

非侵襲MR測定を用いた化学物質のヒト発達障害への 影響評価法の提案と妥当性の検討に関する研究

Investigation on validity of the proposed evaluation method
on the effects of chemical substances to developmental disorders
using non-invasive MR measurements

平成27～29年度
FY2015～2017

NIES



国立研究開発法人 国立環境研究所

NATIONAL INSTITUTE FOR ENVIRONMENTAL STUDIES

<http://www.nies.go.jp/>

国立環境研究所研究プロジェクト報告 第134号

NIES Research Project Report, No.134

SR-134-2019

非侵襲MR測定を用いた化学物質のヒト発達障害への 影響評価法の提案と妥当性の検討に関する研究

Investigation on validity of the proposed evaluation method
on the effects of chemical substances to developmental disorders
using non-invasive MR measurements

平成27～29年度
FY2015～2017

所内公募型提案研究「非侵襲 MR 測定を用いた化学物質のヒト発達障害への
影響評価法の提案と妥当性の検討に関する研究」
(期間：平成 27 ～ 29 年度)

課題代表者：渡邊英宏

執 筆 者：渡邊英宏

編 者：渡邊英宏

序

本報告書は、2015～17(平成27～29)年度の3年間にわたって実施した所内公募型提案研究「非侵襲 MR 測定を用いた化学物質のヒト発達障害への影響評価法の提案と妥当性の検討に関する研究」(研究代表者：渡邊英宏)の研究成果をとりまとめたものです。

本研究で対象としました発達障害は、その増加が社会問題の一つとなっています。この原因として、遺伝的な要因の他に化学物質などの環境要因も疑われています。そこで、化学物質曝露後の動物行動試験によって評価が行われています。この評価方法は、曝露された化学物質による動物の行動異常を議論することができる一方で、発達障害に関するヒト脳との差や、得られた結果をヒト脳に外挿する点に課題が残ります。本研究では、この点に着目し、発達障害に関するヒト脳への影響評価に近づく手法の開発を目指して研究が行われました。

このために、ヒト用 MR 装置を利用したヒト脳の非侵襲的な測定から、発達障害に関する健康影響指標を探索することを大きな目標として、本研究は進められました。従来用いていたヒト全脳を灰白質、白質、脳脊髄液に分類し、それぞれの領域の体積を算出できる技術を開発させました。この結果、各部位内を3領域に分類する技術、例えば前頭葉領域に存在する上前頭回を3領域に分解する技術を開発することができました。この技術を用いて、健常人ベースラインデータと、少数に留まっていますが自閉症スペクトラム障害(ASD)患者データとの比較を試み、白質体積の減少が前頭葉領域、紡錘状回で生じていることが示唆されました。これに加えて、指標候補として考えられる、神経細胞に存在する N-アセチルアスパラギン酸をはじめとしたヒト脳内代謝物の濃度測定法を開発することができました。ASD 小動物モデルに関しては、遺伝子改変、薬物投与の両ラットモデルの行動試験による評価を行い、動物用 MR 装置によるラット脳解析を進めています。薬物投与モデルに関しては、バルプロ酸投与モデルが作製できるようになり、行動試験の他に化学分析を行いました。この結果、ASD との関連が指摘されている遺伝子のニューロギリン発現の減少などが認められています。今後、ヒト、動物、それぞれの側からのアプローチで、類似の応答をする共通の指標を見出すことを大きな目標として、研究を一層進めたいと思います。

本研究を進めるにあたり、研究所内外の多くの方々にご協力とご支援をいただきました。ここに深く感謝いたします。

令和2年3月

国立研究開発法人 国立環境研究所

理事長 渡 辺 知 保

目 次

1	研究の概要	1
1.1	研究全体の目的、目標、構成等	1
1.2	研究の概要	2
2	研究の成果	3
2.1	サブテーマ1「ヒト発達障害に関するヒト MR 指標の探索」	3
2.1.1	目的と経緯	3
2.1.2	方法	5
2.1.2.1	白質体積解析法の開発とヒト脳画像の解析	5
2.1.2.1.1	ヒト全脳画像データのための MRI データ取得法	5
2.1.2.1.2	画像不均一性補正	6
2.1.2.1.3	ヒト脳部位解析法の導入	6
2.1.2.1.4	集積ソフトウェアの開発	8
2.1.2.1.5	統計解析法の検討と開発	9
2.1.2.1.6	ヒト脳画像データの解析	11
2.1.2.2	^1H スペクトロスコピー法を用いた代謝物濃度定量法の開発とヒト脳代謝物解析	11
2.1.2.2.1	ヒト脳内 ^1H スペクトロスコピー測定法	11
2.1.2.2.2	測定プロトコル	11
2.1.2.2.3	後処理法開発	13
2.1.2.2.4	ボランティア測定	14
2.1.3	結果と考察	14
2.1.3.1	白質体積解析法の開発とヒト脳画像の解析	14
2.1.3.2	^1H スペクトロスコピー法を用いた代謝物濃度定量法の開発とヒト脳代謝物解析	15
2.1.4	まとめ	16
2.1.4.1	白質体積解析法の開発とヒト脳画像の解析	16
2.1.4.2	^1H スペクトロスコピー法を用いた代謝物濃度定量法の開発とヒト脳代謝物解析	16
2.2	サブテーマ2「発達障害小動物モデルからの取り組み」	17
2.2.1	目的と経緯	17
2.2.2	方法	17
2.2.2.1	ラット発達障害モデルの作製と評価	17
2.2.2.2	MRI 測定法の開発	19
2.2.2.2.1	ラット脳 MRI 画像データ測定法の開発	19
2.2.2.2.2	分画法の開発	20
2.2.3	結果と考察	21
2.2.3.1	ラット発達障害モデルの評価	21
2.2.3.2	ラット MRI 測定と解析結果	25
2.2.4	まとめ	25
3	まとめと課題	27

【資料】

1	研究の組織と研究課題の構成	31
1.1	研究の組織	31
1.2	研究課題と担当者	31
2	研究成果発表一覧	32
2.1	誌上発表	32
2.2	口頭発表	33

1 研究の概要

1.1 研究全体の目的、目標、構成等

発達障害の増加は社会問題の一つとなっている。この原因として遺伝的要因の他に化学物質などの環境要因の疑いがあり、評価法、対策が急務となっている。この化学物質の発達障害への影響評価法として、曝露後の動物行動試験法が用いられている。この評価法では化学物質曝露という能動的な前進型の試験が可能である反面、発達障害に関するヒト脳との差異やヒト脳への外挿などの点で限界が残り、ヒト脳への影響評価に一層近づく手法が望まれている。この一つの方法として現在、子どもの健康と環境に関する全国調査（エコチル調査）が進行中であり、年数、労力がかかるものの、幼少期などの血液データと発達障害との疫学調査の成果が待たれるところである。

この一方で、ヒト発達障害の理解も進められ、患者の高次脳機能検査、磁気共鳴（Magnetic Resonance: MR）測定などが行われている。特に、非侵襲という特徴を持つ MR 測定では、脳内代謝物濃度などの客観的な量を測ることができ、非侵襲、定量性、客観性という特徴を有していると言える。課題代表者等は、この MR 測定を用いて、広汎性発達障害（現在、自閉症スペクトラム障害（Autism Spectrum Disorders: ASD）と呼ばれている）患者で、未だ一層の確認が必要であるものの、脳内代謝物と白質が指標候補となり得る可能性を見出してきた。

これらの状況を踏まえて、本研究では、化学物質曝露動物の試験法として、国立環境研究所（以下、環境研）が保有する動物用 MR 装置を利用した MR 測定評価法を提案する。この評価法では動物 MR 測定で、発達障害患者と同様な応答を見出せるかを判定する（図 1）。この方法の妥当性検討のため、本研究では、発達障害様の行動が現れる小動物、すなわちこれまでに報告されている発達障害小動物モデルを用いることを特徴とする。この評価法によって、前進型試験の化学物質曝露動物試験法とヒト発達障害への影響評価のつながりが強化され、エコチル調査に対する有用な情報が得られると考える。

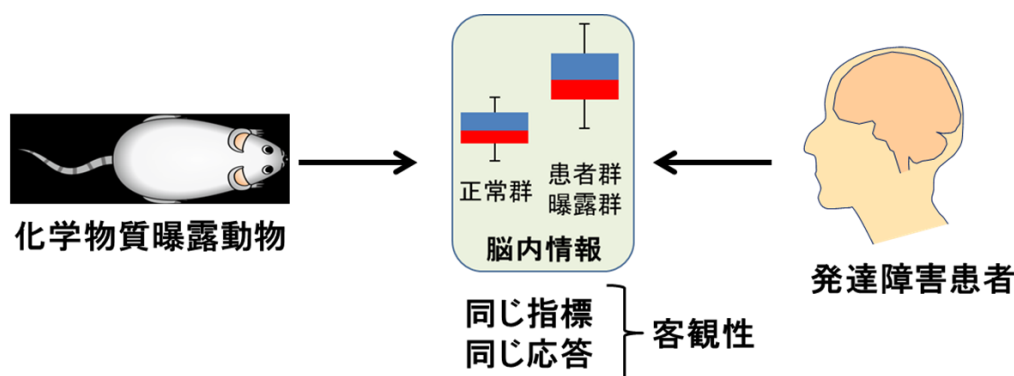


図 1 ヒト測定と化学物質曝露動物との関係。MR 装置を用いることで、ヒト脳内を非侵襲に測定することができる。これを利用して、健常ボランティアと患者ボランティアとの比較を行うことができる。動物用 MR 装置を用いて、化学物質曝露動物の脳内情報も取得することができる。

本研究では、ヒト発達障害への影響評価法として、化学物質曝露動物実験、すなわち能動的な前進型試験をベースとした非侵襲 MR 測定を組み合わせた評価法を提案し、その妥当性を検討することを目的とした。そして、達成目標としては、下記のように考えた。すなわち、提案する評価法の妥当性を、発達障害小動物モデルと発達障害患者とで同じ MR 指標で同様な応答が得られるか否かで検討する。この検討は、ヒト脳との差異を完全に埋めるものではないが、動物モデルで客観性のある MR 指標応答が得られれば、ヒト脳への影響評価に従来法よりも一層近づく期待ができると考える。以上の考えから、次の 2 項目を今回の研究提案の達成目標とする。

- (1) ヒト発達障害に関する非侵襲 MR 測定での指標（ヒト MR 指標と呼ぶこととする）とその応答についての知見を得ること
- (2) 発達障害小動物モデル（ラット）で、ヒト MR 指標と同様な応答をするか否かを見出すこと

これらの目標を達成し目的に到達するため、本研究は、達成目標に対応して、ヒト、小動物の観点から下記2つのサブテーマで構成する。サブテーマ2に関しては、進め易さの観点から2A、2Bの2テーマ体制で推進することとした。

サブテーマ1：ヒト発達障害に関するヒト MR 指標の探索

サブテーマ2：発達障害小動物モデルからの取り組み

2A. MR 測定を用いた探索

2B. 化学分析を用いた探索

この中で、サブテーマ1のヒト発達障害MR指標とその応答に関しては、患者結果と健常人結果との比較検討、測定、解析の高度化を通して研究を進め、目標（1）の達成を目指す。サブテーマ2では、2Aで発達障害ラットモデルなどの非侵襲 MR 測定を行い、指標とその応答の探索を行うこととした。2Bでは、発達障害ラットモデル、マウスモデルの導入と行動試験によるモデルの洗い出しを行い、化学分析などを用いて指標応答を探索することとした。（2Bで洗い出したモデルを2Aで用いることとした。）2A、2Bにより目標（2）の達成を目指した。

1.2 研究の概要

本研究課題「非侵襲 MR 測定を用いた化学物質のヒト発達障害への影響評価法の提案と妥当性の検討に関する研究」では、上述の通り下記の2項目を達成目標とした。

- (1) ヒト発達障害に関する非侵襲 MR 測定での指標（ヒト MR 指標と呼ぶこととする）とその応答についての知見を得ること
- (2) 発達障害小動物モデル（ラット）で、ヒト MR 指標と同様な応答をするか否かを見出すこと

これらの目標を目指して、化学物質のヒト発達障害への影響評価法としての動物 MR 測定法の妥当性評価を目指して、ヒト自閉症スペクトラム障害患者と発達障害小動物モデルの両者の MR 測定から得られる指標が、同様の応答を示すかを検討した。患者での MR 指標候補である白質情報について、ヒト側では患者と健常人データの比較、動物側では小動物モデルを用いて検討した。

2 研究の成果

2.1 サブテーマ1「ヒト発達障害に関するヒトMR指標の探索」

2.1.1 目的と経緯

サブテーマ1では、ヒト発達障害に関する非侵襲MR測定での指標である、ヒトMR指標とその応答についての知見を得ることを目的とした。

この一つとして考えた項目が、ヒト脳内白質情報である。我々はこれまで自閉症スペクトラム障害（ASD）患者ボランティアに関してMRI（Magnetic Resonance Imaging, MR画像化）測定を実施し、健常人ボランティアデータに対して結果を得てきた。その一つが、全脳の分画解析である。ヒト脳は、神経細胞が多く存在する灰白質、軸索などの神経線維が多く存在する白質とその他の脳内領域を満たす脳脊髄液分画の3領域に大きく分類できる。図2には健常人ボランティアから取得したヒト脳画像（a）とこの画像を分画解析した結果（b、c、d）を示し、図3には、年齢と3分画解析結果から求めた体積との関係を示す。これらは、Statistical Parametric Mapping（SPM）¹⁾と呼ばれるソフトウェアを利用した3分画解析結果である。図3では、縦軸は分画体積と全脳体積の比、すなわち分画体積を全脳体積で規格化した値を示している。ASD患者データは少数であるものの、白質対全脳体積比が若干低い値を示している。ASD患者の白質情報に関しては、同じくMR装置で開発されてきた神経索イメージングでも指標になり得る可能性が示唆されている²⁾。そこで、白質変化の部位特性評価について、すなわち若干低値を示した白質体積比についてヒト脳内のどの部位で生じているのかを解析することを目的として研究を行った。これによって今後の医療機関との協力発展に繋がりを見据えた基礎データにしたいと考えた。この内容については、「白質体積解析法の開発とヒト脳画像の解析」にまとめ、全脳画像データ取得、3分画解析を含む方法について記述する。

