

表2 HOXA、HOXDにおけるリピート数多型の解析

HOXA1	(bp/bp)	(328/328)	(319/328)	(325/328)	(331/328)	(334/328)	計
	wild type	-3 His	-1 His	+1 His	+2 His		
東海大学 自閉症(患者)	105	2	0	3	0	110	
自閉症(親)	200	4	0	6	1	211	
東京大学 正常	312	11	1	12	0	336	

HOXD8	(bp/bp)	(423/423)	(358/423)	(420/423)	(423/441)	計
	wild type	-65 bp	-3 bp	+18 bp		
東海大学 自閉症(患者)	22	1	1	1	24	
東京大学 正常	32	0	0	0	32	
鳥取大学 正常	26	0	0	0	27	

HOXA2	(bp/bp)	(159/159)	(153/159)	計
	wild type	-6 bp		
東海大学 自閉症(患者)	31	1	32	
東京大学 正常	32	0	32	
鳥取大学 正常	28	0	28	

HOXD11	(bp/bp)	(387/387)	(391/387)	(368/387)	計
	wild type	+4 bp	-19 bp		
東海大学 自閉症(患者)	27	1	0	28	
東京大学 正常	32	0	0	32	
鳥取大学 正常	26	0	1	27	

HOXD13	(bp/bp)	(329/329)	(317/329)	(332/332)	計
	wild type	-12 bp	+3/+3 bp		
東海大学 自閉症(患者)	25	1	1	27	
東京大学 正常	32	0	0	32	
鳥取大学 正常	27	0	0	27	

表3 FMR1のCGGリピート数解析

リピート数	C	P	N	リピート数	C	P	N
8	0	0	1	30	1	1	8
9	0	0	0	31	1	2	8
10	0	0	0	32	6	5	12
11	0	0	0	33	5	28	58
12	0	0	0	34	2	9	61
13	0	0	1	35	0	0	11
14	0	0	0	36	1	1	9
15	0	0	0	37	0	0	8
16	2	0	1	38	0	0	2
17	0	1	3	39	0	1	1
18	1	0	7	40	0	0	1
19	0	1	2	41	0	0	1
20	0	3	14	42	0	0	0
21	0	4	27	43	0	0	0
22	0	4	18	44	0	0	0
23	0	0	6	45	0	0	1
24	2	11	7	46	0	0	1
25	4	13	12	47	0	0	1
26	45	116	224	48	0	0	0
27	38	91	412	49	0	1	0
28	8	25	202	50	0	0	1
29	0	1	32				
				アレル数	116	318	1153

C: Autism (child) P: Autism (parents) N: Normal

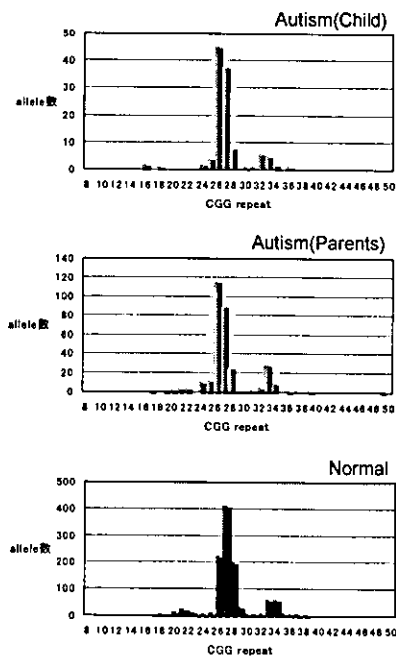


図2 FMR1におけるCGGリピート数の分布

表4 WAVE解析結果(小スケール)

遺伝子	SNP	自閉症	正常
SCN2A2	SC2	59(28)	38(19)
SCL25A12	SL2	26(16)	27(8)
	SL3	45(20)	48(10)
HOXA10	HA102	45(16)	27(18)
HOXA3	HA32	47(11)	27(7)
HOXE5	HB53	37(7)	27(1)
HOXC10	HC101	27(3)	27(8)

()内はヘテロに維持するもの

表5 SSCP解析結果(小スケール)

遺伝子	SNP	アレル型	自閉症	正常	合計
SCN2A2	SC1	t/c	24	14	38
		c	9	6	15
		t	7	7	14
		合計	40	27	67
SCL25A12	SL3	t/c	23	9	32
		c	11	6	15
		t	8	8	16
		合計	42	27	69
TCF7L1	TC1	g/c	15	12	27
		c	16	13	29
		g	1	2	3
		合計	32	27	59
TCF7L1	TC2	a/g	5	3	8
		g	30	24	54
		a	0	0	0
		合計	35	27	62
HOXA10	HA103	t/c	15	8	23
		c	12	10	24
		t	11	9	20
		合計	38	27	65
HOXA4	HA41	g/t	4	8	12
		t	35	18	53
		g	1	1	2
		合計	40	27	67
HOXD8	HD82	g/a	3	1	4
		a	28	26	52
		g	0	0	0
		合計	29	27	58

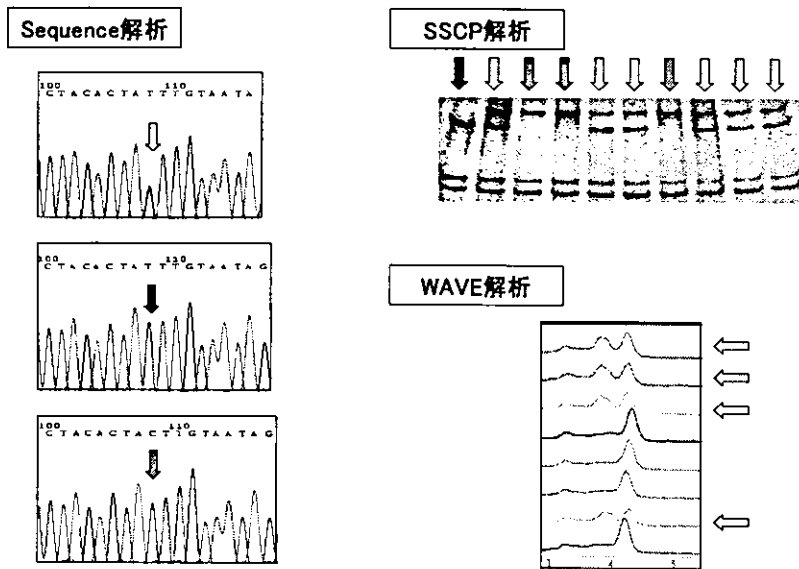


図3 SSCP、WAVEおよびシーケンス解析例(SCL25A12 SL3)

表6 自閉症105家系における4種のSNPのgenotype frequencyとallele frequency解析

Genotype Frequencies				Allele Frequencies	
SL2	AA	GA	GG	A	G
patients	22	62	21	106(0.50)	104(0.50)
parents	57	104	49	218(0.52)	202(0.48)
SL3	TT	TC	CC	T	C
patients	31	53	21	115(0.55)	95(0.45)
parents	57	102	51	216(0.51)	204(0.49)
SC1	TT	TC	CC	T	C
patients	30	54	21	114(0.54)	96(0.46)
parents	56	107	47	219(0.52)	201(0.48)
TC1	GG	GC	CC	G	C
patients	9	38	58	56(0.27)	154(0.73)
parents	13	80	117	106(0.25)	314(0.75)

