

201035021A

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 22 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 成 田 正 明

平成 23 年 (2011) 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 22 年度（3 年計画の 2 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	太城 康良	三重大学大学院医学系研究科	講師
研究協力者	江藤 みちる	三重大学大学院医学系研究科	助教
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	前任准教授
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	袖木 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	
その1 バルプロ酸およびサリドマイドの胎内ばく露モデル動物におけるセロトニン神経系の初期形態	15
成田 正明	
その2 胎生期チメロサルバームばく露によるセロトニン神経の初期発生に関する研究	21
成田 正明	
2. DNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子解析	25
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	36
成田 奈緒子	
4. 有害化学物質と発達障害の関連に関する疫学研究	47
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	83
IV. 研究成果の刊行物・別刷	87

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

本研究は「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」に関し、妊娠中の化学物質ばく露が児に情動・認知行動異常を引き起こすメカニズム解明のための動物実験、ばく露の有無を知るためのバイオマーカー検索のための網羅的発現遺伝子検索、情動・認知行動異常を臨床的に把握する手法解明、生体（歯や毛髪）に蓄積する有害物質と情動・認知行動異常との関連を調べることを目的とする、安全な国民生活の向上を目指した基礎医学・臨床医学・社会医学にまたがる融合研究である。

メチル水銀、ポリ塩化ビフェニル(PCB)、医薬品など、妊娠中の化学物質のばく露は、先天奇形発症の危険は言うに及ばず、最近はこれらの物質による、生後の情動・認知行動への影響が深刻となってきた。「情動・認知行動の異常」は臨床的には「発達障害」と捉えられるが、この発達障害の発症はこの30年ほどで10倍以上と著しく増えており、これは昨今の妊婦をめぐる環境の変化、なかでも有害化学物質と切り離しては考えられない。しかしながら妊娠中の化学物質ばく露によって本当に発達障害が発症するのか、発症するなら妊娠のいつの時期のばく露がいけないのかについては、発達障害そのものの原因や病態が十分解明されていない現在、不明のままであった。これらの問題を解決するため、化学物質で発達障害が発症するかしないかの数字的事実のみならず、それを引き起こす分子メカニズムの解明、ばく露があったかどうかのバイオマーカー、そしてそれを臨床的に客観的に見分ける手掛かりなど、包括的な研究成果が急がれている。

平成22年度の成果は以下のとおりである。

①サリドマイドやバルプロ酸の妊娠ラットへの胎生期ばく露動物実験では、これまで研究代表者が明らかにしてきたヒト自閉症に似た行動異常やセロトニン神経の初期発生の異常に加えて、脳神経、特に顔面・内耳神経の正常な初期発生を妨げることを明らかにした。ヒトの発達障害児でも顔面表情のこわばりが見られることがしばしばあり興味深い。

また他の化学物質、特に有機水銀などの重金属ばく露による生後の情動・認知行動の異常も知られているが（例；先天性水俣病）、詳細な分子メカニズムはわかっていない。今回妊娠ラットに有機水銀をばく露させたところ、セロトニン神経の発生に異常をきたすことを顕微鏡所見として明らかにした。有機水銀による今回のような、将来の行動異常を示唆するような形態学的異常は前例がなく、最終年度には全貌を明らかにしたい。

②化学物質ばく露によりその発現量が増加する遺伝子の探索研究では、通常行われている市販のDNAマイクロアレイ法による膨大な発現遺伝子の網羅的解析とともに、研究分担者・田代朋子により最近開発された、脳シナプス機能に関与する遺伝子の探索に焦点を絞ったDNAマイクロアレイである「シナプトアレイ法」を本研究に適用した。その結果、従来のDNAマイクロアレイ法では検知が難しかったサリドマイド胎生期ばく露による、脳の発達過程での発現が変化している遺伝子群（＝神経シナプス機能に関与する遺伝子群）を検出できた。このことは胎生期のサリドマイドばく露においてシナプス形成やミエリン形成が異常に促進していることが示唆され、自閉症児では頭囲拡大がしばしば見られることから興味深い。

③客観的診断法がなかった発達障害（特に高機能自閉症、アスペルガー障害）に対し、近赤外線酸素モニターを用いた非侵襲的脳機能評価法を適用し、診断への応用を試みた。昨年度は、思い出し記憶（情動想起タスク）による前頭葉の血流動態を調べたところ、健常者と自閉症者で左右差があることが分かり、この左右差は診断ツールとしてだけでなく、自閉症者の思考回路を知る上で応用可能であることが示唆されたが、本年度はこれをさらに詳細に検討するため、前頭葉の実行機能の一つであるワーキングメモリ機能を賦活／非賦活する課題を交互に出現させ、難易度を上昇させる顔表情刺激を用いたタスクを解析した。その結果、(1) 個体の不安レベルにより情動想起の際の前頭葉賦活のlateralityが変化する、(2) このlateralityの差異は計算やワーキングメモリなどの前頭葉実行機能に関連する可能性がある、(3) その本態として不安の高さ、前頭葉機能の先天的障害が示唆されているASD児者での前頭葉機能異常は、刺激に呼応するlateralityの差に起因する可能性が高いと考えられる、という3点が示唆された。

④生後の情動・認知行動異常と、体内に蓄積する有害化学物質と関連の有無を調査するため、研究協力者より生体試料として乳歯・毛髪を提供して頂き、鉛・カドミウムなどの重金属の検出の有無を試みるとともに、毛髪や乳歯などの試料提供者の詳細な発達歴を調査票で検討する全国大規模疫学調査計画を行っている。平成22年11月現在13000部以上配布し現在回収中(500部以上)で、順次解析・検討中である。これまでの調査では発達に問題のありを示唆する一定数の児童が存在することが明らかになったほか、妊娠中の異常、妊娠中の魚の摂取頻度、妊娠中の薬剤の服用歴、さらには妊娠中の居住地と幹線道路との距離などとの関連を解析中である。本疫学調査は全国都道府県の教育委員会・小学校・保育園などに協力を依頼し行っている。

<分担研究者>

田代 朋子
青山学院大学理工学部
教授

横山 和仁
順天堂大学医学部
教授

成田 奈緒子
文教大学教育学部
教授

<研究協力者>

太城 康良
三重大学大学院医学系研究科
講師

江藤 みちる
三重大学大学院医学系研究科
助教

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
先任准教授

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、化学物質ばく露妊娠動物を用い解析する。研究代表者によるサリドマイドやバルプロ酸による自閉症モデル動物で、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。さらにばく露によりその発現動態が変化する遺伝子群を網羅的に検索する(DNAマイクロアレイ)ことで、ばく露があったか無かったを知るバイオマーカーの確定を目指す。同時にばく露による臨床評価法として、近赤外線酸素モニターを用いた脳機能測定法の有効性を確かめ、臨床現場での運用に持ち込む。また、生後の情動・認知行動異常と、体内に蓄積する有害化学物質と関連の有無を調査するため、研究協力者より生体試料として乳歯・毛髪を提供して頂き、鉛・カドミウムなどの重金属の検出の有無を試みるとともに、毛髪や乳歯などの試料提供者の詳細な発達歴を調査票で検討する。

以上により妊娠中の有害化学物質ばく露による情動・認知行動異常発症への影響を客観的に把握する手段を確立し、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

研究方法 1, 化学物質ばく露モデル動物解析

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、その動物でヒト自閉症に似た行動異常、及び自閉症病態の原因とされるセロトニン神経の異常を報告してきた。同じく妊娠中の内服で児に自閉症が生じるとされる抗てんかん薬バルプロ酸(VPA)を用いた動物実験でも、同様の所見を認めている。そこで今回の研究では、サリドマイドやバルプロ酸の妊娠ラットへの投与による影響をさらに調べるとともに、他の化学物質 (メチル水銀、エタノール、ポリ塩化ビフェニル(PCB)など) でも共通のカスケードが存在するかなどを解明する。

Wistar ラット (膣栓確認日を胎齢(E)0.5とした) を用いた。化学物質として VPA の投与は E9 に Thal 500mg/kg または VPA 800 mg/kg を溶媒として 5%アラビアゴム/蒸留水に溶かし、栄養カテーテルを用いて無麻酔下で1回経口投与した。コントロール群には溶媒のみを同様に投与した。そのまま妊娠を継続させ、E14.5 で帝王切開にて胎仔を取り出し、展開標本作製した。

4%パラホルムアルデヒドで6-8時間固定後、PBS中に4°Cで保存した。展開標本を浮遊の状態免疫染色を行い、抗セロトニン抗体 (Invitrogen) とビオチン化した二次抗体を用いてABC法によりDABで神経線維を可視化した。

正立光学顕微鏡下で観察および写真撮影を行い免疫染色された細胞体および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 を用いて線維束の長さ、細胞数などを計測した。統計解析は Microsoft Excel または Origin6 を用いて t 検定を行った。

また妊娠ラットに有機水銀をばく露させどのような異常が起きるかも検討した。即ちチメロサル (有機水銀) /生理食塩水溶液 (1 mgHg/kg) を妊娠9日目の Wistar ラット (膣栓確認日を胎齢0日とした) の大臀筋に筋肉注射により投与した。コントロールは生理食塩水のみを同様に投与した。E15で帝王切開により胎児を取り出し、神経管を背側から切開して脳幹部分の展開標本作製した。標本は4%パラホルムアルデヒドで一晩4°Cにて固定後、TBS中で4°Cにて保存した。標本を抗セロトニン抗体でABC法による免疫染色を行い、DABで発色を行った。光学顕微鏡下で観察し、デジタルカメラによる撮影を行った。背尾側に見られたセロトニン弱陽性細胞の数を片側について計測し、実験群と対照群で比較した。

研究方法 2. DNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子解析

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。ばく露の有り無

しで遺伝子発現にどのような変化が起こるか網羅的に解析する必要がある。その目的で従来より好んで行われてきた市販の大集積DNAマイクロアレイ(44000プローブ)を用いての検索を行った。一方、化学物質ばく露によりその発現量が変化する神経系の遺伝子の探索目的で、通常行われている上記の市販マイクロアレイ法では効率・精度が悪いことが懸念されていた。

胎生期サリドマイド曝露による自閉症モデル・ラットおよび胎生期-生後初期トリブチルスズ(TBT)曝露ラットを作成し、生後1週~9週の各時点で大脳皮質、海馬または中脳における遺伝子発現を非曝露対照群と比較解析した。サリドマイドについては成田らの方法に従い、妊娠9日目の単回強制経口投与(500mg/kg)を行った。TBTについては、妊娠初期より生後3週の離乳期まで母ラットに混餌投与(25または125ppm)し、生後3週~6週まではTBTを含まない通常餌で飼育した。さらに2010年度は生後6週~9週までの間に再曝露あるいは初回曝露する群を作成し、発達期の曝露と成熟後の曝露の違いを検討した。

遺伝子発現の比較解析にはまず、神経系の発達に関与する約500の遺伝子に対する特異的プローブを搭載したオリジナルDNAマイクロアレイ「シナプトアレイ」を使用した。アレイで得られた結果についてリアルタイムPCR法により確認を行った。

さらに、サリドマイド曝露ラットについては成田らのグループとの共同研究により、市販の大集積DNAマイクロアレイ(44,000プローブ)を用いて生後10日の時点での網羅的遺伝子発現解析を行った。

アレイ・データの取得と解析は、反応後

のマイクロアレイをDNA Scope IV (Gene Focus社)を用いてCy3、Cy5両波長域で蛍光スキャンし、得られた蛍光強度データをImaGeneソフトウェア(Biodiscovery社)で定量化した。データは、アレイ上の6種類の標準遺伝子(*rpL3*, *rpL13a*, *rpL22*, *rpL23*, *Ppia*, *ubiquitin1e*)の値を用いて標準化した。

研究方法 3. 近赤外線酸素モニターを用いた非侵襲的脳機能評価

前年度までの研究結果より、情動想起タスクを負荷した際の健常者と自閉症スペクトラム(ASD)者での差異が明確になった。即ち健常被験者19名では、情動想起開始とともに平均的に左側優位のO₂Hb濃度上昇が認められたのに対し、ASD患者及び一部の健常被験者健常被験者と異なり、右側優位のO₂Hb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であり、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について報告した。今年度はこれをさらに詳細に検討するため、前頭葉の実行機能の一つであるワーキングメモリ機能を賦活/非賦活する課題を交互に出現させ、難易度を上昇させる顔表情刺激を用いたタスクを用いてその際の前頭葉O₂Hb濃度変

化を検討した。

(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。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。

研究方法 4. 有害化学物質と発達障害の関連に関する疫学研究

妊娠中の化学物質ばく露により、児に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、化学物質が長く蓄積するとされる毛髪、抜けた乳歯を研究協力者に提供して頂き、合わせて発達に関する調査票(質問紙)とともに、発達の異常と、化学物質の蓄積に有無について、全国規模で調査を行うものである。

調査票で回答していただく項目は50項目以上と多岐にわたるがここに一部を抜粋すると、母親の仕事内容(化学物質ばく露状況)、妊娠中の魚摂取頻度、居住地と幹線道路との距離、妊娠中の異常、妊娠中の鉄剤・栄養剤・サプリメント服用等、幼児児童の出生時の状況、出生順位、既往歴、生活リズム、母親の子育て困難感、発達上の問題などである。発達障害については有用な診断指標として用いられている PARS (Pervasive Developmental Disorders

Autism Society Japan Rating Scale)の短縮版により情報を収集した。

毛髪ならびに乳歯中の微量元素の測定は、マイクロウェーブ湿式分解ののち誘導結合プラズマ質量分析法(ICP-MS法; Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry)で行った。毛髪における測定対象元素は、リチウム(Li)、ベリウム(Be)、ホウ素(B)、アルミニウム(Al)、チタン(Ti)、バナジウム(V)、クロム(Cr)、マンガン(Mn)、ニッケル(Ni)、コバルト(Co)、銅(Cu)、亜鉛(Zn)、ガリウム(Ga)、ヒ素(As)、セレン(Se)、ストロンチウム(Sr)、ルビジウム(Rb)、ジルコニウム(Zr)、モリブデン(Mo)、銀(Ag)、カドミウム(Cd)、錫(Sn)、アンチモン(Sb)、バリウム(Ba)、タリウム(Tl)、鉛(Pb)、およびビスマス(Bi)、とした。歯牙についてはマイクロウェーブ湿式分解ののち、原子吸光度法でのPb、Cdの濃度測定を行った。毛髪中の水銀についても独立行政法人・労働安全衛生総合研究所(鷹屋光俊先生)のご協力のもと、還元気化原子吸光分析装置で今後測定予定。

(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には取らない。

C. 研究結果

結果 1, 化学物質ばく露モデル動物解析

前述のように、妊娠中のサリドマイドやバルプロ酸のばく露では児に自閉症が生じることが知られている。これらの物質の妊娠ラットへの胎生期ばく露動物実験では、これまで研究代表者はヒト自閉症に似た行動異常やセロトニン神経の初期発生の異常を明らかにしてきた。今回の研究ではこれをさらに別の角度からの観察、すなわち胎児展開標本で行ってみた。まず、対照群とサリドマイド投与群、VPA投与群を比較して、体表に顕著な奇形および頂殿長に有意な差はなかったが、菱脳の展開標本において、抗セロトニン陽性の細胞体および線維が観察された。この標本においては後脳に位置する細胞体群を吻側縫線核群、髄脳に位置する細胞体群を尾側縫線核群と称する。また、吻側縫線核群においては、対照群、サリドマイド投与群、VPA投与群ともに、細胞数、占有面積、細胞体の密度に有意な差はみられなかった。

吻側縫線核群の細胞体はフロアプレート の両側に分布している。フロアプレートから最も背側に離れて位置する細胞体までの距離は、対照群と比較してサリドマイド投与群では有意に短くなっていた ($p<0.05$)。VPA投与群においても有意差は認められないものの、減少する傾向にあった。また、フロアプレートから最も背側に離れて位置する細胞体の吻尾軸方向での相対的な位置 (Fig. 3B, b/c; Fig. 3D) は、対照群よりもサリドマイド群がやや吻側に、有意に変位することが認められた ($p<0.05$)。VPA投与群では有意な差は認められなかった。このように、サリドマイド投与群やVPA投与群では、細胞体の数や占有面積は変化しないものの、分布の様式がフロアプレート寄り

に集合し、背側への拡大が少なくなっており、この傾向はVPA投与群よりもサリドマイド投与群で現れやすかった。

尾側縫線核群の細胞体の数や分布に顕著な差は認められなかった。尾側縫線核の吻側の神経核からは、下行性線維が伸長していた。対照群と比較してサリドマイド投与群、VPA投与群ともに、下行性線維の長さは有意に短くなっていた ($p<0.001$)。

また妊娠中の他の化学物質、特に有機水銀などの重金属ばく露による生後の情動・認知行動の異常も知られているが (例; 先天性水俣病)、詳細な分子メカニズムはわかっていない。妊婦への魚貝類摂取の指針 (厚生労働省指針) の科学的裏付けも求められている。そこで今回妊娠ラットに有機水銀をばく露させその影響を見たところ、胎生期に有機水銀をばく露することで、ラットの腹尾側縫線核におけるセロトニン系神経細胞の分布異常が見られ、セロトニン神経の初期発生に影響を及ぼすことが示された。有機水銀による今回のような、将来の行動異常を示唆するような形態学的異常は前例がなく、最終年度に全貌を明らかにしたい。

結果 2. DNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子解析

(1) サリドマイド誘発自閉症モデルラット: 2010年度に三重大学グループと共同で、市販のラット用大集積アレイ (44,000プローブ; Agilent社) を用いたP14大脳皮質におけるサリドマイド曝露群 (THA群)、対照群 (CTL群) およびヴァルプロ酸曝露群 (VPA群) の遺伝子発現解析を行った。THA群と

VPA 群に共通した発現変化に焦点を絞って解析した昨年度とは別に、今年度改めて THA 群の結果を精査したところ、メチル化 DNA 結合タンパク MeCP2 との関連が示唆されたので、この点に注目してリアルタイム PCR による確認を行ったところ、CTL 群に比べて THA 群で 1.3 倍以上発現上昇した遺伝子中には *fkbp5*、*igfbp3*、*ucp2* が含まれていた。これらは Rett 症候群の原因遺伝子である *mecp2* の標的として知られる遺伝子である。また、発現低下した遺伝子群に検出された *egr1* の遺伝子産物である Egr1 タンパクは神経活動により発現上昇する転写因子で、MeCP2 と相互に発現を制御しあうことが知られている。

MeCP2 はプロモーター領域にあるメチル化 DNA 部位に特異的に結合し、その遺伝子の転写を抑制するメチル化 DNA 結合タンパクの一種である。本モデル動物にみられる発達障害にこのようなエピジェネティックな調節機構が関与する可能性を検討するため、マイクロアレイ法で検出された *fkbp5*、*igfbp3*、*ucp2* の三種類に加えて *bdnf*、*mobp* の二種類の MeCP2 標的遺伝子および *mecp2* 自身の発現プロファイルを今年度新たに作成した THA 群、CTL 群を用いてリアルタイム PCR 法で解析した。

その結果、*mecp2* 自身の発現変化はみられなかったが、*ucp2*、*mobp* で有意な発現上昇が、*fkbp5*、*bdnf* では一部の時点で上昇傾向がみられた。現在、MeCP2 の発現やリン酸化状態についてタンパク質レベルで調べている。一方、*egr1*、*camk2b* など神経活動と密接に関連する遺伝子が発現低下していることから、ポストシナプス側の構造を中心にタンパクレベルでの変化を検討予定。

(2) 胎生期-生後初期 TBT ばく露ラット：

2010 年度は、胎齢 2 日目から生後 3 週まで継続的に TBT を経世代ばく露するこれまでの実験群に、生後 3 週～6 週にわたって直接ばく露する群を加えた 4 群で実験を行い、比較した。

9 週齢における 4 群の体重および肝臓、腎臓の組織重量を比較すると、成熟後ばく露 (CT 群; adult-exposed) では非ばく露対照群 (CC 群; control) と差がなく、発達期にばく露を受けた二群 (TC 群; perinatally-exposed および TT 群; re-exposed) で約 25% の減少がみられた。一方、胸腺の組織重量は、発達期、成熟期を問わず、直前までばく露された群 (CT 群、TT 群) で有意に低下しており、免疫系に対する影響が TBT ばく露を止めると回復しやすいことと一致する。

この 4 群を用いて、昨年度までの実験により TBT の影響が大きい部位であることが明らかになった中脳の遺伝子発現をリアルタイム PCR 法で比較した。ドパミン産生の律速酵素であり、ドパミン神経細胞のマーカともなるチロシン水酸化酵素 (*th*) の発現は、発達期ばく露が終了した 3 週齢の時点では、TBT ばく露群で有意に上昇していたが、6 週齢では非ばく露群と同レベルに戻っていた。しかしながら、6 週～9 週での再ばく露により、発達期ばく露群は *th* の大幅な発現低下を示した。一方、6 週～9 週の初回ばく露 (CT 群) での発現低下は発達期ばく露に比べて緩やかであった。

ドパミン輸送体 (*dat*) については、3 週齢、6 週齢では TBT ばく露による変化がなく、

9週齢では再びく露群 (TT 群)のみ、CC 群または CT 群に比較して有意に発現が低下していた。一方、ドパミン分解酵素 *comt* およびドパミン受容体の一つである *drd2* については、9週齢の時点で4群の間に発現差はみられなかった。オープンフィールド・テストにおいても、成熟後に TBT にばく露した群 (CT 群) は非ばく露群 (CC 群) に比べて差はなかったが、発達期ばく露を受けた2群 (TC 群、TT 群) では行動量に低下傾向がみられた。

(3) 培養細胞を用いた評価系：

胎齢18日ラット大脳皮質由来の初代培養神経細胞を用いて TBT の影響評価を試みた。初めは血清入り培地で培養し、培養48時間後に無血清培地に交換すると同時に様々な濃度で TBT を添加した。細胞内の還元性を指標に細胞生存を評価する MTT 法で TBT 添加24時間後に調べた結果、図4に示すように TBT 濃度 $1.25\mu\text{M}$ 以上で細胞死が誘発されることが分かった。また、抗酸化剤である N-アセチルシステイン (NAC) を同時に添加すると、この TBT 濃度での細胞死が有意に抑制された。

次に、より低濃度・長時間のばく露による神経回路への TBT の影響を評価する系を確立するために、 $1.0\mu\text{M}$ 以下の TBT 濃度で4日間培養後の生存率を同様の方法で調べた。その結果、図5に示すように、 200nM 以下の濃度であれば細胞死を誘発せずに、より詳細に神経突起やシナプス形成に対する TBT の影響を評価できることが分かった。

結果 3. 近赤外線酸素モニターを用いた非侵襲的脳機能評価

健常被験者全22名における脳血流動態変化と課題遂行率を、左右前頭葉 O_2Hb 濃度変化と課題の正答率の平均値としてそれぞれの課題ごとに求め、グラフに表した。課題遂行率はワーキングメモリを要しない NWM 課題においてより高く、WM 課題の遂行率は課題の難易度が上がるにつれ下降する結果が得られた。一方、左右前頭葉 O_2Hb 濃度は、課題3より漸時上昇し、課題3-6においては平均として右側優位に上昇していることが認められた。また、右側 WM 課題 2-NWM 課題 2、及び左側 WM 課題 3-NWM 課題 3 間では、Mann-Whitney-Wilcoxon の検定により $p < 0.05$ の有意差を検出し、課題間での前頭葉血流量の切り替えがおこっていることが示唆された。次に、健常被験者の間で正答率の差による前頭葉活動の差異の有無につき検討するため、全課題の遂行率の平均値をもとに健常群を三群に分類した。即ち、遂行率の平均値から 0.5SD 以上を成績上位群 ($n=8$)、平均から上下 0.5SD 以内を成績中位群 ($n=8$)、平均から 0.5SD 以下を成績下位群 ($n=6$) とした。

それぞれの群における脳血流動態変化と課題遂行率平均値で考えると、成績上位群では、WM 課題遂行時に O_2Hb 濃度が上昇し、NWM 課題遂行時に下降する傾向が認められ、全体として左側前頭葉の活性が優位に推移する laterality が観察された。これに対し成績中位群では、上位群と異なり NWM 課題遂行時に O_2Hb 濃度が上昇し、WM 課題遂行時に下降する傾向が認められ

たが、*laterality* はやはり左側優位であった。

一方、成績下位群においては、やはり上位群と異なり NWM 課題遂行時に O₂Hb 濃度が上昇し、WM 課題遂行時に下降する傾向が認められたが、*laterality* は右側優位であり、他の二群とは異なる傾向が見られた。また、他の二群が課題の難易度の上昇と共に左右 O₂Hb 濃度が上昇する傾向を呈したのに対し、成績下位群では NWM3 以降左右共に O₂Hb 濃度は下降していく傾向が観察された。

人生で最も嬉しかったこと、及び最も悲しかったことを想起するよう指示したところ、健常者では、左優位の前頭葉血流増加が認められたのに対し、自閉症者では右優位の活性化が認められた。

即ち、健常被験者19名での情動想起負荷時の前頭葉血流内酸化ヘモグロビン (O₂Hb) 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左側優位のO₂Hb濃度上昇(=左優位の前頭葉活性化)が認められた。一方、自閉症者及び一部の健常被験者では右側優位のO₂Hb濃度変化が認められた。この被験者たちには不安が高い傾向にあった(不安尺度 STAI State-Trait Anxiety Inventoryを用いた不安度の定量により)。このことは自閉症者において、情動処理機能の異常、及びストレスに対する耐性が低下していること示唆する。また情動想起後に計算問題をさせてみると、ネガティブ情動想起後(=不安に関連すると思われる)に正答数が落ちていた。即ち、(1) 個体の不安レベルにより情動想起の際の前頭葉賦活の*laterality*が変化する、(2) この*laterality*の

差異は計算やワーキングメモリなどの前頭葉実行機能に関連する可能性がある、(3) その本態として不安の高さ、前頭葉機能の先天性障害が示唆されているASD児者での前頭葉機能異常は、刺激に呼応する*laterality*の差に起因する可能性が高いと考えられる、という3点が示唆された。

結果 4. 有害化学物質と発達障害の関連に関する疫学研究

小学校就学前検診のため受診会場に来院した児童、及び保育園、幼稚園、小学校在園・在籍の児童・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。

2010年11月現在調査票511例(調査票配布数の約4%)、歯牙検体460例、毛髪検体504例を回収している(現在も研究依頼配布および回収継続中)。分担研究機関にて解析済みの調査票436例中、広汎性発達障害が疑われるとされる診断指標 PARS ピーク時(症状が一番顕著だった時の意)得点5点以上は、14.9%に認められた。この数字は通常の有病率と比較するとかなり高い数字とすることになるが、PARSは本来面接で使用するものであり、今回の調査では母親の自記式であることなどを考慮する必要がある(次項「考察」参照)。一方、興味深いことに、PARS ピーク時5点以上の児童は、出生順位第1子が多かった。また、妊娠中に鉄

剤以外の何らかの服薬有りとする回答の割合が多かった（但しリコールバイアス、即ち思い出し誤り、の可能性もある）。母親の魚の摂取頻度、居住地と幹線道路との距離、妊娠中の異常、妊娠中の鉄剤・栄養剤・サプリメント服用、その他の項目に関連は認められなかった。また調査票中にある発達障害診断指標である PARS 短縮版は 12 項目から構成されており、その各項目と母親の妊娠中の状況や幼児・児童の生活状況等との関連も分析する。

毛髪のマイクロウェーブ湿式分解は、2010 年 12 月現在で 282 検体の分解を終え、そのうち 68 検体の測定を終了した。毛髪の検体については、標準物質として NIES13、内部標準物質として In (0.5ppb) を添加することで再現性・正確性ともに良好な状態で測定できる。歯牙検体中の微量元素を ICP-MS で測定する際には、歯に含まれる Ca、Mg の存在が大きいため、精度よく測定することが難しい。現在、マイクロウェーブ湿式分解ののち、原子吸光光度計を用いて、Pb、Cd 等、特に健康影響が懸念される元素の定量を行う検討を行っている。「方法」の項で述べたように、毛髪における測定対象元素は、リチウム(Li)、ベリウム(Be)、ホウ素(B)、アルミニウム(Al)、チタン(Ti)、バナジウム(V)、クロム(Cr)、マンガン(Mn)、ニッケル(Ni)、コバルト(Co)、銅(Cu)、亜鉛(Zn)、ガリウム(Ga)、ヒ素(As)、セレン(Se)、ストロンチウム(Sr)、ルビジウム(Rb)、ジルコニウム(Zr)、モリブデン(Mo)、銀(Ag)、カドミウム(Cd)、錫(Sn)、アンチモン(Sb)、バリウム(Ba)、タリウム(Tl)、鉛(Pb)、およびビスマス(Bi)である(誘導結合プラ

