

200941026A

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

化学物質の胎内ばく露による情動・認知行動 に対する影響の評価方法に関する研究

平成 21 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 成 田 正 明

平成 22 (2010) 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

化学物質の胎内ばく露による情動・認知行動 に対する影響の評価方法に関する研究

総括・分担研究報告書

平成 21 年度（3 年計画の 1 年目）

研究代表者	成田 正明	三重大学大学院医学系研究科発生再生医学	教授
分担研究者	田代 朋子	青山学院大学理工学部	教授
分担研究者	成田 奈緒子	文教大学教育学部	教授
分担研究者	横山 和仁	順天堂大学医学部	教授
研究協力者	井村 誉史雄	三重大学大学院医科学研究科	大学院生
研究協力者	内田 敦子	三重大学大学院医学系研究科	講師
研究協力者	太城 康良	三重大学大学院医学系研究科	講師
研究協力者	大藪 明子	三重大学大学院医学系研究科	大学院生
研究協力者	黒澤 美智子	順天堂大学医学部	准教授
研究協力者	篠原 光代	順天堂大学医学部	専任准教授
研究協力者	松川 岳久	順天堂大学医学部	助教
研究協力者	宇野 洋太	よこはま発達クリニック	医師
研究協力者	内山 登紀夫	よこはま発達クリニック	院長・福島大学大学院教授
研究協力者	天笠 光雄	東京医科歯科大学大学院	教授
研究協力者	山城 正司	東京医科歯科大学大学院	講師
研究協力者	柚木 泰広	東京医科歯科大学大学院	医員

目 次

I. 総括研究報告書-----	1
化学物質の胎内ばく露による情動・認知行動に対する影響の評価方法に 関する研究 成田 正明	
II. 分担研究報告書	
1. 化学物質ばく露モデル動物解析及びバイオマーカー検索	
その1 胎生期の薬剤ばく露によって引き起こされた自閉症モデルラットの 生後の脳の形態学的異常の有無の検索-----	11
成田 正明 (資料) みねメディカル研究会主催 環境健康学研究会パンフレット	
その2 胎生期の薬剤ばく露によって引き起こされた自閉症モデルラットに おける発現遺伝子の検討-----	18
成田 正明	
その3 バルプロ酸胎内ばく露モデル動物における脳神経形態の初期発達-----	24
成田 正明	
2. DNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子解析-----	30
田代 朋子	
3. 近赤外線酸素モニターを用いた非侵襲的脳機能評価 -----	39
成田 奈緒子 (資料) 「乳幼児期を大切に」 カラーパンフレット	
4. 有害化学物質と発達障害の関連に関する疫学研究-----	51
横山 和仁 (資料1) 調査協力のお願いのカラーパンフレット (資料2) 毛髪の採取の仕方 (資料3) 調査票 (質問紙) (資料4) 子どもの発達に関する調査へのご協力のお願ひ	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表-----	75
IV. 研究成果の刊行物・別刷-----	77

I. 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

総括研究報告書

化学物質の胎内ばく露による情動・認知行動に対する影響の評価方法に関する研究

研究代表者： 成田 正明 三重大学大学院医学系研究科 発生再生医学 教授

研究要旨

我が国の日常生活において使用される化学物質は数万種に及ぶといわれ、国民生活を豊かなものとするに貢献している反面、ヒトの健康への有害影響が社会的に懸念されている。世界的にもヨハネスブルグサミットを受けて国際化学物質管理会議にて「国際的な化学物質管理のための戦略的アプローチ(SAICM)」が採択され、2020年までに化学物質が健康や環境への影響を最小とする方法で生産・使用されるようにすること、また化学物質に対して脆弱な集団を保護する必要性が再確認されており、国際協力の下で化学物質の有害性評価を推進する必要がある。そのために化学物質の総合的な評価を加速し、国際的な化学物質管理の取り組みに貢献するために、化学物質の迅速かつ効率的な評価方法の開発や戦略的な評価スキームの構築研究を推進させる必要がある。

この流れを受けて平成21年度より厚生労働科学研究費補助金の補助を受け、化学物質リスク研究事業「化学物質のばく露による情動・認知行動異常に対する評価方法に関する研究」（代表研究者・三重大学教授・成田正明）が発足した。本研究班では①ヒトでの化学物質の事象（サリドマイドによる自閉症）を動物で再現したモデル動物の解析、②化学物質ばく露の有無の診断のためのバイオマーカー確定（発現遺伝子網羅的解析）、③生後の情動・認知行動異常の評価のための非侵襲的診断法の普及、④疫学的検討、即ち有害化学物質と情動・認知行動の異常との関連、を解明する化学物質の胎生期・発達期ばく露に焦点をあて、それによって引き起こされる生後の情動・認知行動異常を、基礎医学・臨床医学・社会医学的側面から包括的に理解し、胎生期・発達期の化学物質ばく露が危険であるとするならその種類・量・臨界期などあきらかにし、また一方、ここまでは心配ないとする種類・量・臨界期なども明らかにし、今後の厚生労働行政に資する貢献を目指すと共に、広く国民への啓蒙を目的とするものである。初年度～2年目に、モデル動物解析からの生物学的データ、発現遺伝子の網羅的解析を行い、並行してヒトからの臨床データ、疫学データ（毛髪・乳歯・質問紙）を蓄積し、3年目には、臨床にも運用可能なデータに仕上げていく。本研究の遂行、特にヒトが関係する臨床研究、動物実験実験に当たっては、倫理的規定、即ち当該研究機関における倫理委員会の承認のもとで行った。

