

自閉症の原因解明と予防・治療法の開発

一分子遺伝 環境・機能画像のからのアプローチ

分担研究者 松本 英夫 東海大学医学部精神科学部門 助教授

研究要旨

高機能広汎性発達障害5名と、健常者 10 名を対象に、錯視のタスクを用いて fMRI による視覚認知に関する研究を行った。その結果、錯視の正解率では両群間に差を認めなかったが、脳の活性化を示す相関係数では自閉症群で  $p < 0.0001$  で有意に高い結果となった。すなわち、自閉症群では相関係数が 0.5 から 0.7 と非常に高い活性化を示し、視覚連合野と前頭前野を含む広い領域で活性化が認められたが、健常群では相関係数は 0.2 程度であり、領域も一次視覚野と、前頭葉の一部に限局していた。以上より、自閉症群ではかなりのエネルギーと、より脳の広範な領域を使って、健常群と同様の正解率を獲得としたと考えられる。

A 研究目的

現在までの自閉症に関する fMRI 研究は高機能を対象に theory of mind に基く表情認知などの研究が中心であった。一方、自閉症者では健常者に比べて錯視

(illusion) が生じにくいという報告がなされている (Happé 1994) が、PET や fMRI など脳の機能との関連での報告はない。今までは自閉症で欠陥のある機能と対応する脳内の活動を中心に研究が進められてきたが、図形の認知や記憶など自閉症で突出して優れている機能に焦点を当てることも自閉症の脳機能の解明に寄与すると考えられる。

B 研究方法

対象

① 18 歳以上で WAIS-R が 85 以上の高機能広汎性発達障害（高機能自閉症アスペルガー障害、診断は DSM-IV） 5 名

② 性別、年齢、WAIS-R、educational level をマッチングし、精神医学的な障害の存在や既往のない健常者 10 名

③ 全員右利きとする。

④ 研究への参加の同意は文書にて頂く。

方法

① 東海大学医学部附属病院 MRI センターの 1.5T Philips 社製 MRI 装置を使用。② MRI 装置内に横たわった被験者に錯視のタスクが映し出されるスクリーンを見て頂く。

- ③ on/off box-car design にてタスクを呈示し、「左右のどちらか大きいか、あるいは同じに見えるか」を判定し手元のボタンを押して頂く（押す回数かそれぞれ 1, 2, 0 回）。
- ④ offでは背景だけかスクリーン上に映し出される。

#### （倫理面への配慮）

本研究は2003年11月に開催された東海大学医学部倫理委員会にて承認を受けている。またデータは精神科内の鍵のかかる場所に管理し、結果を発表する時にはグループ間の比較の結果として提示されるため個人の同定はできない。

### C. 研究結果

錯視の正解率では両群間に差を認めなかったが、脳の活性化を示す相関係数では自閉症群で  $p < 0.0001$  で有意に高い結果となった。すなわち、自閉症群では相関係数が 0.5 から 0.7 と非常に高い活性化を示し、視覚連合野と前頭前野を含む広い領域で活性化が認められたか、健常群では相関係数は 0.2 程度であり、領域も一次視覚野と、前頭葉の一部に限局していた。

### D 考察

- 1 自閉症群では健常対照群に比べて、タスクに対して強い緊張感を持ってターゲットをしっかりと見つめて望んで

おり、それによって与えられたタスクをより良く遂行しようとしていた、と考えられる。

2

スクに対する“慣れ”も自閉症群では生じていなかったと考えられる。

### E 結論

以上より、自閉症群ではかなりのエネルギーと、より脳の広範な領域を使うことによって、健常対象群と同程度の正解率を獲得することかてきたと考えられる。

## 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

自閉症圏障害 (Autism Spectrum Disorders ASD) の診断と評価について発達の観点から文献的検討を行うと共に、小児行動質問票改訂版 (Child Behavior Questionnaire Revised CBQ-R) による ASD の行動症状の評価を発達水準との関連で検討した。幼児期後期以降は発達の経過中で ASD の診断は変わらないか下位分類間の移行についてさらに検討が必要と示唆された。ASD 37 名 (平均 9 歳 2 歳) の CBQ-R のデータ解析から、基本的な関係の概念が確実な段階に達すると、CBQ-R 得点が cut-off 値以下か 6 名中 5 名で、それ以下の発達水準と自閉症状が大きく異なっていた。ASD の基本症状を発達の経過や発達水準にかかわらず評価することが重要と確認された。

### A 研究目的

自閉症及びその近縁の疾患は行動特徴に連続性があるとして自閉症圏障害 (ASD) とまとめられるようになったか、その範囲や行動表現型について、生物学的研究のためにもさらに検討を進める必要がある。そこで、ASD の診断と評価について発達の観点から文献的検討を行うと共に、小児行動質問票改訂版 (CBQ-R) による ASD の行動症状の評価を発達水準との関連で検討した。

### B 研究方法

1 文献的検討 発達をキーワードにして ASD の診断と評価に関連する最近の研究を文献的に検討した。

2 CBQ-R のデータ解析 ASD 37 名 (平均 9 歳 2 歳, SD 3 9 歳, 男 31, 女 6) の CBQ-R のデータを発達水準との関連で検討した。DSM-IV では 37 名中 34 名が自閉性障害であった。CBQ-R は、32 項目からなる行動症状の評価であり、親などの対象と密に接している者が「目立たない」から「非常に目立つ」の 4 段階で評価した。

