

ンセントを行い、同意が得られた人を健常対照者とした。

## 2. 血液採取

上述の自閉症性障害患者およびその両親、健常対照者から静脈血20ccを通常の方法で採血した。

## 3. DNAの抽出とセルライン化

得られた血液10ccから標準的な方法でDNAを抽出し、残りの10ccをEpstein-Barr virusによってリンパ球を形質転換し、セルライン化して保存した。

## 遺伝子解析

### 1. Notch 4遺伝子

Notch 4遺伝子領域には、すでに報告されているいくつかの遺伝的多型が存在する。今回はその中で統合失調症との相関が報告された5つの遺伝的多型((TAA)n, SNP1, SNP2, (CTG)n, (TTAT)n)について、genotypingを行った(Wei J, Nat Genet., 25(4), 376-7, 2000)。この遺伝子に関しては自閉性障害患者(n=95)と健常対照者(n=95)のサンプルを用いた患者・対照相関解析を行った。

### 2. Serotonin transporter遺伝子

Serotonin transporter遺伝子領域にはすでに自閉性障害との相関解析が報告されている遺伝的多型が存在する。今回はこの遺伝子のpromotor領域に位置し、遺伝子の発現に関与しているVariable Number of Tandem Repeat polymorphismの5-HTTLPRについて、既存の方法に基づき、genotypingを行った(Klauck SM et al., Hum Mol Genet, 6(13), 2233-2238, 1997)。この遺伝子に関しては自閉症性障害患者とその両親(n=104 trios)のサンプルを用いた連鎖不均衡伝達テストを行った。

### 3. 統計学的解析

Notch 4 遺伝子については allele frequencyをClump v. 1.6を用いて患者・対照間で比較し、Serotonin transporter 遺伝子についてはtransmitted allele と Non-transmitted alleleをMcNamer's  $\chi^2$  valueを算出し有意差検定を行った。

## (倫理面への配慮)

本研究は平成13年3月28日に文部科学省・厚生労働省・経済産業省から出された「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に沿って設立された東海大学医学部「医の倫理委員会」の承認をすでに受けている。

## C. 研究結果

### 1. Notch 4遺伝子について

#### 1) (TAA)n

	p-1	p-2	p-3
A. D.	5	29	94
C	1	32	95

	p-4	p-5	p-6
	5	11	18
	5	9	29

	p-7	p-8
	19	3
	14	3

A. D. : Autistic Disorder (n=92)

C : Control (n=94)

T1=6.3092 in 10,000 simulations  
p=0.5148

#### 2) SNP1

	C allele	T allele
A. D.	125	65
C	119	71

A. D. : Autistic Disorder (n=95)

C : Control (n=95)

T1=0.4122 in 10,000 simulations  
p=0.5953

#### 3) SNP2

	A allele	G allele
A. D.	80	110
C	90	100

A. D. : Autistic Disorder (n=95)

C : Control (n=95)

T1=1.0644 in 10,000 simulations  
p=0.3610

#### 4) (CTG)n

	p-1	p-2	p-3	p-4
A. D.	29	68	79	14
C	31	71	75	13

A. D. : Autistic Disorder (n=95)

C : Control (n=95)

T1=0.2723 in 10,000 simulations  
p=0.9696

5) (TTAT)n

	p-1	p-2	p-3
A. D.	0	1	109
C	1	2	116

	p-4	p-5
	73	7
	62	5

A. D. : Autistic Disorder (n=95)  
C : Control (n=93)

T1=2.7385 in 10,000 simulations  
p=0.6409

上に示したようにNotch 4遺伝子の5つの遺伝的多型において自閉性障害と健常対照者との間には有意差が認められなかった。

2. Serotonin transporter遺伝子  
Genotype

	S/S	S/L	L/L
Patients (n=104)	61	33	10
Fathers (n=104)	61	39	4
Mothers (n=104)	62	36	6

S: Short allele (14 VNTR)  
L: Long allele (16 VNTR)

Allele Frequences

	S	L
Patients (n=104)	0.74	0.26
Fathers (n=104)	0.77	0.23
Mothers (n=104)	0.77	0.23

Transmission Disequilibrium Test (TDT)