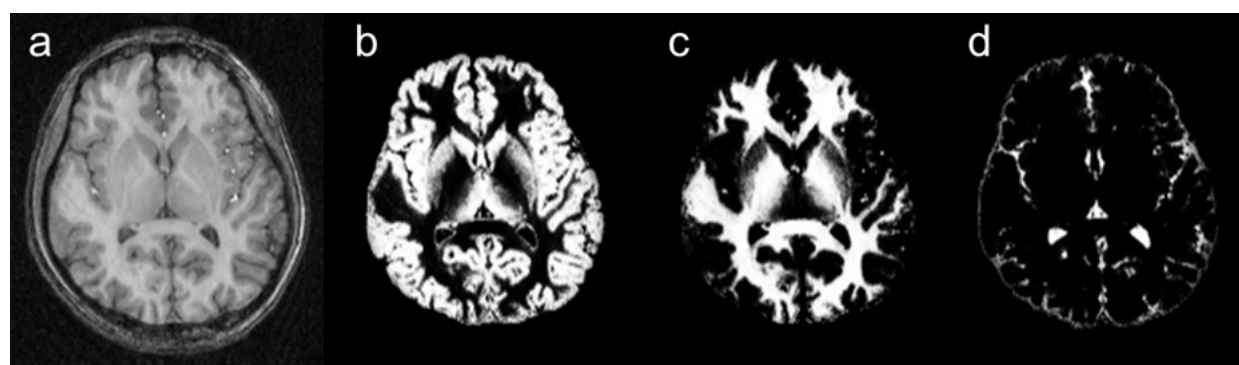


図2 4.7Tで取得したヒト脳T₁強調画像の原画像(a)と3分画画像のtrans axial断面。それぞれ、灰白質(b)、白質(c)、脳脊髄液領域(d)を示す。

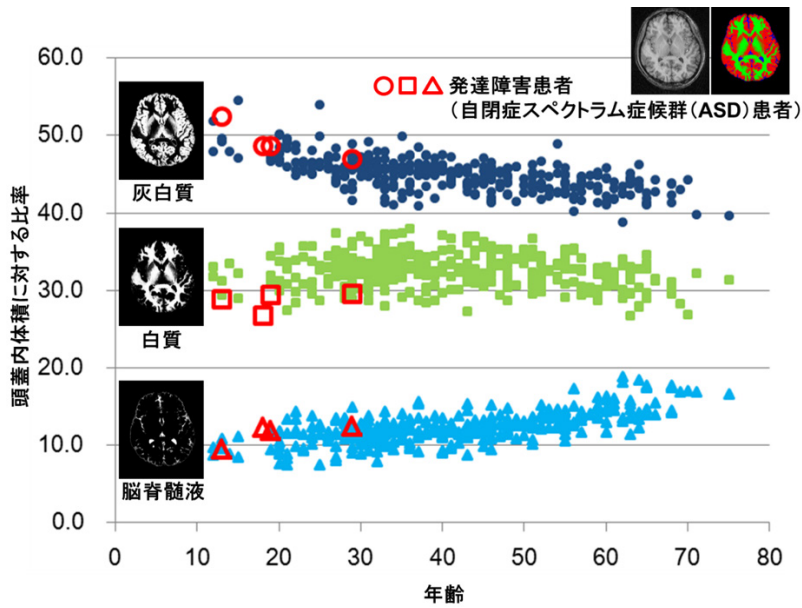


図3 年齢と脳内各分画体積の頭蓋内体積に対する比率を示す。発達障害患者のデータでは、n=4 であるが、白質体積比が若干低値を示した。

もう一つの指標候補が、ヒト脳内の代謝である。脳内での代表的な例が、ブドウ糖、すなわちグルコースから様々なアミノ酸が産生される化学反応であり、これを代謝と呼ぶ。ヒト脳の主要なエネルギー源であるグルコースは、脳内での化学反応によりグルタミン酸 (Glu)、グルタミン (Gln)、 γ -アミノ酪酸 (GABA) などの様々なアミノ酸に代謝される。ヒト脳内では、その他の代謝からも様々なアミノ酸、例えば N-アセチルアスパラギン酸 (NAA)、ミオイノシトール (mI) などが産生される。これらのアミノ酸は、分子内に水素原子核 (^1H) を有し、MR 装置を用いた ^1H スペクトロスコピー (^1H Magnetic Resonance Spectroscopy (MRS)) を用いて測定することが可能であり、それぞれの代謝物濃度を求めることができる。具体的には、ヒト脳内の限定された領域から代謝物内の ^1H ピークを取得することができ、図 4 にヒト脳前頭葉領域から得られた ^1H スペクトルを示す。このピーク面積を図ることで、濃度相当の情報が得られる。ASD 患者に対しては、これまで帯状回領域での代謝物に関する研究が進められてきたが、測定法、解析法に問題があり、十分な情報が得られていない。そこで、本研究では、測定法、代謝物濃度解析法を改良、開発し、ASD 患者データの解析、健常人データの測定、解析を行った。

以下、「白質体積解析法の開発とヒト脳画像の解析」、「 ^1H スペクトロスコピー法を用いた代謝物濃度定量法の開発とヒト脳代謝物解析」の章立てで記載する。

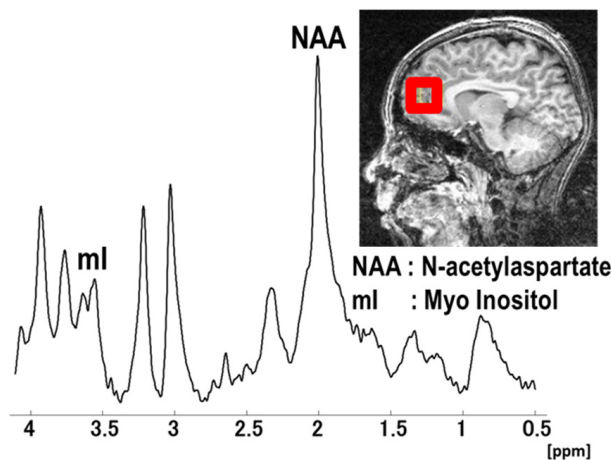


図4 ヒト用 4.7T MR 装置を用いてヒト脳内前頭葉領域から取得した ^1H スペクトル。NAA は、N-アセチルアスパラギン酸、mI はミオイノシトールのピークを示す。

2.1.2 方法

全ての測定、実験は、ヒト全身用 4.7T MR 装置 (Agilent 社製, Inova コンソール) を用いて行った。RF コイルは、体積用 TEM コイルを用いた。脳体積解析には、Linux コンピューター (Cent OS) と Windows コンピューター、スペクトル解析には、Unix コンピューター (Solaris) と Windows コンピューターを用いた。ボランティア測定は、国立環境研究所医学研究倫理審査委員会の承認を受けた(通知番号 2014-1R)。測定内容を説明し、同意を得た被験者に対して、測定を実施した。

2.1.2.1 白質体積解析法の開発とヒト脳画像の解析

白質体積解析法の開発では、上述の通り、白質変化の部位特性評価を目的として開発を行った。この内容としては、大きく分類して、被検者毎の解析法の開発、被検者毎の解析結果 (被検者毎に 100 以上の結果が算出される) の集積ソフトウェア (健常人データ (n=365)、患者データ (n=4)) の開発、統計解析法の検討と開発、そしてこれらのツールを用いて部位特性を評価する。この中で、被検者毎の解析法に関しては、(1) ヒト全脳画像データのための MRI データ取得法、(2) 画像不均一補正、(3) ヒト脳部位解析法の導入で示す。続いて、(4) 集積ソフトウェアの開発、(5) 統計解析法の検討と開発について記載する。

2.1.2.1.1 ヒト全脳画像データのための MRI データ取得法

ヒト全脳画像データ取得には、modified driven equilibrium Fourier transform (MDEFT) シーケンス³⁾を用いた。図 5 に示すこのパルスシーケンスは、 T_1 強調コントラスト付与モジュールとイメージングモジュールとで構成される。最初の T_1 強調コントラスト付与モジュールは、ヒト全脳の組織水 ^1H を励起する領域非選択のラジオ波 (radio frequency, RF) パルス列で構成され、具体的には、 90° パルス - τ - 180° パルス - τ - 90° パルスで構成される。ここで、 90° などの角度は、RF パルスが ^1H 磁化を倒す角度を示し、フリップ角と呼ばれる。このモジュールでは、 ^1H 磁化が 90° パルスによって横磁化となり、磁場不均一性によって τ 時間長の期間にディフェーズする。 90° パルス - 180° パルス列は、通常スピネコー (Spin Echo (SE)) 信号を生成するために利用される。一方、MDEFT シーケンスの T_1 強調コントラストモジュールでは、 90° パルスと 180° パルスの間と、 180° パルスと 90° パルスの間のそれぞれ極性が反転した勾配磁場パルスを印加する特徴を持つ。これによって、横磁化がディフェーズされてスピネコー信号が生成せずに、縦磁化の挙動のみが抽出される。つまり、第 1 の 90° パルスで磁化が 0 となり、続く τ 時間長で縦磁化が回復する。続いて印加される 180° パルスで磁化が反転し、その後の τ 時間長で縦磁化が回復する。このパルスシーケンスでは、第 1 の 90° パルスを印加するため、その直前の磁化大きさに関わらず必ず磁化が 0 となる。このため、縦緩和時間 T_1 に対して、 $(1 - \exp(-\tau/T_1))^2$ の大きさの縦磁化が生成され、 T_1 の長さによって縦磁化の大きさに変化を持たせることができる。これが、MDEFT シーケンスの T_1 強調コントラストモジュールの動きである。

これらで生成された縦磁化に対して、イメージングモジュールとしては、fast low angle shot (FLASH) イメージングモジュールを用いた。このモジュールでは、縦磁化に対して、 3° 程度の浅いフリップ角を用いて観測可能な横磁化を生成してイメージングを行う。具体的には、位相エンコード勾配磁場パルス印加後、読み出し勾配磁場パルスを印加し、これを高速に繰り返す。位相エンコード勾配磁場パルスを位相エンコードマトリックス数回変化させて繰り返すことで、2次元画像に対する生データが取得できる。これを最外殻ループでもう 1 次元の位相エンコードを追加することで、3次元画像に対する生データが取得できる。3次元生データを取得後、フーリエ空間の格子データに並び替えを行い、続く 3次元フーリエ変換により 3次元ヒト脳画像、すなわちヒト全脳画像を取得することができる。

MDEFT シーケンスの測定条件は、ヒト脳灰白質、白質のコントラスト最大化となるように $\tau=2\text{ s}$ とした。FLASH イメージングモジュールでは、1回の T_1 強調コントラストモジュールで 3次元目の位相エンコードを 2回取得する設定、つまり測定時間を 1/2 にすることができる 2セグメントに設定した。FLASH イメージングモジュールでのフリップ角は 3° 、繰り返し時間 TR は 110 ms とした。

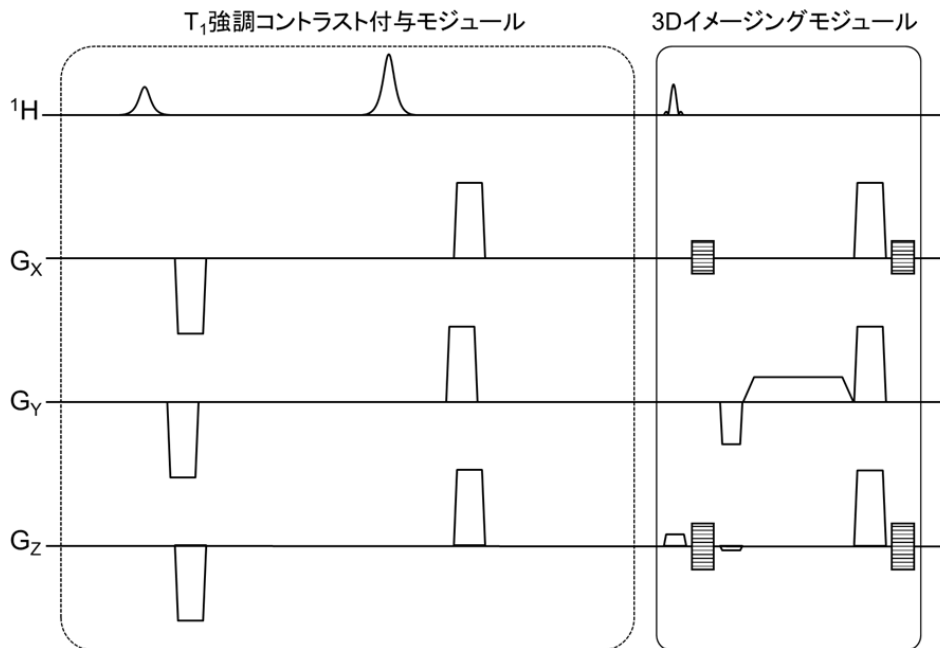


図5 ヒト頭部 3D 画像測定パルスシーケンス。点線内は、 T_1 強調コントラストを付与するためのモジュールで、 T_1 緩和で修飾された縦磁化が生成される。続く 3D イメージングモジュールで、3D 画像測定を行う。

2.1.2.1.2 画像不均一性補正

図6には、MDEFT シーケンスで取得した 4.7T MRI でのヒト脳画像の 1 枚のスライス面を示す。これは、原画像、すなわち、MDEFT シーケンスで得られた 3 次元生データをフーリエ変換のみ行った画像であり、中心領域の信号が高く、周囲領域の信号が低いという 4.7T などの高磁場特有の画像パターンが得られている。MDEFT シーケンスの項での記述のように、生体内部の ^1H 磁化は、ラジオ波パルス、すなわち 200 MHz の高周波磁場パルスで励起される。高周波磁場、すなわち電磁波は生体などの誘電体内では、光速から比誘電率の $1/2$ 乗、比透磁率の $1/2$ 乗分を除算した速度となり、この結果、生体内では波長短縮が生ずる。ヒト脳などの生体内では、被透磁率はおおよそ 1 であるのに対して、比誘電率は 80 程度である。比誘電率が臨床 MRI の磁場強度の 1.5T と環境研での磁場強度の 4.7T で同様に 80 であるとして、ヒト頭の大きさを 16 cm とすると、次のようになる。すなわち、1.5T の場合は、高周波磁場パルスの波長はヒト頭の大きさの 3 倍程度であるのに対して、4.7T の場合は 1 倍程度、すなわち同程度となり、ヒト頭部内で 1 波長がたってしまうこととなる。従って、ヒト脳内で高周波磁場強度の不均一分布が生じ、中心が高く、周囲が低くなる。これが、上述のヒト脳内で見られる画像不均一分布の原因であり、被検体由来のため後処理での均一化補正が必要となる。

今回の研究では、この補正のために、商用ソフトウェアの MATLAB 上で動作する Static Parametric Mapping (SPM) 12 ソフトウェアに搭載されている画像不均一補正ツールを利用した。そして、SPM12 を利用してヒト脳灰白質、白質、脳脊髄液領域の 3 分画解析を行った。この結果得られた画像は、図 2 に示す通りである。

2.1.2.1.3 ヒト脳部位解析法の導入

次に、脳内の部位毎にこの 3 分画を行うため、Parcellation ツールとして広く利用されているヒト脳内部位分類ソフトウェア (FreeSurfer⁴⁾) を Linux に導入し、Linux 環境での立ち上げを行った。そして、上述の通り環境研ヒト用 4.7T MR 装置用に開発してきたヒト脳灰白質、白質、脳脊髄液領域の全脳分画ソフトウェアとの融合ソフトウェアの開発を行った。これによって、ヒト脳内各部位での灰白質、白質、脳脊髄液領域分画が可能となった。この開発のため、最初に、Solaris 環境のヒト用 4.7T MR 装置に対して、再構成による画像算出以降の解析を Linux 環境に整備するなどのパイプラインを構築した。部位分類では、FreeSurfer ツールによって、被験者の全脳画像データ毎に 111 箇所の部位と左

右の部位を合算した 46 箇所の合計 157 箇所に分類される。図 6 には、MRI 画像取得から、全脳分画解析と FreeSurfer を利用した部位分類解析までの概要を示す。これに続いて、図 7 の部位内分画解析を行う。部位分類結果として、図 7 では、前頭葉領域内の三角部での様子を示す。最初に、FreeSurfer の解析結果として算出される各部位のマスク処理データ（図 7 の例では、三角部領域のマスクデータを算出）を求め、これと全脳分画データとの積計算を行うことにより求めた。この処理を FreeSurfer 結果の 157 領域に対して行うプログラムを開発した。