初年度にあたる平成21年度は、各分担研究者によって動物実験を通しての化学物質の胎生期ばく露による生後の情動・認知行動異常に至る機序の解明、ばく露の有無のバイオ

マーカーの検索、ヒトでの情動・認知行動異常の非侵襲的な手法による客観的評価、全国大規模疫学調査による、生体試料（毛髪や抜けた歯）からの重金属をはじめとする有害化学物質の検出と質問紙によるの情動・認知行動異常との関連付けを試みた。

1、胎生期の化学物質ばく露による生後の情動・認知行動異常解明のためのモデル動物として研究代表者らが報告してきている、胎生期のサリドマイドや抗てんかん薬バルプロ酸Na (VPA) 投与によるばく露モデル動物を解析した。本モデル動物は生後、ヒト発達障害に似た症候を呈することが分かっている。本モデル動物では脳の構造的な形態異常はあるとは言えず、また発達に関わるような遺伝子群の発現異常が認められ、診断やばく露の有無のバイオマーカーになり得ることが分かった。少なくとも胎内における化学物質ばく露は生後脳に機能的異常をもたらす。

2、生後の情動・認知行動の異常のひとつ、自閉症スペクトラム障害 (ASD) について、ヒト被験者に協力して頂いて、近赤外線酸素モニターを用いて非侵襲的に脳機能を評価した。ASD児者においては、先天性の脳機能障害に起因する不安・ストレス処理における前頭葉の異所性活性化が起こっている可能性が示唆された。不安に関連すると思われるネガティブ情動想起後に正答数が落ちたことより、不安への脆弱性が大きいことも認められ、ASDではこれら実行機能に関連する前頭葉機能が低下していると考えられた。今後これらの尺度を併用していくことにより、ASD児者への非侵襲的な脳機能評価の手法として応用していくことが期待される。

3、疫学的調査として、環境有害化学物質が長く蓄積するとされる毛髪、抜けた乳歯を提供して頂き、合わせて発達に関する調査票（質問紙）も記入して頂き、発達の異常と、有害物質の蓄積の有無について、全国規模で調査を開始した。2009.9.21～2010.2月末における配布数は5702部、1月22日までに質問紙を228部（配布の4.0%）、生体試料として毛髪を223検体、歯牙を186検体収集した（2年目以降も配布・収集継続予定）。対象とした幼児・学童の15%以上に、PARSピーク時得点5点以上の者が見られた。ただし、PARSは本来面接で使用するものであり解釈には慎重を期す必要がある。生体試料から化学物質（重金属、微量元素等）の測定条件を定めるため、予備実験として、歯（治療のため抜歯されたもの）のサンプルをボランティアから収集し、これを分析開始した。

<分担研究者>

田代 朋子

青山学院大学理工学部

教授

成田 奈緒子

文教大学教育学部

教授

横山 和仁

順天堂大学医学部

教授

<研究協力者>

井村 誉史雄

三重大学大学院医科学研究科

大学院生

内田 敦子
三重大学大学院医学系研究科
講師

太城 康良
三重大学大学院医学系研究科
講師

大藪 明子
三重大学大学院医学系研究科
大学院生

黒澤 美智子
順天堂大学医学部
准教授

篠原 光代
順天堂大学医学部
専任准教授

松川 岳久
順天堂大学医学部
助教

宇野洋太
よこはま発達クリニック
医師

内山登紀夫
よこはま発達クリニック 院長
福島大学大学院 教授

天笠 光雄
東京医科歯科大学大学院
教授

山城 正司
東京医科歯科大学大学院
講師

柚木 泰広
東京医科歯科大学大学院
医員

A. 研究目的

本研究は、母親のばく露により引き起こされる情動・認知行動への影響について、様々な有害化学物質に共通のカスケードが存在するかどうかを、妊娠動物を用い解析することを目的とする。神経伝達物質セロトニンの異常、発生初期の分化誘導因子の発現異常などは研究代表者のサリドマイドによる自閉症モデル動物ですでに明らかになっており、種々の有害化学物質にそれらが発展応用可能かを調べる。さらに発現遺伝子を網羅的に調べる(DNA マイクロアレイ)ことで、バイオマーカー確定を目指す。同時にばく露による健康評価法として、近赤外線酸素モニターでの脳機能評価の有効性を確かめ、臨床現場での運用に持ち込む。有害化学物質の影響を地理的観点からも疫学的に考察する。以上により有害化学物質による次世代への影響を把握し、未然に防ぎ、誰にでもできる早期発見法を確立することで、厚生労働行政に資することを目的とする。

B. 研究方法

1. 化学物質ばく露モデル動物解析

(研究代表者 成田正明、研究協力者 井村誉史雄、内田敦子、太城康良、大藪明子、平成 21 年度)

妊婦の内服で四肢に奇形が生じることで知られるサリドマイドは、妊婦の内服時期によっては児に自閉症を発症させることが知られている (Dev Med Child Neurol 36; 351: 1994)。研究代表者の成田らは妊娠ラットにサリドマイドを投与することで「自閉症モデルラット」を作成し、高セロトニン血症、中脳縫線核の形態形成の異常、セロトニン神経の初期発生分化因子 (sonic hedgehog など) 発現異常を報告してきた (Intnl J Dev Neurosci, 23;287: 2005, Pediat Res 52; 576: 2002)。そこで今回の研究では、子供の情動・認知行動に異常をきたし得る (即ち発達障害) 様々な化学物質 (メチル水銀、エタノール、ポリ塩化ビフェニル(PCB)など) の影響を、まずある程度解明が進んでいるサリドマイドや VPA を例に解明する。

