

201133010B

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 21～23 年度 総合研究報告書

研究代表者 成 田 正 明

平成 24 年 (2012) 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

総合研究報告書

平成 21～23 年度

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	葛山 貴士	三重大学大学院医学系研究科	大学院生
研究協力者	櫻本 新	三重大学大学院医学系研究科	大学院生
研究協力者	雄山 隆弘	三重大学医学部医学科	
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	柚木 泰広	東京医科歯科大学大学院	医員
研究協力者	鷹屋 光俊	労働安全衛生総合研究所	上席研究員

# 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
その2 バルプロ酸胎内ばく露モデル動物における顔面神経の形態発達異常	24
その3 胎生期チメロサルバく露によるセロトニン神経の初期発生に関する研究	31
成田 正明	
2. DNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子解析	37
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	50
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	66
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	107
IV. 研究成果の刊行物・別刷	111



# 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

妊婦が化学物質にばく露されると先天異常などの外表奇形が引き起こされるが、近年は情動や認知行動の異常など、いわば目に見えない先天異常の危険がより注目されるようになってきている。本研究では、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を検討してきた。

**動物実験**では、妊娠中のサリドマイドや抗てんかん薬バルプロ酸のばく露が、児に自閉症など情動・認知行動異常を引き起こすメカニズムを明らかにした。自閉症を引き起こすばく露時期は妊娠中の特殊な時期に（妊娠20-24日）に限られるが、その時期のばく露は、セロトニン神経（情動に関わる神経）や顔面神経の初期発生を妨げる機序を明らかにした。

また、新たに有機水銀に注目し、胎生期の有機水銀ばく露動物では、やはりセロトニン神経の発達異常をきたすことを明らかにした。有機水銀は、妊婦の魚介類摂取を経ての胎児への影響が懸念されているが、今回の結果はその科学的根拠を初めて明らかにしたものである。

化学物質のばく露があったかどうかを知るバイオマーカー確定作業では、胎生期のサリドマイドばく露ラットでは、脳の発達に関わる遺伝子、即ち神経シナプス機能に関与する遺伝子群の発現に影響を与えており、これはバイオマーカー候補になり得る。

**臨床研究**では、近赤外線酸素モニター(NIRS)を用い、情動・認知行動異常を客観的に評価する方法を開発した。即ち、思い出し記憶や、顔表情を呈示する刺激による前頭葉の血流動態では、健常者と自閉症者で差があることが分かった。このような前頭葉の機能の違いは、診断ツールとしてだけでなく、自閉症者の異常な情動・認知行動パターンを知る上でも応用できる。

**疫学研究**では乳歯・毛髪を提供して頂き、鉛・カドミウムなどの微量元素濃度を測定するとともに、発達歴を調査票で検討する全国調査を行ってきた。最終年度までに835例の調査票、737検体の毛髪試料、649検体の歯芽を収集、分析した（なおも順次分析中）。これまでの分析で、調査票では妊娠中に母親が薬剤服用歴があると発達に問題がある場合が多かった。また母親が子育てへ困難を感じている割合・児の身体愁訴・外遊びを好まないことなどと、児の情動認知行動の状況とに相関を認めた。毛髪中の微量元素については発達に問題がある児に、特定の微量元素が低値である結果が得られたが、その元素種には男女差があった。調査票・生体試料解析ともデータ・因子は膨大で、研究期間終了後も継続的な解析が必要である。

<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>

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

葛山 貴士  
三重大学大学院医学系研究科  
大学院生

櫻本 新  
三重大学大学院医学系研究科  
大学院生

雄山 隆弘  
三重大学医学部医学科

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  
前任准教授

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

鷹屋 光俊  
労働安全衛生総合研究所  
上席研究員

## 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。さらに厚生労働省指針で妊婦の摂取が制限されている魚介類中に含まれる有機水銀について、その胎児の脳発達への影響を検討する。ばく露によりその発現動態が変化する遺伝子群が見つかれば、ばく露バイオマーカーになり得る。その目的でDNAマイクロアレイを用い、バイオマーカーの確定を目指す。情動・認知行動異常の臨床評価法として、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。

