

令和 4 年 5 月 17 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K19863

研究課題名（和文）幼少時の豊かな生育環境の提供が自閉症モデルマウスの行動・脳機能改善に及ぼす影響

研究課題名（英文）The effect of Enrich Environment intervention cause to improvement of the behavior and cerebral function of the ASD model mice

研究代表者

小枝 周平（Koeda, Shuhei）

弘前大学・保健学研究科・講師

研究者番号：00455734

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：自閉スペクトラム症(ASD)モデルマウスを用いて、運動や環境エンリッチメントの提供がASDモデルマウスの行動にどのような治療効果を与えるかについて、行動実験を中心に検証した。その結果、強制的な運動は不安を惹起し、社会性の改善が妨げることが明らかとなった。また、環境エンリッチメント下での飼育は、不安の軽減と社会性の改善をもたらすことが明らかとなった。環境エンリッチメントによる自発的な運動の促進や不快な刺激からの逃避がこの変化に関係したと考えられ、リハビリテーション治療時に、自由な環境下での自発的な運動の実施は、自閉症児の行動の改善につながる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、リハビリテーション治療で用いられる運動や遊具の設置が自閉症モデルマウスの行動の改善につながるかを検証した。強制的な運動は不安を増大させ、社会性の改善が妨げたが、遊具のある環境で自由に運動をした場合は、不安や社会性改善の効果があった。自由な環境で自発的な運動を行うことの効果を示した研究は少なく、本研究成果は、現在行われている自閉症のリハビリテーション治療の根拠となる研究である。

研究成果の概要（英文）：In this study, we performed forced running exercise and breeding in the Enrich Environment (EE) as treatments for the autism spectrum disorder (ASD) model mice and examined effect on emotion and behavior. As a result of forced running exercise intervention, they had the increase of the anxiety and inhibition of the improvement of the sociability. Whereas, as a result of EE intervention, they had the decrease of the anxiety and the improvement of the sociability. It is thought that voluntary exercise and security by the EE intervention was associated with the improvement of the behavior test. In the case of rehabilitation treatment of the ASD children, offering the voluntary exercise under free environment were led to improvement of the behavior of the ASD children was suggested.

研究分野：リハビリテーション

キーワード：自閉症 リハビリテーション 動物実験 行動 運動

## 1. 研究開始当初の背景

自閉スペクトラム症 (Autism Spectrum Disorder, ASD) に代表される発達障害の有病率は、学童期の 6.5% に及ぶ。発達障害の症状は自然消失することは少なく、抑うつ症状や不登校、いじめなどの問題に進展することもあるほか、発達障害児の問題行動はネグレクトなどの生育環境の悪化にもつながるといわれている。発達障害の詳細な病態は明らかにはなっていないが、早期療育によって改善する可能性が高い。

ヒトの脳が健康に発育するためには、十分な感覚運動経験のほか、親や子ども同士の集団での関わりが重要であり、発達期にこれらが不足して育つと脳の発達が阻害され、成人期以降に様々な精神症状が認められることが知られている。このように、子どもの脳の発達には幼少期に豊かな生育環境を提供することの重要性が知られてきている。

ASD 児は、限局された興味、反復行動、感覚特異性によって生育時に必要な刺激が十分に入力されないことが多く、それらが発達の遅れにつながることもある。リハビリテーション治療では、集団遊びや遊具での運動などの活動を取り入れることで日常にない刺激を入力し、ASD 児の適応反応を引き出していく。しかしながら、子どもの脳の発育にとって、遊具などのモチベーションのある活動が重要であるのか、運動による刺激が重要であるのかは明らかではない。現在行われている治療のエビデンスを構築していくためには、科学的な検証が必要であるが、脳機能の解析や劣悪な環境下での養育、強制的な運動の実施などはヒトを対象とした研究が難しい。そのため、動物実験による検証を着想した。

動物を用いた基礎研究では、マウスなどの齧歯類の ASD モデル動物が多く用いられている。ASD モデルの作成方法の 1 つとして、妊娠期の母マウスに抗てんかん薬であるバルプロ酸ナトリウム (Valproate sodium, VPA) を投与する方法がある。このような処置を施した母マウスから生まれた仔マウスは、社会性の低下や不安の亢進、空間作業記憶の障害といった症状を示すといわれ、ヒトの ASD 症状と類似することから多くの研究で用いられている。この ASD モデルを用いた先行研究では、自発的な運動が社会性と常同行動に改善につながったことを報告されており、ASD に対する運動の重要性が示されていた。また、ASD モデルに対して、ASD 症状を軽減させるために、環境エンリッチメント (Enriched Environment, EE) を用いた研究も行われている。EE とは、動物種に適した行動的および心理的活動の発現を促進するための刺激を用意するものである。このような環境下で過ごしたことによる ASD モデルは、社会性の向上や不安の軽減といった効果があることが報告されている。