その1 胎生期の薬剤ばく露によって引き起こされた自閉症モデルラットの、生後の脳の形態学的異常の有無の検索

研究代表者らの作製してきた自閉症モデルラットは、機能的な異常で主で、脳に形態の異常があるかどうかは分からなかった。そこで妊娠10日薬剤投与群、正常対照群で、生後50日においてパラホルムアルデヒド固定後の脳をブレインマトリックスを用いて正確に薄切し、脳のパラフィン切片を作成、クリューバー・バレラ染色で髄鞘・細胞体を染色後、脳皮質の厚さ、脳梁、線条体、海馬、小脳の厚さを測定し、胎生期の薬剤ばく露が生後の脳の形態に与える影響を評価した。

その2 胎生期の薬剤ばく露によって引き起こされた自閉症モデルラットにおける発現遺伝子の検討—バイオマーカー検索に向けて

生後14日目の大脳皮質の mRNA を、モデル動物 (サリドマイド3個体、バルプロ酸2個体)、コントロール群3個体について、アジレント社の大集積マイクロアレイ (44000 遺伝子) を用いて、薬物投与モデル動物群 (サリドマイド投与、またはバルプロ酸投与群と) で発現遺伝子の変化をコントロール群と比較した。

その3 バルプロ酸胎内ばく露モデル動物における脳神経形態の初期発達

Wistar ラットに、E8, E9, E10, または E11 に VPA 800 mg/kg を投与、E13 で胎仔を取り出し固定後、全胚でニューロフィラメント (165kD) 抗体で神経線維を可視化、実体顕微鏡下で免疫染色された神経線維を定量化した。取り込んだ画像上で画像解析ソフト Image J を用いて染色強度、占有面積、線維束の長さを計測した。

(倫理面への配慮)

本研究は三重大学動物実験委員会の承認を得ている。

2. DNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子解析 (研究分担者 田代朋子、平成 21 年度)

上記 1. の方法のみではばく露評価項目の抽出は十分とは言えない。研究分担者の神

経化学者田代は、動物の神経系に特徴的な遺伝子の発現態様を網羅的、効率的に解析する手法（シナプトアレイ）を確立した。田代らはこの手法を用い、既にさまざまな発達障害モデルでの評価へその有効性が確認されている（J. Neurosci. Res., 2005; 80:777）。本分担研究ではまず、シナプトアレイを用いて様々な化学物質を妊娠ラットにばく露させ、脳内各部位の遺伝子発現プロファイルと比較解析する。化学物質の胎内ばく露による情動・認知行動に対する影響を明らかにし、より客観的な発達障害診断法を開発するため、モデル動物を用いた網羅的遺伝子発現解析により、化学物質が影響を与える脳内部位とタイミングおよび発達障害に到るメカニズムを明らかにし、バイオマーカーの発見を目指す。本年度は、(1)胎生期サリドマイド曝露による自閉症モデルラット、および(2)胎生期－生後初期トリブチルスズ(TBT)曝露ラット、の二種類のモデル動物の生後発達過程における遺伝子発現プロファイルを非曝露対照群と比較解析した。

3. 近赤外線酸素モニターを用いた非侵襲的脳機能評価（研究分担者 成田奈緒子、平成 21 年度）

分担研究者・成田奈緒子は小児科専門医として長く発達障害児の診療に従事してきた。現在も本務の特別支援教育学と並行して独協医科大学越谷病院で診療に従事している。従来、発達障害の診断は、個々の医師の経験のみによるところが多く客観性に乏しかった。分担研究者・成田奈緒子らは最近、非侵襲的脳機能評価法である

近赤外線酸素モニターを用い、ヒトに絵本読ませと直後の思い出し会話により記憶を賦活させる刺激を負荷した時、発達障害児者では脳血流動態が正常と有意に異なる（思い出し会話で血流変化がない）ことを発見し、これが定量的に診断へ応用できることを報告した（第 7 回国際自閉症学会発表）。本年度は自閉症スペクトラム障害(ASD)児者における不安への脆弱性を脳機能から測定する目的で、不安尺度 State-Trait Anxiety Inventory (STAI) を用いた特性不安レベルと、近赤外線酸素モニター(NIRS)を用いた情動想起時の前頭葉脳血流の変化を測定し、健常者と ASD 者での比較を行った。

（倫理面への配慮）

研究対象者に対する人権擁護上の配慮を徹底するため、各研究施設において研究内容を十分に吟味し、倫理委員会の承認を得た。研究対象者には、十分なインフォームドコンセントを行い、文書で同意を得た。

4. 有害化学物質の地域分布と情動・認知行動異常発症地域との関連（研究分担者 横山和仁、黒澤美智子、篠原光代、松川岳久、宇野洋太、内山登紀夫、天笠光雄、山城正司、柚木泰広、平成 21 年度）

環境有害化学物質ばく露により、発達障害が発症するのではないかと指摘されて久しいが詳細は不明である。その、起こり得るメカニズム解明は、動物実験などで行われるが、実際のヒトでの現状はどうか、可能な限り把握しておく必要がある。今回の研究では、環境有害化学物質が長く蓄積す

るとされる毛髪、抜けた乳歯を提供して頂き、合わせて発達に関する調査票（質問紙）も記入して頂き、発達の異常と、有害物質の蓄積の有無について、全国規模で調査を開始した。