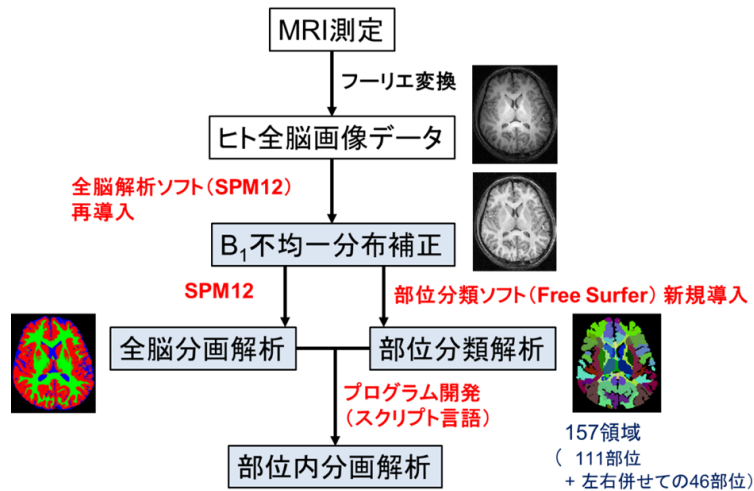
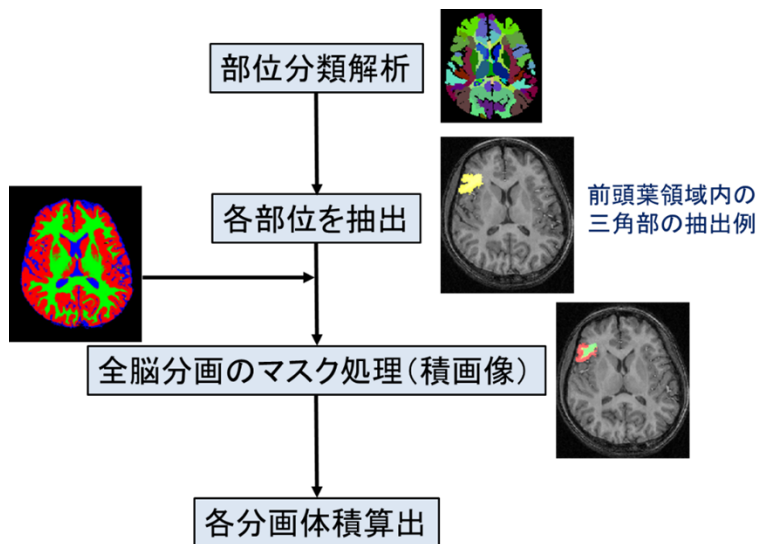


図 6 ヒト脳解析アルゴリズム。MRI 測定後、3D フーリエ変換によりヒト全脳画像データを取得する。B₁ 分布不均一補正後、SPM12 による全脳分画解析と FreeSurfer による部位分類解析を行う。続いて、各部位内の分画解析を行う。部位内分画解析の詳細については、図 7 に示す。



被検者毎に 157 領域 × 3 分画 の体積算出

図 7 ヒト脳内部位解析法のアルゴリズム。前頭葉領域内の三角部での分画アルゴリズムの例を示す。部位分類解析で算出される三角部領域（黄色の領域）のマスク画像を算出し、これと全脳分画画像との積から三角部内の灰白質、白質、脳脊髄液領域の 3 分画画像が算出できる。

2.1.2.1.4 集積ソフトウェアの開発

2.1.2.1.1 から 2.1.2.1.3 までは被検者毎に行う方法について述べた。概要は次の通りである。すなわち、MDEFT シーケンスを用いて被験者の全脳画像データを取得し、SPM12 上で画像不均一補正を行った。続いて、SPM12 上で、灰白質、白質、脳脊髄液領域の 3 分画画像を算出し、FreeSurfer によってヒト脳内の 111 の部位分類を行った。次に、3 分画画像と分類結果の部位とを用いて、ヒト脳内の部位での 3 分画画像を求めた。

被検者毎の解析結果の集積ソフトウェアでは、健常人ボランティア (n=365)、ASD 患者ボランティア (n=4) のデータを扱う。これらの 369 画像のそれぞれが、ヒト脳内の 111 箇所の部位と左右合算した 46 箇所の合計 157 個のデータが算出される。各部位データでは、部位体積 (RegVol)、部位内の灰白質体積 (GM)、白質体積 (WM)、脳脊髄液領域体積 (CSF) を持ち、これに各被験者の頭蓋内体積 (ICVol)、全脳の灰白質体積 (GMsum)、白質体積 (WMsum)、脳脊髄液領域体積 (CSFsum) を加えたデータを各被験者のデータとした。これらを集積するソフトウェアをスクリプト言語で開発した。集積結果の一例を図 8 に示す。

次に、この集積したデータを Windows コンピューターに読み込み、Excel 上でグラフによる可視化ができるようにした。Excel へのデータ取り込みとグラフ化するプログラムは、Visual Basic 言語を用いて開発し、157 個の Excel ファイル (それぞれの部位毎の被検者データが集積) が自動生成できるようにした。データ解析結果の例として、上前頭回、中心前回、上頭頂回、眼窩部、上側頭回、外側後頭回の各部位での灰白質 (GM)、白質 (WM) の年齢依存グラフ、すなわち部位ベースラインデータを示す (図 9)。灰白質、白質に関しては、各部位でのそれぞれの体積の頭蓋内体積に対する比を示す。部位ベースラインデータ出力までのフローを図 10 にまとめた。

name	ICVol	GMsum	WMsum	CSFsum	RegVol	GM	WM	CSF
	1.92284e+06	941807	536202	298569	47120	7.19271e+06	4.40228e+06	383829
	1.97041e+06	1.10841e+06	518936	213261	55950	9.17991e+06	4.17403e+06	811950
	1.86235e+06	971017	503505	276503	53325	8.3725e+06	4.39791e+06	788979
	1.71247e+06	850831	480172	290174	46958	7.5836e+06	3.79273e+06	585208
	1.88499e+06	947512	530247	289407	52242	8.05829e+06	4.05273e+06	1.1748e+06
	1.84151e+06	994764	514488	222719	50123	7.8465e+06	4.04994e+06	826566
	1.84702e+06	942409	513214	302459	55645	8.33098e+06	4.31301e+06	1.48482e+06
	2.13162e+06	1.08197e+06	628189	332757	67626	1.02734e+07	5.93024e+06	1.03189e+06
	2.39471e+06	1.32494e+06	615498	329682	73945	1.1141e+07	5.22393e+06	2.39301e+06
	1.82167e+06	855387	492085	372805	57704	7.02908e+06	4.36402e+06	3.22838e+06
	2.17669e+06	1.06651e+06	537353	428622	54764	9.16446e+06	4.26869e+06	514078
	1.98558e+06	841396	591701	387352	49138	6.53227e+06	5.5848e+06	372548
	2.25651e+06	1.01712e+06	668587	458999	61048	8.09936e+06	5.8093e+06	1.64773e+06
	2.03028e+06	959996	651308	328615	56377	8.13464e+06	5.66339e+06	571265
	2.0496e+06	926381	600996	385103	61062	8.53387e+06	5.70393e+06	1.28639e+06
	2.07852e+06	935454	599400	384253	53392	7.69331e+06	4.90095e+06	912358

図 8 ヒト脳内各部位の集積テキストファイルの例。図 7 で示した各部位分画解析後、頭蓋内外積 (ICVol)、全脳灰白質体積 (GMsum)、全脳白質体積 (WMsum)、脳脊髄液領域体積 (CSFsum)、部位体積 (RegVol)、部位内灰白質体積 (GM)、部位内白質体積 (WM)、部位内脳脊髄液領域体積 (CSF) のそれぞれのデータを出力する。

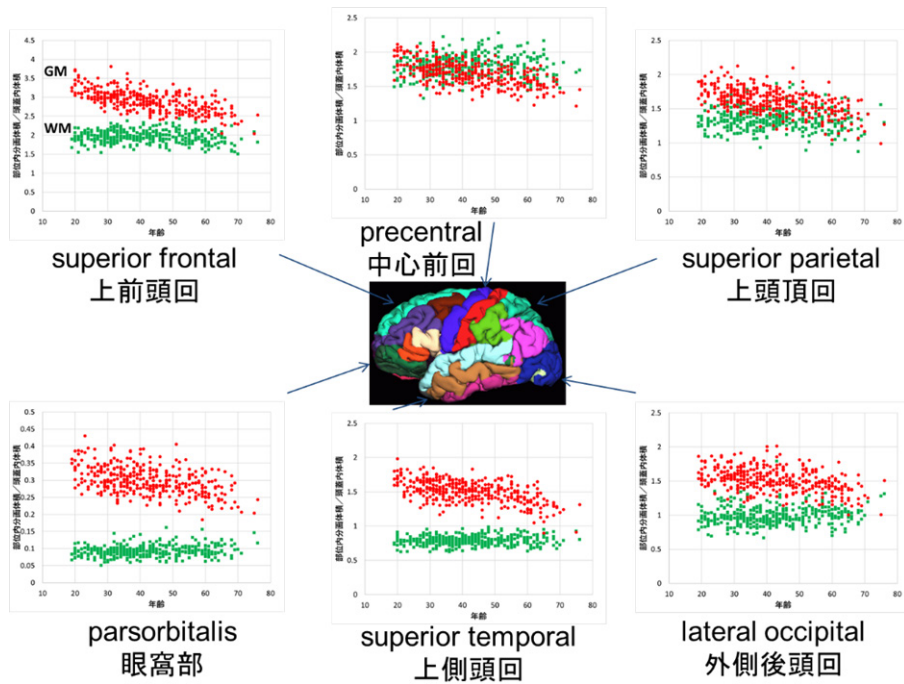


図9 ヒト脳内各部位での6部位からの解析結果を示す。各部位の灰白質体積（赤）、白質体積（緑）の頭蓋内体積に対する比の年齢依存性を示す。



図10 ヒト脳内部位ベースラインデータ出力までのフローを示す。

2.1.2.1.5 統計解析法の検討と開発

被検者毎の解析ツールの開発、集積データ解析ツールの開発により、ヒト脳各部位での灰白質体積、白質体積の年齢依存性が可視化できるようになった。これを用いて健常人ベースラインデータと ASD 患者データの可視化が可能となる。次に、これらを統計的に取り扱うための検討を行った。検討の結果、健常人ベースラインデータに対して近似曲線を算出し、標準誤差と t 分布関数から求められる予測区間 (68%, 95%) を用いるのが良いのではないかと考えた (図 11)。図 12 に示した例では、n = 4 の ASD 患者データ点 (水色の四角) が 65% 予測区間からはずれていることを示している。この解析を全ての脳部位について実施するため、この方法に関しても Excel 内の VBA で開発し、様々な指標に対して評価できるようにした (図 13)。

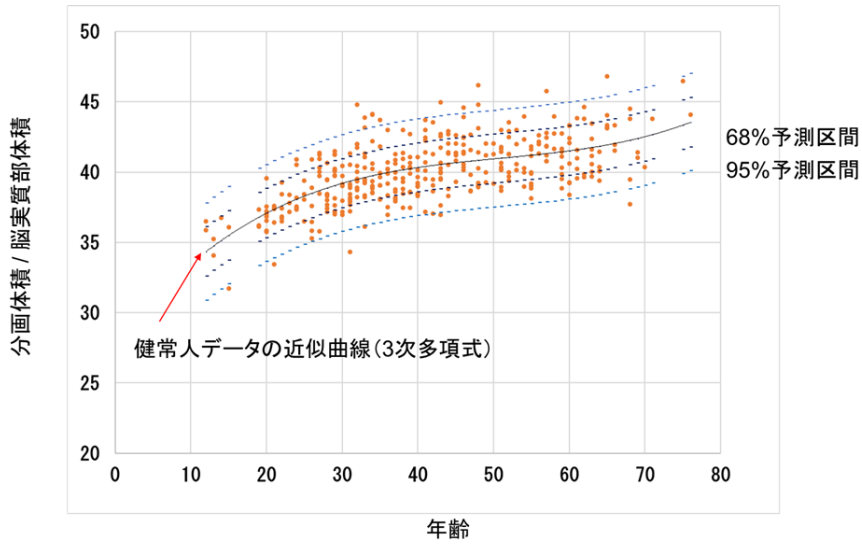


図 11 部位分画体積と年齢の依存関係と近似曲線

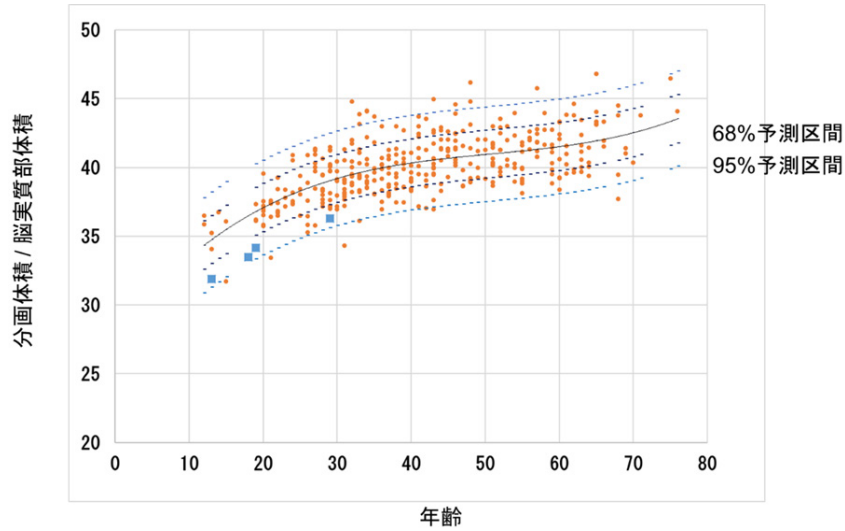


図 12 図 11 の健康人ベースラインデータに発達障害患者データを追加したグラフ

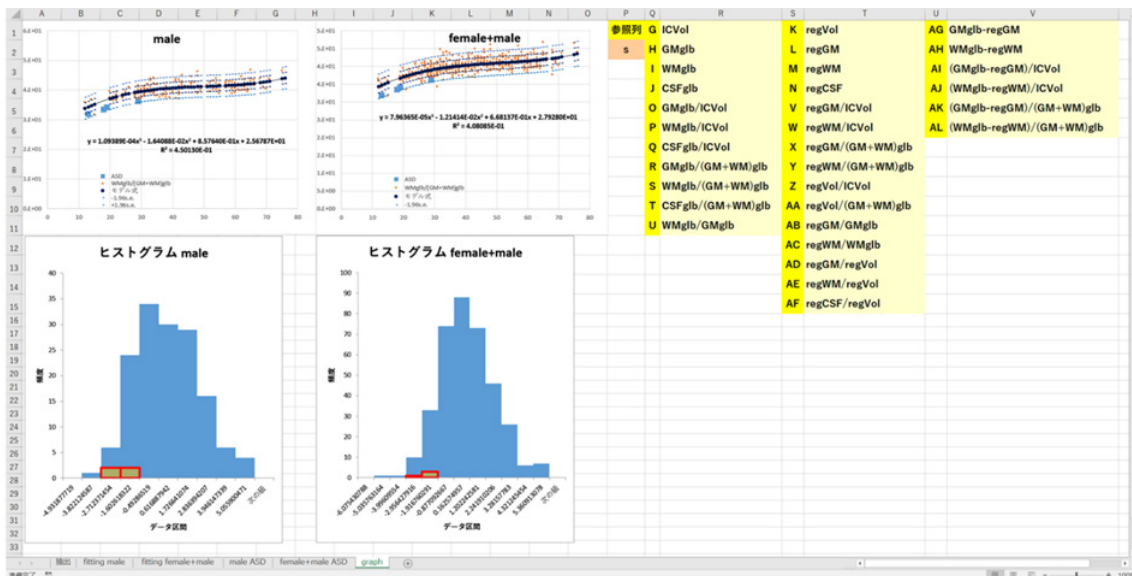


図 13 ヒト脳内一部位での解析結果、様々な指標に対してグラフとヒストグラムの結果が描出できるようにした。ヒストグラムの例では、ASD 患者データが分布の中心からはずれている様子が伺える。

2.1.2.1.6 ヒト脳画像データの解析

以上、開発した解析ツールについて、図13に全体の様子を俯瞰したものを示す。MDEFTシーケンスを用いてヒト全脳画像データを取得後、画像不均一性補正（ B_1 不均一性補正）を行った画像データに対して、全脳分画解析と部位分類解析を行う（図14）。

