43 ± 0.65	ND
boxing	0.29 ± 0.29	0.63 ± 0.38	0.43 ± 0.30	ND
sniffing each	11.57 ± 2.08	7.13 ± 1.65	5.86 ± 0.94	p < 0.05 (C vs VPA)
総相互作用時間	195.14 ± 49.90	179.25 ± 49.64	144.86 ± 33.42	p < 0.05 (C vs VPA)

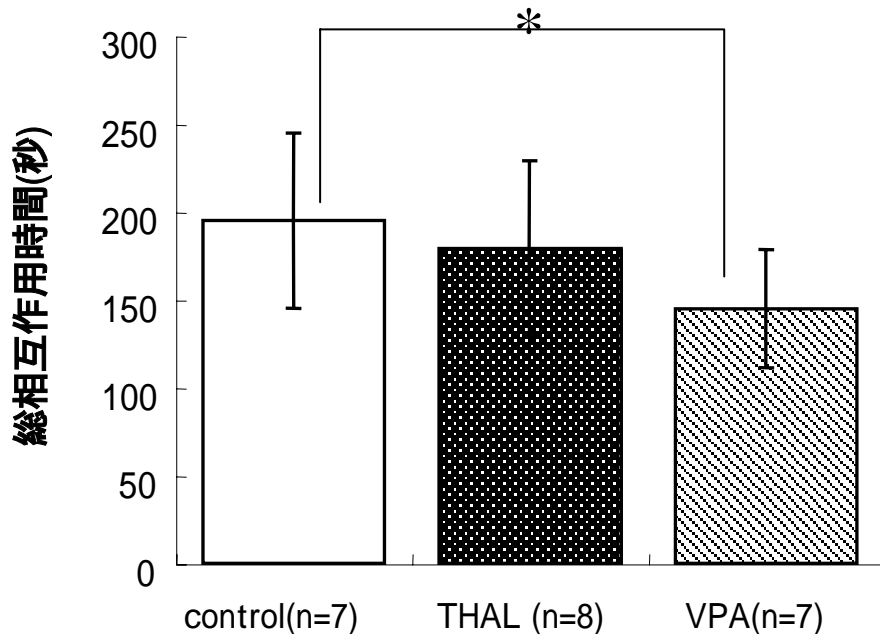


図7 社会相互作用テスト10分間における動物間の総相互作用時間

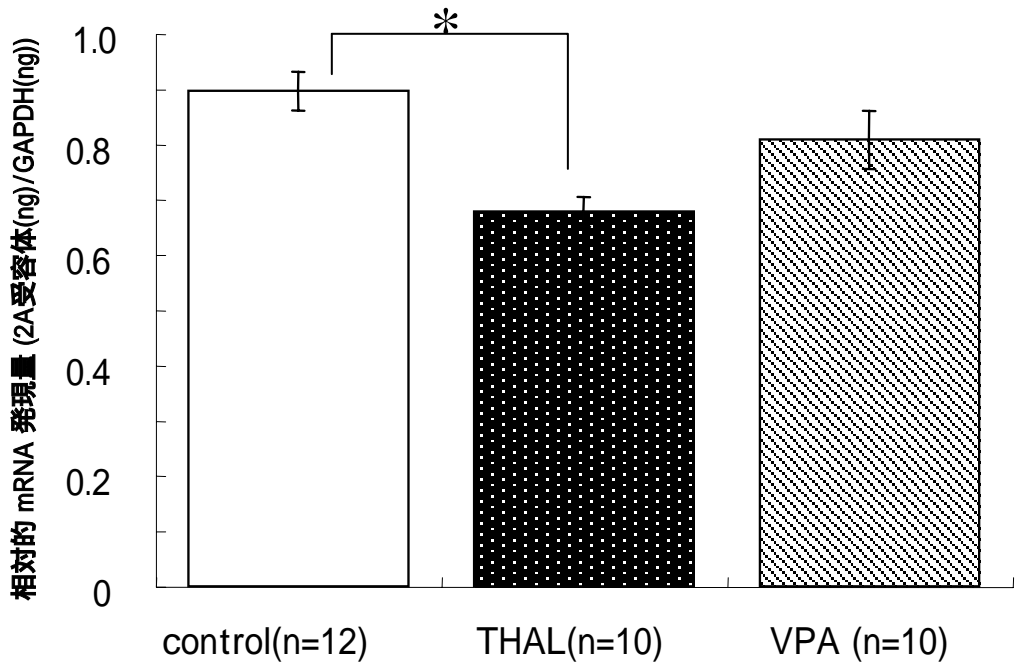
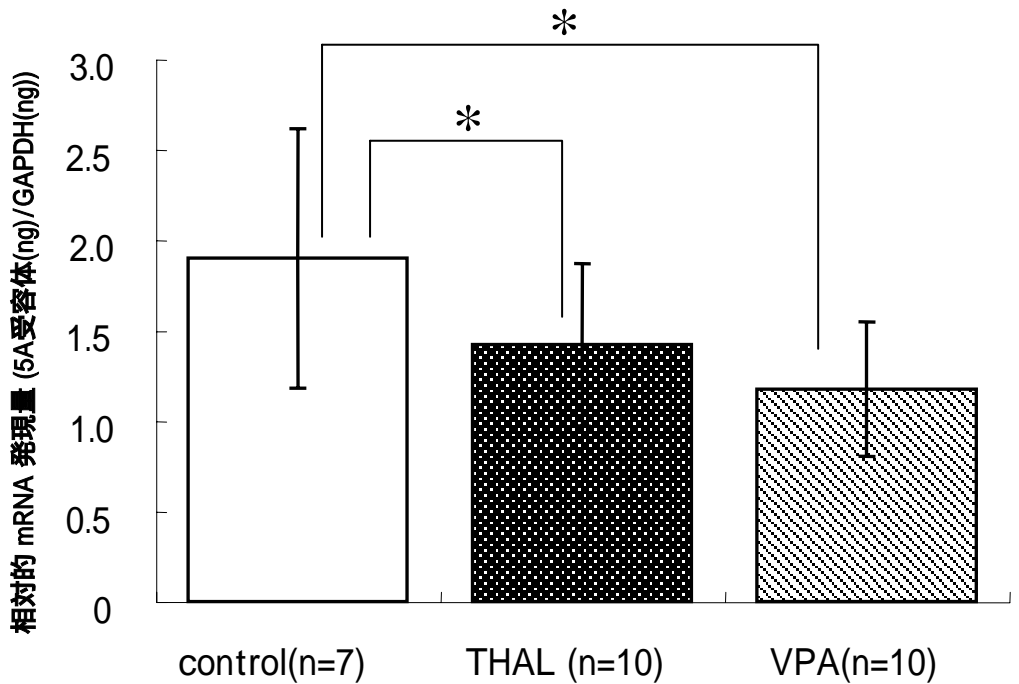
A**B**