### C 研究結果

#### 1 文献的検討

自閉症の診断基準を満たさないか自閉的傾向のある発達性言語遅滞/障害の小児 (平均 4 歳 4 ヶ月) を 4 年間追跡すると、言語障害が改善しても ASD の範囲内であったという (Michelotti, et al, 2002)。また、高機能自閉症及びアスペルガー症候群の小児 (6~8 歳) を 2 年間追跡すると、自閉症ではアスペルガー症候群より意志伝達の症状が有意に減少する一方、アスペルガー症候群では自閉症より対人的相互反応の症状が有意に増加する傾向があったとされる (Stall, et al, 2003)。とはいえ、全体としてはアスペルガー症候群の方が自閉症よりも症状は少なかったという。

#### 2 CBQ-R のデータ解析

37 名中 35 名で表象機能の発達水準を測る太田の Stage 評価を実施しており、Stage I が 7 名、Stage II が 2 名、Stage III<sub>1</sub> が 5 名、Stage III<sub>2</sub> が 6 名、Stage IV が 9 名、Stage V 以上が 6 名であった。また、31 名で知能指数 (IQ) を測定しており、平均 61.2 (SD 26.0、範囲 14~116) であった。

CBQ-Rで「少し目立つ」以上の「有り」を1点とすると13/14点か自閉症と非自閉症とのcut-offになるとの先行研究もあり（井筒ら，2001）、37名中28名（75.7%）が14点以上で自閉症と判定された。Stage評価別に平均点をみると、StageIで19.0、StageIIで24.5、StageIII<sub>1</sub>で20.6、StageIII<sub>2</sub>で16.7、StageIVで19.8、StageV以上で7.8であり、有意差があった（ $p=0.003$ ， $\chi^2$ 検定）。StageIII<sub>1</sub>以下は全員が14点以上であったか、StageIII<sub>2</sub>（平均IQ 62.7）で6名中4名、StageIV（平均IQ 68.7）で9名中8名、StageV以上（平均IQ 90.5）で6名中1名であった。StageV以上で「有り」の割合が最も高かった項目は“言葉の発達が遅れている”“持続的で安定した人間関係を保つことが難しい”で、6名中4名で認めた。

#### D. 考察

文献的検討から、幼児期後期以降は発達の経過中でASDの診断は変わらないが症状がかなり変動しており下位分類間の移行についてさらに検討が必要と示唆された。

CBQ-Rのデータ解析から、StageV以上で基本的な関係の概念が確実なASDはそれ以下の発達水準と自閉症状が大きく異なっていた。その場合でも“持続的で安定した人間関係を保つことが難しい”は高率で、ASDの基本症状を発達の経過や発達水準にかかわらず評価することか重要と確認された。

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

自閉症モデル動物の発生および発達における甲状腺ホルモンの関与に関する研究

分担研究者 定松美幸 滋賀医科大学医学部精神医学講座 講師

A 研究目的

甲状腺ホルモンは哺乳類の発生、発達に必須である。甲状腺ホルモン欠乏症が心身ともに発達遅滞を引き起こすことは古くから知られている。最近、新生児で出生時甲状腺刺激ホルモン濃度がわずかに高値を示す例、すなわち胎生期にこく軽症の甲状腺ホルモン低下症にあったと思われる例が全国的に増えているという。一方で自閉症児の発症率は先進諸国で右上がりの上昇を続けている。すなわち、甲状腺ホルモンのわずかな不足と自閉症発症の間に関連性があるのではないかという仮説を動物モデルを使って検証するというのが当初の目的である。

研究者はすでに出生直後に低甲状腺ホルモン状態においた仔ラットが、成熟後に多動、学習障害、聴原性てんかんを初めとする音過敏性を示すことを報告し、この動物が自閉症モデルとなりえるのではないかと提唱している。このモデルと最近、開発された甲状腺ホルモン受容体ノックアウトマウスを動物モデルとして使用し、検討した。

B 研究方法

自閉症モデル動物として、1) プロピオチオウラシル(PTU)を出生直後から離乳期まで母ラットに飲ませて低甲状腺ホルモン

状態においた仔ラットと 2) 甲状腺ホルモン受容体ノックアウトマウス(TRKO) の2種類を用意した。TRKO は $\alpha$ 、 $\beta$ それぞれを信州大学医学部老年内科橋爪教授から譲り受け、業者委託してF1, F2世代を作成した。PTU濃度を0.02%と低めに設定した。PTUラットについては、生後7,14, 21日めに灌流固定して脳を取り出

して組織学的検討に供した。TRKO については、生後5週令に達した時に行動実験を行い、その後同様の方法にて脳検体を作成した。組織学的検討については、アポトーシスを主に検出するTUNEL法による細胞死の経時的変化の検討と、脳胞分化にかかわり領域特異性のオーガナイザーとして特定された遺伝子のノグナル分子であるFGF8, Pax6 とセロトニンニューロンの分化にかかわるWnt1の免疫組織化学を行った。(倫理面への配慮)動物実験に際しては、日本神経学会の「神経科学における動物実験に関する指針」に従い、滋賀医科大学動物実験倫理委員会の承認を得ている。