SL2:rs3765166, SL3:rs3770448, SC1:rs3769955, TC1:rs3810822

表7 自閉症家系におけるSNPのTDT解析

SNPs	Transmitted*		X ²	P
SL2	G=54	A=50	0.154	0.695
SL3	T=55	C=45	1	0.317
SC1	T=57	C=49	0.604	0.437
TC1	G=38	C=42	0.2	0.655

* The number of alleles transmitted by heterozygous parents

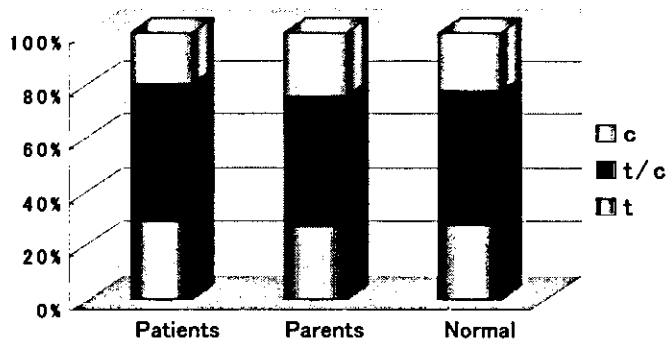
表8 case-control study:

自閉症105家系と正常ヒトにおけるSL3のgenotype frequencyとallele frequency解析

SL3	t	t/c	c	total	t%	c%
patients	32	56	21	109	0.55	0.45
parents	58	105	51	214	0.52	0.48
normal	90	161	72	323	0.45	0.55

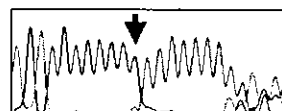
$\chi^2=0.887926$ with 4-degrees of freedom (patients,parents and normal) $p=0.926286$

$\chi^2=0.450531$ with 2-degrees of freedom (patients and normal) $p=0.798304$

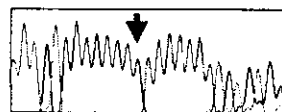


自閉症検体	genotype	発現解析
A018	C7/C8	01-11.17-33.0055
A021	C7	12-17.17-25.0008
A024	C7/C8	12-08.10-34.0043
A025	C7	12-27.10-11.0029
A026	C7/C8	12-27.10-11.0029
A027	C7	12-16.18-33.0094
A030	C7/C8	12-09.10-54.0043
A031	C7	01-11.17-33.0055
A032	C8	12-27.10-11.0029
A033	C8	01-11.17-33.0055
A036	C8	12-22.17-02.0022
A039	C7	12-16.18-33.0094
A042	C7	01-11.17-33.0055
A045	C7	12-16.18-33.0094
A048	C7/C8	01-11.17-33.0055
A052	C7	12-16.18-33.0094
A055	C7	01-11.17-33.0055
A058	C7/C8	12-16.18-33.0094
A059	C7	12-27.10-11.0028
A060	C7/C8?	12-27.10-11.0028
A061	C7	12-22.17-02.0024
A064	C7/C8	01-11.17-33.0055
A067	C7	12-16.18-33.0094
A070	C7	12-08.10-54.0042
A079	C7	12-22.17-02.0022
A082	C7/C8	12-08.10-54.0042
A083	C7	01-11.17-33.0055
A084	C7/C8	01-11.17-33.0055
A085	C7	12-08.10-54.0043
A091	C7	12-08.10-54.0043
A094	C7/C8	12-16.18-33.0094
A095	C7/C8?	12-27.10-11.0028
A096	C8	12-27.10-11.0028
A151	C7/C8	12-08.10-54.0043
A152	C7	12-22.17-02.0022
A153	C7/C8	12-22.17-02.0022
A155	C7/C8	12-16.18-33.0094

父方発現



父方発現



両アレル性発現

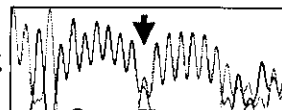


図4 自閉症患者におけるDLX 5遺伝子の発現解析

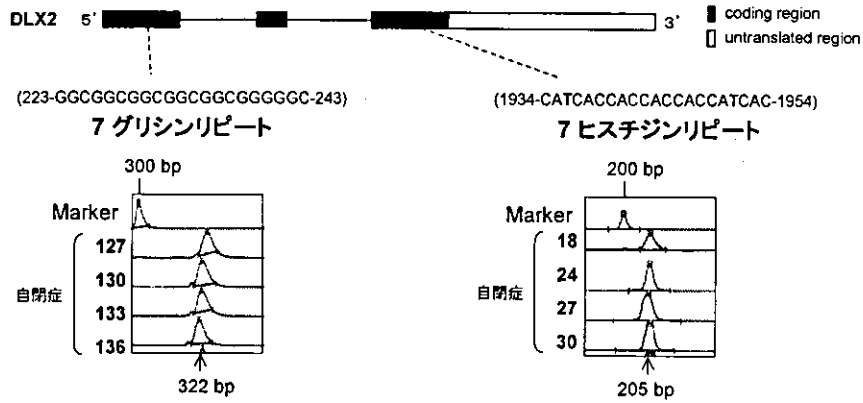


図5 DLX 2に存在するトリプレットリピート長の解析

表9 DLX2のグリシンおよびヒスチジンリピート長の解析結果

リピート	リピート回数	(自閉症解析数)
グリシンリピート	7	(104)
ヒスチジンリピート	7	(102)

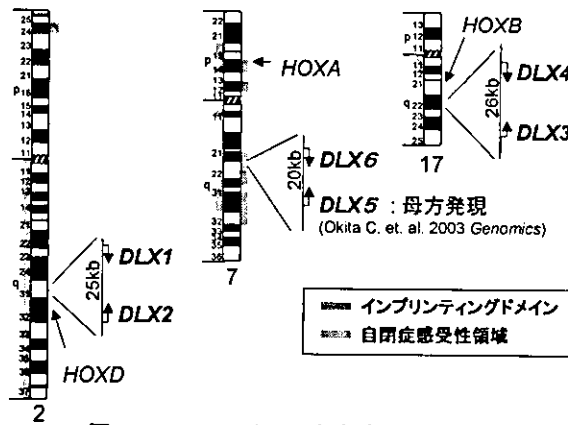


図6 DLX ファミリーの存在する染色体領域

表10 DLXファミリーのインプリンティング解析結果

	fibroblast		LCL		A9 clone		brain	
	methylation	expression	methylation	expression	methylation	expression	methylation	expression
DLX 1	U	ND	ND	mono (1/5)	U	bi	U	mono (1/8)
DLX 2	U	ND	ND	pat? (1/2)	U	bi	U	mono (1/1)
DLX 3	U	ND	ND	mono (2/2)	U	bi	U	ND
DLX 4	U	ND	ND	mono? mat? (3/8)	pat methyl	Bi?	U	ND
DLX 5	U	ND	ND	mat	U	mat	U	mono
DLX 6	U	ND	ND	NO	mat methyl	bi	U	mono (3/6)