（倫理面への配慮）

研究対象者に対する人権擁護上の配慮を徹底するため、各研究施設において研究内容を十分に吟味し、倫理委員会の承認を得た。倫理委員会では、抜けた乳歯や髪の毛を郵送してくれたことで研究に同意したとみなすこととなっている。住所・氏名などの個人情報を取らない。

C. 研究結果

1. 化学物質ばく露モデル動物解析

（研究代表者 成田正明、研究協力者 井村誉史雄、内田敦子、太城康良、大薮明子、平成 21 年度）

その 1 胎生期の薬剤ばく露によって引き起こされた自閉症モデルラットの、生後の脳の形態学的異常の有無の検索

前頭葉皮質、頭頂葉皮質、脳梁、線状体の厚さには差を認めなかった。脳の大きさとして、長径・短径を測定したところ、縦径の有意な拡大を、いずれの薬剤でも認めた。

その 2 胎生期の薬剤ばく露によって引き起こされた自閉症モデルラットにおける発現遺伝子の検討—バイオマーカー検索に向けて

生後 14 日目の大脳皮質の mRNA を、モデル動物（サリドマイド 3 個体、バルプロ酸 2 個体）、コントロール群 3 個体について、アジレント社の大集積マイクロアレイ（44000 遺伝子）を用いて、薬物投与モデル動物群（サリドマイド投与、またはバルプロ酸投与群とで発現遺伝子の変化をコントロール群と比較した。最終的に上昇がみられたもの 6 個、減少していたもの 3 つにまで絞り込んだ。うち詳細な発現定量でも一貫したデータが得られたものは ErbB2v (erythroblastic leukemia viral oncogene 2) であった。

その 3 バルプロ酸胎内ばく露モデル動物における脳神経形態の初期発達

化学物質の一つ、抗てんかん薬バルプロ酸ナトリウムの胎生期ばく露ラットでは、顔面神経など脳神経の初期発達において、これまで分かっていたセロトニン神経とほぼ同様なばく露時期に、形態異常が出現し始めた。

2. DNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子解析（研究分担者 田代朋子、平成 21 年度）

本年度は、(1) 胎生期サリドマイド曝露による自閉症モデルラット、および (2) 胎生期—生後初期トリブチルスズ (TBT) 曝露ラット、の二種類のモデル動物の生後発達過程における遺伝子発現プロファイルを非曝露対照群と比較解析した。(1) では生後 20 日を中心に大脳皮質で、ポストシナプス構成タンパクやミエリン構成タンパクの遺伝

子に有意な発現変化を見出した。また、セロトニン受容体サブタイプの多くは、生後20日以降に有意に発現上昇した。(2) TBT曝露では、大脳皮質に比べて中脳での発現変化が大きく、離乳後に TBT 摂取を止めた場合にも一部の遺伝子の変化が持続することから、不可逆的な影響を残す可能性があることを見出した。

3. 近赤外線酸素モニターを用いた非侵襲的脳機能評価 (研究分担者 成田奈緒子、平成 21 年度)

健常被験者 19 名での情動想起負荷時の前頭葉血流内酸素化ヘモグロビン (O_2Hb) 濃度の変化を全体平均値として表すと、Rosenkranz らによる報告(Proc.Natl. Acad. Sci. 2003)と同様、情動想起開始とともに平均的に左側優位の O_2Hb 濃度上昇が認められた。一方 ASD 患者及び一部の健常被験者では高い特性不安を有し、これら被験者においては、健常被験者と異なり、右側優位の O_2Hb 濃度変化が多く観察され、これは情動処理機能の差異、及びストレス耐性の低下を示す所見と考えられた。また、情動想起の内容による差異を検討するため、健常者において情動刺激を行った直後に計算タスクを負荷したところ、単位時間当たりの正答数はポジティブ情動刺激後がネガティブ情動刺激後に比較して有意に高い結果 ($p=0.015$ 、Wilcoxon の符号付き順位検定) が得られた。

4. 有害化学物質の地域分布と情動・認知行動異常発症地域との関連 (研究分担者 横山和仁、黒澤美智子、篠原光代、松川岳久、

宇野洋太、内山登紀夫、天笠光雄、山城正司、柚木泰広、平成 21 年度)

小学校就学前検診のため受診会場に来場した児童、及び保育園、幼稚園、小学校在園・在校の児童・生徒及び保護者に協力を頂いて、非侵襲的に生体試料(毛髪、抜去歯)を収集し、重金属や微量元素などの含有濃度の測定を開始した。保護者への調査票(質問紙)(対象児童の発達状況、妊娠中の薬物摂取歴、妊娠中の感染症罹患などの妊娠経過、生後の発達発育歴など)の回収も開始した。本年度は、2009.9.21~2010.2月末における配布数は5702部、1月22日までに質問紙を228部(配布の4.0%)、生体試料として毛髪を223検体、歯牙を186検体収集した(2年目以降も配布・収集継続予定)。対象とした幼児・学童の15%以上に、PARSピーク時得点5点以上の者が見られた。また、生体試料は、毛髪を223検体、歯牙を186検体収集した。一方、化学物質(重金属、微量元素等)の測定条件を定めるため、予備実験として、歯(治療のため抜歯されたもの)のサンプルをボランティアから収集し、これを分析した。

D. 研究考察

1. 化学物質ばく露モデル動物解析

(研究代表者 成田正明、研究協力者 井村誉史雄、内田敦子、太城康良、大藪明子、平成 21 年度)