EE の概念は、自発的な心身の運動を引き出す点において ASD 児のリハビリテーション治療における治療環境の設定に類似している。そのため、EE 環境での行動変化を中心に、そこに含まれる運動やストレス等をみていくことで、自閉症児に対する豊かな環境の提供の意味が明らかになり、リハビリテーション治療のエビデンス構築の一助になると考えた。

## 2. 研究の目的

- (1) 胎生期に VPA に曝露させた ASD モデルマウスに対して、EE 環境下での飼育を実施し、情動や行動、ストレス反応への影響を調査すること
- (2) EE 環境に含まれる運動の影響の詳細を明らかにするため、ASD モデルマウスに対して自発的および強制的運動を実施し、運動様式の違いが行動やストレス反応へ与える影響について調査すること

## 3. 研究の方法

- (1) ASD モデルマウスに対する EE 環境での飼育による症状改善効果の検証

### 実験動物

実験動物は、C75BL/6J の雄マウス 27 匹を使用した。12 時間の明暗サイクル下で餌と水を自由に摂取できる環境で飼育した。離乳まで母仔同じケージ内で飼育した後、仔マウスのみ 1 ケージ 3~5 匹で飼育した。本研究は、動物愛護の観点から使用する実験動物は最小限に留め、全ての処置は本学大学院医学研究科附属動物実験施設の承認のもとに行った。(承認番号: G16006)

### ASD モデル動物

ASD モデル動物は、0.9% の生理食塩水に VPA を溶かし、濃度 50mg/ml の VPA 水溶液を作製した。妊娠 (E) 12.5 日目の母マウスの頸部に VPA 水溶液を 600mg/kg で皮下注射し、仔マウスに胎生期曝露させた。一方の母マウスには、0.9% の生理食塩水を同量投与した。

### 群分け

群分けは、VPA を投与した母マウスから産まれた雄の仔マウスを VPA 群、生理食塩水を投与した母マウスから産まれた雄の仔マウスを Control (CTL) 群とした。また、標準環境 (Standard Environment, SE) 下で過ごしたマウスを SE 群とし、環境エンリッチメント (Enriched Environment, EE) 下で過ごしたマウスを EE 群とした。介入前の行動テストを実施した後、CTL+SE 群 (n=5)、CTL+EE 群 (n=8)、VPA+SE 群 (n=7)、VPA+EE (n=7) にランダムに振り分けた。

### 行動テスト

行動テストは、社会性を評価するための Three chamber test、活動量と不安度を評価するための Open field test、不安度の評価のための高架式十字迷路試験、空間作業記憶を評価するための 8 方向放射状迷路試験の 4 つを実施した。テスト時の行動は Web カメラを用いて録画し、行動解析ソフト smart 3.0(バイオリサーチセンター社製)を用いて解析を行った。

#### ストレス評価

ストレス評価は、コルチコステロンの血中濃度を Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay(ELISA)で測定したものをを用いた。ELISA 測定キット(Arbor Assay 社 K014-H1, USA)を使用し、心臓採血により抽出した血清サンプルをキットのプロトコルに準じて測定し、コルチコステロン標準曲線と比較して、コルチコステロン濃度を決定した。

#### 介入

離乳後から SE または EE での飼育を 5 週間実施した。SE は、プラスチックケージ(25×40×20cm)で飼育した。一方、EE は、SE と同じ大きさのプラスチックケージ内に、ランニングホイール(直径 25cm)、巣、営巣材、トンネルを設置した環境で飼育した(図 1)。使用した遊具は、週 2 回決まった位置に再設置し、位置の変化による影響を抑えた。各環境とも 1 ケージあたりの飼育数を 3~5 匹で飼育した。



図 1 EE 環境

#### 統計解析

VPA 投与によるモデル成立を確認するため、CTL 群と VPA 群の介入前の行動テストの結果を Mann-Whitney の U 検定を用いて比較した。EE の効果を比較するため、各群の介入前後の行動テストの結果を Wilcoxon の符号順位和検定を用いて比較した。コルチコステロン濃度は、一元配置分散分析(Tukey-Kramer 検定)を行い、群間比較した。解析には、SPSS Statistics ver.27.0 を用い、危険率 5%未満を有意とした。