U: unmethylated
ND: not detected

表11 A164 家系におけるcDNAマイクロアレイ解析により発現量に有意差のあった遺伝子

Name	Definition	Accession Num	Ratio(A164/A165)	Ratio(A164/A166)
FTHL17	Xp21 ferritin, heavy polypeptide-like 17	AF285592	0.30827506	0.486231585
IL1R2	2q12-q22 interleukin 1 receptor, type II	NM_004633	0.358016998	0.354694177
GHRL	3p26-p25 ghrelin precursor	NM_016362	0.407362701	0.484992283
ESR1	6q25.1 estrogen receptor 1	NM_000125	0.441337436	0.473772504
RANBP9	6p23 RAN binding protein 9	AF064608	0.44238994	0.393117883
CGI-121	2p24.3-p24 CGI-121 protein	NM_016058	0.455069988	0.386850212
SERPINF1	16p25 serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 10	NM_005024	0.474527417	0.342572337
KCNK1	1q42-q43 potassium channel, subfamily K, member 1	NM_002245	0.488373825	0.489198316
COL4A3BP	collagen, type IV, alpha 3 (Goodpasture antigen) binding protein	NM_031381	0.491719462	0.44061494
C20orf40	chromosome 20 open reading frame 40	AL137077	0.49901143	2.055870595
POLS	5p15 polymerase (DNA directed) sigma	NM_008999	0.499716411	0.440465923
TIMM13	19q13.3 translocase of inner mitochondrial membrane 13 homolog (yeast)	NM_012458	2.040070119	3.318029579
POLR2F	22q13.1 polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide F	NM_021974	2.155181785	2.346937125
SSH1	12q24.11 slingshot 1	AB037719	2.190713584	2.458047328
GLTSCR2	19q13.3 glioma tumor suppressor candidate region gene 2	AL122063	2.204863195	2.22627273
E2F4	16q21-q22 E2F transcription factor 4, p107/p130-binding	NM_001950	2.220433544	2.217746956
IGJ	4q21 immunoglobulin J polypeptide, linker protein for immunoglobulin alpha and mu polypeptides	M12759	2.22365234	2.802415099
MRPS33	7q32-q34 mitochondrial ribosomal protein S33	NM_016071	2.250370863	2.053659751
SF3B5	6q24.2 splicing factor 3b, subunit 5, 10kDa	BC000198	2.273286469	2.462182151
PARK7	1p38.33-p1 Parkinson disease (autosomal recessive, early onset) 7	NM_007262	2.308880758	10.35946757
PAM	13q22 protein associated with Myc	NM_015057	2.311937188	2.330204715
ANAPC5	12q24.31 anaphase promoting complex subunit 5	BC008301	2.33975841	4.27585178
SMAP-1	15q26.1 smooth muscle cell associated protein-1	NM_017979	2.356478324	3.918242116
CSDA	12p13.1 cold shock domain protein A	NM_003651	2.373187271	3.495391195
CC18	17q11.2 chemokine (C-C motif) ligand 18 (pulmonary and activation-regulated)	NM_002988	2.387491207	2.312166499
LSM6	4q31.22 LSM6 homolog, U6 small nuclear RNA associated (S. cerevisiae)	NM_007080	2.520207858	3.855225842
PPFBP1	12p11.23-1 PTPRF interacting protein, binding protein 1 (liprin beta 1)	NM_003822	2.541653285	2.110689298
BARHL1	9q34 BarH-like 1 (Drosophila)	AF321618	2.573908027	2.755922574
CGI-27	21q22.12 C21orf19-like protein	NM_015955	2.61138091	2.134435602
SPHK1	17q25.2 sphingosine kinase 1	AF238083	2.692826905	3.856880056
HLA-DOA	6p21.3 major histocompatibility complex, class II, DO alpha	NM_002119	2.738365275	2.382068403
DLL3	19q13 delta-like 3 (Drosophila)	NM_016941	2.745021038	3.786429553
CLK1	2q33 CDC-like kinase 1	NM_004071	2.751736734	3.020026172
MRPS11	15q25 mitochondrial ribosomal protein S11	NM_022839	2.893172899	4.316353019
SLC1A5	19q13.3 solute carrier family 1 (neutral amino acid transporter), member 5	NM_005628	3.06427549	2.803821777
DAB2	5p13 disabled homolog 2, mitogen-responsive phosphoprotein (Drosophila)	NM_001343	3.352252846	2.310084296
CH3L1	1q32.1 chitinase 3-like 1 (cartilage glycoprotein-39)	AJ251847	3.363340464	2.350567232
PAI-RBP1	1p31-p22 PAI-1 mRNA-binding protein	BC002488	3.57130183	4.968789656
GDF1	19p12 growth differentiation factor 1	NM_001492	3.588529249	3.101329054
IGBP1	Xq13.1-q1 immunoglobulin (CD79A) binding protein 1	NM_001551	3.598785798	2.740850479
BLR1	11q23.3 Burkitt lymphoma receptor 1, GTP binding protein (chemokine (C-X-C motif) receptor 5)	NM_001716	3.650822285	2.249539078
DKFZP761	9q34 hypothetical protein DKFZp761H1710	AL136540	3.664434573	2.832977994
OUSP1	5q34 dual specific cy phosphatase 1	NM_004417	3.698404744	4.301433768

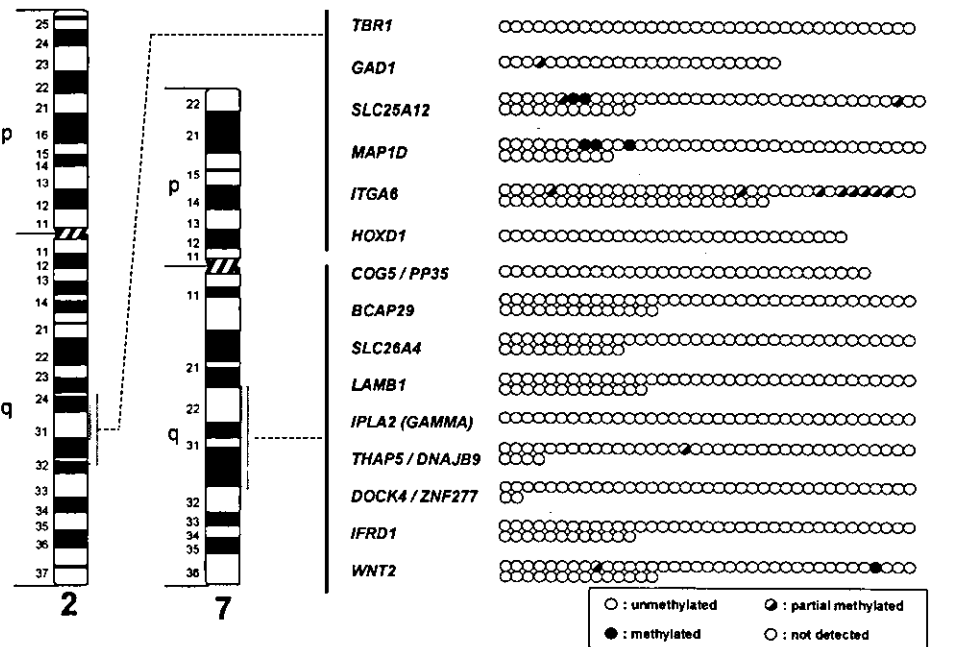


図7 ヒト2,7番染色体の自閉症感受性領域に存在する遺伝子の脳組織におけるDNAメチル化状態

自閉症の原因解明と予防・治療法の開発 —分子遺伝・環境・機能画像からのアプローチ—

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: prepulse inhibition (PPI) の異常は特に大脳辺縁系を中心とした脳内情報処理回路の障害を反映すると考えられており、特に統合失調症で PPI が減弱することが繰り返し報告されている。しかし自閉症と PPI に関する報告はほとんどなく、機能的脳画像と組み合わせた報告は皆無である。今回は preliminary study として 1 名の高機能自閉症者と 2 名の健常者を対象に聴覚刺激を用いて PPI と交感神経皮膚反応(galvanic skin response: GSR)を測定し、event-related functional MRI (fMRI) によって脳機能測定した。fMRI 測定中は GSR で驚愕反応を確認した。その結果、PPI が自閉症で減弱する傾向があること、prepulse-pulse 時に自閉症で後頭葉を中心とした特異な脳内活動の賦活があることが示された。以上により自閉症の脳機能の特殊性を調べるために PPI が有効であること、さらに PPI と event-related functional MRI の組み合わせが自閉症の知覚運動関門の測定に有効であることが示唆された。

A. 研究目的

音などによる突然の強い感覚刺激の提示はヒト、ラットおよびマウスに驚愕反応を引き起こすことが知られている。しかしこの突然の強い感覚刺激によって引き起こされる驚愕反応が、刺激を与える直前に、それ自身では驚愕反応を引き起こさない程度の弱いプレパルス刺激 (prepulse) をあらかじめ負荷することにより低下する現象が確認されており prepulse inhibition (PPI) と呼ばれている(Hoffman & Ison, 1980)。この PPI はほとんどの健常者で認められるものの、特に統合失調統合失調症、強迫性障害、トゥレット障害などで減弱する報告されて症において、数少ない生理学的な異常を示す反応として繰り返し報告されている (Braffら, 2001)。PPI の異常を示す反応として繰り返し報告されている (Braffら, 2001)。PPI の異常は、脳内情報処理回路の障害を反映すると考えられ、近年、統合失調症の動物モデルの評価法としても使用されるようになった。

自閉症とPPIに関してはMcAlonanら(2002)がアスペルガー障害でPPIが減弱し、前頭-線条体と小脳の灰白質量の有意な減少が認められることを報告しているのみである。そこで今回は自閉症者の知覚運動関門 (sensorimotor gating) に関する研究の一環として、日本人の高機能広汎性発達障害の患者を対象にPPIをfMRIを施行し脳内の活性部位を比較する。これにより主に大脳辺縁系の活動を測定できると考えられる。

B. 研究方法

今回の対象は WAIS-R で TIQ=92 (VIQ=96、PIQ=89) で高機能自閉症の右利きの 19 歳男性と、精神医学的な障害の存在や既往のない右利きの健常者 2 名 (26 歳男性: TIQ=99、VIQ=88、PIQ=100、24 歳男性: TIQ=84、VIQ=84、PIQ=90) であった。本研究は東海大学医学部倫理委員会の承認を得ており、研究への参加の同意は文書にて取得した。

実験は以下の2段階で行った。

第1段階:ヘッドホンより聴覚刺激を提示し、驚愕反応を計測するために瞬目反射(blink reflex: BR)と交感神経皮膚反応(galvanic skin response: GSR)を使用する。

第2段階: MRI装置内に横たわった被験者に、ヘッドホンより聴覚刺激を提示する。驚愕反応の計測としてGSRを使用する。MRIは東海大学附属病院MRIセンターの1.5T Philips社製MRI装置を使用する。

第1段階

①聴覚刺激は pulse: 100 dB、2000Hz、40msec prepulse: 70dB、2000Hz、20msecの音を増幅器を介して、MRI室で使用できるヘッドホンから提示した。prepulse と pulse の間隔は 30msec、60msec、120msec、240msec とする(図1)。聴覚刺激の間隔は8秒~60秒間でランダムに提示する。

②瞬目反射(blink reflex: BR)は左眼輪筋に電極を装着し筋電図を測定する。

③交感神経皮膚反応(galvanic skin response: GSR)は左手第三指に装着する。

第2段階

標準脳に写像するために、まず全脳をT1強調画像で3mmスライスで撮像し、続いてevent-related functional MRI (fMRI)を施行した。撮像条件は小脳テントに平行に、スライス厚4mm, gap 1.7mm, 16 slices, FFE, single shot EPI, TR 3000 msec, TE 50 msec, flip angle 90°, FOV 230, Matrix size 64 x 64, 88回測定した。聴覚刺激はpulse, prepulse- pulse, pulse, prepulse- pulseの順で3, 23, 43, 65スライス目にそれぞれ提示した。prepulse- pulseの間隔は120msで行った。fMRIで得られたデータについては3次元画像解析(statistic parametric mapping: SPM)を用いて標準脳図譜上への写像による解剖学的標準化と各座標ごとの統計学的検討を施した。

(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

医学部倫理委員会で承認を受けている。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

対象が高機能自閉症者1名、健常者2名の段階であるため統計的解析は行わなかった。図2で示したようにPPIは健常者では明確に認められたものの、自閉症では減弱する傾向にあった。またBRの結果とGSRの結果は相関していたため、fMRI施行時にはGSRを使用してPPIの有無を確認した。

健常者A(図3)では撮像時にPPIが認められ、single pulse, prepulse- pulse 双方において低賦活であった。健常者B(図4)では撮像時にPPIが認められ、特にsingle pulseにおいて脳内全体の賦活が認められた。

一方、自閉症者(図5)では撮像時にPPIの減弱が認められ、prepulse- pulseにおいて視覚野、視覚連合野を含む後頭葉を中心とした高賦活が認められた。

大脳辺縁系の活動に関しては3例では確認できなかった。

D. 考察

高機能自閉症ではPPIの減弱が認められる可能性があることと、自閉症ではprepulse- pulse時に視覚的な活動が惹起される可能性があること、およびそれは自閉症者が視覚優位の知覚をすることと関係がある可能性を示唆している。今後、対象例を増やしながらか検討していきたい。

E. 結論

自閉症の脳機能の特殊性を調べるためにPPIが有効であること、さらにPPIとevent-related functional MRIの組み合わせが自閉症の知覚運動関門の測定に有効であることが示唆された。

<参考文献>

Braff, D.L., Geyer, M.A. & Swerdlow, N.R.: Human studies of prepulse inhibition of startle: normal subjects, patient groups, and pharmacological studies. *Psychopharmacology* (2001) 156; 234-258.

Hoffman, H.S., & Ison, J.R.: Reflex modification in the domain of startle. 1: Some empirical findings and their implications for how the nervous system processes sensory input. *Psycho. Rev.* (1980) 2; 175-189.

McAlonan, G.M., Daly, E., Kumari V., et al.: Brain anatomy and sensorimotor gating in Asperger's syndrome. *Brain* (2002) 125; 1594-1606.

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

特になし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

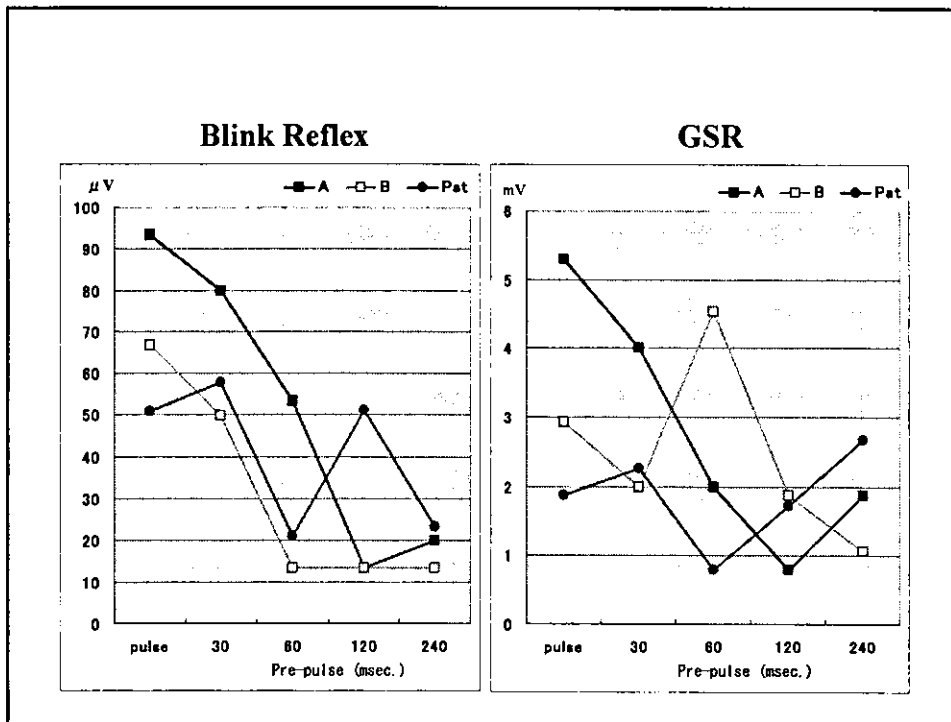
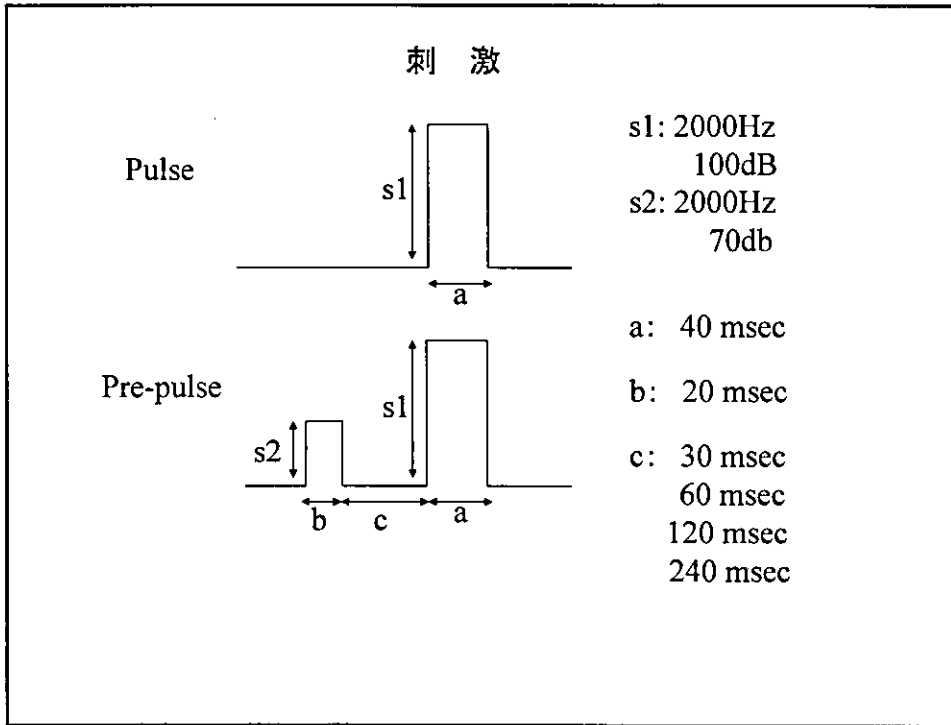
特になし。

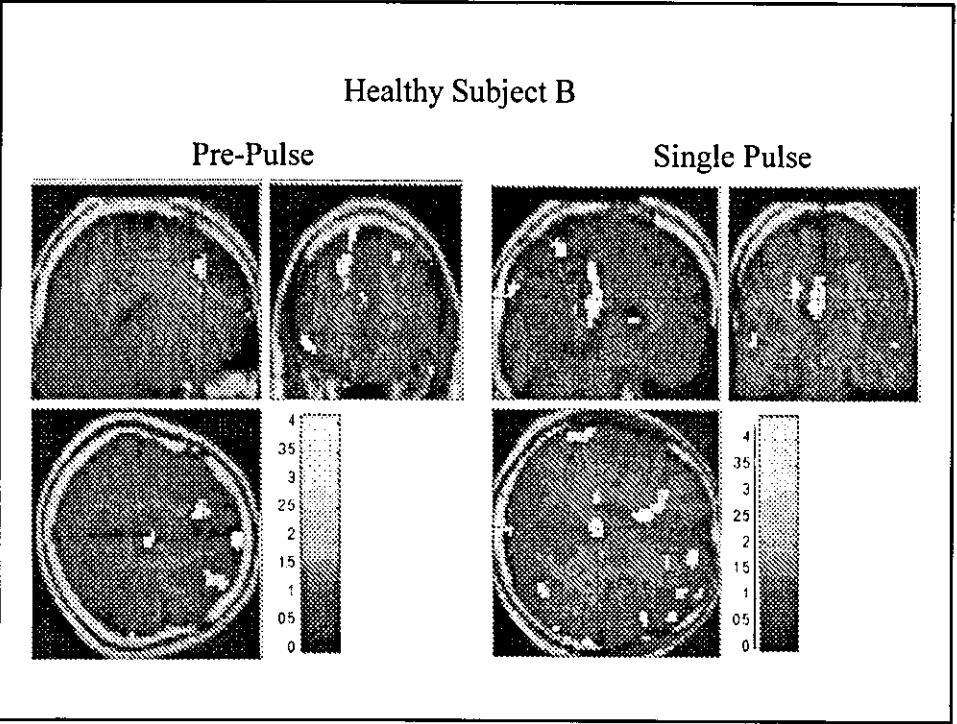
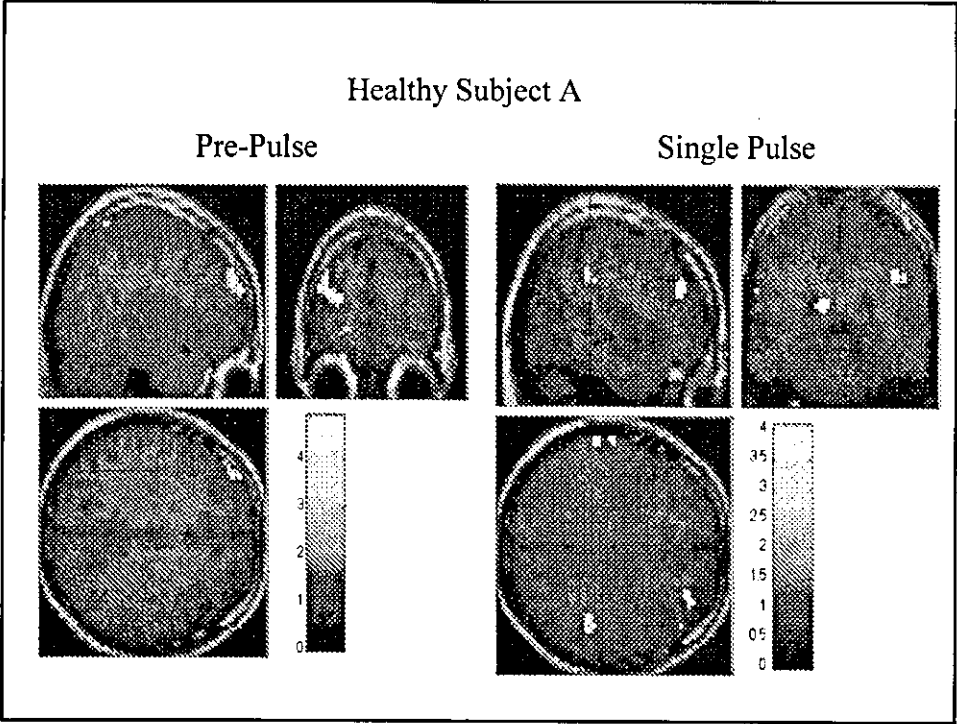
2. 実用新案登録