その1 胎生期の薬剤ばく露によって引き起こされた自閉症モデルラットの、生後の脳の形態学的異常の有無の検索

前頭葉皮質、頭頂葉皮質、脳梁、線状体の厚さには差を認めなかった。脳の大きさとして、長径・短径を測定したところ、縦径の有意な拡大を、いずれの薬剤でも認められた。頭囲拡大はヒト自閉症でもしばしば認められ、興味深い。一方、脳の各部位の構造の形態学的異常は調べた限り、なさそうだ。

その2 胎生期の薬剤ばく露によって引き起こされた自閉症モデルラットにおける発現遺伝子の検討—バイオマーカー探索に向けて

機能的には ErbB2 遺伝子は、Neureglin シグナルのレセプターとしての働きを担っているが、単独では生体内で働くことができず、同じファミリー遺伝子である Egfr、ErbB3、ErbB4 とともに働くことが知られている。ばく露動物群に特徴的なは柘植に電子の変化はバイオマーカーにつながる。

その3 バルプロ酸胎内ばく露モデル動物における脳神経形態の初期発達

セロトニン系に影響を与える時期の化学物質ばく露は、脳神経の形態発達にも影響を与える。

2. DNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子解析 (研究分担者 田代朋子、平成 21 年度)

サリドマイド誘発自閉症モデルラットでは、セロトニン神経の投射先である大脳皮質において、シナプス形成やミエリン形成

に異常が生じていることが示唆された。一方、TBT 曝露ラットでは、ミトコンドリア機能阻害による中脳ドパミン神経の異常が示唆された。

「シナプトアレイ」のような焦点を絞った DNA マイクロアレイは、発達期脳における化学物質の時期特異的、部位特異的影響を明らかにする上で効率的な道具となることが確認できた。また、多様な化学物質をこのような方法で分類することで、その作用機序と障害に到る過程を解明し、バイオマーカーの探索に結びつけることができると考えられる。

3. 近赤外線酸素モニターを用いた非侵襲的脳機能評価 (研究分担者 成田奈緒子、平成 21 年度)

ASD 者においては、先天性の脳機能障害に起因する不安・ストレス処理における前頭葉の異所性活性化が起こっている可能性が示唆され、これは他の不安レベルが高い一部健常被験者にも共通するものであると思われた。情動想起後の計算タスクにおいては、不安に関連すると思われるネガティブ情動想起後に正答数が落ちたことより、不安への脆弱性を有する ASD 児者では大きくこれら実行機能に関連する前頭葉機能が低下する可能性が考えられ、今後これらの尺度を併用していくことにより、ASD 児者への非侵襲的な脳機能評価の手法として応用していくことが期待される。

4. 有害化学物質の地域分布と情動・認知行動異常発症地域との関連 (研究分担者 横山和仁、黒澤美智子、篠原光代、松川岳久、

宇野洋太、内山登紀夫、天笠光雄、山城正司、柚木泰広、平成 21 年度)

対象とした幼児・学童の 15 %以上に、PARS ピーク時得点 5 点以上の者が見られた。これらと PARS 得点の低い者とで属性や母親の妊娠前・妊娠中の生活に違いがあるか、採取した歯や髪の毛の測定結果と合わせて確認する予定である。ただし、PARS は本来面接で使用するものであり、本調査では母親の自記式であること、また面接で調査された場合でも、PARS の結果のみで判断されることはなく、専門家によって総合的に診断されるものであることに留意すべきである。今後、データを追加するとともに、総合的な解析を行う必要がある。試料中の微量元素の測定について正確性を高めるために、前処理および分析条件のさらなる検討が必要と考えられる。

E. 結論

本研究の最終ゴールは、化学物質の胎生期・発達期ばく露に焦点をあて、それによって引き起こされる生後の情動・認知行動異常を、基礎医学・臨床医学・社会医学的側面から包括的に理解し、胎生期・発達期の化学物質ばく露が危険であるとするならその種類・量・臨界期などあきらかにし、また一方、ここまでは心配ないとする種類・量・臨界期なども明らかにし、今後の厚生労働行政に資する貢献を目指すと共に、広く国民への啓蒙を目的とするものである。

三年計画の初年度の結論は以下の如くである。化学物質ばく露モデル動物の形態学的解剖学的解析で、その異常はあくまで機能的な異常であることが確認された。ばく

露モデル動物における発現遺伝子網羅的検索では、発現上昇、発現低下している遺伝子群が確認された。ヒトを対象とした脳機能を非侵襲的に評価する方法を用いた情動・認知行動の異常（アスペルガー症候群など発達障害）を鑑別する方法を開発した。

次年度以降、上記の基礎研究・臨床研究をさらに推進していくと共に、全国の疫学調査で得られた試料・質問紙のデータを解析し、環境有害化学物質との関連を明らかにしていく予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