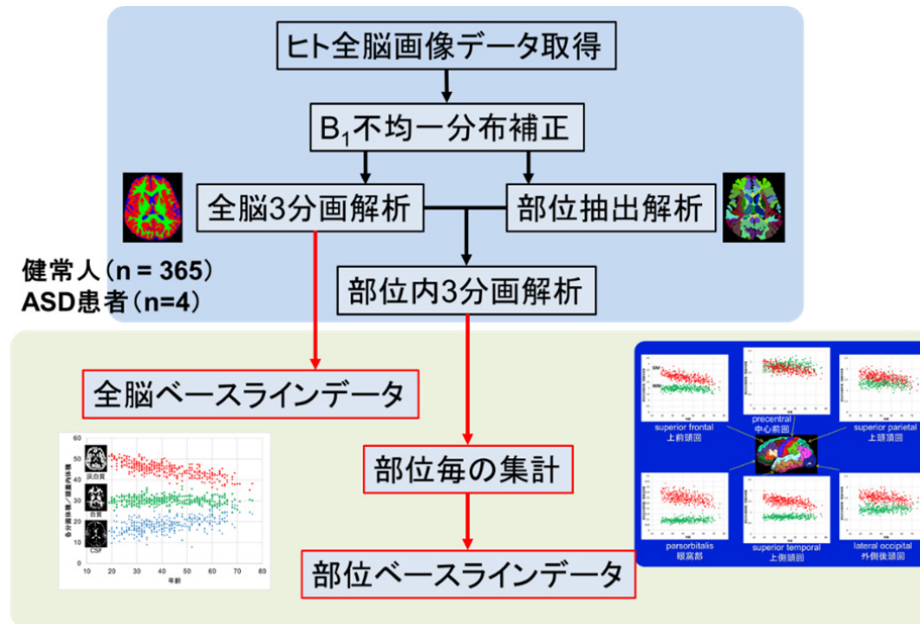


図14 ヒト脳画像データ解析方法のフローを示す。

2.1.2.2 ^1H スペクトロスコピー法を用いた代謝物濃度定量法の開発とヒト脳代謝物解析

2.1.2.2.1 ヒト脳内 ^1H スペクトロスコピー測定法

ヒト脳では、グルコースが主要なエネルギー源として取り込まれ、解糖系、TCA回路を経てグルタミン酸（Glu）、 γ -アミノ酪酸（GABA）などの各種アミノ酸が生成される。これらの代謝物の他に、神経細胞に局在するN-アセチルアスパラギン酸（NAA）なども存在する。 ^1H 磁気共鳴スペクトロスコピー（ ^1H MRS）では、これらの代謝物の ^1H スピンを観測することで、ヒト脳内の代謝物を測定することができる。それぞれの代謝物内の ^1H は、核スピン近傍の電子の空間的分布の差により、それぞれの核スピンの感じる磁場の強さが異なる。これを化学シフトと呼び、ppmオーダーでのピーク分解が可能となる。例えば、NAAの CH_3 のピークは、2.01 ppmに存在し、水 ^1H の化学シフトは、4.7 ppmに存在する。これによって、各代謝物のピーク分解が可能となる。

ヒト用4.7T MRI装置を用いてヒト前頭葉領域から取得された ^1H スペクトルは、図4に示した通りである。これは、Stimulated-Echo Acquisition Mode（STEAM）シーケンス⁵⁾で取得したヒト脳内 ^1H スペクトルであり、各代謝物 ^1H の T_1 緩和による信号飽和を小さくするため、 $\text{TR}=5\text{ s}$ という繰り返し時間を用いている。これに加えて、 T_2 緩和などによる信号減衰を小さくするために、 $\text{TE}=4\text{ ms}$ という、励起から信号収集までの時間を短縮している。しかしながら、短いTEで取得する場合、巨大分子や残留水信号によるベースラインの影響が大きい。この影響は、下記に示す線形結合モデルに組み込まれたスプライン補間によるベースライン推定を用いてスペクトル解析を行うようにしている。

この1次元スペクトルでは、 J_{HH} カップリングと小さな化学シフト差を原因とするピークオーバーラップが、グルタミン酸、グルタミン、GABAで見られる。このため、2.4 ppm近傍のこれらのピークは分解することができない。

2.1.2.2.2 測定プロトコル

ヒト脳内の代謝物を非侵襲に測定するためのパルスシーケンスの基本構成は、水信号励起パルス列、領域外飽和パルス列で構成される前置パルス列と、これに続く空間3次元（3D）局所励起パルス列である（図15）。

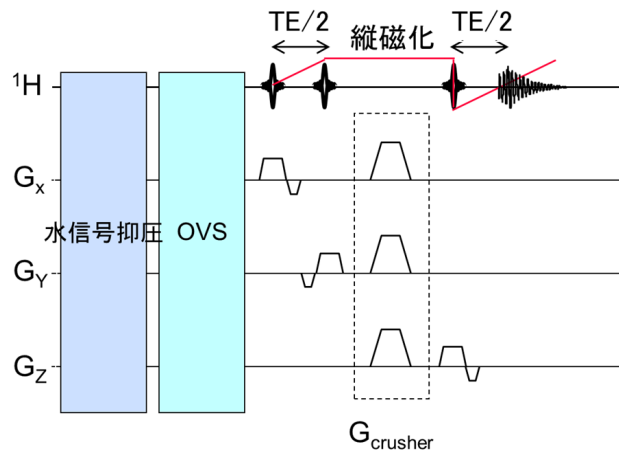


図 15 ヒト脳内代謝物測定パルスシーケンス

3D 局所励起パルス列には、Point Resolved Spectroscopy (PRESS) 法⁶⁾、STEAM 法が良く用いられる。いずれも空間 3 軸に対して、同時に印加する高周波磁場パルス (RF パルス) と勾配磁場パルスで構成される、1 軸毎のスライスパルスを利用する。3 つのスライスパルスで、空間 3 軸の局所化、すなわち、空間 3 軸で限定された領域からの信号のみを検出できるようにする。PRESS 法では、 90° 、 180° 、 180° の 3 つのスライスパルスで Spin Echo (スピネコー) を形成し、局所励起信号が検出できる。STEAM 法では、 90° 、 90° 、 90° の 3 つのスライスパルスで Stimulated Echo (ステミュレートドエコー) を形成し、局所励起信号が検出できる。本研究では、上述の通り、STEAM シーケンスを用い、これは $TE = 4 \text{ ms}$ がより実現し易い理由による。

ヒト脳内の組織水濃度は、 40 M 程度であるのに対して、測定対象の代謝物濃度は、 10 mM 程度であり、組織水濃度が 4000 倍程度である。上述の通り、組織水 ^1H の化学シフトは 4.7 ppm 近傍であるため、各代謝物 ^1H の化学シフトとは相異なる。このため、分解は可能であるが、受信系のダイナミックレンジの問題、組織水 ^1H ピークの裾野の影響などから、実際には、水ピーク存在下での代謝物スペクトル取得は難しい。このため、水信号抑圧パルスにより、水信号をできるだけ抑制してから、代謝物信号を取得する。

領域外飽和パルスは、PRESS シーケンス、STEAM シーケンスといった、3D 局所励起シーケンスで局所化した関心領域 (Volume of Interest, VOI) のスライス特性を一層良好にするために用いられる。スライスパルスで選択されるスライス面のエッジは完全ではなく、領域外からの信号が若干含まれる。このため、領域外飽和パルスを前置パルスとして利用する。

図 16 には、ボランティア測定での測定プロトコルを示す。

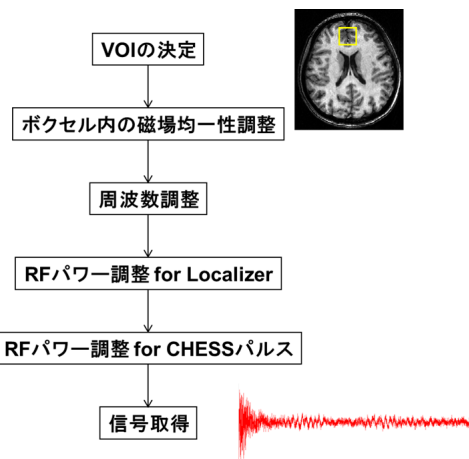


図 16 ヒト脳内代謝物スペクトル取得のためのボランティア測定プロトコル

被験者を磁石に仰臥姿勢でセットしてから、位置確認の画像を取得する。続いて、 T_1 強調画像、 T_2 強調画像を取得し、 T_2 強調画像を利用して ^1H スペクトルを取得する領域を設定する。これを関心領域 (Volume of Interest、VOI) と呼び、図 16 内右上の画像上では VOI を黄色線の四角で示している。続いて、VOI のボクセル内の磁場均一性調整 (シミング) を行う。本システムでは、FASTMAP 法⁷⁾ を用いて、2 次のシムコイルまでのシミング、1 次のシムコイルのシミングという手順で磁場均一性調整を行う。この方法により、前頭葉領域の $20 \times 20 \times 20 \text{ mm}^3$ のボクセルで、10 Hz 程度の線幅が達成できる。磁場均一性調整によって半値幅が狭まり、ピーク分解能、S/N が向上する。加えて、水信号抑圧の性能も向上する。磁場均一性調整が十分でない場合、抑圧しきれない水信号によるビート、ベースライン歪みなどが生じ、代謝物スペクトルの質が低下する。磁場均一性調整に続いて、周波数調整を行う。これによって水信号抑圧のための搬送周波数が設定される。続いて、水信号抑圧のための RF パルスのパワー調整を行う。これらの調整後、水信号抑圧パルス用の RF パルスを印加せずに、勾配磁場パルスを印加した STEAM シーケンスにより、水信号を取得する。この信号は、後処理法での渦電流磁場補正のために用いる。代謝物濃度定量化のために、STEAM シーケンスで水信号を取得する。この後、水信号抑圧パルスを印加した代謝物信号取得を行う。

2.1.2.2.3 後処理法開発

得られた代謝物信号に後処理を行い、代謝物スペクトルを取得し、代謝物濃度を算出する。図 17 に、この後処理フローを示す。最初に、得られた代謝物信号と水信号から、渦電流磁場補正を行う。ヒト脳内の局所領域からの代謝物信号を取得するために、水抑制パルス、局所励起パルスとして勾配磁場パルスを印加する。静磁石中で、勾配磁場を高速スイッチングするため、静磁石内の導体上に渦電流磁場が発生する。これがスペクトル歪みにつながるため、補正を行う。補正には、上述の水信号の位相を用いる。続いて、S/N 向上のため、アポダイゼーション、すなわちガウス関数利用の窓関数を代謝物信号に乘じ、高分解能化のためゼロ補填を行う。複数回の積算を行った代謝物信号を 1 ブロックとして複数ブロックで構成される測定を行い、それぞれのブロック毎にスペクトルを算出する。NAA 2.01 ppm のピークを利用して、複数ブロック間の周波数シフトを補正する。続いて、スペクトルを合計し、得られたスペクトルの位相補正、すなわち 0 次、1 次の位相補正を行い、代謝物スペクトルを取得する。得られた代謝物スペクトルは、既知の代謝物スペクトルの線形和モデルを用いて解析し、ボクセル内の水スペクトルとの比較から濃度定量化を行う。ボクセル内の水濃度は、内部水標準法⁸⁾ を用いて行う。すなわち、灰白質、白質の含水量既報値を用い、それぞれのボクセル内の含有率は全脳 T_1 強調画像から算出した 3 分画画像を用いて算出した。

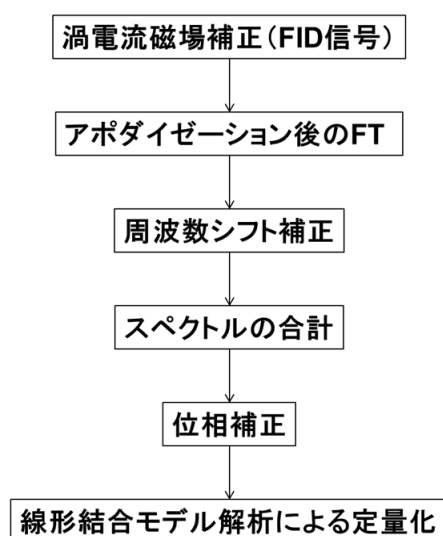


図 17 ヒト脳内代謝物スペクトル取得のための後処理フロー。

2.1.2.4 ボランティア測定

ボランティア測定では、最初に、勾配エコー画像で位置を決定し、続いて全脳 T₁ 強調画像法の 3D MDEFT シーケンスを印加し、信号を取得した。続いて、Fast Spin Echo シーケンスによる T₂ 強調画像法を実施し、T₂ 強調画像を取得した。得られた T₂ 強調画像上に、帯状回領域 8ml (20×20×20 mm³) のボクセルを設定した。設定したボクセル内の水信号を取得して、周波数調整を行った後、局所励起パルスの RF パワー調整を行った。続いて、局所励起内の磁場均一調整を FAST MAP シミングを用いて行い、10 Hz 程度の線幅となるように調整した。この後、代謝物信号を取得し、上述の後処理を用いてヒト脳内 ¹H スペクトルを算出した。続いて、ヒト脳での存在が知られている代謝物スペクトルの線形和で表現する線形結合モデル解析⁹⁾を用いて、各代謝物スペクトルを求め、内部水標準法により代謝物濃度算出を行った。

2.1.3 結果と考察

2.1.3.1 白質体積解析法の開発とヒト脳画像の解析

開発した方式を用いて、ASD 患者データと健常人ベースラインデータに関する、白質体積の脳内各部位特異性の評価を行った。この結果、健常人ベースラインデータに対する 95% 予測区間からのはずれ度が大きい部位として、前頭葉 3 領域 (上前頭回、吻側中前頭回、中心前回)、頭頂葉内 1 領域 (中心後回)、側頭葉内 1 領域 (紡錘状回) を抽出した (図 18)。前頭葉領域は情動などに関与し、紡錘状回は顔認知などに関わっているとされており、自閉症との関連も示唆される領域である。図 19 には、抽出した領域を各スライス面上に示す。

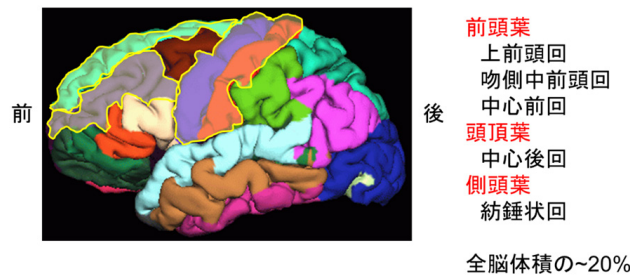


図 18 ヒト脳部位解析結果。前頭葉領域の上前頭回、吻側中前頭回、中心前回、頭頂葉領域の中心後回、側頭葉の紡錘状回で、ASD 患者データの健常人ベースラインデータ 95% 予測区間からのはずれ度が大きかった。

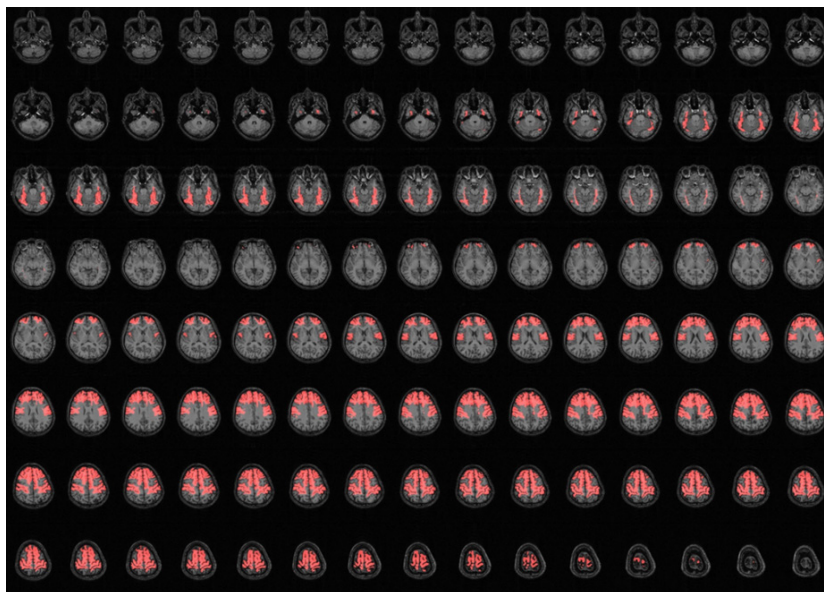


図 19 ヒト脳画像上にはずれ度が大きかった領域を示した。

2.1.3.2 ¹H スペクトロスコピー法を用いた代謝物濃度定量法の開発とヒト脳代謝物解析

測定法、後処理法、測定プロトコルの改良、開発によって、ヒト脳の前頭葉領域からの代謝物スペクトルが安定して取得できるようになった。得られたスペクトルの例と、線形結合モデルによる解析結果を図 20 に示す。図 20 に示した線形結合モデル解析では、15 の代謝物 (Asp: アスパラギン酸、Cre: クレアチン、GABA: γ -アミノ酪酸、Glc: グルコース、Gln: グルタミン、Glu: グルタミン酸、Gly: グリシン、GPC: グリセロホスホコリン、GSH: グルタチオン、mI: ミオイノシトール、NAA: N-アセチルアスパラギン酸、NAAG: N-アセチルアスパラチルグルタミン酸、PCh: ホスホコリン、PE: ホスホリルエタノールアミン) での線形和との解析結果となった。ヒト脳代謝物スペクトル上には、巨大分子による幅広のベースラインが含まれ、これは、スプライン補間により解析され、+baseline として表示されている。続いて、各代謝物スペクトルのピーク面積から内部水標準法によって代謝物濃度を算出した。図 21 には、健常人代謝物スペクトルデータ解析から求めた NAA 濃度の年齢依存性を示す。得られた代謝物スペクトルの S/N と比較して、NAA 代謝物濃度のばらつきが大きいという結果となった。ヒト発達障害の指標候補として考えているミオイノシトールに対しても、ばらつきが大きく、ASD 患者データとの差が論じるまでに至らなかった。