C 研究結果

行動実験は、今回はTRKO $\alpha$ に限定して行い、オープンフィールドテストでhomoTRKOかheteroTRKOに比較して有意に多動であったことが確認できた。

組織学的検討についてであるが、小脳の全体的な構築について、クレシルハイオレット染色により、PTU ラットでは小脳虫部、葉部ともに分化が遅れており、容積も小さいことがわかった。また小脳葉髄質の形成も悪かった。しかし、これは体重差を反映したものとも考えられる。TUNEL 法により検討した細胞死については、PTU ラットでは、脳幹のオリブ核と青斑核付近、小脳葉のプルキンエ細胞層に出現するアポトーシスに遅れが見られた。

免疫組織化学では、視蓋の決定因子といわれる Fgf8 は特に小脳において PTU ラットで発現時期の遅れと発現量の減少が目立った。同様に胎生期の発生にかかわる Wnt1, Pax6 などについても PTU ラットの小脳と脳幹において同様の結果となった。TRKO  $\alpha$  については、逆に対照群とした週令をあわせた wild type より小脳プルキンエ細胞層と橋部において、Wnt1 Fgf8 ともに発現が増加していた。またパイロットとして行った TRKO  $\alpha$  の電子顕微鏡による細胞内微細構造の観察で、海馬 CA1 錐体細胞のミトコンドリアの形態異常と、異常封入体の存在を認めた。

#### D. 考察

TRKO  $\alpha$  の行動異常については、今回オープンフィールドのみであり、多動は確認できたものの、PTU ラットで見られたような固執、学習障害については今後の検討課題として残っている。TRKO  $\beta$  については同じ系列の TRKO を使ってすでに他施設から行動異常を認めないという報告が出されており、それを考慮に入れると  $\alpha$  と  $\beta$  とて行動異常に違いがあるという結論になるが、

その機序はまた明らかでない。今後の検討課題である。

組織学的検討については、現時点では PTU ラットの主として小脳で部位特異性、発現時期特異性のある転写因子の発現時期の遅れと発現量の減少を認めた。今回検討したのは、PTU か母乳を通して投与されていた期間中の経時的变化であるか、少なくとも仔ラットの低甲状腺ホルモン状態とこれら因子の発現の間に何らかの関係があると考えることができよう。胎生期に甲状腺ホルモンを抑制した結果、脳内セロトニン、トパーミンの代謝が変化した、あるいはミトコンドリア内酵素活性が減少した、などこれまでにさまざまな報告が認められる。今回、胎生期の脳胞形成に直接かかわる因子が甲状腺ホルモン欠乏によって変化していることが明らかになり、この結果は、小脳のマクロあるいはミクロの構築異常に直接結びつくものである可能性が高いと考える。今後はこれらの転写因子と成長後の行動異常あるいは自閉症に認められる脳幹の微細構造異常や髄鞘形成異常などについて検討する予定である。

#### E 結論

今回、TRKO  $\alpha$  が自閉症モデルとして有用である。可能性の一端を明らかにした。また、PTU ラット脳を用いて、成熟後の脳微細構造の異常に結びつく因子の一部を確認した。

胎児期から新生児期にかけての甲状腺機能と精神発達との関連に関する研究  
先天性甲状腺機能低下症マスキング陽性児の情緒と行動の問題評価

分担研究者 立花 克彦 神奈川県立こども医療センター・内分泌代謝科 部長  
研究協力者 朝倉 由美 神奈川県立こども医療センター・内分泌代謝科

研究要旨

胎児期から新生児期にかけての甲状腺機能低下か自閉症・ADHD 発症と関連するかを検討する目的で、神奈川県での新生児先天性甲状腺機能低下症マスキング陽性児の情緒と行動の問題を Child Behavior Checklist/4-18 を用いて評価した。今回対象となった甲状腺機能低下症マスキング陽性児の CBCL 各尺度得点は一般群に比べて高いということはなく、内向尺度、外向尺度、総得点の何れをとっても臨床域（含む境界域）となった割合はマスキング陽性者と一般群で差がなかった。マスキング TSH 値および初診時 TSH・FT4 値と CBCL 総得点 SD score の間にも相関は認められなかった。

今回の結果からは、胎児期から新生児期早期にかけての甲状腺機能低下かこれらの精神発達に影響することを確認することはできなかった

A 研究目的

先天性甲状腺機能低下症では、胎生期あるいは新生児期からの甲状腺ホルモンの不足により、無治療で経過すると神経学的・身体的な発育・発達が障害されることはよく知られている。現在では、新生児マスキングにより早期に発見され治療されることにより、これらの予後が画期的に改善した。身体的発育は標準と差がなく、また神経学的発達においても、IQ の評価では知的発達はおおむね良好とされている。