特になし。

3. その他

特になし。

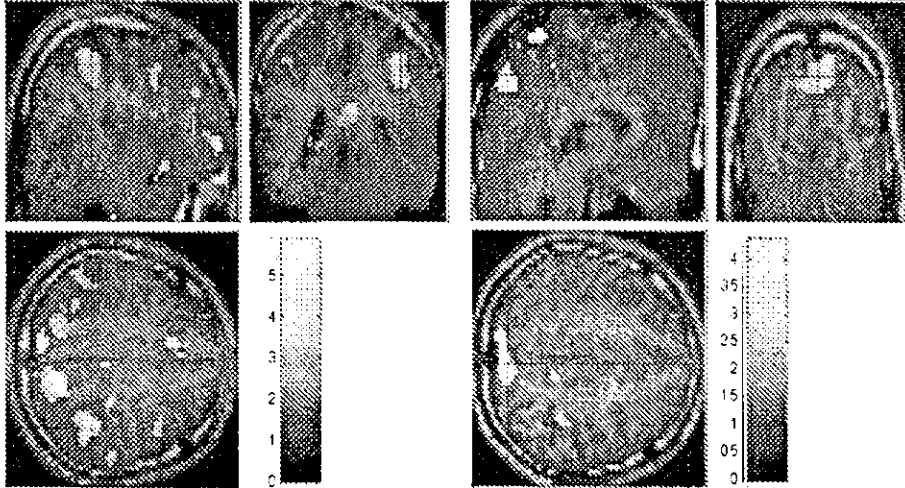




Patient

Pre-Pulse

Single Pulse



自閉症圏障害の診断と評価及び研究への理解の促進に関する検討

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文献的検討を進めると共に、自閉症シンポジウムを開催して参加者の意見を解析し、研究への理解の促進を目指して検討した。文献的検討から ASD 児・者及び家族の臨床評価にあたっては、ASD 児・者の発達水準を限定せずに、言語発達の特徴、対人技能、コミュニケーションなどを評価して行動表現型を検討することが重要と確認された。シンポジウムでは、胎内環境、認知機能の画像化、遺伝や遺伝子などについて発表や討論を行い、約 950 名が参加した。アンケートに回答した 543 名の 95%以上がどの研究も重要と回答し、シンポジウムは生物学的研究への理解を促すのに有用であった。

A. 研究目的

生物学的研究の発展に向けて、第1に、自閉症圏障害(ASD)の診断と評価について文献的検討を進めた。第2に、自閉症シンポジウムを開催して参加者の意見を解析し研究への理解の促進を目指して検討した。

B. 研究方法

1. 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. シンポジウムの開催と参加者アンケートの解析

シンポジウムを2004年11月7日(日)に東京大学安田講堂で開催した。自閉症の現状、胎内環境、認知機能の画像化、遺伝や遺伝子について5題の発表と討論が行われた。約950名が参加し、543名がアンケートに回答した。回答者は、ASD児・者の親204名、親以外の家族56名、医療職48名、心理職36名、教師76名、福祉職65名、その他55名であった。アンケートは、シンポジウム全体に関する3項目、個々のテーマに関する7項目、研究協力に関する1項目は4者択一で回答を求め、自由記載で意見を問うた。

C. 研究結果

1. 文献的検討

Asperger症候群について、高機能自閉症とは全くの別個の疾患ではないとの考え方が強まっている。一方、DSM-IVの特定不能の広汎性発達障害について、Asperger症候群に類似しているが一過性の言語発達遅滞または軽度の認知障害を有する群など3群に分かれたとの報告がある(Walker, et al, 2004)。また、自閉症の素因に関連する広い自閉症表現型について、ASD児の親ではASD児の知能にかかわらず自閉症スペクトラム指数の対人技能とコミュニケーションの2つの下位尺度が健常児の親より有意に高得点との報告もある(Bishop, et al, 2004)。高機能ASDが”純粋な”ASDとは限らないとして表現型の検討を進める必要があろう。

2. シンポジウムの開催と参加者アンケートの解析

肯定と否定とに2分すると、シンポジウム全体として興味深かったが95.4%、分かりやすかったが89.0%、新しい知識を得られたが96.4%であった。テーマ別に新しい知識を得られたかでは、自閉症の現状が88.4%、胎内環境が79.2%、認知機能の画像化が81.3%、遺伝や遺伝子が92.4%であった。研究が重要と思うかでは、胎内環境、認知機能の画像化、遺伝や遺伝子のいずれも95%以上であった。研究に協力したいは95.3%であった。

親、親以外の家族、医療職、心理職、教師、福祉

職、その他の7群と比較すると、胎内環境について新しい知識が得られた、認知機能の画像化で新しい知識が得られた、胎内環境の研究が重要と思う、遺伝や遺伝子の研究が重要と思うという4項目で有意差が認められた(各々 $p=0.004$, $p=0.039$, $p=0.007$, $p=0.018$; χ^2 -検定)。遺伝や遺伝子の研究が重要と思うは4者択一で強い肯定が親で最も高く69.3%であり心理職で最も低く43.3%であった。自由記載では生物学的研究が治療教育を初めとする治療や支援に繋がることを求める意見などがあつた。

D. 考察

文献的検討から、ASD児・者及び家族の臨床評価にあたっては、ASD児・者の発達水準を限定せずに、言語発達の特徴、対人技能、コミュニケーションなどを評価して行動表現型の検討を進めることが重要と確認された。

自閉症シンポジウムはASD関係者に生物学的研究への理解を促すのに有用であつた。特に遺伝や遺伝子の研究への関心が高かつたが、治療や支援に繋がるかの疑問も呈された。生物学的研究への理解の促進のためには、治療や支援にどのように繋がるかを示すことも重要と思われた。

自閉症モデル動物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 滋賀医科大学精神科神経科 講師

A. 研究目的

自閉症の発症メカニズムを探るためにモデル動物を作成し、行動および組織学的解析を行うことを目的とした。3 年目にあたる今年度は、昨年までの結果を踏まえ、主として小脳における細胞増殖や分化を制御する遺伝子に注目した。

B. 研究方法

出生直後から離乳まで、母ラットの母乳を通してプロピルチオウラシル (PTU) を仔ラットに投与し、軽度低甲状腺ホルモン状態においた PTU ラットを作成した。生後 7、14、28、6 週、3 ヶ月の時点で灌流固定して脳を取り出し、組織学的検討に供した。細胞増殖、分化を制御する遺伝子群の中でも FGF8, Pax6, Wnt1, MBP、セロトニンの免疫組織染色、MBP については Western Blot を行った。

(倫理面への配慮)