ズマ質量分析法；ICP-MS 法；Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry)。関心の大きい毛髪中の水銀についても、独立行政法人・労働安全衛生総合研究所（鷹屋光俊先生）のご協力のもと、還元気化原子吸光分析装置で今後測定予定。

D. 研究考察

考察 1, 化学物質ばく露モデル動物解析

胎生期のセロトニン神経の起始核となる縫線核群と下行性線維の形態について、自閉症モデルであるサリドマイド投与と VPA 投与群では、吻側縫線核群の細胞体分布と尾側縫線核からの下行性線維に異常が観察された。本研究の胎生期のセロトニン神経系の形態観察に展開標本を用いたことは適切かつ有用であるといえる。

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。化学物質ばく露モデル動物の解析で、胎生期有機水銀（＝チメロサル）ばく露ラットでセロトニン初期発生異常を認めたことは化学物質の種類に関わらず、生後のセロトニン神経不全に向けての共通のカスケードが存在する可能性を示唆する。チメロサルは有機水銀の一種であることから、その神経毒性について懸念されていたが、詳細は明らかにされていなかった。本研究では、妊娠ラットにチメロサルをばく露後その胎仔のセロトニン系神経の形態学的解析を行い、胎生期チメロサルばく露がセロトニン神経細胞の増加を引き起こしセロトニン系神経の初期発生に影響を及ぼすことを初めて示した点で意義深い。

考察 2. DNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子解析

本研究のこれまでの結果は、セロトニン神経の投射先である大脳皮質においてこのモデル動物では、シナプス形成の時間的ずれや早期のミエリン形成などの神経発達異常が生じていることを示す。その原因として MeCP2 による制御が低下している可能性が示唆されたため、今後、個体レベルと培養細胞レベルでの確認を進める。

また胎生期 - 生後初期での TBT ばく露の影響は大脳皮質より中脳で顕著であること、発達期の曝露の方が成熟後の曝露より影響が大きいこと、発達期に TBT 曝露を受けた動物が成熟後に再曝露されて場合はさらに影響が大きくなること、が確認できた。

考察 3. 近赤外線酸素モニターを用いた非侵襲的脳機能評価

初年度の解析では自閉症者においては、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が、本年度は新たに、顔表情タスクを施行する際に、健常者では左側優位の前頭葉の活性化が起こることが示唆された。今回作成したタスクに用いた人の表情の写真は、喜怒哀楽それぞれ複数種の表情を含んでおり、表情認知を行う際に情動を想起する可能性がある。また比較的課題の難易度は高いために、課題遂行そのものによりネガティブな情動を想起したことも推測された。今回の実験で

得られた左側優位の前頭葉 O₂Hb 濃度の上昇の理由としては、単にワーキングメモリの賦活のみならず、情動想起も起こっていたからと考えることができる。

考察 4. 有害化学物質と発達障害の関連に関する疫学研究

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。通常の発症率（多くても 1 %）と比較するとかなり高い数字と考えられるが、PARS は本来面接で使用するものであり、今回の調査では母親の自記式であり、母親が自分の子供たちを繊細に注意深く観察している裏返しともとれる。また PARS 判定の基本的注意事項として結果の数字のみで判断してはならず、診断の確定には専門医によってなされるものであることを考慮しなければならない。今後は、PARS 下位分類間での得点と母親の妊娠前・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。さらにデータを追加するとともに、総合的な解析を行う予定である。

E. 結論

化学物質ばく露モデル動物の解析では、胎生期有機水銀ばく露ラットでセロトニン初期発生異常を認めた。サリドマイドやバルプロ酸投与と共通する所見ともいえるが、合同の所見ともいえない。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、病態解明・診断への応用を目指す。臨床的にはヒトで、先天性の前頭葉機能障

害に着目した近赤外線酸素モニターによる情動・認知行動の異常（アスペルガー症候群など発達障害）を鑑別しうる方法を検討中である。有害化学物質の生体中蓄積と情動認知行動異常との関連を、研究協力者からの抜けた乳歯・毛髪提供により、全国規模で調査中である。

ま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。

最終年度は上記の基礎研究・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

別に記載

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 22 年度研究課題: 「化学物質ばく露モデル動物解析」

その 1 バルプロ酸およびサリドマイドの胎内ばく露モデル動物におけるセロトニン神経系の初期形態

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	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	博士課程

研究要旨

抗てんかん薬バルプロ酸ナトリウム (VPA) は、妊婦の服用、即ち胎生期のばく露で児に情動・認知行動の異常である発達障害 (自閉症) を引き起こすことが知られており、私どもはこれを妊娠ラットで再現し、「自閉症モデルラット」として報告してきた。自閉症モデルラットでは、VPA ばく露の時期特異的に、自閉症病態の鍵物質とされるセロトニンの異常がある。本研究では胎生期のセロトニン系の形態異常を菱脳の展開標本を用いて報告した。セロトニン神経の起始となる吻側縫線核群の細胞体の分布に異常が認められ、尾側縫線核からの神経線維の伸長は抑制されていた。