一方、マウスでは胎生期からの甲状腺ホルモンの不足が仔の行動発達異常を引き起こすと報告されている 1)。また、ヒトで

は母体の甲状腺機能低下は軽度であっても児の発達に影響することが報告されており 2)、胎生期から新生児期にかけての甲状腺機能か精神・神経発達に作用することか考えられる。私達も早期から治療された例、あるいは低下の程度が軽度のため治療が必要とされなかった例でも、後に学習障害、自閉傾向等を呈する子供を経験することかある。これらの点から、胎生期・新生児期の甲状腺機能低下か自閉症・ADHD の原因となり得るのではないかと危惧される。今回私達は、新生児先天性甲状腺機能低下症マスキング陽性児の情緒と行動の問題を評価することにより、胎児・新生児期の甲状腺機能低下と自閉症・ADHD 発症

との関連を検討した。

## B 研究方法

胎生期・新生児期の甲状腺機能低下の関与を検討するため、胎生期から新生児期にかけ甲状腺機能の低下かあったことか疑われるマススクリーニング陽性児を対象に、情緒と行動の評価を行った。情緒と行動の評価は Child Behavior Checklist/4 18 (以下 CBCL/4-18) 3)4)を用いた。CBCL/4 18 は Achenbach TM らによって開発された子供の情緒と行動の問題を包括的に評価するチェックリストである。現在、58 の言語に訳されて、研究や臨床の場で国際的に広く用いられている。CBCL/4 18 は表 1 に示す 8 つの症状尺度と二つの上位尺度である内向尺度と外向尺度から構成されている。その尺度構成は国や文化の違いを超えて一貫性があり、その信頼性や妥当性はいくつかの国で検討されている。しかし、標準値は国によって異なり、各国のこども達を対象とした標準化が必要と考えられる。日本では、国立精神・神経センターの上林らが中心となって、4 歳から 15 歳の子供を持つ保護者 5,159 人の回答を基にわが国の標準値が作成されており、臨床例との比較も併せ、その信頼性・妥当性が報告されている 5)。

### 1 対象

神奈川県先天性甲状腺機能低下症マススクリーニング陽性者で、精査のために神奈川県立こども医療センターを受診した児のうち、現在 4 歳から 15 歳に達している児 282 名を対象とした。このうち、1 2500g 未満の低出生体重児、2 他に合併する疾患のある児、3 転居のため現住所のわからな

い児 を除外した結果、実際の対象は 205 例となった。

甲状腺機能に関しては、初診時に甲状腺機能検査に異常のないものは正常とした。初診時の検査で FT4 低値あるいは TSH 高値が認められる場合は、精密検査と経過観察が行われ、後に甲状腺機能が正常化したことか確認された例を一過性甲状腺機能低下症とした。精査により甲状腺機能低下が恒久的と診断されたものを先天性甲状腺機能低下症とした。

### 2 方法

CBCL/4 18 の調査表と研究の目的を記した説明文を、回収用の封筒と共に保護者あてに郵送した。調査表には通し番号のみを記載し、名前の記入は行わなかった。研究への参加が任意であることを明記し、保護者が記入するか否かを自由に選択できるようにした。

2003 年 12 月初旬から中旬までに郵送し、2004 年 1 月末日までに返信のあったものを今回の検討の対象とした。上林らの報告に従い標準値を算出し、性別毎に年齢を 4~11 歳と 12~15 歳に分けて検討した。95~97.7 パーセンタイルを境界域、97.7 パーセンタイル以上を臨床域とした。

今回の研究は神奈川県立こども医療センター倫理委員会での検討を経て承認された。

## C 研究結果

### ① 回収率

対象となった 205 例に調査票を発送し、住所不明で返送された 53 例を除くと応答数は 82/152 (53.9%)、そのうち調査に協力できるもの 75/82 であった。到着数に占める応答数の割合は、正常者 42.6%、一過性



甲状腺機能低下症 53.3%、先天性甲状腺機能低下症 62.4%であった。

#### ② 各年齢・性別での尺度得点の平均値

対象の内訳は、男児 33 例 (4~11 歳 19 例、12~15 歳 14 例)、女児 42 例で (4~11 歳 26 例、12~15 歳 16 例) で年少の女児かやや多かった。

表に各年齢・性別での CBCL 尺度得点の平均値を示す (表 2~5)。4~11 歳の男児における思考の問題と非行的行動と 12~15 歳の男児における不安/抑うつ項目の尺度得点の平均値が高い傾向がみられたが、どれも統計的に有意差のある項目はなかった。女児では対象群のほうが平均値の低い項目も認められ、対象が一般群に比べて尺度得点が高いという結果はえられなかった。全体の CBCL 尺度得点 SD-score では一般群と比べ身体的訴えが有意に低い意外に有意差のある項目は見られなかった (表 6)。

#### ③ 境界領域の T 得点以上の値をとった子供の割合

境界領域の T 得点以上の値をとった子供の割合も一般群との頻度の差は認められなかった (表 7)。

#### ④ マスクリーニング TSH および初診時 TSH・FT4 値と CBCL 総得点 SD score の関係

胎児期から新生児期にかけての甲状腺機能を反映していると考えられるマスクリーニングの TSH と総得点 SD score の関係を検討した。図 1 に見られるように、総得点 SD score とマスクリーニングの結果の間には相関は認められなかった。初診

