

令和 5 年 5 月 19 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08205

研究課題名（和文）自閉症モデルラットを用いた自閉症児における嗅覚過敏の機序解明

研究課題名（英文）Mechanism of olfactory hypersensitivity in human autism using autism model rats

研究代表者

江藤 みちる（伊田みちる）（Ida-Eto, Michiru）

三重大学・医学系研究科・講師

研究者番号：80393148

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：自閉症は、コミュニケーション障害・社会性の障害・常同行動といった中核症状のほかに、感覚過敏など感覚処理の問題がしばしば合併する。本研究では、ヒト自閉症における嗅覚過敏の病態解明と自閉症児のQOL向上を目指し、自閉症モデルラットを用いて嗅覚刺激に対する嗅覚神経系の生理学的・形態学的解析を行った。

新生仔ラットにおける嗅覚系行動実験（Nest-seeking test）を行い、自閉症モデルラットでは嗅覚に対する感受性が高いことが示された。成獣ラットでは4種類の匂い物質のうち、1,8-シネオールに対して自閉症モデルラットの後梨状皮質におけるc-fos陽性細胞の増加が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、自閉症の患者数は増加の一途をたどっている。社会性行動など中心的な病態の解析は進んでいるが、感覚の問題は見過ごされており、患児のQOLの低下を引き起こしている。特に嗅覚は危険に対する認識や食事の好き嫌いなど多岐にわたる機能を担っており、自閉症児において大きな問題となる。本研究結果から、成獣ラットでは匂い物質に対する変化は見られなかった一方で新生仔ラットでは自閉症モデルで感受性が高いことが示された。ヒト自閉症における感覚の問題は年齢によって変化が現れることがあり、本モデル動物では時期特異的に嗅覚過敏を呈するものであると結論づけられる。

研究成果の概要（英文）：Autism spectrum disorders (ASD) is characterized by impairment in social interaction; communication abnormalities; and limited activity and curiosity. Sensory hypersensitivity is frequently observed with ASD. In this study, I performed behavioral and morphological analysis of the olfactory nervous system in response to olfactory stimuli using autism model rats.

Behavioral experiments on the olfactory system in neonatal rats (Nest-seeking test) showed that the autism model rats tended to be highly sensitive to the smell of home cage. Adult rats were exposed to four odorants. Increased c-fos positive cells in the posterior piriform cortex of autism model rats were observed for 1,8-cineole.

研究分野：神経科学、解剖学

キーワード：自閉症 ラット サリドマイド 嗅覚

1. 研究開始当初の背景

自閉症は、コミュニケーション障害・社会性の障害・常同行動を特徴とする発達障害である。感覚障害など感覚処理の問題がしばしば合併するが、その病態解明はほとんどなされていない。

研究代表者の所属研究室では、子に自閉症をもつ母親が妊娠の特定の時期にサリドマイドを服用したという疫学的事実に基づき自閉症モデルラットを作製し (Narita et al. *Pediatr Res* 2002)、ヒト自閉症と同様にセロトニン神経系の異常を呈することを報告してきた (Narita et al. *Neurosci Res* 2010)

研究代表者は「自閉症患者に聴覚過敏が多い」という事実に着目して自閉症モデルラットの聴覚神経系の解析を行い、脳幹の上オリーブ複合体、特に台形体核の形態異常を報告した (Iida-Eto et al. *Pediatr Int* 2017)。台形体核は抑制性ニューロンで構成され情報過多を防ぐ調整役を担っていることから、台形体核の異常が聴覚過敏を引き起こしていると考えられた。

研究代表者は上記研究遂行中に偶然、梨状皮質および扁桃体において抑制性神経の異常を発見した。いずれも嗅覚神経系に属することから、本モデルラットで嗅覚過敏を呈する可能性が考えられた。そこで本研究では嗅覚神経系に着目して自閉症モデルラットの解析を行動および形態から行うこととした。また、嗅覚と味覚は日常生活においても風邪や花粉症などで鼻の調子がおかしくなったときに嗅覚ではなく味覚がおかしくなったと感じるなど、かなり密接な関係があることから、味覚神経系との関係についても併せて行った。

2. 研究の目的

(1) 自閉症モデルラットの嗅覚中枢神経系の形態学的解析

嗅覚神経系には、嗅球 - 梨状皮質 - 視床背内側部 - 前頭眼窩野中央後部、嗅球 - 扁桃体 - 視床下部 - 前頭眼窩野背外側後部の経路が存在し、さらに梨状皮質から島皮質や海馬など他の領域への投射がある。本研究では成獣ラットの梨状皮質、扁桃体、嗅内皮質における抑制性ニューロンの局在解析を行う。

(2) 嗅覚刺激に対する嗅覚神経系の行動学的・形態学的解析

自閉症モデルラットにおいて嗅覚刺激を与えてどのような反応が見られるかを新生仔および成獣で解析する。生後 10 日の新生仔ラットには視覚・聴覚能力が未発達だが嗅覚能力はすでに獲得し、においをかぎ分けて自分の巣へ移動する性質がある。そのため、他の感覚刺激を排除した試験 (Nest-seeking test) が可能である。成獣ラットには 4 種類の匂い物質を提示し、その後嗅覚神経系における神経細胞の活動についてマーカーを用いて形態学的解析を行う。

(3) 嗅覚神経系と味覚神経系の相互作用解析

味覚と嗅覚の間には大きな相互作用が存在することが知られている。匂い物質が味覚受容器を刺激するという末梢性の現象ではなく、中枢性に増強されたためと考えられているため、自閉症モデルラットの味覚の中枢神経系についても解析を行う。

3. 研究の方法

(1) 自閉症モデルラットの作製

自閉症モデルラットの作製は既報に従った (Narita et al. *Pediatr Res* 2002)。具体的には、妊娠 9、10 日目の Wistar ラットに 5% アラビアゴムに溶解したサリドマイドを 500 mg/kg で投与し、生まれた仔ラットを自閉症モデルラットとした。薬剤ばく露対照群では妊娠ラットに 5% アラビアゴムのみを投与した。

(2) 行動実験

(2-1) Nest-seeking test

生後 10 日のラットを使用した。ケージ (25cm × 30cm × 17.5cm) の対角に直径 10cm のプラスチックシャーレを設置し、それぞれ自分の巣の床じき (すくなくとも 3 日間は交換していないもの) と新しい床じきを入れた。ラットを中央に置き、どちらかのシャーレに到達するまでの時間を計測した。シャーレに頭と前肢が入ったときに到達したと判断した。計測時間は最長 3 分間とした。

(2-2) Openfield test

生後 10 日のラットを使用した。ケージ (25cm × 30cm × 17.5cm) 内における 30 秒間の自由移動を動画撮影し、オープンソースのモーション分析ソフト Kinovea (<https://www.kinovea.org/>) で移動距離を計測した。軌跡追従計測のため、ラットの背にトラッキングマーカーを貼付した。

(3) 匂いばく露

ドラフトチャンバー内に匂いばく露装置を設置した。アクリル真空デシケーターのバルブを全開にし、ポンプで一方向から 5 L/min で空気が流れるようにした。ポンプとデシケーターの間に揮発性匂い物質を入れたフラスコをはさんだ。匂い物質としてはイソアミル酢酸、1,8-シネオール、シトラール、オイゲノールを使用した。生後 50 日のラットをアクリルデシケーターに入れてポンプで空気のみを送り 15 分間環境に慣らし、次に匂い物質入りフラスコを接続して 30 分間匂い物質をばく露した。

(4)免疫組織化学

麻酔後、4%パラホルムアルデヒド (PFA) で灌流固定し、脳を摘出した。4%PFA で一晩浸漬固定し、スクロース溶液に置換後、OCT コンパウンドに包埋して厚さ 50 μm の浮遊凍結切片を作製した。DAB で発色する場合には、3%過酸化水素-メタノール溶液で内在性ペルオキシダーゼの失活を行い、ブロッキングし、1 次抗体を反応させたのち、酵素標識ポリマー法 (ImmPRESS, Vector Laboratories) を行った。二重染色の場合には、二次抗体に Alexa Fluor 標識した抗体を使用し、共焦点レーザー顕微鏡 (FV-1000, Olympus) で観察した。