Transmitted	Not Transmitted	
	S	L
S	123	31
L	44	10

McNamer's  $\chi^2 = 1.92$   
p=0.17

上記のようにSerotonin transporter遺伝子の遺伝的多型はTDTでは連鎖不均衡を示さなかった。

D. 考察  
Notch 4遺伝子はNotch familyに属し、

中枢神経系の発達制御に関与する複数の報告がなされている。また、この遺伝子と統合失調症との相関が近年になって報告されており、従来からいわれている統合失調症と自閉性障害との症状レベルの類似性から考えても、自閉性障害の原因候補遺伝子のひとつと考えられる。しかし、今回のわれわれの結果では明らかな相関は認められなかった。Notch 4遺伝子解析上の問題として、①患者・対照相関解析であり、population stratificationの影響を受けている可能性があること、②サンプル数が少ないことなどが考えられた。これらに対し、今後はサンプル数を増やすことやFamily basedのassociation studyを行う必要があると考えられた。

また、自閉性障害患者の約25%で血中Serotonin濃度が上昇しているという報告がなされており、この神経伝達物質が感情・不安・衝動性など多くの精神症状と関連している事実から考えても、Serotoninに関連する遺伝子は自閉性障害の原因候補遺伝子である。実際、今日までにSerotonin transporter遺伝子のpromotor領域に存在する5-HTTLPRと自閉性障害に関する報告は数多く混沌としている。今回、初めてわれわれはJapanese populationを用いて、この遺伝的多型と自閉性障害との連鎖不均衡伝達テストを行った。結果として、明らかな連鎖不均衡は認められなかった。しかし、最近になりこの遺伝子は重症度と相関があるとの報告 (Tordjman S et al., Mol Psychiatry, 6(4), 434-439, 2001) もあり、今後は表現型としての臨床症状や行動面での違いなどとの相関を再検討していく必要があると考えられた。

#### E. 結論

今回のわれわれの結果はNotch 4遺伝子、Serotonin transporter遺伝子と自閉性障害との相関を支持しなかった。

今後はこのような形での相関解析以外に、未知なる原因候補領域を特定していく必要があるものと考えられ、Genome wideな解析を家系 (大家系または両親と患者というtrios) を用いて行う必要があるものと考えられた。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Sato S, Yamazaki K, Yamamoto K et al.:  
Notch4 gene polymorphisms are not  
associated with autism in Japanese  
population. Am J Med Genet (submitted)

2. 学会発表

- 1) 山本賢司, 山崎晃資, 佐藤慎子, 小石誠二, 安枝三哲, 朝倉 新, 渥美真理子, 猪股丈二, 猪子英俊, 松本英夫:  
NOTCH4 遺伝子の遺伝的多型と自閉症との関連について. 第 25 回日本生物学的精神医学会(2003)にて発表予定
- 2) 佐藤慎子, 山崎晃資, 山本賢司, 小石誠二, 安枝三哲, 朝倉 新, 渥美真理子, 猪股丈二, 猪子英俊, 松本英夫:  
日本人集団におけるセロトニントランスポーター遺伝子プロモーター領域の遺伝的多型 (5-HTTLPR) と自閉症との関連について. 第 25 回日本生物学的精神医学会(2003)にて発表予定

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

特になし。

2. 実用新案登録

特になし。

3. その他

特になし。

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）  
分担研究報告書

分担研究 自閉症圏障害の診断と評価に関する研究

分担研究者 金生由紀子 北里大学大学院医療系研究科発達精神医学助教授

研究要旨

生物学的研究との関連で自閉症圏障害（Autism Spectrum Disorders: ASD）の診断と評価について文献的にレビューした。ASDの概念の広がりに対応して、行動症状が軽度で精神遅滞がないASDの範囲を明確に捉える必要がある。典型的な症状や精神遅滞を有する自閉症とそうでないASDとは病因的に異なる可能性があるためそれらを弁別する評価法も必要である。我が国で現在使用可能な小児自閉症評価尺度（Childhood Autism Rating Scale: CARS）及び小児行動質問表改訂版（Child Behavior Questionnaire Revised: CBQ-R）は自閉症の診断手段として有用だが、広がったASDの範囲全体を捉える点では不十分で、さらなる検討が必要と思われた。