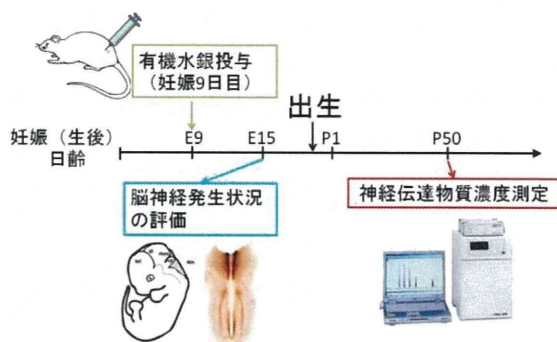
## B. 研究方法

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)。研究代表者の成田正明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。

自閉症患者では顔面の表情のこわばりなど、顔面神経を含む脳神経系の異常が指摘されている。そこで胎生期の服用で児に自閉症を引き起こす薬剤を妊娠ラットに服用させ、脳神経、特に顔面神経の発達に変化が起きているか検討した。

### 妊娠ラットへの有機水銀ばく露実験



実験には Wistar 系ラットを用いた。薬剤の投与は、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、メタノール中に -20℃ で保存した。

妊娠 13 日目の上記両グループ胎仔にて脳神経、特に顔面・内耳神経の走行を、ニューロフィラメント抗体、及び妊娠 14.5 日目で発生初期の運動ニューロンで発現する転写調節因子 Tbx20 をマーカーとして顔面神経核を可視化した。発生初期の運動ニューロンで発現する転写調節因子 Tbx20 などをマーカーとして、それらの mRNA を検出する non-RI のプローブを用いて、顔面神経核を可視化した。

正立光学顕微鏡下で観察および写真撮影を行い染色された神経核の面積を定量化した。取り込んだ画像上で画像解析ソフト Image J を用いてバックグラウンドを除く域値以上のシグナルの面積を計測した。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℃にて固定後、TBS 中で 4℃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、実験群と対照群と比較した。

なお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。

## 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。その目的で以前から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。

サリドマイド誘発自閉症モデルラットの作成：成田らの方法 (Narita et al., *Int. J. Dev. Neurosci.*, 2005) に従い、妊娠 9 日目ラットにサリドマイド (500mg/kg) を単回強制経口投与することで作成した。また、溶媒に用いたアラビアガム水のみを投与し、対照群を作成した。生後 7、14、20、40 日の各時点で、生まれた仔ラット (♂) の頸動脈から PBS を灌流した後、大脳皮質および海馬を採取した。大脳皮質は左右それぞれの前半部を RNA 抽出用とタンパク質抽出用に使い、後半部で HPLC によるセロトニンの定量を行った。

学習・行動解析：老化促進マウス SAM (Senescence accelerated mouse) は老化度



評点の急速な加齢依存的増加を指標として確立されたもので、促進老化を示す SAMP 系統と正常老化を示す SAMR 系統の 2 系統に分けられ、老化関連病態により SAMP 系統はさらに 9 つに分類されている。その一つである SAMP8 は加齢に伴い顕著な学習・記憶障害を示し、脳の加齢変化を調べる有効なモデルとして使用されている。本研究では、1～10 カ月齢の SAMP8 と、対照群となる同月齢の SAMR1 (正常老化を示す) でオープンフィールド・テストおよび明暗箱による受動的回避テストを行った。

リアルタイム PCR 解析：各個体、各組織の total RNA から逆転写によって cDNA を作製し、各遺伝子に特異的なプライマーと蛍光インターカレーター Sybr Green I を用いてリアルタイム PCR を行った (ABI 社、StepOne)。Ppia または  $\beta$ -actin を内部標準遺伝子としてデータを標準化した。

セロトニンおよび代謝産物の測定：脳組織を過塩素酸抽出し、逆層 HPLC 法により、セロトニン、ドーパミン、および HIAA 含量を測定した。

DNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を基盤に、化学物質の影響を強く受ける脳内部位とタイミングを効率的に検討し、化学物質の胎内ばく露による情動・認知行動への影響を明らかにするとともに、より客観的な発達障害診断法の開発を目的とした。全期間を通して、(1) 評価用遺伝子の実験的選定と独自のマイクロアレイへの応用、(2) 独自アレイを用いた胎生期化学物質ばく露動物の脳における発達異常の検出、(3) 注意欠陥多動性障害 (ADHD) 様行動異常を示すマウスでの原因究明、(4) 培養細胞を用いたより簡便な評価系の検討、を行った。

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

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するだけでなく、発達障害者支援センターや児童相談所の嘱託医として、発達障害支援活動に従事している。

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。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、特に前頭葉の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) ことを分担研究者は発見し、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)。そこで嬉しかったことや悲しかったことなどの情動を想起させた時の前頭葉脳血流の変化を測定し、その反応の違い (=左右差など) が健常者と自閉症者を区別できないか (=診断に使えないか)、検討した (2009 年)。

2009 年度の結果をもとに、これをさらに詳細に検討するため、2010、2011 年には、前頭葉の実行機能の一つであるワーキングメモリー機能を賦活/非賦活する課題を作成することとした。課題として様々な顔の表情を用いて情動の想起も期待し、本課題を遂行している際の前頭葉 O<sub>2</sub>Hb 濃度変化を検討した。課題はワーキングメモリーを要求される課題 (ワーキングメモリー課題 WM) とワーキングメモリーを要求されない課題 (ノンワーキングメモリー課題 NWM) から成り、

これらは交互に提示される。被験者は WM 課題では 3 秒ずつ出てくる顔表情刺激（フリーデータベースを使用）を覚え、その後出てきた順番通りに選択する。一方 NWM では上の標的刺激と同じものを、下の刺激から順番通りに選択することを要求される。

WM と NWM の課題は交互に提示され、提示される刺激数は 1 つから順々に 6 まで増加する。これらの課題を安静を間に挿みながら行い、全タスク前後にはそれぞれ 2 分間の安静時間を設けた。

タスクの遂行中は継続的に、左右前頭葉の O<sub>2</sub>Hb 濃度を近赤外線酸素モニター

(Near-infrared spectroscopy, NIRS)

(NIRO200、浜松ホトニクス社) を用いて測定した。NIRS は組織に近赤外線を照射し、反射した近赤外線の減衰を測定することによって計測される血管内の O<sub>2</sub>Hb、脱酸素化ヘモグロビンの相対的濃度変化から、組織内の酸素状態の変化を経時的に知ることができる。今回は左右の前額部に照射プローブ及び検出プローブを装着し、左右前頭葉における O<sub>2</sub>Hb 濃度の相対的な変化量を測定することによってタスク中の前頭葉の活性の変化を推測した。プローブは両面シールを用いて固定し、アーティファクトを避けるためにプローブの上から黒色布を巻いて太陽光を遮断した。タスクを行った際の前頭葉の血流変化を 1 秒ごとに測定した上で最終的に O<sub>2</sub>Hb 相対濃度は集計し、安静時 10 秒の平均値により標準化して検討した。



(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. 乳歯・毛髪などの生体試料分析と発達状況調査票の配布と回収・分析

本研究は順天堂大学医学部倫理委員会（受付番号 550、平成 21 年 9 月 8 日承認）、及び三重大学研究倫理委員会（受付番号 1081、平成 21 年 8 月 25 日承認）で審査を受け、承認されてから実施した。実施にあたっては、対象者に研究目的、内容等を記した文書を配布し、これには、質問紙調査票あるいは抜けた乳歯・毛髪などの返送をもって同意とみなすと明記した。質問紙調査票、生体試料に個人情報記載は求めなかった。対象者は乳歯が抜ける時期にあたる保育園、幼稚園、または就学前健診の児童や小学生の保護者で、本調査の主旨を理解し協力を申し出た者とした。

対象者には調査説明書、質問紙調査票、生体試料採取ビニール袋および返信用封筒を配布した。調査票への記入と、生体試料（児童の抜去歯および毛髪）の提供を求めた。母親の仕事内容(化学物質曝露状況)、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、および発達上の問題を、また、発達の状況については PARS(広汎性発達障害日本自閉症協会評定尺度 Pervasive developmental disorders Autism society Japan Rating Scale) の項目を用いて情報を収集した。2009 年度は主にデータ収集の準備と回収、2010 年度はこれに加えて回収した検体の分析とデータ入力、さらに 2011 年度は引き続き配布と検体回収、分析とデータの総合的検討を、それぞれ主として行った。

## 乳歯・毛髪ご提供と 調査票ご記入のお願い



厚生労働科学研究費補助金・化学物質リスク研究事業

記入済みの質問紙調査票および生体試料(歯および毛髪)は郵送法により回収した。回収した質問紙調査票は、入力後 HALBAU 7 により集計・分析した。生体試料(歯および毛髪)については下記の予備実験を先に行うこととし、測定まで室温にて保管することとした。

質問紙調査票に用いた PARS 評定項目は広汎性発達障害の特性の判定と支援に関する困難度を母親に面接し評定する尺度で、幼児期(就学前)ピーク評定(幼児期の症状が最も顕著な時)と現在評定(幼児用、小学生用、中学生用)で構成されている。幼児期ピーク評定項目は 34 項目あり多い。そこで本調査では短縮版 12 項目と幼児用の現在評定短縮版 12 項目(調査票の項目 37~48)を用いた。短縮版でも十分信頼できる評価が得られるとされる。幼児期ピーク評定、現在評定共に各項目の評定に重み付けした合計点で評価される。幼児・児童対象の場合はスコアの合計点がピーク時 5 点以上、幼児期現在評定は 7 点以上で広汎性発達障害が強く疑われるとされている。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とされる。

本研究では対象児の PARS ピーク時得点と幼児期現在評定の分布を確認し、広汎性発達障害が強く疑われるピーク時 5 点以上、幼児期現在評定は 7 点以上の割合を示した。次に PARS ピーク時 5 点以上と 5 点未満の児童に異なる特徴があるか、母親の妊娠前・妊娠中の状況に違いがあるか確認するために、質問紙調査票の各項目別に  $\chi^2$  乗検定(Yates の補正)を行い、p 値を求めた。平均出生体重、出生時平均妊娠週数については対応のない t 検定を行った。

毛髪・歯牙中の無機元素を誘導結合プラズマ質量分析(ICP-MS)を用い、定量分析を行った。毛髪は洗浄および酸分解のち

に誘導結合プラズマ質量分析 (ICP-MS) を用いて元素の定量分析を行った。洗浄は非イオン系界面活性剤により洗浄した後、乾燥させた。乾燥した毛髪試料をセラミック製のはさみで細切・粉末化することにより均質化し、その一部をフッ素樹脂分解容器に正確に秤量した。これに高純度硝酸 (0.4mL) ならびに過酸化水素 (0.2mL) を加え、マイクロウェーブ湿式分解装置を用いて酸分解した。分解液は超純水で適宜希釈したのち、ICP-MS にて測定した。なお、標準試料には国立環境研究所より提供されている NIES CRM No.13 (Human Hair) を用いた。得られたデータは質問紙調査票の結果と合わせて SPSS ver.19.0 for windows を用い集計・分析した。なお、Hg については、毛髪を洗浄ののち加熱気化原子吸光光度計にて測定を行った。

歯牙については純水中で超音波洗浄を行うことにより洗浄し、乾燥したのち粉碎をして、その一部を検体として用いた。酸分解ののち ICP-MS による分析を試みたところ、含まれる Ca、Mg の存在が大きいため、微量元素を精度よく測定することが困難であった。そこで、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っている。同時にレーザーアブレーション誘導結合プラズマ質量分析計による測定も試みており、歯牙において特にエナメル質中に存在する微量元素濃度の測定方法についての検討を行なっている。歯牙の標準試料には、歯のマトリックスに近似すると考えられる NIST SRM 1486 (Bone Meal) を用いた。