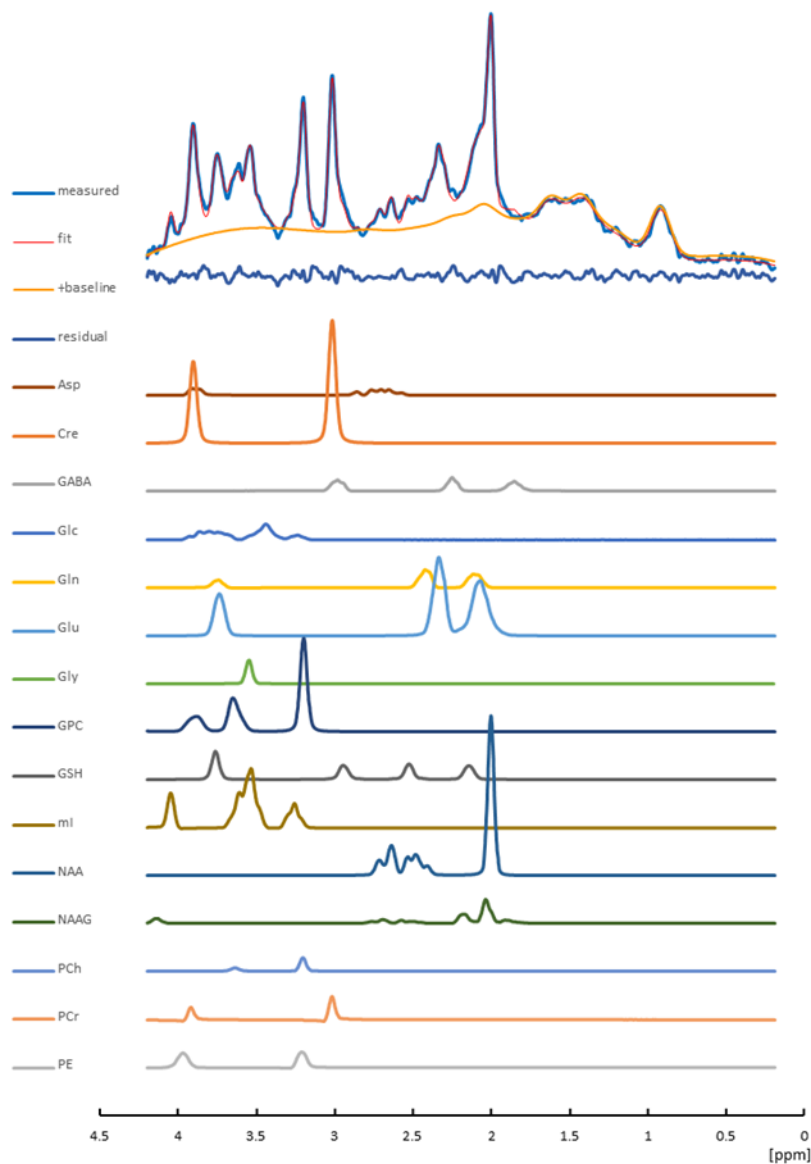


図 20 ヒト脳前帯状回 ¹H スペクトルと線形結合モデルを用いた解析結果。

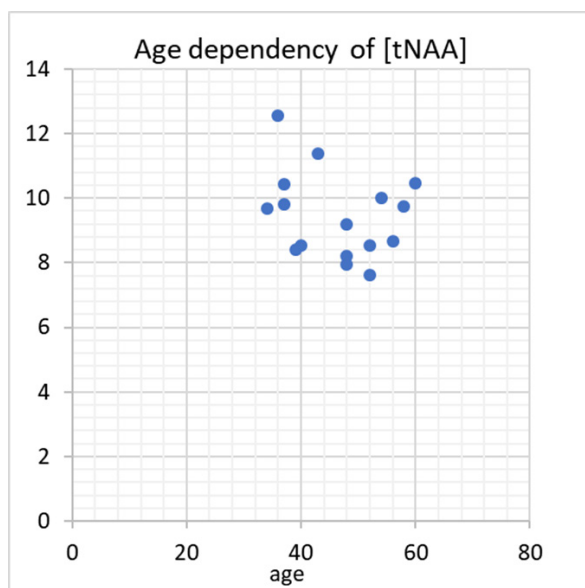


図 21 ヒト脳前帯状回での NAA 濃度の年齢依存性。

2.1.4 まとめ

2.1.4.1 白質体積解析法の開発とヒト脳画像の解析

ヒト全脳画像データの取得から、灰白質、白質、脳脊髄液領域の3分画解析、各部位分類解析と、各部位の3分画解析を行うツールを開発した。多数のボランティアデータを集積し、結果を可視化し、統計解析するツールも併せて開発した。これらの開発したツールを用いて、これまでに取得した健常人ボランティアデータ (n = 365)、ASD 患者ボランティアデータ (n = 4) の統計解析を行い、健常人ベースラインデータに対する 95% 予測区間からのはずれ度が大きい部位として、前頭葉3領域 (上前頭回、吻側中前頭回、中心前回)、頭頂葉内1領域 (中心前回)、側頭葉内1領域 (紡錘状回) を抽出した。今後、患者ボランティア測定を実施し、解析を行うための基本ツールとなることが期待される。

2.1.4.2 ¹H スペクトロスコピー法を用いた代謝物濃度定量法の開発とヒト脳代謝物解析

健常人ボランティアデータ測定を実施し、濃度解析を行った。これまでに得られていた患者データとの比較を行ったが、指標候補と考えていたミオイノシトールでの差異は見出せていない。この原因として、健常人ボランティアデータのばらつきの大きさがあると考えられる。内部水標準法でのボクセル内含水量の算出に課題があると考えている。4.7T の高磁場 MRI 装置の場合、高周波磁場の不均一分布が生じるが、設定するボクセルでは、灰白質、白質の脳実質部の感度に対して、灰白質外の脳脊髄液が含まれる領域では感度が低い。含水量の算出に、この感度差を考慮できていないため、実際の水濃度よりも大きな値に見積もられていると考えられる。被検者によって、脳脊髄液領域が大きい場合があり、この結果算出される代謝物濃度が実際とは異なり、ばらつきが大きくなるのではないかと考えている。今後、この高周波磁場不均一分布について補正を加え、ばらつきが小さくなるかを検討する。

2.2 サブテーマ2「発達障害小動物モデルからの取り組み」

2.2.1 目的と経緯

サブテーマ2では、発達障害ラットモデルを用いた取り組みを行った。最初に、発達障害モデルの導入を検討し、自閉症様行動を示すラットに対してMRI装置を用いたイメージング測定を行い、ヒトMR結果と同様の白質での差異が生じるかの評価を行った。

発達障害ラットモデル導入に関しては、遺伝子改変モデルラット、薬物投与モデルラットについて論文調査などから検討を行い、導入モデルを決定した。前者の遺伝子改変モデルラットは、SAGE ラボラトリ (St. Louis, MO, USA) が遺伝子編集技術を用いてラットでの開発に成功したモデル¹⁰⁾であり、この開発元から購入することとした。後者の薬物投与モデルラットに関しては、上記調査の結果、決定したプロトコルからモデルを作製した。いずれのモデルに対しても、行動試験法による評価を行い、自閉症様行動を示すラットを抽出しイメージング測定を行った。

高額な遺伝子改変モデルに対し、環境研での作製が可能な薬物投与モデルに関しては、自閉症様行動と脳の関連を調べるために、社交性関連遺伝子、炎症性マーカーなどに関する化学分析を行った。

全ての動物実験は、国立環境研究所動物実験委員会の承認を得た。

2.2.2 方法

2.2.2.1 ラット発達障害モデルの作製と評価

(1) ラット発達障害モデルの作製

全ての動物実験に関しては、国立環境研究所動物実験委員会の承認を受けた。

遺伝子改変モデルラットとしては、自閉症に関連する遺伝子と考えられている *Fmr1* と *Nlgn3* をノックアウト (KO) した、*Fmr1* KO Sprague-Dawley (SD) ラット (雄、雌 各 $n=5$ 、7 週齢)、*Nlgn3* KO SD ラット (雄 $n=5$ 、雌 $n=5$ 、7 週齢) を SAGE ラボラトリ (St. Louis, MO, USA) から購入し、15 週齢から 17 週齢で行動試験を行った後、ペントバルビタール麻酔のもと脳摘出を行い、MRI 測定を実施した。

薬物投与モデルラットについては、下記のようにして作製した。妊娠 SD ラット ($n=16$) をチャールズリバーラボラトリ日本法人から購入し、コントロールグループ ($n=8$) と薬物投与グループ ($n=8$) に分類した。コントロールグループでは生理食塩水のみを投与し、薬物投与グループでは生理食塩水中に 600 mg/kg のバルプロ酸ナトリウム (VPA、和光純薬 (株)) を溶かした溶液を胎生 12.5 日に腹腔内注射により投与した¹¹⁾。それぞれのグループの仔ラットを母ラットと共に離乳 (3 週齢) まで個別のプラスチックケージで飼育した。その後、各ケージから雄、雌の仔ラット (各 $n=1$) を抽出し、各グループの雄、雌の仔ラット (各 $n=8$) に対して行動試験と遺伝子発現アッセイを行った。仔ラットは、雄 2 匹あるいは雌 2 匹を、一定条件の環境制御ケージ (温度 22 ± 0.5 °C、湿度 $50 \pm 5\%$ 、700 ~ 1900 時間照射) に移して飼育した。その後、コントロールグループ、VPA 投与グループ共に、11 週から 13 週齢の雄、雌仔ラット (各 $n=8$) の行動試験を行った。コントロールグループ、VPA 投与グループに関しては、行動試験 24 時間後にペントバルビタール麻酔のもと脳摘出を行った後、6 匹のラットに対して海馬を摘出し、右海馬については mRNA 分析、左海馬についてはタンパク質分析を行った。それぞれのグループ内の残り 2 匹のラットに対しては組織学的分析を行った。MRI 測定に関しても同様に VPA モデル作製を行い、雄、雌仔ラット (各 $n=4$) の測定を実施した。

実験プロトコルの概要を図 22 に示す。

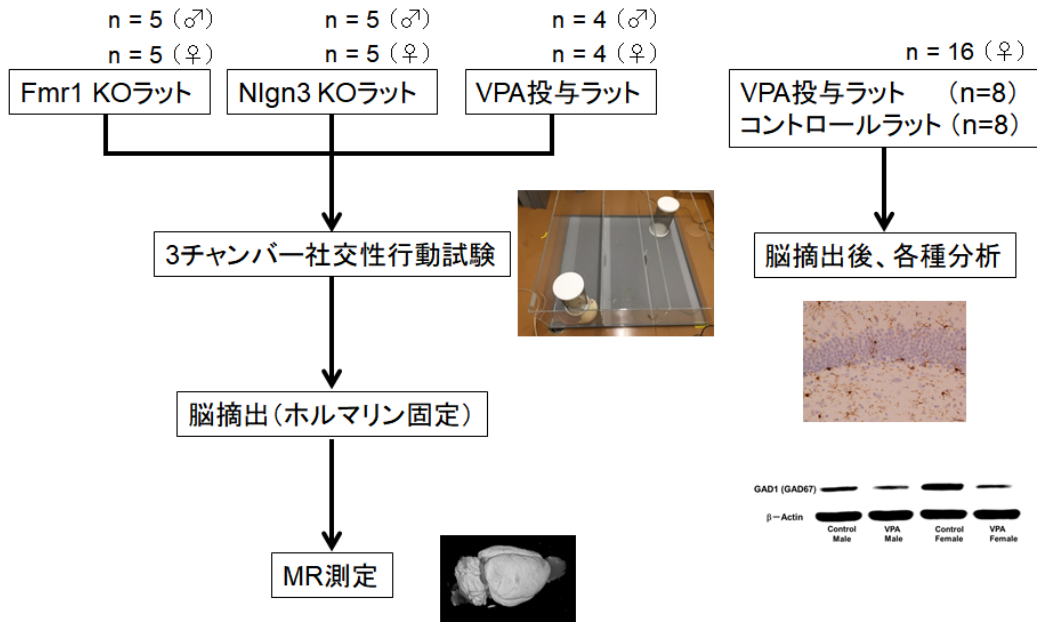


図 22 動物実験プロトコルを示す。

(2) 行動試験法などによる評価

行動試験では、Any-maze ソフトウェアビデオ支援トラッキングシステムを利用した装置（室町機械（株））を用いた。この装置は、アクリルガラス（100 cm×100 cm×35 cm）を3部屋（チャンバー）に等分し、チャンバー間を自由に行き来できるように、10 cm×10 cm 大の穴が開けられ、両端のチャンバーには、新規ラットとの接触時間測定のためのカップ（直径 15 cm、高さ 30 cm）を設置した。これは、新規ラット、すなわち馴染みのないラット（unfamiliar rat）とどの程度接触したかで社交性を評価するための装置である。

行動試験の測定プロトコルは次の通りとした。最初に、馴化させるため、測定対象ラットを中央のチャンバーに5分間導入した。これに続いて、社交性試験（sociability test）を行い、一方のカップに同じ週齢だが馴染みのない新規ラットを導入し、10分間の測定を行った。続いて、新規探索性試験（social novelty preference test）を実施した。この試験では、もう一方のカップにも馴染みのない新規ラットを導入し、10分間の測定を行った。社交性試験、新規探索性試験共に、新規ラットに近接した時間（カップから1 cmの距離まで近づいた時間）を測定した。行動試験のプロトコルの概要を図 23 に示す。