A. 研究目的

最近では、自閉症及びその近縁の疾患が共通する傾向を有して一つのスペクトラムを形成するとの考えが広がり、自閉症圏障害（ASD）と呼ばれている。ASDは行動に連続性があるが“単一疾患”とは言いがたい。予防や治療法の開発に繋がる生物学的研究を目指すにあたっては、範囲や行動表現型を明確にして臨床特徴と生物学的所見との関連を検討する必要がある。そこで、ASDの診断と評価について検討して、実際に使用可能な方法に考察を加えた。

B. 研究方法

生物学的研究との関連を念頭に置き、自閉症あるいはASDの診断と評価に関連する内外の先行研究を文献的に検討した。共同研究施設で使用中の評価法自体も検討対象とした。

C. 研究結果

1. ASDをめぐる最近の動向

最近では自閉症は従来の報告よりも頻度が高く精神遅滞を伴う割合が低いと示唆されている。このような変化には、ASDの概念の広がりに加えて、ASDの診断や評価の方法の洗練化、ASDに関する情報の普及などの関連が指摘されている。

2. ASDの概念の広がりと生物学的研究

軽度の自閉症的な行動特徴が、広義の自閉症表現型（broader autism phenotype）として検討されている。自閉症の親族で広義の自閉症表現型を検討すると、高機能（＝精神遅滞のない）、多発（＝複数の自閉症がいる）家系で特に高頻度との報告もある。

3. 診断と評価の実際

自閉症状の定量化が英米を中心に試みられているが、ASD内の弁別は十分とは限らない。我が国で現在使用可能で妥当性が示されている評価法に以下がある。

1) 小児自閉症評価尺度（CARS）

ノースカロライナ州のTEACCHプログラムで、自閉症児と非自閉症の発達障害児との区別のために開発された。対人関係、模倣などの15項目について評定する。我が国の小児で、ASDと非ASDの精神遅滞とのカットオフ値、ASD内で自閉症と非定型のASDとのカットオフ値が示されている。

2) 小児行動質問表改訂版（CBQ-R）

自閉症の三主徴に関する19項目、三主徴以外でしばしば随伴する行動症状に関する13項目からなる32項目について問う。我が国の小児で、ASDと非ASDの精神遅滞とのカットオフ値が示されており、ASD内で自閉症と非定型のASDの得点に有意差を認めた。

4. ASDの行動表現型

広義の自閉症表現型として、対人認知または社会認知、発達水準を勘案した言語や認知構造なども手がかりになる可能性がある。最近の家族研究や遺伝子解析ではより均質な対象を得ることを視野に入れて行動症状の検討がされており、精神遅滞、言語発達、反復的で常同的な行動について対象の絞込みに有用であったとの報告がある。

D. 考察

行動症状が軽度で精神遅滞がないASDの範囲を明確に捉える必要がある。典型的な症状や精神遅滞を有する自閉症とそうでないASDとを弁別する評価法も必要である。CARS及びCBQ-Rは自閉症の診断手段として有用だが、高機能ASD、広義の自閉症表現型の評価には不十分と思われた。他の発達障害や人格障害などとの鑑別に留意しつつ広範囲のASDまで評価する方法の追加を検討したい。発達水準、言語、反復的で常同的な行動、適応を妨げる感覚の異常や攻撃行動などの評価の整備も必要と思われた。

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）  
（分担）研究報告書

自閉症の発症機序 に 関与する環境要因に関する研究  
（分担）研究者 定松 美幸 東京大学保健管理センター 講師

研究要旨

近年の自閉症発症率の増加に環境ホルモンが関与している可能性について、ヒト臍帯や乳歯中に含まれる環境ホルモン等の測定法を確立した。今後は自閉症児と対照となる健常児からの検体を増やして検討する予定である。その第1歩として、自閉症児の患者会に向けたパンフレットに「検体提供についてのお願い」を加え、理解を求める機会を作った。動物モデルについては、より均一な動物を得られるノックアウトマウスを入手し、今後詳細な行動解析と行動異常の治療について実験を行う。

A. 研究目的

近年自閉症の発症率が増加していることに、内分泌かく乱物質や環境汚染からくる微量重金属が関与しているのではないかという仮説を検証する。胎内環境を臍帯や乳歯に含まれる微量重金属の測定によって推測し、その後の経過と照合することで胎内環境と自閉症発症について検討する。乳歯（前歯）は母親の胎内中で形成されるため、胎内環境を反映するよい検体と考えられる。また、自閉症の発症率と相関を検討されたことはないが、新生児の出生時スクリーニングで高TSH血症を示し、再検査を要する新生児が増えていることに注目し、動物モデルを用いて行動解析と治療方法を検討することを最終目標とする。