時の甲状腺機能とも比較したがやはり相関は見られなかった (図 2 3)。

以上の結果から、甲状腺機能低下症マスキリーニング陽性児の CBCL 各尺度得点は一般群に比べて高いということではなく、内向尺度、外向尺度、総得点の何れをとっても臨床域 (含む境界域) となった割合はマスキリーニング陽性者と一般群で差がなかった。

#### D 考察

今回対象となったマスキリーニング陽性児にみられる情緒と行動の問題は、一般人口に認められるものと同頻度・同程度であり、今回の結果からは、胎児期から新生児期早期にかけての甲状腺機能低下がこれらの精神発達に影響することを確認することはできなかった。年齢・性別で分類した際に対象数が少なくなってしまうので、更に症例を増やして統計的な検討を行うことが望まれる。

また、既に ADHD・自閉症等と診断されている例では今回のような調査に回答しない可能性もあり、それらが過小評価の原因となっていることか否定できない。

回収率の検討で、甲状腺機能低下症と診断され治療中と考えられる例で回収率が高くなっていたことは、これらの児が現在も当施設に通院中であることから説明できる。自閉症・ADHD などの情緒や行動の異常を呈する例は、むしろ無治療で経過した一過性甲状腺機能低下症の群に多いことも考えられ、この様な例ではフォローが終了しているために、転居などの情報が得られずに調査票が届き難い。このために情緒や

行動の異常を呈する例を発見できなかった可能性もある。

母体が慢性甲状腺炎で無治療の場合などは母の甲状腺機能低下が明らかで、胎児の甲状腺ホルモンレベルも低いと思われるので、このような症例を増やして CBCL を検討することか可能であれば、胎児期の甲状腺機能低下が情緒と行動の問題を引き起こす原因となりうるかという疑問に対する回答が期待できるであろう。

checklist/4-18 日本語版の開発 小児の精神と神経, 2001, 41 243

#### 文献

- 1) Akaike M, Kato N Abnormal behavior, spatial learning impairment and neuropeptides caused by temporary neonatal hypothyroidism In Recent Research Development in Neuroendocrinology- Thyroid Hormone and Brain Maturation (ed C E Hendrich), pp39-48, Research Signpost, Trivandrum, India, 1997
- 2) Haddow JH, et al Maternal thyroid deficiency during pregnancy and subsequent neuropsychological development of the child N Engl J Med 1999,341 549
- 3) Achenbach TM Manual for the child behavior checklist/4-18 and 1991 profile Burlington VT University of Vermont, Department of Psychiatry 1991
- 4) Achenbach TM The child behavior checklist and related forms for assessing behavioral/emotional problems and competencies Pediatrics in review 2001,21 265
- 5) 井濶知美、上林康子 他 Child behavior

表1 CBCL/4-8の尺度

症状尺度	項目数	項目内容	上位尺度
I ひきこもり尺度	9	ひきこもる、しゃべろうとしない など	内向尺度
II 身体的訴え尺度	9	めまい、頭痛、腹痛 など	
III 不安・抑うつ尺度	14	落ち込んでいる、自分に自信がない、心配する	
IV 社会性の問題尺度	8	行動が幼い、仲良くてきかない など	外向尺度
V 思考の問題尺度	7	脅迫観念、強迫行為 など	
VI 注意の問題尺度	11	注意が続かない、落ち着きがない、衝動的 など	
VII 非行的問題尺度	13	うそをつく、家出する など	
VIII 攻撃的行動尺度	20	言う事をきかない、けんか、ものを壊す など	

表2 4～11歳・男児の尺度得点の平均値

	一般群 (1,494人)		対象群 (19人)		有意差 P<0.05
	平均値	(標準偏差)	平均値	(標準偏差)	
ひきこもり	1.06	1.45	1.32	2.75	
身体的訴え	0.42	0.95	0.42	0.69	
不安 / 抑うつ	2.26	2.68	2.32	3.47	
社会性の問題	1.93	2.2	1.68	2.26	
思考の問題	0.24	0.64	0.84	1.46	
注意の問題	3.1	2.81	2.79	3.46	
非行的行動	0.86	1.21	1.79	2.98	
攻撃的行動	4.46	4.69	5.42	7.61	
内向尺度	3.71	4.18	4.00	6.08	
外向尺度	5.31	5.6	7.16	10.40	
総得点	16.1	14.47	18.37	24.27	

表3 4～11歳・女児の尺度得点の平均値

	一般群 (1,579人)		対象群 (26人)		有意差 P<0.05
	平均値	(標準偏差)	平均値	(標準偏差)	
ひきこもり	1.01	1.47	0.96	1.15	
身体的訴え	0.5	1.03	0.27	0.53	×
不安 / 抑うつ	2.28	2.68	2.00	2.42	
社会性の問題	1.6	1.81	1.35	1.41	
思考の問題	0.22	0.6	0.08	0.27	×
注意の問題	2.36	2.41	1.85	2.13	
非行的行動	0.62	1.05	0.85	0.97	
攻撃的行動	3.72	4.1	3.35	3.52	
内向尺度	3.77	4.24	3.23	3.45	
外向尺度	4.34	4.86	4.19	4.30	
総得点	14.35	13.48	12.12	10.02	