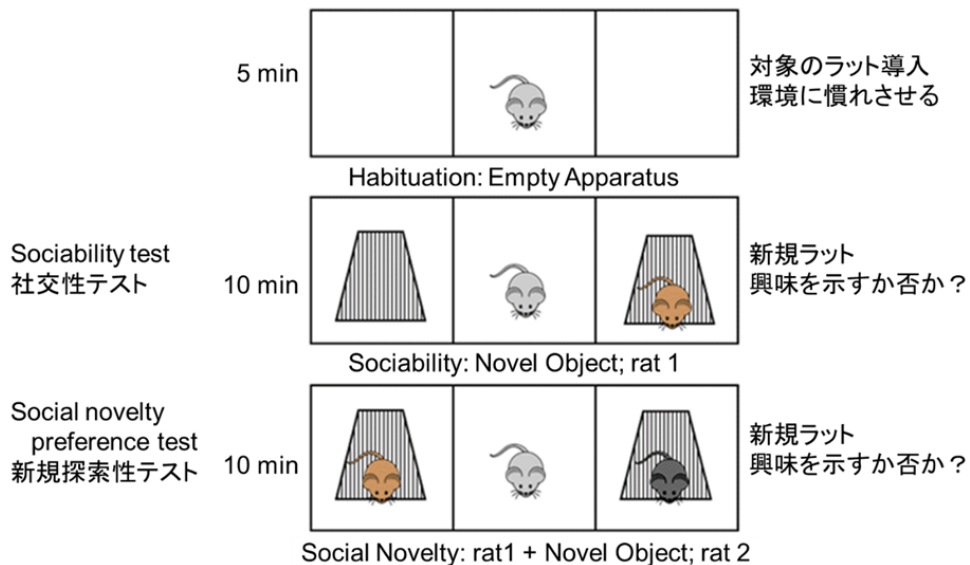


図 23 行動試験プロトコルを示す。

mRNA 分析では、摘出した海馬組織を即座に液体窒素で冷凍し、全 RNA を抽出するまで -80°C で保存した。RNA 抽出は BioRobot EZ-1 と EZ1 組織ミニキット (Qiagen、ドイツ) を用い、ND-1000、NanoDrop RNA アッセイプロトコルを利用して量を推定した。次に、SuperScript RNase H-Reverse Transcriptase II (Invitrogen, USA) を用いて全 RNA から 1st strand cDNA を合成した。次に、Prism Detection system を用いてリアルタイム RT-PCR アッセイによって 18S rRNA (内部標準)、セロトニン、BDNF、インターロイキン (IL) 1β 、腫瘍壊死因子 (TNF) α の mRNA 発現レベルを測定した。プライマーは、Qiagen, Sample & Assay Technologies から購入した。TNF- α のプライマーは北海道システムサイエンスから購入した。

その他の化学分析として、行動試験の 24 時間後に採取した血液の 8-hydroxydeoxyguanosine (8OHdG) レベル測定、ウェスタンブロッティング、組織学的分析および免疫組織化学分析を行った。

8-OHdG は、酸化ストレスの指標であり、各グループから取得した $n=6$ の血液サンプルに対して実施した。測定には、高感度 8-OHdG Check ELISA Kit (Code #KOG-HS10E) を用いた。

ウェスタンブロッティングは、 $n=6$ の仔ラットの左海馬 (45 mg 程度) に対して行った。氷冷した RIPA Lysis Buffer 上に摘出試料を浸した後、 4°C 条件下で超音波破碎機 ((株) トミー精工) を用いて均質化した。その後、上清画分を回収し、iMaker Microplate Reader (Bio-Rad Laboratories, USA) を用いてタンパク質濃度を決定した。各試料から $20\ \mu\text{g}$ のタンパク質をゲル電気泳動にかけ、PVDF 膜に転写した。膜は室温で 1 時間ブロックした後、一次抗体と 4°C で一晩インキュベートし、TBST で洗浄した。続いて、暗室で二次抗体と室温で 1 時間のインキュベートを行い、再度 TBST で洗浄した。その後、Odyssey Fc. Imaging System を用いて化学発光法により測定した。

組織学的分析では、摘出脳を 10% フォルマリン固定し、エタノールシリーズ脱水、キシレンで透徹後、パラフィン封入を行った。厚さ $5\ \mu\text{m}$ の冠状面を切り出し、ヘマトキシリン・エオジット (H&E) で染色を行った。免疫組織化学分析は、神経毒を引き起こすミクログリア活性検出のため、海馬に対して行った。

全てのデータの統計解析は、SatMate II 統計解析システムを用いて行った。行動試験では、対応のある t 検定を用いた。mRNA レベルと血中 8-OHdG レベルはスチューデント t 検定を用いた。 0.05 より小さな p 値に対して有意な差があるとした。

2.2.2.2 MRI 測定法の開発

2.2.2.2.1 ラット脳 MRI 画像データ測定法の開発

測定には、動物用 4.7T MRI 装置を用いた。RF コイルには、体積コイルを用いた。高コントラスト、高 SNR の観点で、ラット摘出脳を用いてラット全脳高分解能画像測定のための測定法、すなわちパルスシーケンスの検討を行った。ヒト用に用いている MDEFT シーケンスの他、勾配エコーシーケンスを検討した結果、コントラストモジュールとして反転パルスを用いた反転スピンエコー法 (IR-SE 法) を用いた T_1 強調画像法を用いることに決定した。このパルスシーケンスでは、最初に反転パルスを印加して磁化を反転させる。 T_1 緩和により磁化が回復後、スピンエコーシーケンスによりスピンエコー信号を生成し、測定する。灰白質、白質などで T_1 緩和定数が異なるため、組織間のコントラスト付与が可能となる。

ラット摘出脳を用いて検討した結果、測定条件は次のようになった。すなわち、コントラスト付与のための反転パルス印加時からのディレイ (TI) は $25\ \text{ms}$ 、繰り返し時間 (TR) は $800\ \text{ms}$ とした。画像大きさ、Field of View (FOV) は、 $28.16\ \text{mm} \times 28.16\ \text{mm} \times 24\ \text{mm}$ として、マトリクス数は $512 \times 256 \times 96$ とした。磁気共鳴信号収集後、ゼロ補填し $1024 \times 512 \times 256$ として 3 次元フーリエ変換を行い、3D 画像を取得した。この結果、得られた画像分解能は、 $55\ \mu\text{m} \times 55\ \mu\text{m} \times 94\ \mu\text{m}$ とすることができた。測定時間は、22 時間 18 分であった。図 24 に、ラット摘出脳の直交 3 断面画像とサーフェスレンダリングした画像を示す。

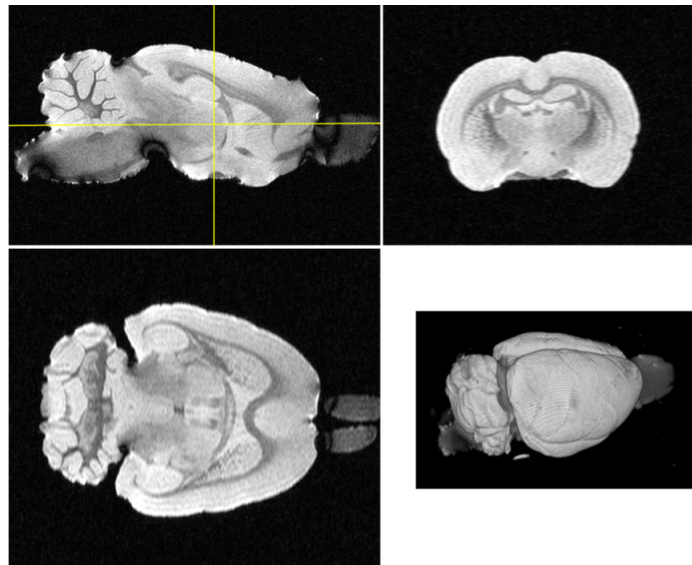


図 24 ラット脳の直交 3 断面画像と、サーフェスレンダリング画像

2.2.2.2.2 分画法の開発

得られたラット全脳画像解析から特徴的な白質領域を抽出するための方法を開発した (図 25)。白質領域としては、特徴的な脳梁を選択し抽出した。最初に、原画像としきい値との差分の絶対値表示を行う。次に、Gaussian 関数を施した。下記に示す白質領域を安定的に抽出するため、複数のラット摘出脳から標準マスク画像を算出した。この標準マスク画像データと解析対象のラット全脳画像データの位置合わせを行った後、上記で算出した Gaussian 関数とマスク画像との乗算を行った。この結果得られた抽出データに対して空間平均化処理を行った後、白質体積を算出した。

Fmr1 KO ラット、Nlgn3 KO ラット、VPA 投与モデルラットのそれぞれの群の中で、社交性行動結果がコントロール群と比較して有意な差が認められた個体に関して、開発した分画法による解析を行った。

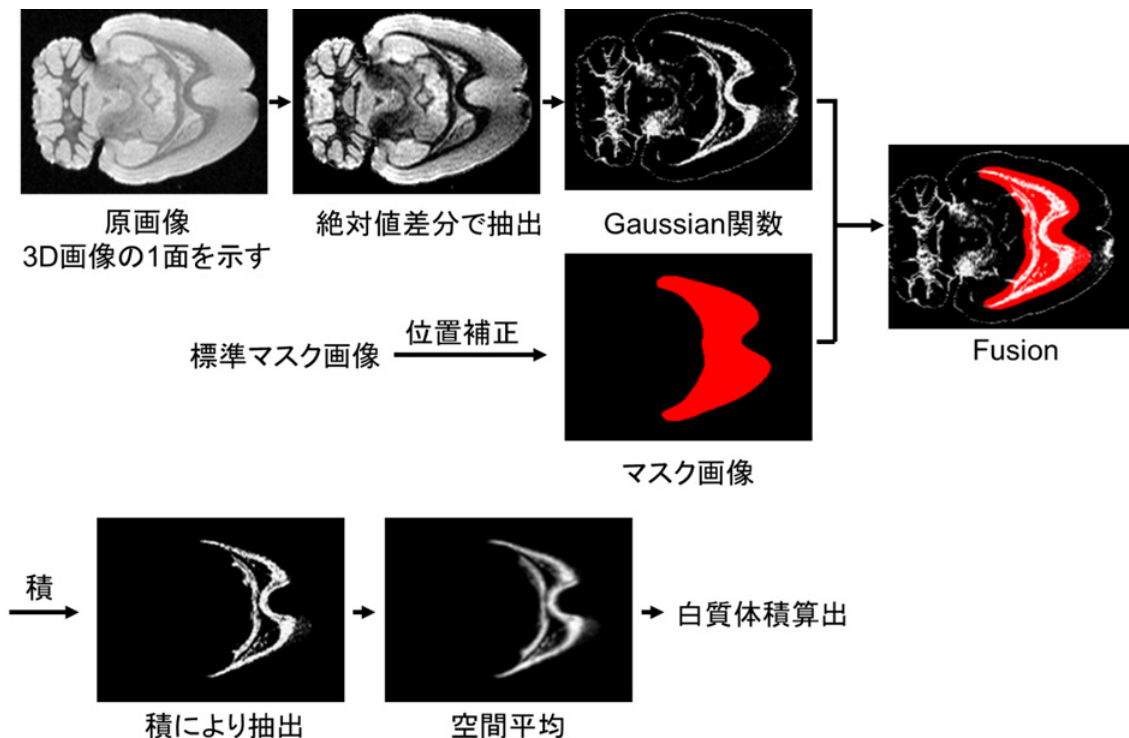


図 25 開発したラット脳 3D 画像からの分画方法

2.2.3 結果と考察

2.2.3.1 ラット発達障害モデルの評価

遺伝子改変モデルラットに関しては、Fmr1 KO ラット群 (図 26)、Nlgn3KO ラット群 (図 27) 共に、コントロール群に対して、社交性、新規探索性共に、雄仔ラット群で $P < 0.01$ の有意差が認められた。雌仔ラットに関しては、社交性に関して、 $P < 0.05$ の有意差が認められた。

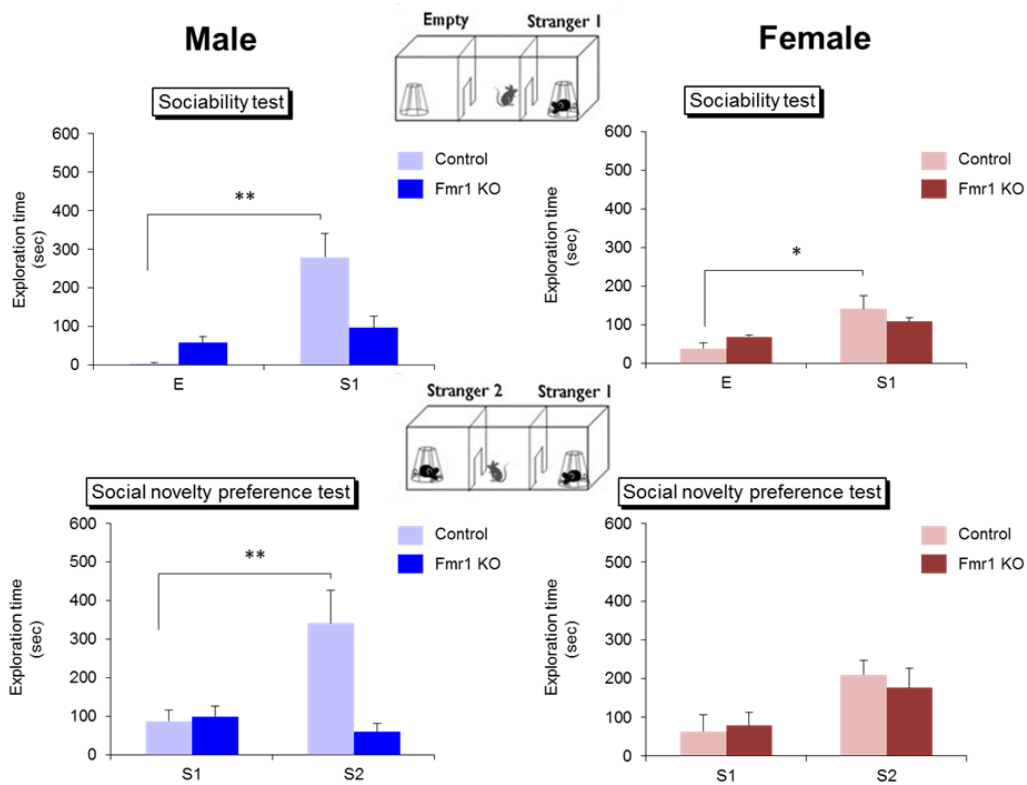


図 26 遺伝子改変モデル (Fmr1 KO) ラットに関する行動試験結果

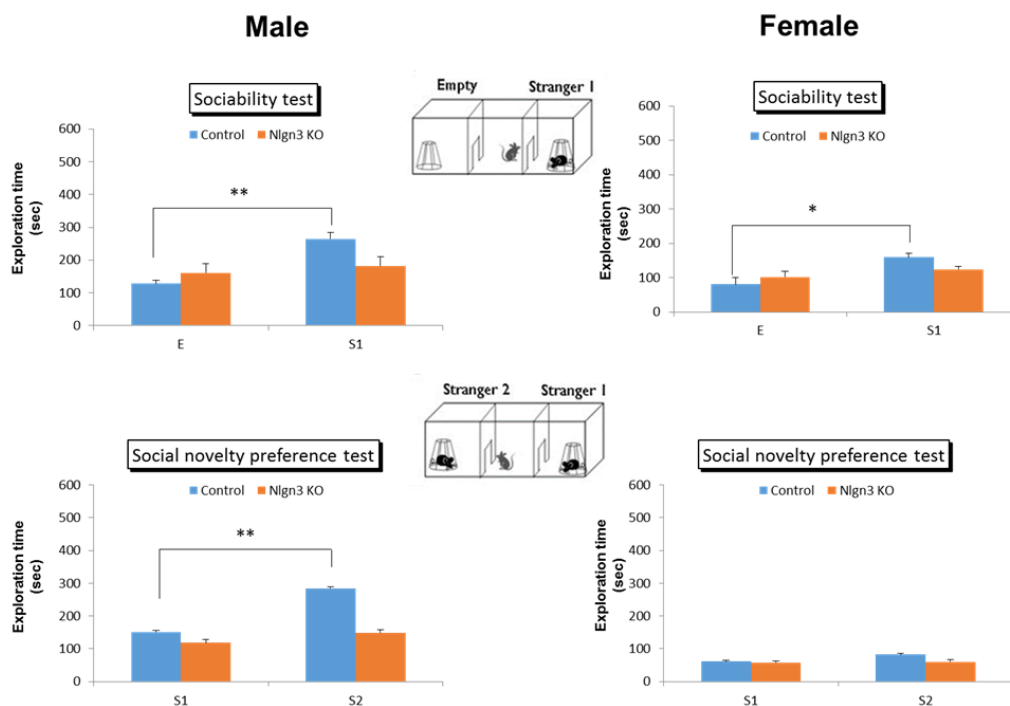


図 27 遺伝子改変モデル (Nlgn3 KO) に関する行動試験結果

VPA 投与モデルラットの結果は次の通りとなった。コントロール群と VPA 投与モデル群との体重、脳重量の有意な差は認められなかった。遺伝子改変モデルの結果と同様、VPA 投与モデルラット群でも、コントロール群に対して、社交性、新規探索性共に、雄仔ラット群で $P < 0.01$ の有意差が認められた。雌仔ラットに関しては、社交性に関して、 $P < 0.05$ の有意差が認められた (図 28)。