別紙参照

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

II. 分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金
化学物質リスク研究事業 分担研究報告書

化学物質の胎内ばく露による情動・認知行動に対する影響の評価方法に関する研究
平成 21 年度研究課題: 「化学物質ばく露モデル動物解析及びバイオマーカー検索」

その 1 胎生期の薬剤ばく露によって引き起こされた自閉症モデルラットの、生後の脳の形態学的異常の有無の検索

研究代表者 成田 正明 三重大学大学院医学系研究科 教授
研究協力者 井村 誉史雄 三重大学大学院医科学研究科 大学院生

研究要旨

ヒト妊娠 20-24 日のサリドマイドばく露で、児に自閉症が高率に発症することが報告されている。この疫学的事実をもとに、妊娠ラットでヒト妊娠 20-24 日に相当する妊娠時期 (妊娠 10 日) にサリドマイドを投与すると生まれた子ラットはヒト自閉症に似た症状を呈し、「自閉症モデルラット」とした。今回の研究では自閉症モデルラットにおける脳の形態学的異常の有無について検討した。妊娠 10 日目にサリドマイドを 100 mg 経口投与、生後 50 日目に脳の各部位の定点計測を行い、コントロール、及び同じく妊婦の内服で児に自閉症が発生するとされている抗てんかん薬バルプロ酸 Na (VPA) と比較した。前頭葉皮質、頭頂葉皮質、脳梁、線状体の厚さには差を認めなかった。脳の大きさとして、長径・短径を測定したところ、縦径の有意な拡大を、いずれの薬剤でも認めた。頭囲拡大はヒト自閉症でもしばしば認められ、興味深い。一方、脳の各部位の構造の形態学的異常は調べた限り、なさそうだ。

A. 研究目的

催奇形物質として知られるサリドマイドは、手足の奇形が出る前の、妊娠のごく早期の内服で児に自閉症が発症することが知られている。自閉症は先天的な脳の機能障害とされ、「目に見えない先天異常」と言える。研究代表者は、ヒトで起こったこの疫学的事象を妊娠ラットで忠実に再現し、セロトニン神経の胎生期の分化成熟

との仮説を立ててきた。

化学物質の妊婦ばく露による先天異常をめぐっては、たとえばサリドマイドによる四肢の異常、アルコールによる胎児の顔貌異常など、目に見える形態的異常 (先天奇形) はよく知られている。これらの先天奇形は、器官形成期 (臨界期) におけるばく露により引き起こされ、発生学的観点からも理解しやすい。一方、化学物質の妊婦

へのばく露は、目に見えない機能的な障害、即ち知能や発育・発達の障害（自閉症など）をも引き起こし得る。しかしながらこの機能的な障害の発症機序については、「発達」の臨界期がはっきりしないこともあり、実験的検討、即ちどういった化学物質をどの妊娠時期に投与するかなどが明確でなかった。

先天的な脳の機能障害として知られている自閉症は、対人関係の障害、コミュニケーションの障害、こだわりなど、人との関わりを主症状とする発達障害である。その症状からの類推により、神経伝達物質セロトニン系の異常が根底にあると考えられているが、詳細は不明のままである。本症の有病率は現在では150人に一人と、30年前に比し数十倍に激増している。これは単に診察医の診断技術の向上だけでは説明がつかないほどの増加であり、ここ数十年の妊婦をめぐる環境の変化、薬物（含アルコール）・環境ホルモン・ストレスなどによると考えられている。2005年発達障害者支援法が施行され発達障害者に対し正しい理解と対応が求められており、その病態の解明は社会的にも急務であった。

研究代表者は、ヒトで起こった疫学的事実を妊娠ラットで忠実に再現することで、「自閉症モデルラット」を作成した(Narita et al, *Pediatric Research*, 52; 576: 2002)。即ちサリドマイドを内服した妊婦から生まれた児に自閉症児を高率（通常の頻度の30倍）に合併したという疫学的事実(*Dev Med Child Neurol*, 36; 351: 1994)に着目した。ここで自閉症を発症したサリドマイド被害児たちは、通常見られる四肢の奇形はなく、外表奇形としては耳

介の小奇形のみ見られた。このことより器官形成臨界期のタイムテーブルから、児に自閉症を併発した場合のサリドマイド内服時期（即ち自閉症発症の臨界時期）は妊娠20-24日と同定した。ヒト妊娠20-24日はラットでは妊娠9日目に相当する。そこで本モデルラットは妊娠9日目の妊娠ラットにサリドマイドを内服させて作成したものである。その後の解析で本ラットでは胎生期のセロトニン神経の初期発生・分化の異常（isthmusからの遊走異常＝縫線核の形の異常）を認めている(*Intl J Dev Neurosci*, 23; 287: 2005)。なおセロトニンは自閉症児の臨床病像を説明できる唯一のマーカーとして知られており、自閉症研究もまたセロトニンとの関連を中心に発展してきた。

研究代表者はE10でのサリドマイドやVPAの投与での脳の形態学的異常として、抗セロトニン抗体を用いて明らかにした中脳セロトニン神経の起始核（縫線核）の形の異常を報告してきた。この「縫線核の形の異常」は薬剤によるセロトニン神経の初期発生の異常によるものでshh発現の異常を介していることは我々が明らかにしてきた。しかしながら、脳のより細部にいたる、計測に基づく構造上の違いの有無については不明のままである。もし単純な形態上・構造上の違いが存在すればそれもばく露評価の指標となり得る。そこで本課題では薬剤投与群、正常対照群で、生後50日においてパラフォルムアルデヒド固定後の脳をブレインマトリックスを用いて正確に薄切し、脳のパラフィン切片を作成、クリューバー・バレラ染色で髄鞘・細胞体