B. 研究方法

- ・臍帯に含まれる PCB や農薬などの分析については、高分解能 GCMS、四重極 GCMS を用い、正常被験者から採取した30-40年経過した臍帯について検討した。乳歯（前歯）については、新たに開発したレーザーアブレーション誘導結合プラズマ質量分析法（LA-ICPMS）を用いた。
- ・動物モデルについては、開始当初は人工的に甲状腺ホルモン合成酵素阻害剤を妊娠ラットに投与し、胎内で低甲状腺ホルモン状態において作成したモデル動物を予定していた。その後甲状腺ホルモン受容体のノックアウトマウスが開発されたことが判明し、遺伝的に均一なモデルを作成することがより確実であることから、このノックアウトマウスを使用することとした。

（倫理面への配慮）

臍帯や乳歯の提供に際しては、文書および口頭で担当者から十分に説明し、文書で同意を得た上で行った。このプロジェクトは東京大学医学部倫理委員会の承認をすでにえている。動物実験に際しては、日本神経科学学会の定める動物実験指針に従う。

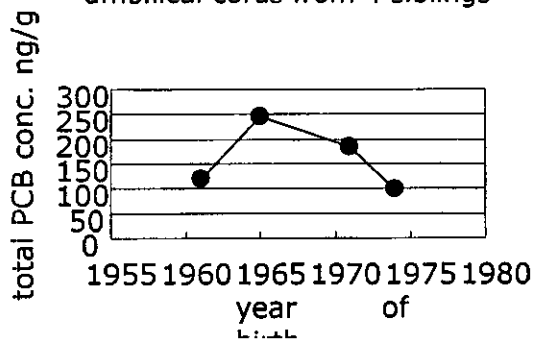
C. 研究結果

臍帯、乳歯に含有される PCB や微量重金属の測定は、正常被験者から得られた検体について、測定可能であることを明らかにした。（別紙 図 1, 2 参照）動物モデルについては、甲状腺ホルモン $\alpha$ および $\beta$ 受容体ノックアウトマウスを入手し、現在系統を維持するために個体数を増やしている段階である。 $\beta$ 受容体のノックアウトマウスについては繁殖力が落ちており、戻し交配が必要であることから、行動解析に必要な個体数がそろいうまで数ヶ月を要する状況である。

D. 結論

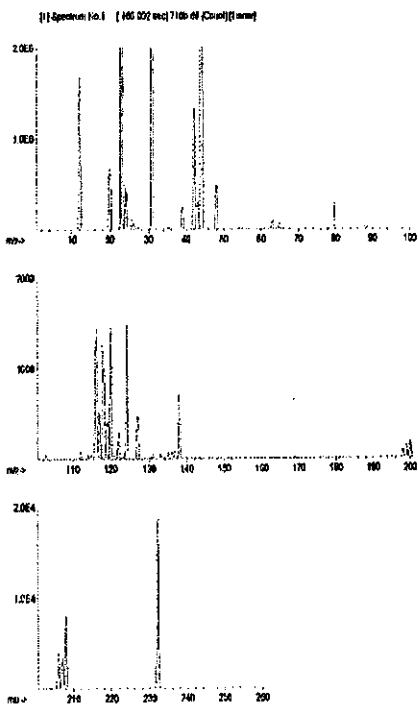
臍帯、乳歯中に含まれる内分泌かく乱物質および微量重金属の測定については、今後自閉症児の検体を得て測定にかかる準備が整ったと考える。動物モデルについては、個体数がそろい次第、行動解析を開始する。

Total PCB concentrations in the umbilical cords from 4 siblings



☒ 1

ICP mass spectrum



☒ 2

平成 14 年度厚生労働科学研究費補助金（こころの科学研究事業）  
分担研究報告書

分担研究者 立花克彦 神奈川県立こども医療センター小児科部長

分担研究：先天性甲状腺機能低下症新生児マススクリーニング陽性者における自閉症頻度の検討

### 研究要旨

自閉症発症に胎児期、新生児期の甲状腺機能が関係しているか否かを検討するため、二種類の調査を計画した。すなわちすでに自閉症と診断された小児の新生児期の甲状腺機能の調査と、胎児期、新生児期に甲状腺機能低下が存在した可能性のある小児の追跡調査である。本年度はいたずらに保護者などの不安を高めずにいかに調査を行うかについて、及び得られるデータの問題点について検討した。