## (2) ASD モデルマウスに対する運動による症状改善効果の検証

#### 実験動物

C57BL/6J の雄マウス 22 匹を使用した。飼育環境は(1)と同様である。

#### ASD モデル動物

(1)と同様に E12.5 の母マウスの頸部に VPA を 600mg/kg で皮下注射することにより作成した群分け

対象を、VPA+Ex 群(n=6)、VPA+No-Ex(n=6)、CTL+Ex(n=5)、CTL+No-Ex(n=5) の 4 群にランダムに振り分けた。

#### 行動テスト

(1)と同様に、Three chamber test、Open field test、高架式十字迷路試験、8 方向放射状迷路試験の 4 つを実施し、解析を行った。

#### ストレス評価

(1)と同様に、血中コルチコステロン濃度の測定を ELISA 法で実施した。

#### 介入

運動介入は強制回転ケージ(FWS-1504, MELQUEST 社製, 図 2)を用いて、運動群に対し強制的な走行運動を実施させた。運動負荷量は、速度を 5m/min、運動時間を 1hour/day、頻度を 7day/week、期間を 2weeks に設定した。強制回転ケージへの馴化のため、運動介入群に対して、介入 3 日前から毎日 1 時間強制回転ケージ内にマウスを入れた。この際速度は 2m/min から 5m/min に段階的に増加するように設定し、ケージ内でマウスが走り続けることができるようにした。運動介入期間に、非運動群は飼育しているケージ内で過ごしていた。



図 2 強制回転ケージ

#### 統計解析

運動介入の効果を確認するため、介入後の行動テストの結果の変化について、介入前の値との変化を増加率(介入後の値/介入前の値×100)で示した後、群間比較を行った。群間比較には、Kruskal-Wallis 検定を用い、有意であった場合には post-hoc 検定として Steel Dwass 法を用いた。解析には SPSS Statistics ver.27.0 を用い、危険率 5%未満を有意、10%未満を傾向ありとした。

## 4. 研究成果

### (1) ASD モデルマウスに対する EE 環境での飼育による症状改善効果の検証

Three chamber test の Stranger Zone 滞在時間割合は、CTL 群と比較し、VPA 群の滞在時間割合が有意に低かった(p<0.05)。このことにより、VPA 群に ASD の主症状である社会性の低下が認められ、モデル成立が確認された。

EE 介入によるマウスの行動特性の変化を評価するために、EE 介入前後で行動テストを実施した。その結果、Three chamber test において、CTL+SE 群の介入後の Stranger Zone 滞在時間割合が、介入前に比べ有意に低かった(p<0.05)。また、VPA+EE 群の介入後の Stranger Zone 滞在時間割合が、介入前に比べ有意に高かった(p<0.05)。これは、SE 条件下で過ごした CTL 群と VPA

群の Stranger Zone 滞在時間割合が維持もしくは低下したこと、EE 条件下で過ごした CTL 群 VPA 群の Stranger Zone 滞在時間割合が維持もしくは向上したことを示している。つまり、EE 条件下で過ごすことはマウスの社会性の向上に繋がったといえ、これは ASD モデルに対しても有効だった。一方、Open Field Test において、VPA+EE 群の介入後の中心滞在率が、介入前と比べ有意に高かった。CTL+SE 群、CTL+EE 群、VPA+SE 群は、有意な差が認められなかった。これは、SE 条件下で過ごした CTL 群と VPA 群の中心滞在率が維持したこと、EE 条件下で過ごした CTL 群と VPA 群の中心滞在率が維持または向上したことを示している。つまり、EE 条件下で過ごすことはマウスの不安の減少に繋がったといえ、これは ASD モデルに対しても有効だった。先行研究において、EE は自発的な運動を誘発するといわれている。また、自発的な運動は、社会性の向上や不安の軽減に効果があることを示している。その他に、トンネルのような隠れ場所は、マウスの不安を軽減するといわれている。今回の実験においても、ランニングホイールで遊ぶ様子やトンネルと巣に隠れる様子が頻りに観察できた。そのため、本研究では、EE によって、自発的な運動が誘発されてマウスの運動量が増加したことと不快な刺激から逃避できる環境だったことが ASD モデルマウスの社会性の改善と不安の軽減に繋がったと考える。

EE 介入によるマウスのストレスの変化を評価するために、EE 介入後にストレス評価を実施した。その結果、有意な差は認められなかった。そのため、ストレスは、全ての群において通常飼育時と変わらず、これは本研究において、SE と EE とともに強制的な運動刺激はなかったため、全ての群間において、コルチコステロン濃度に差が認められなかったと考える。

以上より、EE は、ストレスを与えることなく、ASD モデルマウスの社会性の向上と不安の軽減に繋がったことが示された。そのため、ASD 患者に対して、自発的な運動による運動量の増加や不快な刺激から逃避できる環境を提供することは、ストレスを与えることなく、社会性の向上や不安の軽減に繋がることが示唆された。

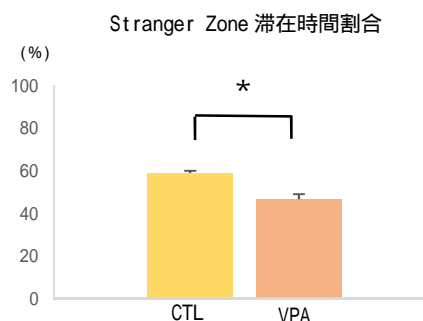
しかしながら、この効果は、EE によって自発的な運動が誘発され、運動量が増加した効果と推察したが、運動自体がよいのか、運動様式が良いのかは明らかにならなかったため、(2)で述べる運動様式の違いについて検討を行った。

## (2) ASD モデルマウスに対する運動による症状改善効果の検証

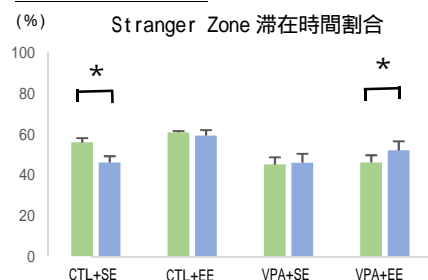
モデル成立の確認は、(1)と同様に行動テストにより行った。ここでも Three Chamber Test の Stranger Zone 滞在割合において、CTL 群に比べて VPA 群の割合が有意に低く ( $p < 0.05$ )、VPA 群の社会性が低下していることが認められ、モデル成立が確認された。

運動介入によるマウスの不安の変化を評価するために、運動介入前後に Open Field Test を実施した。その結果、VPA+No-Ex 群に比べ、VPA-Ex 群の中心滞在率の増加率が有意に低くなっていた ( $p < 0.05$ )。不安の高いマウスは、ボックスの中心部を避け、移動距離が少なくなる。本研究では、総移動距離では中心滞在率で、非運動群に比べて運動群の滞在率が減少していたことから、運動群で不安が増加したといえる。運動群の不安が増加した理由として、強制的な運動や閉鎖的な空間にマウスを隔離したことが考えられる。これらの実施は、先行研究において、マウスの不安に関係することはすでに知られており、閉鎖的空間での隔離や強制的な運動の実施はマウスにとってストレス要因

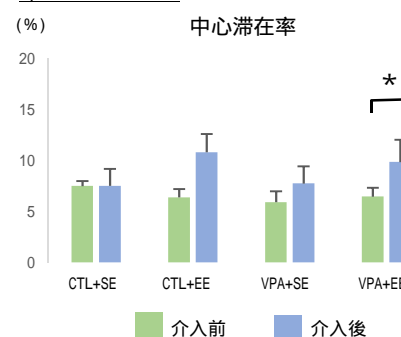
### Three Chamber Test



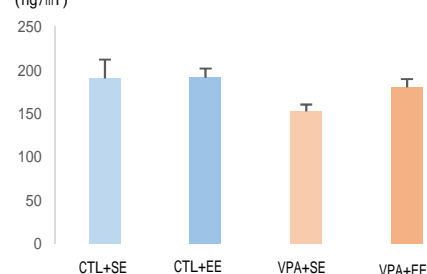
### Three Chamber Test



### Open Field Test

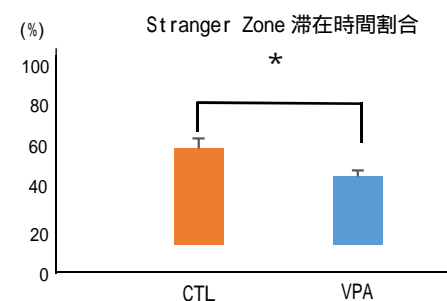


### 介入後のコルチコステロン濃度



### Three Chamber Test

### Three Chamber Test

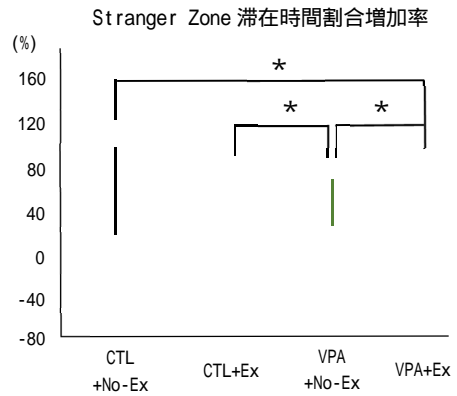


となり、運動したマウスの不安が高くなったと推察される。

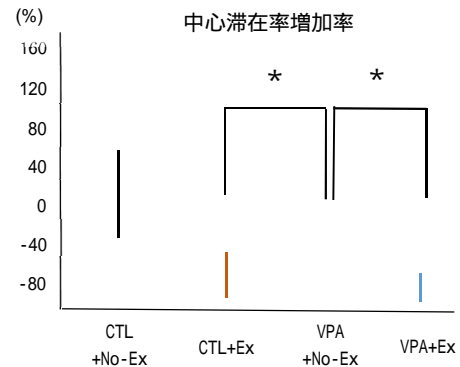
運動介入によるマウスの社会性の変化を評価するために、運動介入前後に Three Chamber Test を実施した。その結果、VPA+No-Ex 群に比べて、VPA+Ex 群の Stranger Zone 滞在時間割合の増加率が有意に低くなっていた ( $p < 0.05$ )。これは、CTL 群においても同様の差が認められた ( $p < 0.05$ )。このことから、強制回転ケージでの運動は、社会性の向上を妨げたといえる。幼少期の身体的または心理的なストレスは、マウスの社会性の低下を引き起こすと考えられる。本研究では、運動群の不安が増加しており、不安行動が現れるほどのストレスがマウスにかかっていたと考えられる。実際に、介入後のストレスホルモンであるコルチコステロン濃度は、運動群が有意に高くなっていた ( $p < 0.05$ )。したがって、閉鎖的な空間での隔離や強制的に運動を行わせるといった介入によるストレスがマウスの社会性の向上を妨げたと推察される。

### (3)まとめ

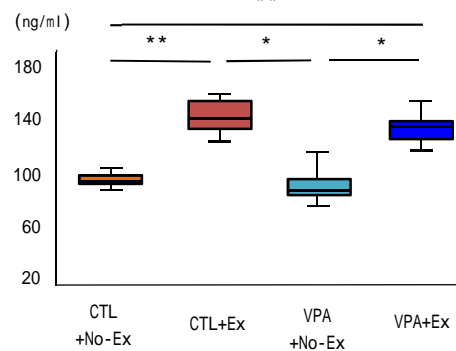
実験 1 で示すように、EE での飼育は ASD モデルマウスの社会性向上や不安の改善に寄与することが明らかとなった。一方、運動の効果を確認するために実施した実験 2 では、強制運動を実施した Ex 群は社会性の低下が妨げられ、不安行動が惹起され、明らかに Ex の実施による悪影響が現れていた。運動は、うつ病などの精神疾患の非薬物療法として、有用であることが知られているが、強制的に実施する運動では、ストレス反応が引き起こされ、精神的な問題を引き起こすことが明らかになった。そのため、実験 1 で示された EE 環境飼育による改善効果は、対象が自発的かつ自由な運動を実施できたことが要因と考えられる。したがって、自閉症児に対するリハビリテーション場面で運動を用いる際には、運動に対するモチベーションを対象が高く持つことを意識し、対象者が自由に、ストレスを感じにくい環境でのびのびと運動を実施できることが、社会性などの ASD の主症状を改善する上で非常に重要であることが明らかとなった。