図8 海馬におけるセロトニン受容体サブタイプmRNA 発現量

(A)セロトニン2A受容体

(B)セロトニン5A受容体

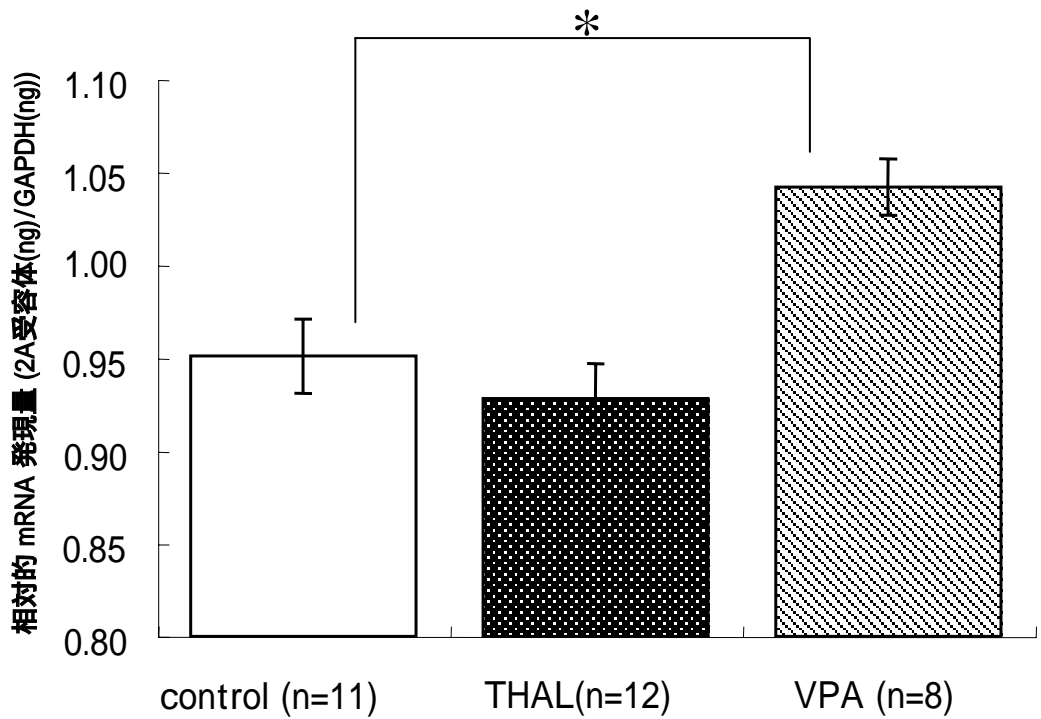
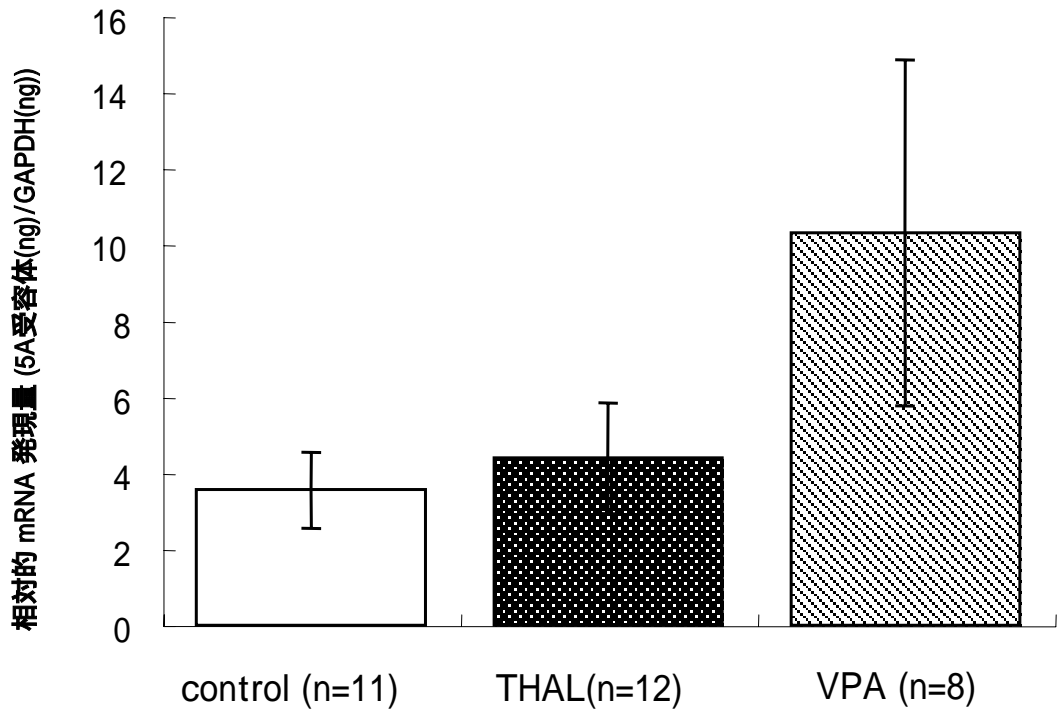
A**B**

図9 小脳におけるセロトニン受容体サブタイプmRNA 発現量

(A)セロトニン2A受容体

(B)セロトニン5A受容体

表2: 各自閉症モデルラットで見られた行動学的、生化学的变化:コントロール群との比較

THAL

VPA

八方向放射状迷路実験

正選択数

誤選択数

所要時間

アーム平均滞在時間

学習達成

オープンフィールドテスト

総移動距離(1試行目)

総移動距離(2,3,4試行目)

不安の高さ

社会相互作用テスト

sniffing

grooming

genital investigation

following

climbing

boxing

sniffing each

総相互作用時間

セロトニン受容体サブタイプ

mRNA 発現量

海馬セロトニン2A受容体

海馬セロトニン5A受容体

小脳セロトニン2A受容体

小脳セロトニン5A受容体