(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改めて確認した。

さらに妊娠中のサリドマイドばく露は、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。即ち妊娠ラットにサリドマイド、または正常対照として溶媒のみを投与し、妊娠 13 日目に脳神経の走行をニューロフィラメント染色による神経走行を検討したところ、サリドマイド投与群で、脳神経のうち特に顔面・内耳神経で免疫染色性が減少していた。重要なことに、この異常は妊娠 8 日目ばく露胎仔では認めず、妊娠 10 日目ばく露で最も顕著であり、投与時期依存性の影響を認めた。妊娠 10 日目はサリドマイドによる自閉症が起きるクリティカルなタイムウインドウである。さらに同様の所見はバルプロ酸投与でも認められた。今回サリドマ



イドやバルプロ酸で認めた顔面神経の走行異常は、ヒト自閉症児において顔面表情のこわばりが見られることが多い（このメカニズムはまだ分かっていないが）という臨床的知見を考え合わせると、興味深い（2010年度）。

2011年度は、これをさらに詳しく検討した。即ち、顔面神経核の移動パターンを、初期の運動ニューロンで発現する転写調節因子 Tbx20 などをマーカーとして着目し、それらの mRNA を検出する non-RI のプローブを用いて、顔面神経核を可視化した。対照群の E13.5 において、後脳の展開標本の前庭神経節レベルのフロアプレート付近で観察されたシグナルは、E14.5 には尾側へ向かって「ハ」の字状に拡大した。

この移動様式は VPA 群においても同様であった。即ち VPA 群においても、対照群と同様な顔面神経核の移動パターンが見られ、細胞移動が阻害されていることが明らかとなった。

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、初期（ラット胎生15日）の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新たに認め、論文発表した（Neuroscience Letters, 505; 61-64; 2011）。またその神経伝達物質の異常は、胎生期の一時的なものではなく、生後長期に持続することも明らかにした（投稿中）。

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の報告は前例がない。本研究成果は、NHKテレビ“視点論点”「妊娠中の化学物質と子どもの発達」に取り上げられた他、平成23年9月17日付け中日新聞3面（総合面）にも掲載され、多くの反響を得た。発表した論文は編集委員より、重要論文と認定され、コメント付きで巻頭に掲載された。

結果 2. DNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子解析

(1) 評価用遺伝子の実験的選定と独自のマイクロアレイへの応用、(2) 独自アレイを用いた胎生期化学物質ばく露動物の脳における発達異常の検出、(3) 注意欠陥多動性障害 (ADHD) 様行動異常を示すマウスでの原因究明、(4) 培養細胞を用いたより簡便な評価系の検討、を行った。

(1)では、脳の機能的発達に必須の甲状腺ホルモンに制御される遺伝子群および脳の特徴である神経活動依存性遺伝子群に注目し、新たな遺伝子を抽出した。(2)では、胎生期サリドマイドばく露による自閉症モデルラットおよび胎生期-生後初期トリプチルスズ(TBT)ばく露ラット、の二種類の動物を用いた。前者では大脳皮質および海馬におけるセロトニン受容体の発現変化など、セロトニン神経伝達システムの発達異常と、生後 20 日を中心とする遺伝子発現プログラムのずれを検出した。後者では、大脳皮質に比較して中脳での発現変化が大きく、TBT ばく露を止めても中脳では持続的な影響が残ること、発達期のばく露が成熟後の TBT 感受性を高めることなどを見出した。(3)では、ADHD 様行

動異常と脳における甲状腺ホルモン代謝との関連を示す結果を得た。(4)では E18 ラット大脳皮質由来の初代培養神経細胞系を用いて、細胞死には至らない低濃度 TBT のばく露による樹状突起形成やシナプス形成の抑制を示すことができた。

これらの研究を通して、発達期脳における異常を検出するための新たな評価遺伝子を提案した。

### 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

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内 O2Hb 濃度の増加が認められたのに対し、自閉症者では、特にネガティブ情動想起（最も悲しかったことを想起）の際に、右優位の活性化が認められた（2009 年報告）。健常群の左側優位の前頭葉賦活は既報と矛盾せず、一方ネガティブ情動想起中の自閉症患者における右側優位の賦活化は、自閉症被験者においては特にネガティブな感情やストレス負荷による耐性が低下している、という可能性が示唆された。実際に、自閉症患者では並行して測定した STAI による特性不安得点が健常群平均と比較して高い傾向（＝強い特性不安）が認められた。

そこでこの結果をもとにこれをさらに詳細に検討するために、ワーキングメモリー機能（前頭葉の実行機能の一つ）を賦活/非賦活する課題実験を行った。顔刺激を用いた WM（ワーキングメモリー）/NWM（ノンワーキングメモリー）タスク施行において、自閉症者(2011 年度)では健常者(2010 年度)

にみられる、ワーキングメモリー施行時に一致した前頭葉の脳血流量の増加が、観察されなかった。また、以前研究分担者が行った、図形刺激を用いたワーキングメモリータスクの場合には健常者と同等のタスクパフォーマンスが観察されたが、今回の顔刺激においては、特に WM におけるタスクパフォーマンスは極めて低下していた。

2011 年度の結果から、自閉症者における情動想起や顔表情を見せた刺激時の前頭葉血流動態が健常児と異なることを近赤外線酸素モニターで捉えることが可能となり、様々な情動刺激時や WM タスク時の脳血流を赤外線酸素モニターで測定することで、情動・認知行動評価の診断補助ツールとして用いることができると考えられる。

### 結果 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

#### 乳歯・毛髪・発達調査の実施分布

1都1道13県の41 保育園・幼稚園・小学校

乳歯748例、毛髪761例、調査票836例  
(平成23年8月の段階)



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。

最終年度までに、乳歯 748 例、毛髪 761 例、調査票 842 例を回収し、順次解析している（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言うことになるが、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測定する。

既に毛髪中の微量元素濃度の測定が終わった対象者（全 664 例）では PARS が 5 点未満の者は 548 例（82.5%）、PARS 5 点以上の者は 116 例（17.5%）であった。測定した元素のうち Al, Cu, Ga, Sr, Cd, Sb, Ba および Pb において、PARS 5 点未満群に比べて PARS 5 点以上の群で有意に低値を示した。毛髪は微量元素に関しては一種の排泄器官ととらえることができる。食物等から摂取されている微量元素量に大きな差がないとするならば、PARS 5 点以上群では、それ以外の児童に比べ、毛髪への微量元素排出が低い可能性が示唆された。Hg については、年度末までに分析を行う予定である。歯牙の原子吸光光度計による微量元素の分析については、Pb について 30 検体の測定を終えたところである。また、レーザーアブレーション

誘導結合プラズマ質量分析計での歯牙分析については、測定条件の確定に時間がかかっている。分析条件検討に供した1例では、エナメル質における Mg, Cr, As および Sr の濃度分布が確認できた。今後は、測定対象元素を増やし、他の乳歯のルーチン測定を行なっていく。

#### D. 研究考察

##### 考察 1, 化学物質ばく露モデル動物解析

セロトニン系に影響を与える時期の化学物質ばく露は、情動系の神経（セロトニン神経）のほか、脳神経の形態発達にも影響を与える。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。

##### 考察 2. DNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析

###### (1) サリドマイド誘発自閉症モデルラット :

成田らの研究により、胎生 9 日目サリドマイド曝露ラット (THA 群) では、成熟後 (P50) の時点で海馬セロトニン濃度が高値を示すこと、縫線核におけるセロトニン神経細胞・細胞体の分布に正常とは異なる偏りがみられること、からセロトニン神経系の発達異常が示唆されていた (Narita et al., *Pediatr. Res.*, 2002; Miyazaki et al., *Int. J. Dev. Neurosci.*, 2005)。今回の研究により、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セロトニン受容体の発現プロファイルが正常と異なることをはじめ、シナプス形

成の時間的ずれや早期からのミエリン形成など、神経発達異常が生じていることを示す結果を得た。THA 群と対照群の遺伝子発現の差はシナプス形成の完了する生後 20 日でもっとも顕著であった。MeCP2 によるエピジェネティックな制御がどのように関与するかについては今後の課題である。

###### (2) 胎生期 - 生後初期における TBT 曝露の影響 :

TBT は当初、水生生物に対する内分泌かく乱物質として注目を集めた。これは TBT のアロマターゼ阻害作用によるものと考えられるが、その他に TBT はミトコンドリア・ATP 合成酵素を直接阻害することが *in vitro* の実験で示されている。さらに近年、TBT がごく低濃度で塩素イオンの細胞膜透過をひき起こす  $Cl^-$  イオノフォアとなることが示され、神経細胞においては GABA 神経伝達に直接影響を与える可能性が懸念される。マイクロアレイの結果は、TBT がミトコンドリアに影響を与え、酸化ストレスを誘発する可能性を示唆している。

また、今回の研究で、発達期の TBT ばく露の方が成熟後のばく露より影響が大きいこと、発達期にばく露を受けた動物が成熟後に再びばく露された場合はさらに影響が大きくなること、が確認できた。

このような一連の研究から、焦点を絞ったオリジナル 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、部位特異的影響を効率的に調べる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。

これまでの結果を総合すると、以下の遺伝子が発達期の脳における異常を検出する評価



遺伝子の候補として挙げられる。

- ・シナプス、神経突起、ミエリン構造：

*synaptophysin, syn1, homer 1,  
homer 2, mbp, plp*

- ・甲状腺ホルモン依存性遺伝子：

*dio2, dio3, hairless, enpp2, (mbp),  
sortilin 1, kcc2*

- ・神経活動依存性遺伝子：

*bdnf, synaptotagmin4, ania4/carp/dclk,  
ywhaz, ssh11, pak4, limk1, cfl*

### 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

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。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自閉症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る。顔認知タスクも同様である。今後これらの尺度を併用していくことにより、自閉症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。

今回の研究から、①特にネガティブな情動刺激が、前頭葉の実行機能に影響を与え得る可能性が示唆され、特に ADHD を初めとする ASD のスペクトラム群での前頭葉機能異常がさらに学校現場などで受けるネガティブな情動により増強され、それが学習

習得度の低下につながることも考えられた。多様な種類の化学物質のばく露によっても引き起こされる可能性のある ASD 児者において、今回用いたような情動刺激タスク下における前頭葉機能変化や不安尺度を指標として用いることは、病態の把握や補助的診断ツールとしての有用性があるかもしれない。また、②凶形や顔表情刺激を用いたスイッチングタスクを用いることで、健常者と ASD 者における前頭葉血流の差異を検出することができた。また、ASD 者における異所性の神経ネットワークの存在も示唆された。

### 考察 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

対象とした幼児・学童の 15% 前後に、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。

結果の項でも示したように、測定した元素のうち Al, Cu, Ga, Sr, Cd, Sb, Ba および Pb において、PARS5 点未満群に比べて PARS5 点以上の群で有意に低値を示した。毛髪は微

微量元素に関しては一種の排泄器官ととらえることができる。食物等から摂取されている微量元素量に大きな差がないとするならば、PARS 5 点以上群では、それ以外の児童に比べ、毛髪への微量元素排出が低い可能性が示唆された。Hg については、年度末までに分析を行う予定である。歯牙の原子吸光度計による微量元素の分析については、Pb について30検体の測定を終えたところである。また、レーザーアブレーション誘導結合プラズマ質量分析計での歯牙分析については、測定条件の確定に時間がかかっている。分析条件検討に供した1例では、エナメル質におけるMg, Cr, As および Sr の濃度分布が確認できた。今後は、測定対象元素を増やし、他の乳歯のルーチン測定を行なっていく。

#### 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。ヒトで、近赤外線酸素モニターを用いれば、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。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、全国規模での調査で、関連の有無を調べてきたが、最終的な結論を出すにはより多くのサンプル数の確保が望まれる。

#### F. 研究発表

「II. 分担研究報告書」の項に代表研究者・分担研究者ごとに記載

#### G. 健康危険情報

なし

#### 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  
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