表4 12～15歳・男児の尺度得点の平均値

	一般群 (1,000人)		対象群 (14人)		有意差 P<0.05
	平均値	(標準偏差)	平均値	(標準偏差)	
ひきこもり	0.99	1.65	1.21	2.42	
身体的訴え	0.69	1.26	0.36	0.63	
不安 / 抑うつ	1.4	2.37	2.43	2.77	
社会性の問題	1.37	1.93	1.93	3.20	
思考の問題	0.17	0.54	0.21	0.43	
注意の問題	2.75	2.87	2.86	4.24	
非行的行動	0.57	1.26	0.29	0.61	
攻撃的行動	2.9	3.86	2.36	3.27	
内向尺度	3.95	4.3	3.86	4.57	
外向尺度	3.47	4.79	2.64	3.69	
総得点	11.71	13.44	12.86	14.05	

表5 12~15歳・女兒の尺度得点の平均値

	一般群 (1,086人)		対象群 (16人)		有意差 P<0.05
	平均値	(標準偏差)	平均値	(標準偏差)	
ひきこもり	1.03	1.77	0.81	1.11	
身体的訴え	0.88	1.41	0.44	0.81	×
不安 / 抑うつ	1.69	2.72	0.81	1.17	
社会性の問題	1.32	1.87	1.13	1.41	
思考の問題	0.2	0.56	0	0	-
注意の問題	2.3	2.64	1.94	2.27	
非行的行動	0.4	1.01	0.25	0.58	
攻撃的行動	2.71	3.57	1.50	1.75	
内向尺度	3.56	4.78	2.06	1.88	×
外向尺度	3.11	4.31	1.75	1.92	×
総得点	11.98	13.54	7.75	6.11	×

表6 尺度得点の平均SD-score

	SD-score	sd	有意差 p<0.05
ひきこもり	0.03	1.25	
身体的訴え	-0.19	0.59	×
不安 / 抑うつ	-0.18	1.00	
社会性の問題	-0.44	1.04	
思考の問題	0.09	1.30	
注意の問題	-0.12	1.08	
非行的行動	0.19	1.41	
攻撃的行動	-0.08	1.04	
内向尺度	-0.07	1.06	
外向尺度	-0.10	0.99	
総得点	-0.03	1.14	

表7 境界領域のT得点以上の値をとった子供の割合

	対象群 (%)	一般群 (%)
ひきこもり	4	6
身体的訴え	0	5
不安 / 抑うつ	6.7	5
社会性の問題	4	4
思考の問題	5.3	4
注意の問題	5.3	5
非行的行動	4	14
攻撃的行動	2.7	5
内向尺度	13.3	15
外向尺度	14.7	17
総得点	17.3	17
内向外向のうちひとつ以上	16	24
8つの症状尺度のどれか1つ以上	12	24