動物実験は滋賀医科大学動物実験委員会倫理委員会の承認を受けて行った。

C. 研究結果

PTU ラットはコントロール群に比べ、FGF8, Wnt1, MBP などの発現が遅れていた。そのため、コントロール群でこれらの遺伝子の発現が減少する時期には、一過性に PTU ラットにおいて、発現が増加しているように見えることが明らかになった。小脳の外顆粒細胞層の migration が PTU ラットでは遅れるため、3 ヶ月齢になるまで、小脳虫部、葉部ともに細胞構築に乱れが診られた。

D. 考察

PTU ラットでは、甲状腺ホルモンは成長後正常レベルに回復する。中枢神経系の発達期に見られた細胞増殖、分化を制御する遺伝子群の異常は小脳の微細な細胞構築、神経系に異常をもたらした可能性が示唆された。

E. 結論

出生後低甲状腺ホルモン状態においたラットは、成長後は顕著な組織学的異常を認めないが、発達期には細胞構築や内分泌学的な異常を示した。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

定松美幸、尾関祐二 胎生期に発現する遺伝子と精神疾患 臨床精神医学 33(11): 1439-1445, 2004

定松美幸、今井秀樹 環境汚染の影響 現代社会は精神科をどう変えるか 精神科 5(4) 303-307, 2004

定松美幸 自閉症の動物モデル研究の現況 脳と精神の医学 (印刷中)

M. Sadamatsu, N. Kato Behavioral changes induced by hypothyroidism; A new animal model for autism. Congenital Anomalies (in submit)

2. 学会発表

ANIMAL MODEL FOR AUTISM M. Sadamatsu,
IACAPAP, Berlin, 2004/8

自閉症モデル動物における甲状腺ホルモンの
関与 定松美幸; 金井裕彦 ; 吉村篤; 黒川
清; 加藤進昌 第47回日本神経学会 大阪
2004/9

ANIMAL MODEL OF AUTISM: POSSIBLE
IMPLICATION OF THYROID HORMONE

M.Sadamatsu*; H.Kanai; A.Yoshimura; K.Kurokawa;
N.Kato 34th Annual meeting for Society for
neuroscience, San Diego, 2004/10

ANIMAL MODEL FOR AUTISM M. Sadamatsu,
IACAPAP, Berlin, 2004/8

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

新生児マススクリーニングの TSH 値および FT4 値と広汎性発達障害(その2) -横浜市の療育センターでの共同調査-

分担研究者 原 仁 横浜市中部地域療育センター
研究協力者 朝倉友美 神奈川県立こども医療センター
立花克彦 神奈川県立こども医療センター

A. 研究要旨と目的

自閉症(以下 AD; Autistic Disorder)は本当に増加しているのであろうか? 高橋によると、多くの疫学調査は広汎性発達障害(以下 PDD; Pervasive Developmental Disorders)の増加を示唆しているという(高橋,2004)。もとより、L. Kanner が 1943 年に報告した 11 例の症状を原点とする AD はイコール PDD ではない。PDD は AD を含む AD 近似の症状を示す障害群の総称である。PDD が増加し、AD は変化していないのか、PDD も AD も共に増加しているのか、それらは診断概念の拡大に過ぎないのか、疑問は尽きないのである。

人口 350 万人を越える横浜市は、6箇所の地域療育センターと総合リハビリテーションセンターが市内 18 区の地域割りをして、それぞれの担当区の障害児の療育を行う体制を取っている。これらの地域療育センターは1施設当たり、乳幼児人口の1-2%の利用を想定して配置されていた。しかし、現状において、5%前後の利用率となっている。その理由はなぜか?

前述の7施設の平成 15 年度の新規利用児の診断分類を比較すると、PDD の割合が 80%を越えるセンターすらある。また、PDD 診断率の増加傾向はこの4-5年特に顕著である(原,2005)。確かに、概念の拡大の問題があるのかもしれないが、それだけでは PDD がこれだけ増加したことを説明しにくい。なお、概念の拡大に関する議論は本論では触れずに他に譲る(原,2003)。

この PDD の急激な増加の説明として、内分泌かく乱物質(PCB など)が胎児の発達に影響を及ぼし、その結果 AD あるいは PDD の発症頻度を高めているのではないかという仮説が生まれる(Kato, Akaike, Masui & Naruse, 1992)。特に PCB 類は甲状腺ホルモン類似の化学物質であり、胎児脳が PCB 類に汚染されると、軽微な甲状腺機能低下症状が発生し、胎児の神経系の発達抑制が起こる(黒田,2003)。AD あるいは PDD に対する素因的脆弱性(男性が最たるもの)のある胎児にその機序が働き出すと、AD あるいは PDD の発症につながっていく、という仮説である。

わが国においては、大部分の新生児は日齢 5 日前後にろ紙採血をして先天代謝異常のスクリーニング検査を受けている。もちろん、PDD 児の新生児マススクリーニングの結果はほとんど正常範囲にある。PDD の症状が明らかになるのは、早くても1歳台であり、その後、2-3歳の年齢帯で診断される PDD 児であっても新生児期の甲状腺機能異常を示唆する所見は得られていない。

仮に胎児の甲状腺機能が低下状態であるならば、フィードバックがかかって、甲状腺刺激ホルモン(以下 TSH; Thyroid Stimulating Hormone)の値は高くなるだろう。しかもそれらの変動は正常範囲の中で起こっているのではなかろうか。甲状腺機能低下と PDD 発症が関係するとしても、その状態は軽微あるいは一過性の可能性が大である。もとより、甲状腺ホルモンは知的発達に影響を及ぼす重要なホ

過性の可能性が大である。もとより、甲状腺ホルモンは知的発達に影響を及ぼす重要なホルモンであって、大幅に欠乏するといわゆるクレチン病、先天性甲状腺機能低下症が発症する。

以上の仮説を検証するために、新生児マススクリーニング検査結果と PDD の診断分類 (AD と PDD Not Otherwise Specified; 以下 PDD-NOS)、性別(男女)、知能(発達)指数を比較検討してみた。ただし、PDD となった胎児が高濃度の内分泌かく乱物質に暴露していることを証明されなければこの仮説は成り立たない。本調査は仮設の後半部分の検証の試みである。

平成 15 年度の予備調査(原,立花,加藤,2003)では横浜市中部地域療育センター利用者の内、PDD との診断が確定した児でかつ神奈川県内の医療機関で出生という条件のもと、平成 15 年 10 月の時点で保護者に文書による研究協力を求めた。同意書が得られた 22 例の調査結果はすでに報告した。統計学的に有意な結果が得られなかったが、AD 群(12 例)と PDD-NOS 群(10 例)を比較すると、前者の TSH 値が若干高い傾向となった($p=0.0871$)。

本研究は調査対象を拡大し、前述の仮説の検証につなげるために実施した。なお、調査を神奈川県内出生児に限定した理由は、新生児マススクリーニング検査結果を入手する手続きが可能だったからである。

B. 研究方法

PDD と診断されたため横浜市内の5箇所の地域療育センターの知的障害児通園施設に措置されていて神奈川県内の医療機関で出生した児の新生児マススクリーニング検査結果を調査した。調査依頼期間は、平成 15 年 10 月および平成 16 年 9-10 月であった。

対象となる児の保護者に研究の主旨を説明する文書(補遺1)を配布し、承諾書(補遺2)が得られた児の新生児マススクリーニングで

のろ紙血 TSH および FT4 値の資料を入手した。あわせて診断分類(DSM-IV基準での AD/PDD-NOS)、直近の知能(発達)指数の利用の許可を同じく文書にて得た。