結論: サリドマイド、バルプロ酸のばく露は、胎生期のセロトニン神経の起始核の形態発達にも影響を与える。下行性線維の伸長の抑制が認められたことから、上行性線維の伸長も抑制される可能性があり、中枢神経系の広汎なセロトニン神経の投射形成が阻害されている予見される。

A. 研究目的

研究代表者らは妊婦の内服で発達障害 (自閉症) をきたすサリドマイドや抗てんかん薬バルプロ酸 Na (VPA) を妊娠ラットに投与することにより、「自閉症モデルラット」を作成してきた。自閉症モデルラットでは、行動異常、セロトニン系の異常を認めヒト自閉症と多くの点で共通する。

セロトニン神経系は後脳の縫線核群を起始として上行性および下行性の神経線維によって中枢神経系の広汎に投射する。先行研究において、自閉症モデルラットでは縫線核群の分布状況が対照群と異なることが報告されている。薄切切片を再構成し、冠状面の連続切片における抗セロトニン陽性の細胞数をそれぞれ計数すると、自閉症モデルラットでは細胞体の

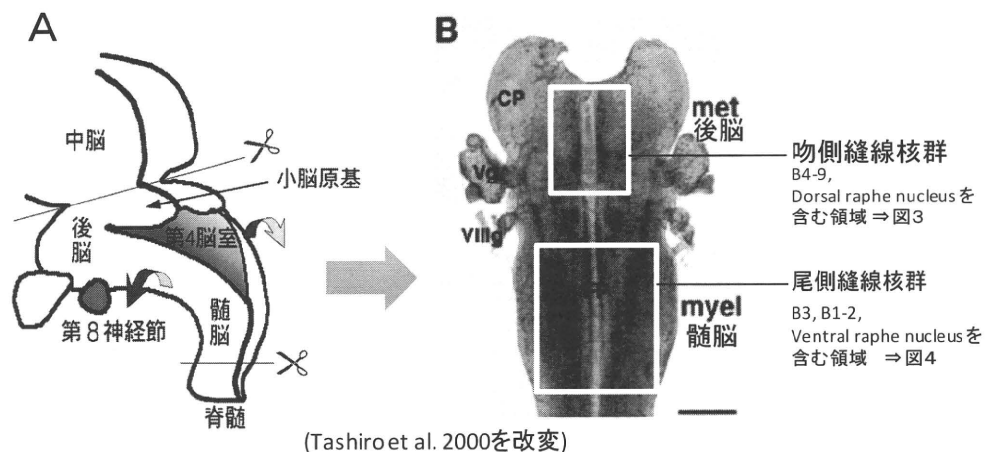


Fig. 1 神経管展開標本の作製と観察部位

分布が吻側に変位する傾向が認められた。しかし、このような生後の形態異常が胎生期から生じているかは明らかではない。

胎生期中枢神経系における細胞体の分布や軸索伸長の形態を観察するのに適した方法の一つとして、展開標本(後述)を活用することができる。発生期中枢神経系は管状構造をなす神経管である。管状構造をシート状に展開することで、三次元情報を相対的に保持したまま、吻尾軸、背腹軸方向に沿って、細胞体の分布や軸索の走行を容易に連続的に把握することができる。

本研究では、縫線核群を含む菱脳(後脳+髄脳)の展開標本を用いて、自閉症モデルラットにおけるセロトニン神経系の形態異常が、胎生期から存在することの解明を目的とした。

B.研究方法

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。Wistar ラット(陰栓確認日を胎齢(E)0.5とした)を用いた。VPAの投与はE9にThal 500mg/kg またはVPA 800 mg/kg を溶媒として5%アラ

ビアゴム/蒸留水に溶かし、栄養カテーテルを用いて無麻酔下で1回経口投与した。コントロール群には溶媒のみを同様に投与した。そのまま妊娠を継続させ、E14.5で帝王切開にて胎仔を取り出し、展開標本を作製した(Fig.1)。

4%パラホルムアルデヒドで6-8時間固定後、PBS中に4°Cで保存した。展開標本を浮遊の状態免疫染色を行い、抗セロトニン抗体(Invitrogen)とビオチン化した二次抗体を用いてABC法によりDABで神経線維を可視化した。

正立光学顕微鏡下で観察および写真撮影を行い免疫染色された細胞体および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を用いて線維束の長さ、細胞数などを計測した。統計解析はMicrosoft Excel または Origin6を用いてt検定を行った。

C. 結果

対照群とサリドマイド投与群、VPA投与群を比較して、体表に顕著な奇形および頂殿長に有意な差はなかった(Fig.2)。