図1 マスクリーニングTSHと総得点SD-scoreの関係

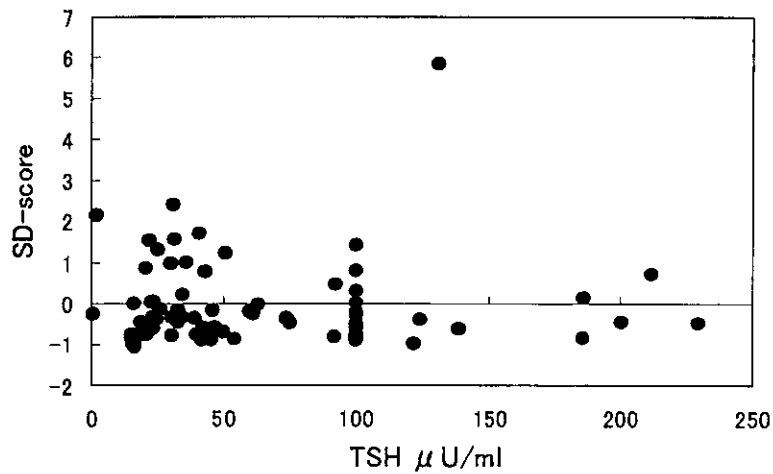


図2 初診時TSHと総得点SD-scoreの関係

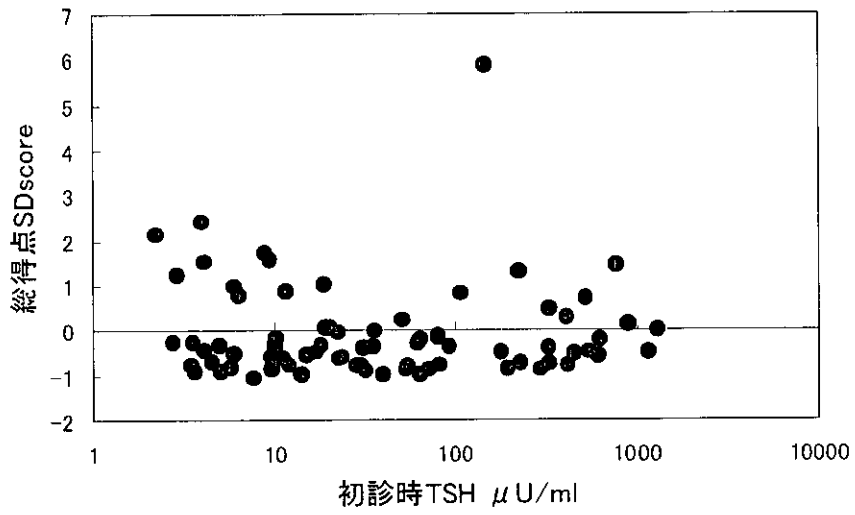
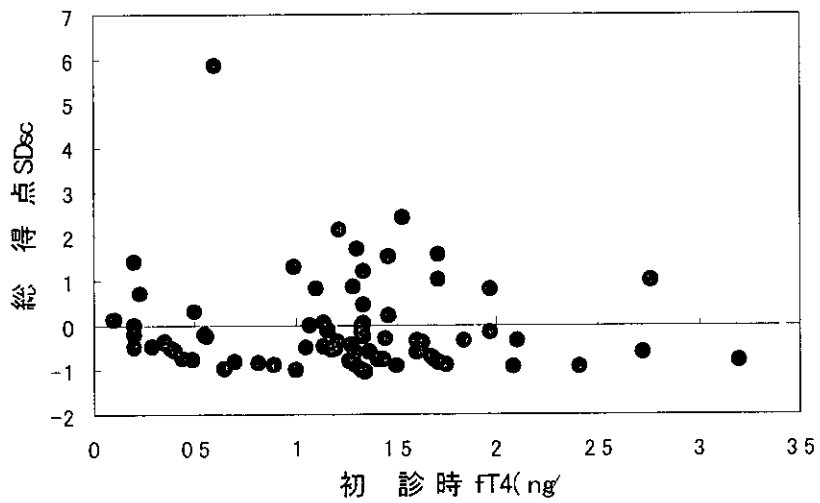


図3 初診時fT4値と総得点SD-scoreの関係



### Ⅲ. 協力研究報告



## 自閉性障害に対する遺伝子解析研究

協力研究者 山本 賢司 東海大学医学部専門診療学系精神科学

分担研究者 松本 英夫 東海大学医学部精神科学部門

### 研究要旨

自閉性障害は多因子遺伝性疾患のひとつであり、その原因候補遺伝子（群）の同定は、自閉症性障害の原因や病態を明らかにしていく上で重要である。これらの原因候補遺伝子（群）の同定には大家系を用いた連鎖解析、罹患者とその同胞を用いた罹患同胞対法、患者と健常対照者を比較する患者・対照相関解析、患者およびその両親を用いた連鎖不均衡伝達テストなどさまざまな方法がある。今回、われわれは本研究に対する同意の得られた自閉性障害患者およびその家族（n=104 trios）の DNA サンプルを用い、原因候補遺伝子である Serotonin transporter と Dopamine Beta-Hydroxylase, Dopamine Receptor D4 それぞれの遺伝子的多型について、連鎖不均衡伝達テストを行った。いずれの遺伝子領域においても有意な結果は得られず、どちらも自閉性障害との相関は否定された。今後はこれらの原因候補遺伝子（群）と自閉性障害の相関解析を進めていくと同時に、Single Nucleotide Polymorphism (SNP)や Microsatellite を genome wide に解析し、自閉性障害の原因候補領域を同定していくことが重要と思われる。

### A. 研究目的

今日までに行われた自閉症性障害に対する家族研究や双生児研究の結果は、この障害に遺伝的な要因の関与があることや、それか多因子遺伝疾患であるということをも明らかにしてきた。しかし、今日までの遺伝子解析研究は、その原因候補遺伝子を同定するまでに至っていない。

本研究の主要な目的は自閉症性障害の原因候補遺伝子（群）を明らかにすることである。今回はSerotoninやDopamineのなど神経伝達物質に関連する蛋白質として、Serotonin transporter, Dopamine Beta-Hydroxylase, Dopamine receptor D4 の遺

伝子に注目し、自閉症性障害との相関を検討した。

### B. 研究方法

#### DNA サンプルの収集

#### 1 対象

東海大学病院精神科外来に通院中で、Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorder, 4<sup>th</sup> edition (以下、DSM IV, American Psychiatric Association), International Classification of Disease (以下、ICD 10, World Health Organization)の2つの診断基準を用い、2名の児童精神科医によ

り、自閉性障害と診断された患者(男性92名、女性12名。平均年齢17.4±10.5歳)およびその両親を対象にした。口頭および書面を用いて本研究に対するインフォームド・コンセントを行ったか、自閉性障害患者本人から同意が得られない場合にはその両親から同意を得た。

## 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 Serotonin transporter遺伝子

Serotonin transporter遺伝子はヒト染色体の17q11.1-q12領域に位置し、自閉性障害との相関が報告されたか、その後に関係を否定する報告もあり、一定の見解が得られていない。今回はこの遺伝子のpromoter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、既知の方法に基づいてgenotypingを行い(Klauck SM et al, Hum Mol Genet, 6(13), 2233-2238, 1997)、連鎖不均衡伝達テストを行った。また、並行して血中のSerotonin濃度をHPLC法にて測定した。

### 2 Dopamine Beta-Hydroxylase遺伝子

Dopamine Beta-Hydroxylase (以下DBHと略す)はDopamineをNorepinephrineに変換する反応を触媒する酵素であり、その遺伝

子はヒト染色体の9q34領域に位置している。この遺伝子領域には血中のDBH活性と関連する2つの遺伝的多型(DBH5'-ins/del and DBH 444g/a)が存在すること知られている。

また、自閉性障害患者の血中DBH活性が低値であるという報告や、自閉性障害患者の母親の血中DBH活性はコントロールと比較して低値を示すことなどかすてに報告されている。これらのことから、今回は血中DBH活性と関連のあるDBH5'-ins/delとDBH 444g/aの2つの遺伝的多型を既知の方法に基づいてgenotypingを行い(Cubells J F et al, Mol Psychiatry, 5:56-63, 2000)、連鎖不均衡伝達テストを行った。

### 3 Dopamine Receptor D4遺伝子

Dopamine Receptor D4 (以下、DRD4と略す)はDopamine receptor D2 familyのひとつであり、今日までに様々な疾患やその臨床特徴との相関が報告されている。特に、自閉性障害とも関係が深い統合失調症とこのDRD4遺伝子との相関は数多くの研究がなされている。DRD4遺伝子はヒト染色体上の11q15.5領域に位置し、今日までに数多くの遺伝的多型が検出されている。その中で、今回はpromoter領域に位置し、DRD4遺伝子の発現に関与すること知られている-521C/Tという遺伝的多型を既知の方法に基づいてgenotypingを行い(Okuyama Y et al, Biochem Biophys Res Commun 1999, 258(2):292-5)、連鎖不均衡伝達テストを行った。

### 4 統計学的解析

それぞれの遺伝的多型についてはtransmitted alleleとNon-transmitted alleleを分類し、McNemar'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部「医の倫理委員会」の承認をすてに受けている。

### C 研究結果

#### 1 Serotonin transporter遺伝子

##### 5 HTTLTR

	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'  $\chi^2 = 1.92$ ,  $p = 0.17$

Odds ratio = 0.705, with a 95% C I extending from 0.430 to 1.141

前記のように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。

また、自閉性障害患者およびその両親のSerotoninの血中濃度とそのgenotypeによる比較を図に示した。思春期前の自閉性障害患者では全体にSerotoninの血中濃度が高い傾向にあり、約15%の思春期前患者は同世代のボランティアより高い血中濃度を示していた。しかし、思春期後の自閉性障害患者は一般成人の正常範囲(57-240 ng/ml)にあることが明らかとなった。また、自閉性障害患者の両親のSerotonin血中濃度はほぼ正常範囲であった。Long alleleのdominant modelでSerotonin transporter遺伝子の遺伝的多型とSerotoninの血中濃度との間には優位な相関は認められなかった。

#### 2 Dopamine Beta-Hydroxylase遺伝子

##### DBH5' Ins/Del polymorphism

	D/D	D/I	I/I
Patients (n=104)	20	50	34
Fathers (n=104)	20	56	28
Mothers (n=104)	15	61	28

D Deletion allele

I Insertion allele

##### Allele Frequences

	D	I
Patients (n=104)	0.43	0.57
Fathers (n=104)	0.46	0.54
Mothers (n=104)	0.44	0.56

### Transmission Disequilibrium Test (TDT)

Transmitted	Not Transmitted	
	D	I
D	35	55
I	62	56

McNemar's  $\chi^2 = 0.308$ ,  $p = 0.5791$

Odd ratio = 1.127, with 95% CI extended from 0.771 to 1.651

### DBH444g/a polymorphism

	a/a	a/g	g/g
	Patients (n=104)	79	24
Fathers (n=104)	83	19	2
Mothers (n=104)	83	20	1

### Allele Frequences

	a	g
	Patients (n=104)	0.88
Fathers (n=104)	0.89	0.11
Mothers (n=104)	0.89	0.11

### Transmission Disequilibrium Test (TDT)

Transmitted	Not Transmitted	
	a	g
a	164	19
g	22	3

McNemar's  $\chi^2 = 0.098$ ,  $p = 0.7548$

Odd ratio = 1.158 with 95% CI extended from 0.598 to 2.262

DBH 遺伝子の2つの遺伝的多型と自閉症との間には統計学的に有意な連鎖不均衡は認められなかった。

### 3 Dopamine Receptor D4遺伝子

#### - 521C/T polymorphism

	C/C	C/T	T/T
	Patients (n=104)	16	48
Fathers (n=104)	14	48	42
Mothers (n=104)	14	63	27

### Allele Frequences

	C	T
	Patients (n=104)	0.38
Fathers (n=104)	0.37	0.63
Mothers (n=104)	0.44	0.56

### Transmission Disequilibrium Test (TDT)

Transmitted	Not Transmitted	
	C	T
C	28	52
T	59	69

McNemar's  $\chi^2 = 0.324$ ,  $p = 0.5690$

Odd ratio = 0.881, with 95% CI extended from 0.595 to 1.302

DRD4 遺伝子の - 521C/T と自閉症の間には統計学的に有意な連鎖不均衡は認められなかった。

### D. 考察

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