統計解析には StatViewJ4.5 を使用した。

C. 研究結果

103 例(男 86, 女 17)の協力が得られた。なお、この数値には昨年度の調査で報告した 22 例を含んでいる。対象児の出生時期は平成 9 年 11 月から 13 年 3 月までであった。対象児の診断分類は AD 86 例、PDD-NOS 17 例となった。また、対象児の知能(発達)指数の平均値は 53 であり、その分布は 20 から 110 となった。いずれも特定の神経疾患と診断できる児は含まれていない。研究対象児はいわゆる「特発性」の PDD である。

TSH 値(μ U/mL)の平均(標準偏差)は、3.8(2.6)、その範囲は 0.7 から 15.3 であった。FT4 値(ng/dL)の平均(標準偏差)は、1.95(0.45)、その範囲は 1.17 から 4.26 であった。

AD 群と PDD-NOS 群の TSH 値と FT4 値の平均を比較した。TSH 値では、AD 群の平均(標準偏差)は、3.988(2.797)、PDD-NOS 群のそれは、3.071(1.550)となった。統計学的に有意差はなかった($t=1.310, p=0.1931$)。FT4 値では、前者は 1.963(0.465)、後者は 1.861(0.330)となりやはり有意差はなかった($t=0.868, p=0.3876$)。

男児群と女児群の TSH 値と FT4 値の平均を比較した。TSH 値では、男児群の平均(標準偏差)は、3.950(2.787)、女児群のそれは、3.045(1.745)となった。統計学的に有意差はなかった($t=0.975, p=0.3321$)。FT4 値では、前者は 1.927(0.452)、後者は 2.044(0.413)となりやはり有意差はなかった($t=-0.983, p=0.3279$)。

重度・中度遅滞群(IQ(DQ)<50)49 例と軽度遅滞・正常知能群(IQ(DQ)≥50)54 例の TSH 値と FT4 値の平均を比較した。TSH 値では、

重度・中度遅滞群の平均(標準偏差)は、4.378(2.753)、軽度遅滞・正常知能群のそれは、3.346(2.473)となった。前者の平均 TSH 値が統計学的に有意に高値であった($t=2.003, p=0.0479$)。FT4 値では、前者は 2.033(0.491)、後者は 1.868(0.389)となり有意差はなかった($t=-1.899, p=0.0604$)。

IQ(DQ)と TSH 値と FT4 値との相関を求めた。図に示したように、知能段階と TSH 値とは弱い逆相関を示した($r=-0.201, p=0.0420$)。すなわち、知能が低いほど TSH 値は高かった。なお、IQ(DQ)と FT4 値との相関係数は -0.138 であり、統計学的に有意でなかった($p=0.1650$)。

D. 考察と結論

本調査は、昨年度の予備調査に引き続いて、提起した仮説の後半部分の検証を、例数を増すことで再度試みたものである。つまり PDD 増加の原因としての内分泌かく乱物質の評価ではなく、その結果発生するだろう「潜在的」甲状腺機能低下状態を新生児マススクリーニングの測定値で推定できないかというものである。得られた結論は、知能段階が重度・中度遅滞群の方が軽度遅滞・正常知能群よりも TSH 値が高いことが示された。PDD と診断された児において、新生児期の TSH 値と知的発達段階の関連の可能性である。ただし、この相関が事実としても、現在設定されている TSH 値の正常範囲内での現象である。

いわゆる環境汚染と健康の問題が社会問題となっているが、これまで注目されてきたのは、発ガン性の有無やアレルギー発現あるいは先天奇形の発生率などであった。小児の発達の問題に目が向けられるようになったのは最近のことである。注目された環境汚染物質の中では、ダイオキシン類は発ガン性や生殖器官への影響が示唆されているが、神経発達へのそれらは結論が一定でない。また、一時 AD の発生原因として水銀汚染が取りざたされたが、多くの疫学調査の結論はその因果関係を

否定するものである。

一方、PCB 類によるカネミ油症事件、ミシガン湖汚染魚事件はいずれも PCB 類に胎児脳が汚染されると知能発達に負の影響が及ぶというものであった。黒田(2003)によれば、PCB 類は甲状腺ホルモンと類似した「にせホルモン」構造を持ち、甲状腺ホルモン依存性の遺伝子発現を阻害するという。しかし、これらの神経細胞レベルの実験結果からも、いつどの神経系がどのような程度に障害を受けるのかは不明のままである。逆に、これらの基礎実験の成果から、PDD を発生させる脳障害の時期の絞込みが可能になるかもしれない。

高橋(2004)が指摘するように、PDD の発生頻度が1%を越えるとするなら、胎内環境の詳細な情報を把握して PCB 類の汚染の程度と甲状腺ホルモンの状態、そして PDD 発生の因果関係を明らかにする前方視的研究が可能になる。1万人程度のコホートを6年程度追跡するならば、我々の仮説は実証されると思う。なお、わが国においては東北大学と北海道大学のグループが環境汚染物質と新生児期から幼児期の発達との関連をテーマにしたコホート研究を開始している。それらの成果にも注目したい。

今後、本研究の仮説の検証のためには、

- 1) PDD となった胎児が内分泌かく乱物質(特に PCB)に高濃度に暴露していたことを証明する必要がある。
- 2) 今回の調査協力者は知的障害の明らかな AD 児が大半を占めた。いわゆる高機能群 PDD でどのような結果となるかも確認する必要がある。
- 3) 内分泌かく乱物質の影響があるとするなら、それは PDD 特有な脳障害を引き起こすのか、あるいはより非特異的に知的発達の阻害要因となるかが未解決の疑問として残る。

(本研究の一部は、2004年11月7日に開催された、こころの健康科学研究公開シンポジウ

ム。「自閉症の原因を探る. よりよい治療への手がかりを求めて」で発表した。)

こころの健康科学研究事業.平成 15 年度
総括・分担研究報告書. pp. 38-41.

謝辞

本調査の主旨に理解を示し、承諾いただいた保護者の皆様と、研究協力者として資料を提供して下さった横浜市戸塚地域療育センター半澤直美センター長、同西部地域療育センター北村由紀子センター長、同東部地域療育センター日原信彦所長および同南部地域療育センター菅野美紀所長に深謝いたします。

参考文献

1. 高橋修(2004)地域療育システムにおける自閉症の診断と説明. 発達障害研究 26:153-163.
2. 原仁(2005)知的障害児の早期療育の今日的課題. 発達障害医学の進歩第 17 集 診断と治療社.
3. 原仁(2003)高機能広汎性発達障害-LD/ADHD との関連-. 乳幼児医学・心理学研究 12:37-42.
4. Kato N, Akaike M, Masui A & Naruse H (1992) Brain somatostatin in possible animal models of infantile autism. Naruse H & Ornitz EM (Eds.) Neurobiology of Infantile Autism. Elsevier, pp.363-372.
5. 黒田洋一郎(2003)子どもの行動異常・脳の発達障害と環境化学物質汚染: PCB,農薬などによる遺伝子発現のかく乱. 科学 73:1234-1243.
6. 原仁,立花克彦,加藤進昌(2004)新生児マスマスリーニングTSH値およびFT4値と広汎性発達障害-横浜市中部地域療育センターでの予備調査-. 自閉症の原因解明と予防,治療法の開発に関する研究-分子遺伝・環境・機能画像からのアプローチ-. 厚生労働科学研究費補助金.こ