4. 研究成果

(1)嗅覚中枢神経系の形態学的解析

本モデルラットでは台形体核における抑制性ニューロンの異常が明らかになっている (Iida-Eto, 2017)。そこで、自閉症モデルラットにおける抑制性ニューロンの局在や形態について嗅覚神経系において検討を行った。抑制性ニューロンの分子マーカーとしてパルプアルブミン (PV)、カルビンジン (CB) を用いた。これまでに予備的検討でも自閉症モデルラットの梨状皮質および扁桃体において PV ニューロンの神経突起が少なく細胞数も少ないことを見出してきた。一方、CB ニューロンは梨状皮質および扁桃体での異常は見られなかった。また、匂いの情報処理や海馬と密接な関係がある嗅内皮質についても同様に検討を行ったが、明らかな違いは見出されなかった。

(2)嗅覚刺激に対する行動学的解析

嗅覚刺激を与えてどのような反応が見られるか新生仔ラットを用いて行動学的に解析した。新生仔ラットの発達には、平衡覚、嗅覚、触覚、聴覚、視覚の順に発達する。嗅覚の発達は早く、生後 8 日から嗅覚による帰巣行動が可能となる一方で、聴覚や視覚は未発達である。したがって、他の感覚刺激を排除した試験が可能である。自閉症モデルラットでは自分の巣に到達するまでの時間が短く、正答率が高い傾向があった (有意差なし)。帰巣までの時間に差が見られたことから、基本的な運動能力を知るために体重測定と Openfield test を行ったところ、体重に差はなく、30 秒間における移動距離が自閉症モデルラットでわずかに長い傾向があった (有意差無し)。雌雄差は見られなかった。Openfield test で見られた移動距離の差が帰巣時間に影響を与えている可能性は否定できないが、自閉症モデルラットでは新生仔期において嗅覚に対する感受性が高い傾向が示された。

(3)嗅覚刺激に対する形態学的解析

嗅覚刺激を与えてどのような反応が見られるか成獣ラットを用いて形態学的に解析した。匂いばく露装置にて 30 分間匂いを提示し、その直後に灌流固定して脳の浮遊切片を作成し神経活動マーカーである c-fos で免疫組織化学を行った。自閉症モデルラットおよびコントロールラットの嗅球、扁桃体、梨状皮質において検討を行ったところ、1,8-シネオールをばく露したラットの後梨状皮質において c-fos 陽性細胞の増加が見られた。C-fos 陽性細胞の同定を行うため各種マーカーを用いて免疫蛍光二重染色を行ったところ、NeuN 陽性でありニューロンであることは確認できたが、抑制性ニューロンマーカーである PV、CB で検討したところ PV との二重陽性細胞がわずかに確認することができた。しかし自閉症モデルラットとコントロールでの差は見出されなかった。

(4)嗅覚神経系と味覚神経系の相互作用解析

延髄の孤束核は顔面神経、舌咽神経、迷走神経に含まれる味覚線維の終止核であり、味覚の神経路において重要な神経核である。また、ノルアドレナリンの神経核 A1~A7 のうち A2 が孤束核にあたる。本研究ではノルアドレナリン神経のマーカーであるドーパミン ヒドロキシラーゼ (DBH) に対する抗体を用いて免疫組織化学を行い、自閉症モデルラットにおける孤束核 DBH 陽性細胞の形態や分布について検討を行った。しかしながら、コントロールラットと比較して形態学的な差は見出されなかった。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Michiru Ida-Eto, Takeshi Ohkawara, Masaaki Narita	4. 巻 123
2. 論文標題 Localization of the neuropeptide manserin in rat dorsal root ganglia: Involvement in nociceptive function	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Acta Histochemica	6. 最初と最後の頁 151812
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.acthis.2021.151812	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 江藤みちる、大河原剛、成田正明
2. 発表標題 胎生期サリドマイドばく露ラットの新生仔期における嗅覚行動異常
3. 学会等名 第60回日本先天異常学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 江藤みちる、次山ルシラ絵美子、大河原剛、成田正明
2. 発表標題 自閉症の嗅覚神経系の異常：胎生期サリドマイド投与モデルラットを用いた解析
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会
4. 発表年 2020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
---------	---------