を染色後、脳皮質の厚さ、脳梁、線条体、海馬、小脳の厚さを測定し、胎生期の薬剤ばく露が生後の脳の形態に与える影響を評価する。

B. 研究方法

薬剤投与

Wister 系ラット（CLEA 社）を交配し、plug 確認日を Embryonic Day1 (E1) とした。E10 の時期に 5%アラビアゴム 2m l へ溶解したサリドマイド 500 mg/kg または VPA 800 mg/kg を経口胃チューブ（アトムメディカル株式会社）により妊娠ラットへ経口投与した。なお、対照群として同時期に 5%アラビアゴム 2m l 投与したラットを使用した。飼育は飼料及び水は自由に摂取でき、25°Cの恒温室で午前7時より午後7時まで照明のついた環境下にて行った。

髄鞘・ニッスル染色によるラット脳の形態観察

生後 50 日の雄ラットを 4%パラホルムアルデヒド/0.01M リン酸ナトリウム緩衝液で還流固定し、解剖により脳を取り出した。一晩 4%パラホルムアルデヒド/0.01M リン酸ナトリウム緩衝液に浸し固定を行った。50%, 70%, 80%, 90%, 99%, 100%エタノールにより脱水し、100%クロロホルム浸潤後パラフィンにて包埋した。薄切機により矢状断 5 μ m の切片を作成後、42°Cの水上で伸展させた。スライドガラス（DAKO）吸着後、50°Cにて 2 日間インキュベートし乾燥を行った。乾燥後は 4°Cに

て保存した。スライドガラスを 50°Cで 30 分インキュベート後、キシレンとエタノールにより脱パラフィンを行った。蒸留水に通した後、95%エタノールにて 5 分、58°Cのルクソールファストブルー液に 16 時間、95%エタノール後蒸留水に浸した。炭酸リチウム溶液に 5 秒浸した後 70%エタノール中で脱色を行った。蒸留水に浸した後、37°Cクレシル紫染色液にて 5 分染色を行った。95%エタノールに浸した後、エタノールとキシレンにて脱水を行い、マリノールで封入を行った。

胎生期のサリドマイド、VPAばく露が、生後50日ラットの脳形成に及ぼす影響の形態学的検索（クレーパー・パレラ染色による髄鞘・神経細胞の染色像）

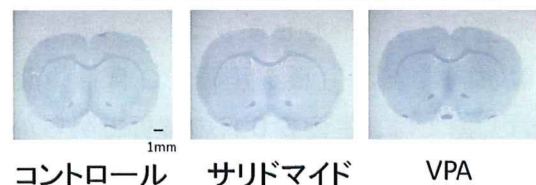


図 1

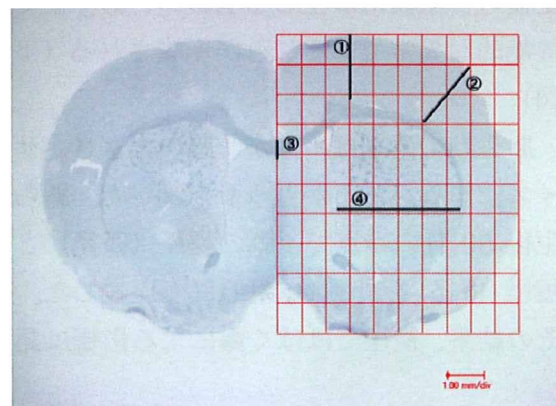


図 2

測定方法

脳染色像の半分の脳を、縦・横に 10 等分し下図で示す部位の測定を行った。

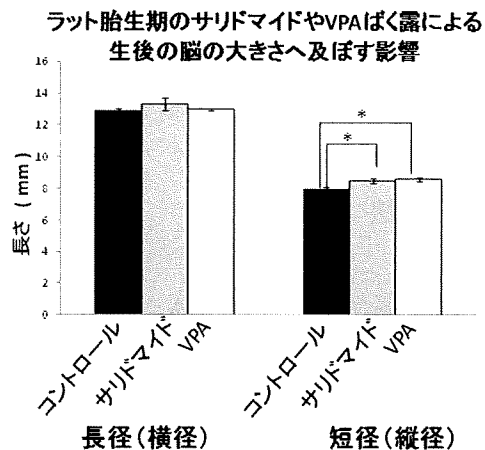
- ①前頭葉皮質
- ②頭頂葉皮質
- ③脳梁
- ④線条体

本研究は三重大学動物実験委員会の承認のもとで行われた。

C. 研究結果

生後 50 日目の前頭葉皮質、頭頂葉皮質、脳梁、線条体の長さを、コントロール群、サリドマイド群、バルプロ酸 Na 群で比較したところ、有為な差は認められなかった。これは、ヒトでこの時期のばく露で自閉症が生じ、ラットでセロトニン系の異常、行動異常などが生じる妊娠 10 日目の薬剤ばく露では、生後 50 日の解析で明らかな脳の形態学的異常が生じないことを示唆する。すなわち胎生早期の薬剤ばく露では、生後の行動異常が生じるものの、あくまで機能的な異常であることが示唆される（下図）。

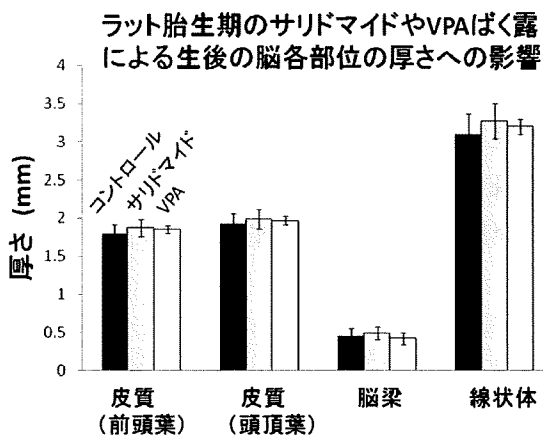
胎生期の薬剤ばく露が、脳の大きさ、サイズに影響があるかどうかを調べた。即ち生後 50 日の時点で、脳の長径（横径）と短径（縦径）を計測し、対照群と比較した。その結果、横径ではばく露による影響は認