### Open Field Test



### 介入後のコルチコステロン濃度



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Misaki Mikami, Tomoya Hirota, Michio Takahashi, Masaki Adachi, Manabu Saito, Shuhei Koeda, Kazutaka Yoshida, Yui Sakamoto, Sumi Kato, Kazuhiko Nakamura, Junko Yamada	4. 巻 52(2)
2. 論文標題 Atypical sensory processing profiles and their associations with motor problems in preschoolers with developmental coordination disorder	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Child Psychiatry & Human Development	6. 最初と最後の頁 311-320
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10578-020-01013-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Sato Chihiro, Tanji Kunikazu, Shimoyama Shuji, Chiba Mitsuru, Mikami Misaki, Koeda Shuhei, Sumigawa Koshi, Akahira Kazuki, Yamada Junko	4. 巻 31
2. 論文標題 Effects of voluntary and forced exercises on motor function recovery in intracerebral hemorrhage rats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 NeuroReport	6. 最初と最後の頁 189 ~ 196
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/WNR.0000000000001396	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計15件（うち招待講演 0件/うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Chihiro Sato, Kunikazu Tanji, Mitsuru Chiba, Shuhei Koeda, Misaki Mikami, Junko Yamada
2. 発表標題 The motor recovery synaptic plasticity after stroke were affected by the types of exercise
3. 学会等名 The 43th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Chihiro Sato, Kunikazu Tanji, Shuhei Koeda, Mana Kishimoto, Shun Mori, Misaki Mikami, Junko Yamada
2. 発表標題 The motor recovery and synaptic plasticity was affected by the types of exercise in the hemorrhage model rat
3. 学会等名 the 98th Annual Meeting of The Physiological Society of Japan, the 126th Annual Meeting of The Japanese Association of Anatomists (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Misaki Mikami, Masaki Adachi, Michio Takahashi, Tomoya Hirota, Manabu Saito, Shuhei Koeda, Kazutaka Yoshida, Kazuhiko Nakamura, Junko Yamada
2. 発表標題 Sensory processing abnormalities and their associations with behavioral and emotional difficulties in preschoolers with Developmental Coordination Disorder
3. 学会等名 The International Association for Child and Adolescent Psychiatry and Allied Professions (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小枝周平, 三上美咲, 斉藤まなぶ, 中村和彦, 山田順子
2. 発表標題 日本人の自閉症児における栄養と食物摂取
3. 学会等名 第54回日本作業療法学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三上美咲, 小枝周平, 斉藤まなぶ, 中村和彦, 山田順子
2. 発表標題 幼児期における発達障害児の筆記具操作と描線運動
3. 学会等名 第54回日本作業療法学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤ちひろ, 小枝周平, 三上美咲, 山田順子
2. 発表標題 脳出血モデルラットにおける運動種類の違いが運動麻痺回復および脳可塑性関連因子に及ぼす影響
3. 学会等名 第54回日本作業療法学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Chihiro Sato, Kunikazu Tanji, Kazuki Akahira, Koshi Sumigawa, Shuhei Koeda, Misaki Mikami, Junko Yamada
2. 発表標題 The comparison of the synaptic changes with voluntary and forced rehabilitation in intracerebral hemorrhage model rats
3. 学会等名 The 1st Japan-Korea-Taiwan Neurorehabilitation Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤ちひろ, 澄川幸志, 小枝周平, 赤平一樹, 山田順子
2. 発表標題 脳出血モデルラットにおける運動に伴うモチベーションが麻痺回復および脳機能に及ぼす効果
3. 学会等名 第53回日本作業療法学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Chihiro Sato, Kunikazu Tanji, Koeda Suhei, Mana Kishimoto, Shun Mori, Misaki Mikami, Junko Yamada
2. 発表標題 The motor recovery and synaptic plasticity was affected by the exercise in the hemorrhage model rat.
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤ちひろ, 小枝周平, 三上美咲, 赤平一樹, 山田順子
2. 発表標題 脳出血モデルラットにおける異なる種類の運動が機能回復に与える影響
3. 学会等名 第157回弘前医学例会
4. 発表年 2020年



1. 発表者名 小枝周平, 三上美咲, 斉藤まなぶ, 佐藤ちひろ, 富田桃子, 中村和彦, 山田順子
2. 発表標題 運動嫌いにより介入が困難であった発達性協調運動障害の一症例
3. 学会等名 第4回日本DCD学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小枝周平, 三上美咲, 佐藤ちひろ, 山田順子
2. 発表標題 自閉症モデルマウスに対する強制運動の悪影響
3. 学会等名 第55回日本作業療法学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 秋山郁菜絵, 小枝周平, 三上美咲, 斉藤まなぶ, 山田順子
2. 発表標題 発達障害児の感覚特異性と栄養素摂取との関係
3. 学会等名 第55回日本作業療法学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shuhei Koeda, Ayaka Monden, Misaki Mikami, Chihiro Sato, Junko Yamada
2. 発表標題 Forced exercise causes the negative emotional and behavioral changes to the mouse model of autism spectrum disorder.
3. 学会等名 The 44th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shuhei Koeda, Honami Yanagimachi, Misaki Mikami, Chihiro Sato, Junko Yamada
2. 発表標題 Enrich environment causes the emotional and behavioral changes to the mouse model of autism spectrum disorder.
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関