### 研究目的

抗甲状腺薬を投与されたマウス母体から生まれた仔ラットにヒトでの自閉症様の症状を認めることより、胎児期、新生児期の甲状腺機能低下が自閉症発症にかかわっているのではないかとの推測がある。また、自閉症は近年その頻度が著しく増加しているとされ、いわゆる環境ホルモンとの関連も示唆されているが、一方で、これら環境ホルモンは新生児甲状腺機能にも影響しているのではないかとする意見もある。このため、新生児マススクリーニングでの甲状腺機能検査結果を利用し、自閉症発症と胎児期、新生児期の甲状腺機能の関連を検討することとした。

### 研究方法

1) すでに自閉症と診断されている小児の新生児マススクリーニングでの濾紙血 TSH 値、T4 値を調査し、一般小児の結果と差があるかどうかを検討する。

2) 新生児マススクリーニングで甲状腺機能について要精密診査となった小児について、現在の状況を調査し、マススクリーニング及び精密診査時の甲状腺機能検査結果、診断との関連を検討する。

本年度はこれらの調査を実際にいかに実施するか、また結果の解析についての問題点などについて検討した。

### 研究結果

1) の方法について検討した。この研究のためには小児精神科外来などで自閉症とすでに診断されている小児について、保護者の同意を得た上で新生児マススクリーニングでの結果を調査する。この方法は保護者の同意を得るのは比較的容易であると思わ

れ、またいたずらにその不安をかきたてることは無いと思われる。しかしながら、いくつかの問題点がある。ひとつには新生児マススクリーニングは自治体ごとに行われているが、異なった検査機関でのデータはそのまま比較することが可能なほど正確な測定ではない。そのためさしあたって神奈川県で出生した小児のみを対象とするが、それでもスクリーニングという性格上、測定値を数値として統計的に検討することにはその測定精度から見て無理がある。同時にスクリーニングをうけた対象全体の平均、分布などとの比較で検討することになる。また、この方法でどの程度の症例数を集められるかも問題である。症例を集めるために複数の施設で診断されている小児を対象とすると、その診断の一貫性も検討する必要が出てくる。

次に2)の研究である。この対象はスクリーニングで要精密診査となった小児であるので、新生児期の甲状腺機能はかなり正確に判明する。そして胎児期、新生児期の甲状腺機能の状態もある程度判定可能である。われわれの施設で精密診査を受けたものをまず対象として、現在の状況についてアンケート調査を行い、希望のある場合には心理判定なども行う。アンケートとしてはCBCLが適切かと考える。

ここで大きな問題は、いかに保護者の不安をかきたたずにこの調査を行うかであり、調査についての説明、同意取得の文案を作成中である。また、保護者が対象児の行動に何らかの不安を持っている場合には調査に協力する動機が高くこの意味でバイアスが生ずる危険性が除外できない。

これらの点について検討し次年度では実際の調査を開始する予定である。

## 研究成果の刊行に関する一覧表

著者	題名	雑誌	巻号	頁	年
朝倉由美、安達昌功、立花克彦	新生児甲状腺機能におよぼすヨード過剰の影響	日児誌	106(5)	644	2002
Y Asakura, K Tachibana, M Adachi, S Suwa, and Y Yamagami	Hypothalamo-pituitary hypothyroidism detected by neonatal screening for congenital hypothyroidism using measurement of thyroid-stimulating hormone and thyroxine	Acta Paediatr	91	172	2002
Kano Y, Leckman JF, Pauls DL	Clinical characteristics of Tourette syndrome probands and relatives' risks	J Am Acad Child Adolesc Psychiatry	41(10)	1148-1149	2002
金生由紀子	注意欠陥/多動性障害	精神科	1(1)	64-68	2002
金生由紀子	軽度発達障害	精神科	1(3)	261-264	2002
金生由紀子	高機能自閉症圏障害	精神科	1(5)	427-431	2002
米田衆介、金生由紀子	Tourette症候群の遺伝子解析の動向	分子精神医学	2(4)	359-365	2002
金生由紀子	トゥレット症候群	精神科	2(1)	97-100	2003



20020846

以降は雑誌/図書に掲載された論文となりますので、  
別紙5の「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。