めなかったが、縦径では、いずれの薬剤投与群でも有意に増加、即ち大きかった。ただし図 1 でもわかるようにこの脳の大きさの増加は、見た目に顕著というほどではない。しかし両薬剤でも同様の所見を認めたことは大変興味深い。実際ヒト自閉症では頭囲拡大を認めることがしばしばあり、これを考え合わせると興味深い。

D. 考察

ヒトで妊娠 20-24 日にサリドマイドを服用した妊婦から生まれた児に通常の 30 倍以上の高頻度で自閉症が発症したという疫学的事実を妊娠ラットで忠実に反映させて、研究代表者らはこれまで自閉症モデルラットを作成してきた。この自閉症モデルラットでは、非探索的行動のほか、高セロトニン血症などひと自閉症病態をよく反映する。つづくさらに詳細な解析では、生後 50 日の解析で、セロトニン神経の起始核である縫線核の形の異常が明らかになった。縫線核の形づくりは、胎生期にセロトニン前駆細胞が峽（中脳後脳境界領域）から尾側方向へ遊走することによって完成される。この遊走には sonic hedgehog



(SHH), fibroblast growth factor(FGF)などの分化誘導因子の、厳密な時期及び部位特異的な発現によって規定されており、縫線核の形の異常はセロトニン神経の初期発生の異常ということができた。しかしながらこの異常は抗セロトニン抗体で免疫染色したセロトニン神経の細胞体の分布から推測した、いわばバーチャルな、「機能的な」形態の異常であり、脳の真の形態異常があるかどうかは分からなかった。

今回、縦径は有意に大きくなっていたものの、皮質、脳梁、線条体など脳の構造に関するサイズに異常を認めなかったことは、胎生期の薬剤ばく露による情動・認知行動の異常が形の異常によるのではなく、先天的な「機能的」な異常にのみ基づくものであり、ヒト自閉症が、先天的な脳の機能異常とされている点と矛盾しない。もし自閉症が先天的な形態の異常に基づくものであるとするならば、生後のその根本的な解決は困難と考えられるが、神経伝達物質セロトニンの機能的な異常に基づくものであるなら、その QOL 的予後は生後の支援の対処によるともいえる。

今後の研究で、胎生期のばく露による発達障害についての生後の機能回復法について検討していきたい。

E. 結論

脳の大きさとして、長径・短径を測定したところ、縦径の有意な拡大を、いずれの薬剤でも認めた。頭囲拡大はヒト自閉症でもしばしば認められ、興味深い。一方、脳の各部位の構造の形態学的異常は調べた限り、なさそうだ。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1, 論文発表

Nonexploratory Movement and Behavioral Alterations in a Thalidomide or Valproic Acid-induced Autism Model Rat

Masaaki Narita, Akiko Oyabu, Yoshio Imura Naoki Kamada, Tomomi Yokoyama, Kaori Tano, Atsuko Uchida, Naoko Narita

Neuroscience Research 2010, 66;2-6

2, 学会発表

1) 国内

1, 井村誉史雄、高橋理貴、内田敦子、田代朋子、成田正明

「モデル動物を用いた自閉症発症機構の解明～脳内セロトニン量に影響を及ぼす因子の探索」

第 12 回活性アミンに関するワークショップ 2009 年 8 月 28 日 三重

2, 大藪明子、井村誉史雄、太城康良、内田敦子、成田正明

「自閉症モデルラット胎生期におけるセロトニン神経の分化誘導因子の発現異常とその影響について」

第 115 回日本解剖学会総会全国学術総会 2010 年 3 月 28-30 日 盛岡

3, 成田正明、大藪明子、井村誉史雄、横山智美、鎌田尚樹、田野かおり、太城康良、内田敦子、

第52回日本神経化学学会大会

シンポジウム (オーガナイザー)

「発達障害（自閉症）モデル動物の現状」
2009年6月21－24日 伊香保

4, 成田正明 三重メディカル研究会主催
第2回環境健康学研究会 「化学物質の胎
内ばく露がもたらす発達の異常」 2010
年2月19日 三重 （資料 パンフレッ
ト）

5, 成田正明 化学物質と健康・環境シン
ポジウム 「胎児と化学物質」2010年2月
18日 仙台、3月2日 東京

2) 海外

1, Akiyuki Saotome, Mami Tazoe, Osawa,
Mitaka, Masaaki Narita, Kaoru Sakatani,
Naoko Narita,

Impaired prefrontal cortical response by
switching stimuli in autism spectrum
disorders assessed by near-infrared
spectroscopy.

8th Annual International Meeting For Autism
Research

May 8-10, 2009, Chicago, USA

2, Naoki Kamada, Kaori Tano, Yoshio Imura,
Akiko Oyabu, Tomomi Yokoyama, Naoko
Narita, Yasura Tashiro, Atsuko Uchida,
Masaaki Narita

Immunohistochemical localization of
manserin, a novel neuropeptide derived from
secretogranin II, in the rat adrenal glands:
Relevance to stress response mechanism

Society For Neuroscience meeting, Oct 23-27,
Chicago, USA

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を
含む）

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし