

特集 社会性にかかわる脳機能の異常と環境因子との関連

動物と人間の社会性行動発達とその神経基盤

中村 俊¹⁾, 狩野 源太¹⁾, 妹尾 綾¹⁾, 三村 喬生¹⁾, 白川 由佳¹⁾, 山崎 和行¹⁾, 福嶋 勇太¹⁾,
小原 早綾¹⁾, 関原 仁美¹⁾, 小澤 晋平¹⁾, 油井 邦雄²⁾, 小柴 満美子¹⁾

社会的コミュニケーション行動の神経基盤を解明するために、コミュニケーション場面の動画像から行動学的パラメータを抽出し、多変量解析によって情動の状態を判別するための統計科学的方法を開発した (Bouquet 法)。この方法を用いて、個別飼育あるいは集団飼育を行ったモデル動物 (家禽ヒヨコおよび小型霊長類コモンマーマセツ) の行動発達を解析し、他個体に対する親和的行動は、高感受性期における他個体との社会的相互作用を通じて発達する可能性が示された。家禽モデルの神経基盤解析では、扁桃体垂核の細胞構築、中脳辺縁系領域の脳容積 (MRI)、側坐核におけるトリプトファン水酸化酵素などの遺伝子発現パターンに群間の差異が認められた。個別飼育を行った個体でも、SSRI/SNRI あるいはユビキノール (還元型 CoQ10) を摂取し、感受性期以後に社会的相互作用を体験した場合には、行動の改善が認められた。さらに、発達臨床の場面に、Bouquet 法を適用し、アスペルガー障害児の社会的コミュニケーション行動の質を判別することが可能であった。

<索引用語：社会親和性行動，環境制御，生体リズム，行動解析，ユビキノール>

はじめに

自閉症スペクトラム障害 (autism spectrum disorder: ASD) は、社会的コミュニケーションの困難さと常同的行動/限局した興味を特徴とする発達の障害で、この 20 年間に診断件数が 25 倍、2005 年では 1% に達している²⁾。この増加はいくつかの理由が考えられる。すなわち、ASD の病態が幅のあるスペクトルとしてとらえられるようになったこと、ASD が医療・教育関係者の間で広く認知され、受診者が増えていること、成人も含め、アスペルガー症候群、非定型 ASD、軽度の ASD など、autism spectrum condition と呼ぶべき状態も ASD という診断に含まれていることなどが挙げられる。さらに、子どもをとりまく、近年のさまざまな発達環境は、遺伝学的に ASD のリスク因子をかかえている者が、発症しやすい

ものとなっている可能性、また環境汚染などによる胎児期のエピジェネティックな変化という形で、遺伝的リスク因子自体が増えている可能性も考えられる。日本では早産、低体重 (出生体重 2,500 g 未満) で生まれる子どもは 1 割に達しているが、とくに極・超低体重児 (1,000 g~1,500 g, 1,000 g 未満) は 0.8% いて、その 3~5 割が発達障害にいたるとする試算もある⁹⁾。胎児は、25 週までに寝返り、四つ這い、下肢キック・支持、手指をしゃぶる、あくび、笑顔などの行動を発現し、誕生までに運動感覚をさらに発達させている。したがって、安静管理が絶対に必要とされている。胎生 24 週以前に生まれた子どもの体外環境は人類が経験したことのないものである。

胚発生から誕生、その後思春期にいたる発達の各ステージで環境とかわりながら身体機能、神

著者所属：1) 東京農工大学大学院工学研究院

2) 芦屋大学臨床教育学部

経系が質的な成長をとげる。遺伝子と環境のかかわりにおけるどのようなつまづきが、ASDの病態を生み出すのだろうか？ ASDを、ヒトであれば誰もが発達させる共感性 (empathizing) とシステム性 (systemizing) 機能の特異的な表現型であるとして²⁾、その神経基盤はいかなるものであろうか？ この問いに答えることができれば、ASDの病態をよりよく理解すること、早期に的確に診断し、個性にあった療育的なかわりをより工夫することができるようになり、彼らが生きやすい社会環境を整える力になる。その社会はどの子どもにとっても生きやすい環境であると期待される。

I. 動物モデル

ヒトとそれ以外の動物では、脳は異なった進化をとげている。そのため、発達障害や精神疾患の動物モデルには当然限界がある。それでも疾患の中間表現型に着目すれば、動物モデルによる研究から有用な知見が得られる¹⁴⁾。中間表現型として脳画像^{13,7)}、遺伝子型・遺伝子発現パターン (SNP, CNV, microRNA など)⁸⁾、および行動 (行動薬理学を含む) が主要なものである。幸い社会的コミュニケーションは、非言語コミュニケーションまで拡張すれば、ヒト以外の動物にも普遍的な行動である¹⁰⁾。そこで我々は、ヒトと同様に昼行性で、可聴域も似ている音声コミュニケーションが豊富な鳥類 (家禽ヒヨコ *gallus gallus domesticus*) および小型霊長類コモンマーモセット (*Callithrix jacchus*) をモデルに社会親和性行動発達に関する研究を行った。まず、家禽ヒヨコの研究結果を述べ、ついで、コモンマーモセットについて述べる。

1. 家禽ヒヨコ

1) 主成分分析による行動解析

鳥類の社会親和性行動の研究では、動物行動学者ローレンツ (1973年ノーベル賞) の「刷り込み学習」がよく知られている。孵化したハイイロガンの雛は、目にした生物になつき、成体になつ

てもそのあとを追う。この行動は、カメラのシャッターをきって撮影するように、一瞬目にした対象に、長くなつくようになるため、刷り込み (imprinting) 学習と呼ばれた。家禽のヒヨコにも同様な刷り込み学習機構が備わっている^{4,11)}。ヒヨコは刷り込み以外に、predispositionと呼ばれるほとんど先天的な仕組みにより同種の個体になつく⁴⁾。我々が見出した社会性学習は、孵化後5日位から9日位までの間 (高感受性期) に獲得される同種同年齢個体に対する親和性行動である。数羽の個体とともに群飼育された個体は、群れから離され、となりのケージに入れられると、群れのいる側に向かって行き、仕切りに沿って行き来する。一方、個別飼育された個体は、同様な他個体との対面場面で、すくむ、あるいは逃避するという行動を見せる。我々は社会的環境によって発達が異なる、この親和的社会性行動に着目し、神経基盤の解明に取り組んでいる。社会性行動が親和的であるとか、逃避的であるとか、定性的な議論をしていたのでは研究がすまない。そこで、客観的な行動指標を得るために、対面場面をビデオ撮影し、テストケージに座標系を定め、個体の頭部、嘴の位置を2次元座標の値として表示した。1秒ごとの座標値から、移動速度、視野の向き、頭部の回転速度、他個体との距離などを計算でもとめ、さらに、鳴き声についてはソノグラフの解析¹²⁾から、特定の声 (call) の頻度を算出した。このようにして、2分間の対面場面の一個体の行動が、算出したパラメータを要素 (m個) とするm次元ベクトルの時系列情報として表現される。群飼育の個体 (n=6)、個別飼育の個体 (n=6) を孵化後14日目 (P14) で行動テストし、個体数分のベクトルが得られたところで、ベクトルを主成分分析し、特徴空間上のベクトルに変換する。主成分分析は、ベクトルの分散が最大となる主成分ベクトルを設定し、吸収しきれない分散量を順次、直交基底ベクトルを構成することで、全分散量を吸収した主成分を算出する。通常、分散量を最大に表現している軸と、2番目の軸で構成した特徴平面に、ベクトルをプロットする。個

体の発達 (P 3, P 7) をおいて、同様な解析を行い、発達日齢を縦軸とする 3 次元特徴空間にデータをプロットすると、群ごとの発達曲線が得られる。孵化後 P 14 では、群間の行動は、有意に異なっているが、P 7 では、行動が似通っているように見える。別の一連の実験から、P 5 から P 9 の間に、発達の社会的環境にたいする高感受性期があることが明らかにされている。P 3 でも、刷り込み学習により、群間の行動学的差異が存在しているが、P 7 では行動要素 (移動速度、他個体に対する社会的注視など) の組み換えが起り、より安定した社会性行動パターンが確立される時期 (感受性期) であると考えられる。

2) 神経基盤

社会的環境による行動発達の神経基盤を明らかにするために、3 つのラインで研究を進めた。1 つは、社会性行動を制御する神経ネットワークの発達について扁桃体の細胞構築の変化を解析した。その結果、中心亜核におけるニッスル染色される細胞の径が 20~30 μm と比較的大きめの細胞集団の数が、群飼育において有意に多かった。扁桃体の中心体からは、中脳水道灰白質の逃避・すくみなどの行動制御核に興奮性の出力が送られる。一方、基底外側核からは、側坐核への出力があることが知られている。中心亜核の機能、細胞径の相違がもつ機能的意味の解析は今後の課題である。第二に、MRI による脳容積の計測を行った。2 T 小形動物用永久磁石 MRI を用い、同一個体の発達をおいて側坐核を含む矢状断面の高さを指標に脳容積を計測した。その結果、個別飼育個体では、P 8 で、有意に減少していることが観察され、P 16 では、差異はなかった。最後に遺伝子発現を解析した。脳の正中領域、すなわち、内側前頭野、前帯状回、視床下部、扁桃体、中脳内側を含む領域の遺伝子発現パターンを DNA マクロアレイで解析した。その結果、セロトニン合成の律速酵素であるトリプトファン水酸化酵素 (TPH) の遺伝子などを含む数百の遺伝子の発現が、P 2 から群間で異なっており、定量 PCR でも脳型の TPH 2 遺伝子の発現が P 5 において群

飼育で有意に高かった。このように、飼育の社会的環境により、細胞構築、脳容積、遺伝子発現に変化が生じることが明らかにされた。

3) 行動薬理的解析とあらたな療育法の開発

以上のようなヒヨコの行動学的特徴が、ASD の中間表現型としてどのような意味をもっているかを明らかにするために、ASD においても社会的適応を改善するとされている選択的セロトニン再取り込み阻害薬 (SSRI; パロキセチン, 0.4~3 mg/kgwt) あるいはセロトニン・ノルアドレナリン再取り込み阻害薬 (SNRI; ミルナシプラン, 5~25 mg/kgwt) をヒヨコに投与し、行動を改善するかについて検討を行った。個別飼育個体に対し、投薬は高感受性期から始め、感受性期終了後、P 12~14 に社会性行動のトレーニング (1 日 10 分間、他個体と一緒に餌を食べる) を行ったところ、どちらの投薬でも、群飼育個体の行動パターンに近づいた。大切な点は、投薬のみでも、行動トレーニングのみでも行動は改善しないことである。診断がつかない段階で、しかも幼児に副作用のある向精神薬を用いることはできない。そこで、栄養補助食品であるユビキノール (還元型 CoQ 10) を餌にまぶして摂取させ、同様に感受性期以後に、行動トレーニングを行ったところ、行動の改善が認められた (図 1)。還元型 CoQ 10 は、ミトコンドリアの補酵素であり、エネルギー生産を高める一方、膜結合型の抗酸化作用があり、酸化ストレスに対する神経保護作用が知られている。作用機構解明は今後の課題だが、診断がつかない段階でも摂取でき、他の療育と組み合わせることで社会親和性行動を改善する可能性が示された。

2. 小形霊長類マーモセット

コモンマーモセットは、biological motion の認識⁹⁾、音声など豊富な社会的コミュニケーション行動、家族の絆が強く父親も育児に参加すること¹³⁾、利他的行動を行うこと⁶⁾などが知られている。さらに、トランスジェニック技術が開発され¹⁵⁾、霊長類でありながら、社会的コミュニケー

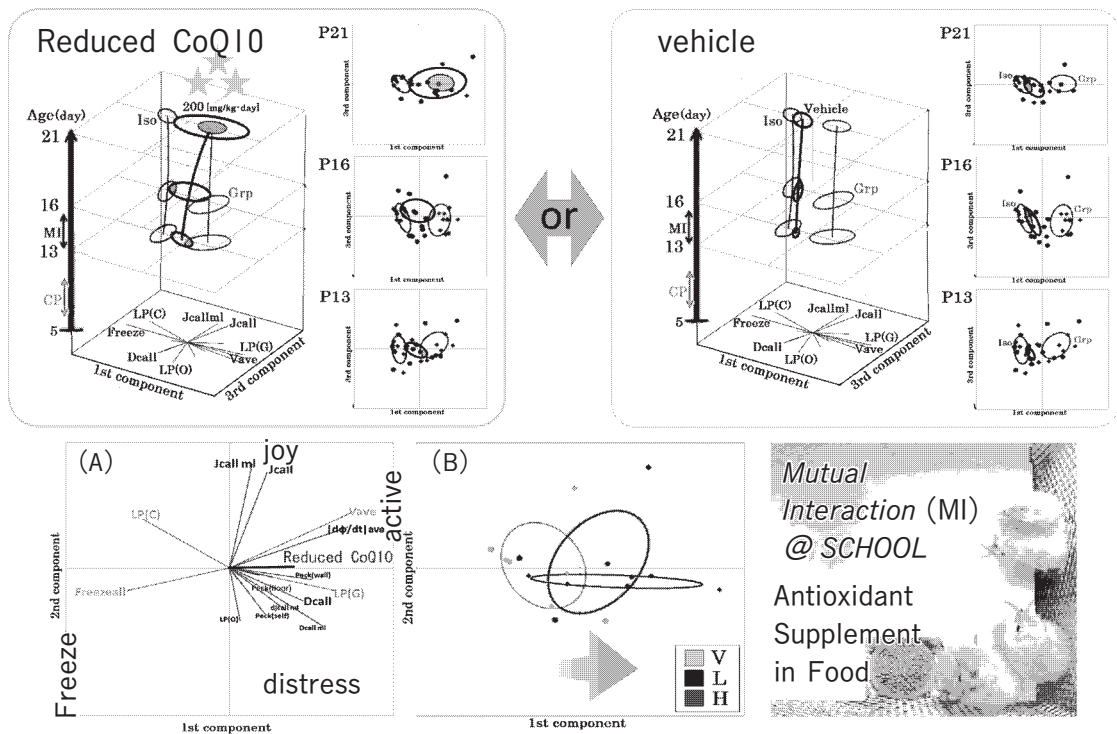


図1 社会的コミュニケーション行動障害に対するユビキノール（還元型 CoQ 10）の改善効果

還元型 CoQ 10 を摂取した個体は、個別飼育個体 (Iso) に比べ、生後 21 日 (P 21) における行動が有意に群飼育個体の行動に近くなっていた。上段の左パネルで、CP は臨界期 (高感受性期 critical period)、MI は社会的相互作用を体験した時期 (P 13~15) を示す。MI の概要は、下段右パネルに示した。主成分分析で得られた特徴平面上での 3 群の分散楕円を左パネル右側に示した。一方、還元型 CoQ 10 を溶かした食用コーンオイルのみ (vehicle) では、このような行動変化は生じなかった。主成分分析で得られた特徴平面は、行動パラメータの因子負荷量ベクトルによって情動の解釈が可能になる (下段 A)。また、還元型 CoQ 10 を高濃度 (1,200 mg/kgwt) で摂取した個体と、低濃度 (200 mg/kgwt) 摂取では、行動パターンに差異が生じた (下段 B)。

シオンにかかわる神経回路発達を遺伝子レベルで解析できる。また、年 2 回、毎回 2~3 頭の幼獣が生まれ、ほぼ 1 年で繁殖可能となる点も動物モデルとしてのメリットが高い。家禽ヒヨコの同年齢間コミュニケーションの発達研究と並行して、マーモセットにおいても、乳幼児期からの同年齢間コミュニケーション行動の発達を目標に、研究を行った。マーモセットのつがいとその仔は、家族ごとに異なるケージで飼育されていて、親の異なる子ども同士を、実験のために、10 分間程度身体接触させた後で、親のいるケージに戻すと、異なる家族のにおいのためか、子どもが親から攻撃を受け、死にいたる場合もある。そのため、人

工保育した個体同士を定期的に社会接触させ (餌や遊具のある遊び場用のケージで 10 分間程度、ともに過ごす)、社会的コミュニケーション行動の発達を解析した。対照として、生みの親が育てた個体も、行動テストした。通常、1 ペアから 2 頭が生まれ、両親が交代でおぶって養育するが、1 頭の場合もある。そこで、2 頭の場合と 1 頭で育った場合の行動発達も比較した。家禽ヒヨコの場合と同様の行動パラメータを抽出し、主成分分析を行うと、2 頭で育った個体の行動発達は、3 次元の特徴空間上で、生後 100 日 (P 100) 位に屈曲点をもつ曲線で近似することができた。これに対し、“ひとりっこ” の場合は、P 90~120 に

かけ、この曲線から大きく乖離する行動が現れた。一方、人工保育した個体の行動は、P 40~70 にかけて、乖離した。“ひとりっこ”の行動が、兄弟姉妹がいる場合と異なることから、マーモセットの子どもは全てを親から学ぶのではなく、子ども同士でも学んでいることがわかる。人工保育仔は、対面場面において多動（他個体への接近速度、首を回す速度、垂直方向への移動速度などが速いなど）で、親和性を表現する call を頻発するなどの特徴がある。

人工保育仔は1頭で飼育されているため、複数個体いる場合には困難な24時間の行動観察を行うことができる。夜間での活動も記録するために、赤外線熱画像カメラを用い、in house のソフトを共同開発して、24時間、通年の観察を試みた。赤外線熱画像カメラは、生体の表面温度も同時に計測できる。誕生1週間後から継続的に計測を行うと、12時間の明暗照明のもとでは、だいたいP 25位から夜間の活動量が減り、サーカディアンリズムが形成される。体温のリズムもほぼ同じ時期に昼夜の2交代になる。ASDの発症過程において、睡眠-覚醒リズムの形成障害、筋緊張の消失をREM期に限局させる仕組み（抗重力筋の発達の1ステップ）の不全などが報告されているため¹⁶⁾、夜間の活動や、体表面温度のリズムなどを発達の初期から、長期にわたり観察することは情動・認知発達の評価のために重要な意味があると思われる。我々は、さらに、社会的接触の効果について検討を行った。すなわち、P 40頃から定期的に社会的接触を体験させると、体験した直後、あるいは、3~5日後に夜間の活動が不規則に起こり、早朝の体温が上昇するという生体リズムの変化が生じた。社会的接触を体験した個体とそのような体験を持たなかった個体の行動発達を、上記と同様な方法で比較解析すると、P 40~160（P 200までの個体も含む）に社会的接触を体験した個体群では、P 160~280（P 200~230の個体も含む）に体験した個体に比べ、対面場面において、多動で警戒的な鳴き声を頻発し、後者は、すくみがちであっ

た。この差異は、P 280頃でも保たれていたため、マーモセットにおいても、社会的環境による行動発達への影響には感受性期があることが示唆された。社会性環境以外に、照明環境が社会性行動に与える影響についても研究を行っていて、誕生後から常時明環境に100日以上継続して置かれた個体は、対面場面では、多動で警戒的な行動をとることを報告している¹⁷⁾。以上のように、誕生から成体に達するまでの環境を制御することによる社会的コミュニケーション発達をモデル化できたため、今後、発達のバイオマーカーの探索、さらにエピジェネティカルな研究の発展が期待される。