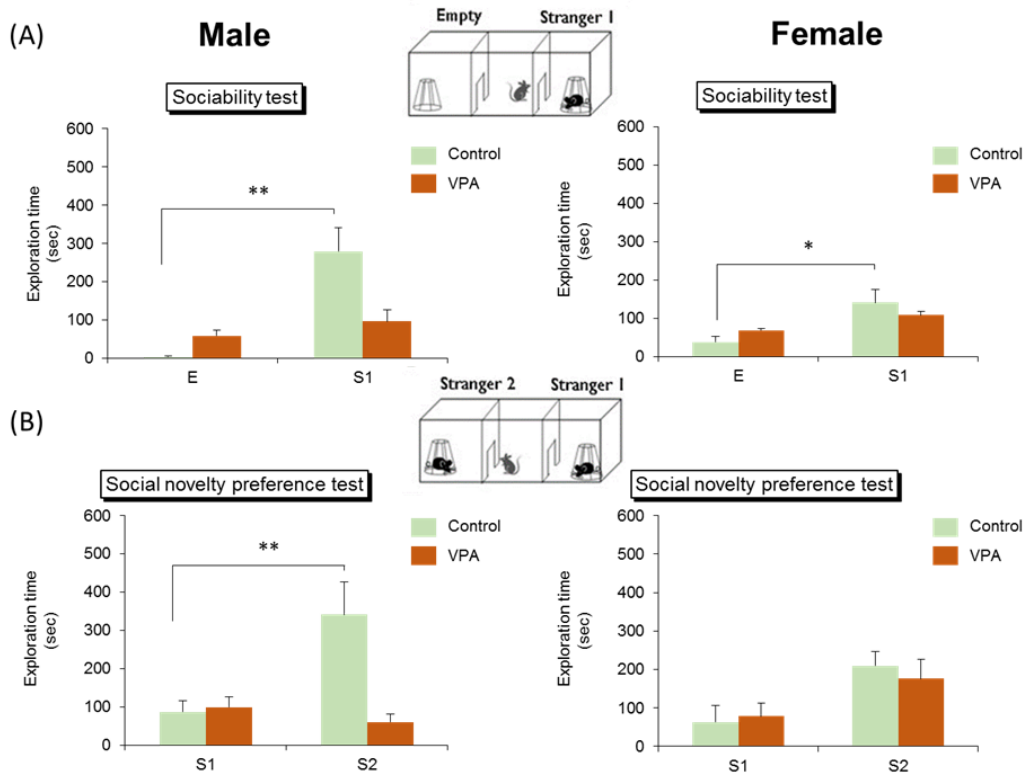


図 28 薬物投与モデル (VPA 投与) ラットに関する行動試験結果

VPA 投与モデルラットに関しては、社交性関連遺伝子、炎症性マーカーの海馬での発現、血漿中の酸化ストレスマーカー、グルタミン酸デカルボキシラーゼ (GAD) タンパク質、海馬組織変化、免疫細胞活動に関する測定を行った。

図 29 に、社交性関連遺伝子の海馬での発現結果を示す。この中で、セロトニン (Serotonin) は、脳内の情報伝達に重要な役割を示す神経伝達物質の一つである。VPA 投与モデルラット群では、雄仔ラットで、このセロトニンが、海馬での mRNA 発現レベルが有意に減少することが分かった。雌仔ラットでも減少したが、有意な差までには至らなかった。図 29 に示す脳由来神経栄養因子 (brain-derived neurotrophic factor: BDNF) は、神経細胞の発生や成長、維持、再生を促す作用を持つ。この BDNF も、セロトニンと同様に雄仔ラットで有意に減少し、雌仔ラットでの減少は有意な差までには至らなかった。ニューロギリンは、神経細胞内に存在するシナプスの成熟や機能の調製の役割を持つが、雄、雌共に、有意に減少することが分かった。

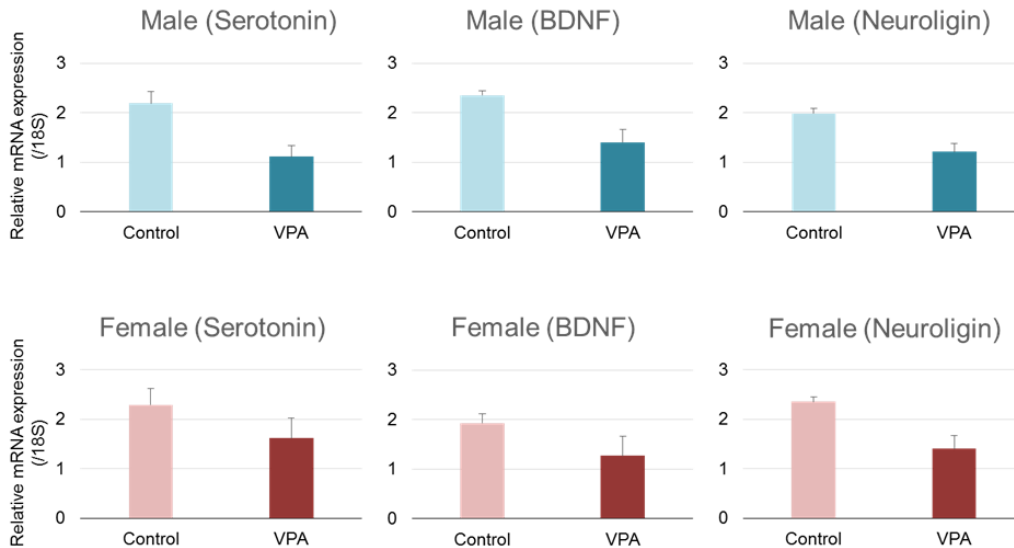


図 29 薬物投与モデル (VPA 投与モデル) ラットに関する社交性遺伝子の発現

炎症性マーカーの海馬での発現に関しては、炎症を強め機能障害や細胞などの崩壊をもたらす炎症性サイトカインについて調べた。この結果、インターロイキン (IL) 1 β 、腫瘍壊死因子 (TNF) α の発現レベルが、雄仔ラットでは VPA 投与モデルラット群で両者共にコントロールラット群に対して有意に増加した。しかし、雌仔ラットでは有意な差が認められなかった (図 30)。

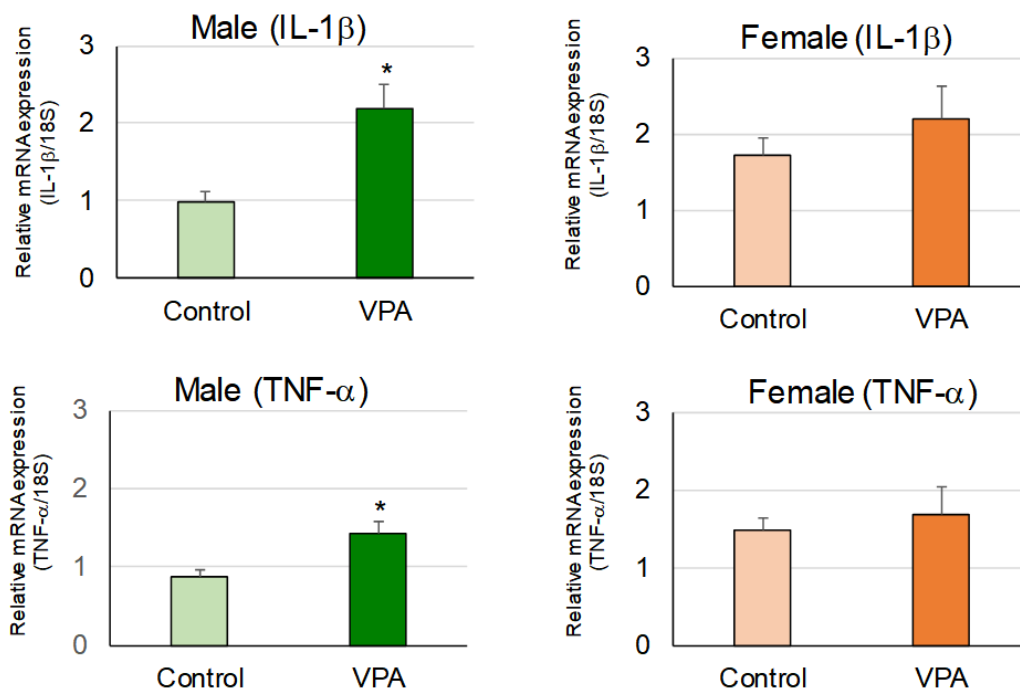


図 30 薬物投与モデル (VPA 投与モデル) ラットに関する炎症性マーカーの分析結果

次に、炎症性反応機構の理解のため、酸化ストレスによる DNA 損傷マーカーである血漿中 8-OHdG レベルを調べた (図 31)。VPA 投与モデルラット群の雄仔ラットでは、海馬での血漿中 8-OHdG レベルが増加したのに対して、雌仔ラットでは、コントロール群との有意な差が認められなかった。

Plasma 8 OHdG level

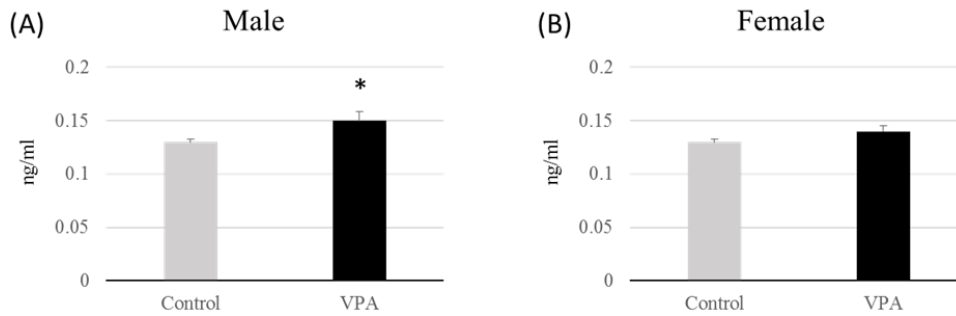


図 31 薬物投与モデル (VPA 投与モデル) ラットに関する血漿中 8-OHdG レベル

グルタミン酸、 γ -アミノ酪酸 (GABA) は、主要な神経伝達物質であり、それぞれ興奮性、抑制性の役割を持ち、グルタミン酸が代謝されて GABA が産生される。そこで、グルタミン酸と GABA のバランスに関与する、グルタミン酸の代謝酵素である GAD 分析を行った。この結果、GAD65、GAD67 のウェスタンブロッティング解析から、GAD67 タンパク質レベルが VPA 投与モデルラット群の雄、雌仔ラットで減少することが分かった (図 32)。

GAD protein level in the hippocampus

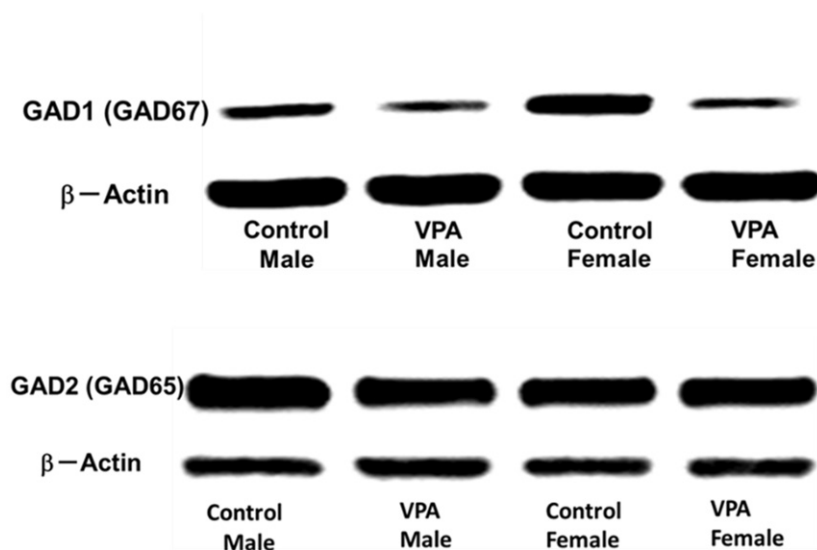


図 32 薬物投与モデル (VPA モデル) ラットに関する GAD タンパク質分析結果

組織学的分析に関しては、海馬の形態学的な変化を評価するため HE 組織染色により調べたが、海馬領域での差は認められなかった。

免疫化学分析に関しては、主要な免疫細胞であるミクログリアの活動をミクログリアマーカーの Iba1 を用いて調べた。この結果、コントロールラット群と比較して VPA 投与モデルラット群の雄仔ラットの海馬でミクログリア活性が顕著であった (図 33)。

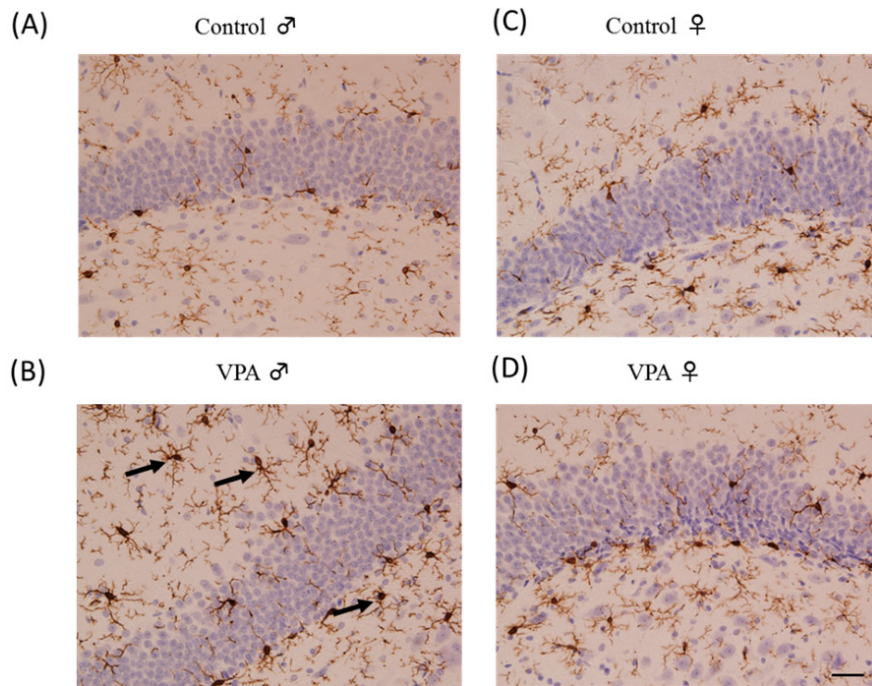


図 33 薬物投与モデル (VPA モデル) ラットに関する組織分析結果

2.2.3.2 ラット MRI 測定と解析結果

コントロール群と、Fmr1KO ラット、Nlgn3KO ラット、VPA 投与モデルラットのそれぞれの群について社交性行動結果で有意差が認められた群とを合わせた結果を図 34 に示す。後者のデータに対して、両側、分散が等しくないという条件での t 検定を行った結果、P 値 = 2.8% となり、自閉症モデルラットにて白質体積が有意に小さくなることが示唆された。

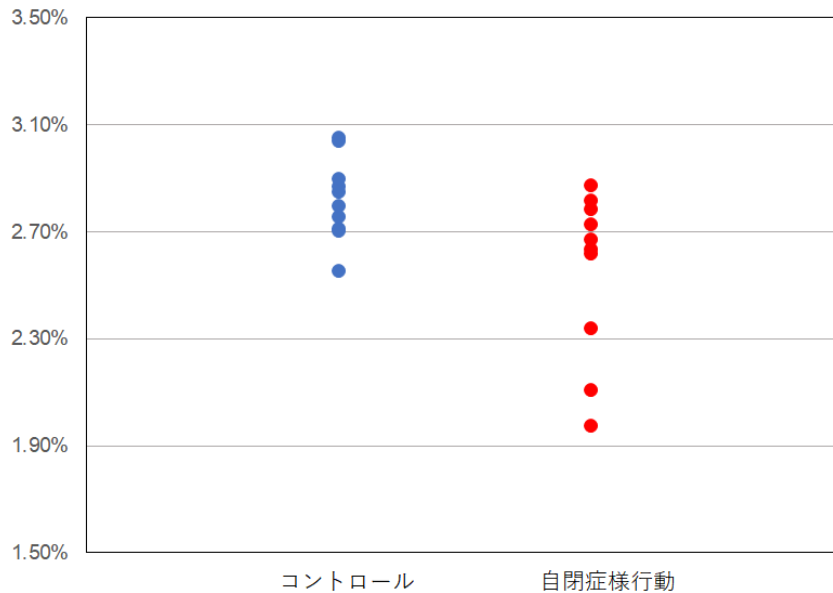


図 34 自閉症様行動を示したラットと、コントロール群との白質体積比

2.2.4 まとめ

動物側からのアプローチでは、発達障害モデルラットの検討と導入、行動試験による自閉症様行動ラットの抽出、MR イメージングによる形態情報の取得と解析を行った。発達障害モデルラットとしては、Fmr1 KO と Nlgn3 Ko の遺伝子改変モデルラットと薬物投与モデルとして VPA 投与モデルラットを導入した。VPA 投与モデルラットは環境研で作製可能となり、行動試験によって自閉症様行動を示すことが確認できた。MR イメージングによる形態情報に関し

ては、白質として脳梁のみの抽出解析とした。この結果、自閉症モデルラットでは、白質体積が小さいことが示唆された。VPA 投与モデルに対しては、発達障害脳の化学分析を行った。この結果、神経伝達物質のセトロン、ニューロギリンの mRNA 発現レベルの減少、脳由来神経影響印紙 (BDNF) の減少が海馬で認められた。炎症性に関しては、炎症性サイトカイン、8-OHdG の増加が認められた。グルタミン酸代謝酵素の GAD の減少は、グルタミン酸、GABA 代謝のバランスの崩れを示唆するものと思われた。

3 まとめと課題

本研究では、ヒト発達障害の影響評価法として非侵襲 MR 測定を利用した方法を提案した。発達障害小動物モデルでの応答に対して、発達障害患者で得られる MR 指標で同様な応答が得られるのかという点に着目し、ヒト側からと動物側からのアプローチでそれぞれ研究を進めた。

ヒト側からのアプローチでは、形態情報、代謝物情報について測定法、測定プロトコル、後処理法、解析法の開発、改良を行った。形態情報に関しては、発達障害患者の白質体積に関して、前頭葉領域、紡錘状回などで特異性が示唆された。前頭葉領域は情動、紡錘状回は顔認知に関与していることが知られている。従って、この特異性は、発達障害との関連を示唆していると思われる。一方、ヒト脳内代謝物に関しては、ミオイノシトールでの差異は見出せなかった。この原因として、測定結果の健常人代謝物濃度のばらつきが大きいことが考えられる。被検者毎の代謝物濃度差が大きい可能性もあり得るが、測定側からの原因として、測定対象のボクセル内の感度不均一分布が影響していることも考えられる。このため、感度不均一分布を考慮した濃度換算法を開発する必要があると思われる。

動物側からのアプローチでは、発達障害ラットモデルを検討し、遺伝子改変モデルとして *Fmr1* KO と *Nlgn3* KO のそれぞれのモデルラットの導入、薬物投与モデルとして VPA 投与モデルの作製、導入を行った。それぞれのモデルラットに対して社交性行動試験、新規探索性行動試験を行い、自閉症様行動を示すことが確認できた。自閉症様行動を起こしたラットに対しては、動物用 MRI 装置を用いた高分解能全脳イメージングを行った。ヒト側からのアプローチで示唆された白質に関しては、特徴的な脳梁の抽出を行った。この結果、自閉症様行動を示したラットに関して、若干の減少を示し、この様子は、ヒト脳と同様であった。環境研で作製可能な VPA モデルに関しては、発達障害モデル脳を調べるため、自閉症に関連すると考えられている遺伝子発現、炎症、神経伝達物質のグルタミン酸代謝酵素の GAD についての分析を行った。この結果、VPA モデルラットでの、社交性に関連する遺伝子発現の減少など、自閉症様行動に合致する結果が得られた。この中でも、GAD の減少に関しては、MRI 装置での非侵襲測定対象であるグルタミン酸、GABA の代謝バランスに関連すると考えられるため、今後の非侵襲測定法開発に期待したい。

今後、前進型試験の化学物質曝露試験法とヒト発達障害への影響評価の繋がりを強化すべく、両アプローチで提案、開発した測定法、解析法などを一層発展させていきたい。

引用文献

- 1) Penny W., Friston K., Ashburner J., Kiebel S., Nichols T.: Statistical parametric mapping: The analysis of functional brain images 1st Edition, Academic Press (2006).
- 2) Dimond D., Shuetze M., Smith R. E., Dhollander T., Cho I., Vinette S., Eycke K. T., Lebel C., McCrimmon A., Dewey D., Connelly A., Bray S.: Reduced white matter fiber density in autism spectrum disorder, *Cerebral Cortex*, 29, 1778-1788 (2019).
- 3) Ugurbil K., Garwood M., Ellermann J., Hendrich K., Hinke R., Hu X., Kim S.G., Menon R., Merkle H., Ogawa S.: Imaging at high magnetic fields: initial experiences at 4T, *Magn Reson Q*, 9: 259-277 (1993).
- 4) Fischi B: *FreeSurfer*, *Nueuroimage*, 62(2), 774-781 (2012).
- 5) Frahm J., Bruhn H., Gyngell M.L., Merboldt K.D., Hänicke W., Sauter R.: Localized high-resolution proton NMR spectroscopy using stimulated echoes: initial applications to human brain in vivo, *Magn. Reson. Med.*, 9(1), 79-93 (1989).
- 6) Bottomley P.A.: Spatial localization in NMR spectroscopy in vivo, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 508, 333-348 (1987).
- 7) Gruetter R.: Automatic, localized in vivo adjustment of all first- and second-order shim coils, *Magn. Reson. Med.*, 29(6) 804-811 (1993).
- 8) Gasparovic G., Song T., Devier D., Bockholt H.J., Caprihan A., Mullins P.G., Posse S., Jung R.E., Morrison L.A.: Use of tissue water as a concentration reference for proton spectroscopic imaging, *Magn. Reson. Med.*, 55, 1219-1226 (2006).

- 9) Provencher S.W.: Estimation of metabolite concentrations from localized in vivo proton NMR spectra, *Magn. Reson. Med.*, 30(6), 672-679 (1993).
- 10) Hamilton S.M., Green J.R., Veeraragavan S., Yuva L., McCoy A., Wu Y., Warren J., Little L., Ji D., Cui X., Weinstein E., Paylor R.: *Fmr1* and *nlg3* knockout rats: novel tools for investigating autism spectrum disorders, *Behav. Neurosci.*, 128(2), 103-109 (2014).
- 11) Win-Shwe T.T., Nway N.C., Imai M., Lwin T.T., Mar O., Watanabe H.: Social behavior, neuroimmune markers and glutamic acid decarboxylase levels in a rat model of valproic acid-induced autism, *J. Toxicol. Sci.*, 43(11), 631-643 (2018).

[資料]

1 研究の組織と研究課題の構成

1.1 研究の組織

[A 研究担当者]

環境計測研究センター

画像・スペクトル計測研究室

渡邊英宏

環境リスク・健康研究センター

生体影響評価研究室

Tin Tin Winshwe

(注) 所属・役職は年度終了時点のもの。

[B 協力研究者]

高屋展宏 ((株) エンテックス)

(平成 27 ~ 29 年度)

1.2 研究課題と担当者

サブテーマ 1 ヒト発達障害に関するヒト MR 指標の探索

渡邊英宏

サブテーマ 2 発達障害小動物モデルからの取り組み

Tin Tin Winshwe

2 研究成果発表一覧

2.1 誌上発表

<雑誌>

発表者・(刊年)・題目・掲載誌・巻(号)・頁

Tin-Tin Win-Shwe, Nay Chi Nway, Motoki Imai, Thet Thet Lwin, Ohn Mar, Hidehiro Watanabe (2018). Social behavior, neuroimmune markers and glutamic acid decarboxylase levels in a rat model of valproic acid-induced autism. *J. Toxicol. Sci.*, 43 (11) 631-643.

Watanabe H., Takaya N., Mitsumori F.: (2015) Quantitation error in ^1H MRS caused by B1 inhomogeneity and chemical shift displacement at high B0 field. *Proceeding of 23rd Scientific Meeting of Intl. Soc. Mag. Reson. Med.*, 1949-1949.

Watanabe H., Takaya N., Mitsumori F.: (2015) Phasing and curve fitting of highly resolved 2D constant time PRESS spectra for quantitation of glutamate, GABA and glutamine. *Proceeding of 23rd Scientific Meeting of Intl. Soc. Mag. Reson. Med.*, 4730-4730.

Watanabe H., Takaya N.: (2016) Simultaneous absolute quantitation of glutamate and GABA on highly resolved 2D constant time PRESS spectra using 2D FT with shared time domain data. *Proceeding of 24th Scientific Meeting of Intl. Soc. Mag. Reson. Med.*, 4023.

Watanabe H., Takaya N. (2017) Quantitation error in ^1H MRS caused by B1 inhomogeneity and chemical shift displacement. *Magn Reson Med Sci., Magn. Reson. Med. Sci.*, 17 (3) 244-250.

Watanabe H., Takaya N.: (2017). Highly resolved ^1H decoupled spectroscopy with a shorter constant time delay using the 2D CT-PRESS with J refocusing. *Proceeding of 25th Scientific Meeting of Intl. Soc. Mag. Reson. Med.*, 5500.

2.2 口頭発表

発表者・(暦年)・題目・学会等名称・予稿集名・頁

Thet Thet Lwin, Yoneyama A, Tin-Tin Win-Shwe, Watanabe H, Imai M, Maruyama H, Huodo K, Takeda T (2017). Using phase contrast X-ray computed tomography imaging for valproic acid rat model of autistic brain. 10th World Congress on Developmental Origins of Health and Disease, Rotterdam, the Netherlands October 15-18. Abstract PO2.07.12 (Poster), page 381.

Thet Thet Lwin, Tin-Tin Win-Shwe, Motoki Imai, Watanabe H., Hiroko Maruyama, Tohoru Takeda (2018) Phase contrast X-ray tomography brain imaging of rat model autism. 46th Myanmar Health Research Congress. Yangon, Myanmar, January 8-12. Abstract Poster-22, page 120.

Tin-Tin-Win-Shwe, Chaw Kyi Tha Thu, Yadanar Moe, Fujitani Y., Tsukahara S, Watanabe H., Hirano S. (2015) Developmental exposure to diesel engine exhaust origin secondary organic aerosol on social behavior in adult mice. 8th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Society Congress, S-A178

Tin-Tin Win-Shwe, Fujitani Y., Watanabe H., Hirano S. (2016) Role of toll-like receptor 4 in diesel exhaust origin secondary organic aerosol-induced impaired spatial learning ability in neonatal mice. Society for Neuroscience 2016. San Diego, USA, November, Abstract Poster 740-02, page 61

Tin-Tin-Win-Shwe, Watanabe H. (2017) Social behavior and related gene expressions in fragile X mental retardation 1 (Fmr1) gene knockout and valproic acid (VPA)-induced autism rat models. 45th Myanmar Health Research Congress. Yangon, Myanmar, January 9-13. Abstract Poster-3, page 88.

Tin-Tin Win-Shwe (2017). Abnormal social behavior and alteration of neuroimmune biomarkers in the valproic acid-induced autism rat model. International Advisory Board, National Institute for Environmental Studies, Tsukuba, August 31. Abstract P-22

Tin-Tin Win-Shwe, Imai M, Nway NC, Lwin TT, Mar O, Maruyama H, Kawakami F, Watanabe H (2017). Alteration of social behavior and glutamic acid decarboxylase level in the valproic acid-induced autism rat model. 10th World Congress on Developmental Origins of Health and Disease, Rotterdam, the Netherlands October 15-18. Abstract PO2.07.15 (Poster), page 383.

Tin-Tin Win-Shwe, Motoki Imai, Nay Chi Nway, Thet-Thet-Lwin, Ohn Mar, Watanabe H. (2018). Expression of inflammatory markers and glutamic acid decarboxylase level in a rat model of valproic acid induced autism. 46th Myanmar Health Research Congress. Yangon, Myanmar, January 8-12. Abstract Poster-19, page 117.

Watanabe H., Takaya N., Mitsumori F.: (2015) Quantitation error in ¹H MRS caused by B1 inhomogeneity and chemical shift displacement at high B₀ field. 23rd Scientific Meeting of Intl. Soc. Mag. Reson. Med., 1949-1949.

Watanabe H., Takaya N., Mitsumori F.: (2015) Phasing and curve fitting of highly resolved 2D constant time PRESS spectra for quantitation of glutamate, GABA and glutamine. 23rd Scientific Meeting of Intl. Soc. Mag. Reson. Med., 4730-4730.

渡邊英宏, 高屋展宏, 三森文行: (2015) グルタミン酸、GABA、グルタミン定量化を目指した 2D CT-PRESS スペクトルの位相補正とカーブフィッティング. 第 43 回日本磁気共鳴医学会大会, 講演抄録集

高屋展宏, 渡邊英宏: (2015) 高磁場ヒト全脳画像の定量解析法の開発ーヒト脳各部位内の灰白質、白質分画解析. 第 43 回日本磁気共鳴医学会大会, 講演抄録集

渡邊英宏, 高屋展宏, Tin-Tin-Win-Shwe, 三森文行: (2016) 化学物質のヒト脳への影響評価を目指した MR 定量測定法の開発. 第 20 回マイクロイメージング研究会, 抄録集

渡邊英宏, 高屋展宏: (2016) 高分解 2D ¹H 定時間 MRS の開発ー時間領域データの共有再構成法を用いたグルタミン酸、GABA の絶対定量ー. 第 44 回日本磁気共鳴医学会大会, 講演抄録集

渡邊英宏, 高屋展宏, Tin-Tin-Win-Shwe, 三森文行: (2016) 化学物質のヒト脳への影響評価を目指した MR 定量測定法の開発. 第 55 回 NMR 討論会, 抄録集

渡邊英宏, 高屋展宏: (2017) ヒト ¹H MRS の安定したスペクトル測定に関して. 第 44 回日本磁気共鳴医学会大会, 講演抄録集

渡邊英宏, 高屋展宏: (2017) ヒト脳内のグルタミン酸、GABA、グルタミンの濃度定量を目指した ¹H デカップル MRS 法の開発. 第 45 回日本磁気共鳴医学会大会, 講演抄録集

国立環境研究所研究プロジェクト報告 第134号
NIES Research Project Report, No.134

(SR - 134 - 2019)

非侵襲 MR 測定を用いた化学物質のヒト発達障害への
影響評価法の提案と妥当性の検討に関する研究
平成 27 ~ 29 年度

Investigation on validity of the proposed evaluation method
on the effects of chemical substances to developmental disorders
using non-invasive MR measurements
FY2015 ~ 2017

令和 2 年 3 月 31 日発行

編 集 国立環境研究所 編集分科会

発 行 国立研究開発法人 国立環境研究所

〒305-8506 茨城県つくば市小野川 16 番 2

E-mail: pub@nies.go.jp

Published by the National Institute for Environmental Studies

16-2 Onogawa, Tsukuba, Ibaraki 305-8506 Japan

March 2020

組 版 株式会社 イ セ プ

〒305-0005 茨城県つくば市天久保 2 丁目 11-20

無断転載を禁じます

国立環境研究所の刊行物は以下の URL からご覧いただけます。
<http://www.nies.go.jp/kanko/index.html>