II. 発達臨床における行動・生理学的解析 ——アスペルガー症候群の行動特性の判別——

以上のように、対面場面における行動の動画像から多変量解析によって行動の特徴を抽出し、発達の質を判別する方法の有効性が示されたので、これを Bouquet 法 (Behavior output analysis for quantification of emotional state translation)¹²⁾、と名付け、発達臨床におけるアスペルガー症候群の児童の行動特性を定量評価することを試みた。Bouquet 法の特徴は、血中分子の動態、ADI-R (autism diagnostic interview-revised) などの診断スコア、異常行動チェックリスト日本語版 (ABC-J)、social responsiveness scale (SRS) などの離散値をもつスコアも標準化して解析に加えられる点である。また、ただ漫然と観察しているのではなく、対面場面で情動変化を引き出すための社会的文脈づくりも重要であり、介入的観察を意識した場面設定を行った。すなわち、スタートでは診察室の区切られた一角で机にむかってTVゲームをしているが、順次交代で、見知らぬ成人女性、見知らぬ成人男性、主治医、最後に母親が仕切りのドアをあけて廊下側から入ってくる。また、女性と主治医は、定型的な質問を行うが、見知らぬ男性はぶっきらぼうに振る舞い、TVゲームのスキルをけなしたり (negative emotion)、ほめたりする (positive emotion)。この時の生体情報の変化をビデオカ

メラ動画像, 赤外線熱画像, 脳波などを用いて計測した。今回の臨床研究は, アスペルガー症候群と診断された6~15歳の男子5名, 女子2名, およびこれらの症例の同胞健常者で7~15歳の男子2名, 女子4名を対象にした。まず, ビデオカメラの動画像解析から行動パラメータを抽出し, 多変量解析を行って群間のパラメータの相関構造(因子負荷量の解析および群内のデータ分散の楕円近似)を比較したところ, アスペルガー症候群の児童は, 対面場面間で, ほとんど相関構造が変化しなかったのに対し, その兄弟姉妹では, 場面ごとに対応を変化させており, 特に, 見知らぬ男性に対する応答が有意に異なっていた。今後, 赤外線熱画像による頭部, 顔面表面温度, 脳波などの生理学的パラメータの相関構造についても解析を行い, ASDのスクリーニング, 診断の支援ツールとして有用な技術に仕上げていきたい。疾患特異性, 誤差精度を担保することに加え, 同一の個人を縦断的に観察し, 発達の個人的特徴に則した判別, それにもとづく個別適格的な支援法の開発が目標である。

謝 辞

モデル動物の研究において, 東京農工大学「動物実験小委員会」に研究計画を申請し承認を得ており, 同規則を遵守した。人間の研究については, 東京農工大学「ヒトを対象とする研究に関する倫理委員会」の承認を得ており, 同規則を遵守している。国際的には, アメリカNIHのClinicalTrials.govに臨床研究プロトコルを登録済みである(NLM_DES S0002LCR)。リアルタイムPCRに関しては, 児玉亨先生, 田中進先生にご指導いただき, 深謝いたします。この研究は, 新学術領域研究課題提案型, JST先端的低炭素化技術開発事業の助成を得て行われた。

文 献

- 1) Amaral, D.G., Schumann, C.M., Nordahl, C.W.: Neuroanatomy of autism. *Trends Neurosci*, 31 (3); 137-145, 2008
- 2) Baron-Cohen, K.: *Autism and Asperger Syndrome*. Oxford University Press, New York, 2008
- 3) Blakemore, S.J.: Development of the social brain during adolescence. *J Exp Psychol (Hove)*, 61

(1); 40-49, 2008

4) Bolhuis, J.: Development of perceptual mechanisms in birds: predispositions and imprinting. Chapter 13. *The Development of Animal Behavior: A Reader* (ed. by Bolhuis, J.J., Hogan, J.A.). Blackwell, Oxford 1999

5) Brown, J., G. Kaplan, G., Rogers, L.J., et al.: Perception of biological motion in common marmosets (*Callithrix jacchus*): by females only. *Anim Cogn*, 13 (3); 555-564, 2010

6) Burkart, J.M., Fehr, E., Efferson, C., et al.: Other-regarding preferences in a non-human primate: common marmosets provision food altruistically. *PNAS*, 104; 19762-19766, 2007

7) Domschke, K., Dannlowski, U.: Imaging genetics of anxiety disorders. *Neuroimage*, 53 (3); 822-831, 2010

8) Ebstein, R.P., Israel, S., Chew, S.H., et al.: Genetics of human social behavior. *Neuron*, 65 (6); 831-844, 2010

9) 木原秀樹, 中野尚子: 早産・低出生体重児のより良い発達を支援するために。ベビーサイエンス, vol.9, 2009

10) Hinde, R.A.: *Non-verbal Communication*. Cambridge University Press, London, 1972

11) Horn, G.: Pathways of the past: the imprint of memory. *Nat Rev Neurosci*, 5; 109-121, 2004

12) Koshiba, M., Mimura, K., Sugiura, Y., et al.: Reading marmoset behavior 'semantics' under particular social context by multi-parameters correlation analysis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 35 (6); 1499-1504, 2011

13) Kozorovitskiy, Y., Hughes, M., Lee, K., et al.: Fatherhood affects dendritic spines and vasopressin V1a receptors in the primate prefrontal cortex. *Nat Neurosci*, 9; 1094-1095, 2006

14) LaPortea, J. L., Ren-Patterson, R. F., Murphy, D. L., et al.: Refining psychiatric genetics: from 'mouse psychiatry' to understanding complex human disorders. *Behav Pharmacol*, 19 (5-6); 377-384, 2008

15) Sasaki, E., Suemizu, H., Shimada, A., et al.: Generation of transgenic non-human primates with germline transmission. *Nature*, 459 (7246); 523-527, 2009

16) 瀬川昌也, 社会技術研究システム・公募型プログラム 研究領域「脳科学と教育」研究課題「神経回路の発達からみた育児と教育の臨海齢の研究」平成14年1月～平成16年12月, 研究代表者 瀬川昌也 (瀬川小児神経学クリニック院長), 2005

17) Senoo, A., Okuya, T., Sugiura, Y., et al.: Effects of constant daylight exposure during early development on marmoset psychosocial behavior. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 35 (6) ; 1493-1498, 2011

Development and Neural Basis of Social Behavior

Shun NAKAMURA¹⁾, Genta KARINO¹⁾, Aya SENOO¹⁾, Koki MIMURA¹⁾, Yuka SHIRAKAWA¹⁾,
Kazuyuki YAMAZAKI¹⁾, Yuta FUKUSHIMA¹⁾, Saya OBARA¹⁾, Hitomi SEKIHARA¹⁾,
Shinpei OZAWA¹⁾, Kunio YUI²⁾, Mamiko KOSHIBA¹⁾

1) *Tokyo University of Agriculture and Technology*

2) *Ashiya University*

We have developed a multi variate analysis of social communication behavior which allows for discriminating the emotional state of an agent interacting with other agents (Bouquet method). Domestic chick or common marmoset was reared under socially isolated conditions, later tested for its development of communication behavior with peers by Bouquet, and compared with that of animals reared under grouping conditions. We found the existence of high sensitive period for social interaction, given less experience, developing less affiliated behavior. From chick model, a couple of neuronal difference was observed between two groups, amygdale core central cell size, MRI volumetric measure in mesolimbic area, and gene expression patter including brain type tryptophan hydroxylase in nucleus accumbens. The isolated chick behavior changed better to be socially affiliated by taking SSRI/SNRI or Ubiquinol (the reduced form of CoQ10) together with social interaction experience after the sensitive period. Finally, we could discriminate the behavior of Asperger syndrome children (n=7) from that of the typically developed siblings (n=6) during the clinical interview by applying Bouquet method.

<Authors' abstract>
