

201236018A

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

妊娠中の化学物質による、子どもの行動・情動への影響評価に関する臨床的・基礎的・疫学的研究

平成 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 成 田 正 明

平成 25 年 (2013) 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

妊娠中の化学物質による、子どもの行動・情動への影響 評価に関する臨床的・基礎的・疫学的研究

総括・分担研究報告書

平成 24 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 化学・生命科学科 | 教授 |
| 分担研究者 | 成田 奈緒子 | 文教大学教育学部特別支援教育専修 | 教授 |
| 分担研究者 | 横山 和仁 | 順天堂大学医学部 衛生学講座 | 教授 |
| 分担研究者 | 定松 美幸 | 金城学院大学人間科学部 多元心理学科 | 教授 |
| 分担研究者 | そうけ島茂 | 三重大学大学院医学系研究科 公衆衛生・産業医学 | 教授 |
| 研究協力者 | 江藤 みちる | 三重大学大学院医学系研究科 発生再生医学 | 助教 |
| 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 | 金井 裕彦 | 滋賀医科大学医学部精神医学講座 | 講師 |
| 研究協力者 | 樋口 大樹 | 筑波大学大学院人間総合科学研究科 | 大学院生 |
| 研究協力者 | 黒澤 美智子 | 順天堂大学医学部 衛生学講座 | 准教授 |
| 研究協力者 | 篠原 光代 | 順天堂大学医学部 衛生学講座 | 前任准教授 |
| 研究協力者 | 松川 岳久 | 順天堂大学医学部 衛生学講座 | 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 |
| 研究協力者 | 神田 浩路 | 三重大学医学部付属病院 | 助教 |

目 次

| | |
|---|----|
| I. 総括研究報告書 | 1 |
| 妊娠中の化学物質による、子どもの行動・情動への影響評価に関する 臨床的・基礎的・疫学的研究 成田 正明 | |
| II. 分担研究報告書 | |
| 1. 動物実験（化学物質ばく露モデル動物の発生生物学的解析） | 13 |
| 成田 正明 | |
| 2. 動物実験（ばく露に有無を知るバイオマーカー検索） | 19 |
| 田代 朋子 | |
| 3. 内分泌かく乱物質と子どもの情動認知行動異常 | 25 |
| 定松 美幸 | |
| 4. 臨床的研究（非侵襲的脳機能評価） | 29 |
| 成田 奈緒子 | |
| 5. 疫学的アプローチ（乳歯や毛髪からの有害物質検出） | 34 |
| 横山 和仁 | |
| 6. 疫学的アプローチ（子どもの発達・行動異常の疫学） | 67 |
| 笠島 茂 | |
| III. 研究成果の刊行に関する一覧表 | 71 |
| IV. 研究成果の刊行物・別刷 | 75 |

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

妊娠中の化学物質による、子どもの行動・情動への影響評価に関する臨床的・基礎的・疫学的研究

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

妊婦が化学物質にばく露されると、児に先天異常が引き起こされることはよく知られているが、近年は、ばく露により児に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が引き起こされる危険がより注目されるようになってきた。先般の東日本大震災でも大量の瓦礫の発生で膨大な化学物質が放出されており、そのリスクも懸念される。私たちは平成21年度より3年間、本厚生労働科学研究事業に従事、妊娠中の化学物質の影響について、動物実験、生体試料分析（乳歯や毛髪）、臨床研究（情動異常の診断法）に取り組んできた。この中で私どもは、



2013年1月6日中日新聞
(写真は研究代表者)

- ・妊娠中のある特定の時期にサリドマイドや抗てんかん薬を服用すると児に自閉症が発症するというヒトでの疫学的報告に着目、これを妊娠ラットで忠実に再現、生まれた子ラットで行動・情動面で自閉症様の特徴を持つ「自閉症モデルラット」の作成に成功、その解析から、「自閉症は胎生期のセロトニン神経の初期発生の異常である」と報告してきた。
- ・妊婦の魚介類摂取許容量の目安については国が定めた指針がある。これは胎児への有機水銀の経胎盤ばく露を考慮してのものであるが、私どもは有機水銀の胎生期ばく露実験で、感情を司るセロトニン神経の発達に異常が起きることを動物実験で明らかにしてきた。
- ・化学物質投与動物を用いた発現遺伝子を網羅的に解析する手法により、化学物質ばく露の有無のバイオマーカー確定に向けての作業
- ・全国の教育委員会や幼稚園・小学校の児童・保護者の協力を得て、生体試料として子どもたちの毛髪や抜けた乳歯を提供して頂き、有害物質の検出を試みるとともに発達歴の間診票と照らし合わせ因果関係を明らかにする疫学的研究
- ・近赤外線酸素モニター(NIRS)を用い、これまで医師の経験に頼っていた情動・認知行動異常の客観的診断法を確立してきた。
本年度（平成24年度）からの3年計画では、平成21-23年の3年間の研究をさらに発展させ、妊娠中の化学物質のばく露による子どもの行動・情動に対する影響の評価方法を一層深く検討する。

平成24年度からの3か年計画の1年目の本年度の成果は以下のとおりである

①化学物質ばく露モデル動物の発生物学的解析（三重大学・医・発生再生医学・成田正明）

有機水銀ばく露の影響の臨界時期、即ち妊娠期間中のどの時期の有機水銀のばく露が胎児の感情神経に影響を与えるかを明らかにした。その成果は次のような形で国民に公表した。

- ・ “Brain and Development” 誌（日本小児神経学会機関誌）での論文発表、日本解剖学会シンポジウム
- ・ クジラやイルカは有機水銀含有量が他の魚より多いが、それらの食習慣のある和歌山県太地町における有機水銀摂取の影響、とくに妊婦や子どもに対する影響について、マスコミより意見を求められ誌上でわかりやすく解説した（2012年6月1日読売新聞）。
- ・ 国民への分かりやすい活動として、NHKテレビ “視点論点” 「妊娠中の化学物質と子どもの発達」（2011年8月21日放映）に出演。さらに「妊娠中の環境放射線と子どもの発達」（2011年6月23日放映）、「化学物質ホルムアルデヒドと健康」（2012年6月15日放映）という内容でも“視点論点”に出演した。
- ・ 環境健康学研究会で特別講演（研究協力者江藤みちる）に招聘され、成果を講演した（2013年1月25日）。

ばく露に有無を知るバイオマーカー検索（青山学院大学・理工・化学生命科学科・田代朋子）

上記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。研究分担者の田代朋子は神経化学者として、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、1期目の3年間の研究でばく露のバイオマーカー候補となる遺伝子の絞り込みを行ってきた。今年度はさらに胎生期サリドマイドばく露の影響がラット大脳皮質で最も強く現れるのは生後20日を中心とする時期であること（＝即ちばく露には影響を受けやすい臨界期がある）を明らかにした。

内分泌かく乱物質と子どもの情動認知行動異常

一体内ホルモン、特に甲状腺ホルモンが情動認知行動に与える影響（金城学院大学・人間科学部・定松美幸）

今回の研究から新たに参画した研究分担者の定松は、今年度は以前から手がけていた出生直後に低甲状腺ホルモン状態にしたラットの行動異常と甲状腺受容体をノックアウトしたマウスのさまざまなストレインの一部で、行動異常や脳内モノアミンに違いがあることを認めた。

②臨床的研究・非侵襲的脳機能評価（文教大学・教育・成田奈緒子）研究分担者の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ており、この3年間で非侵襲的脳機能評価法である近赤外線酸素モニターを発達障害児者の評価に応用してきた。今年度はこれまで教育・療育現場で経験的に試みられてきた「前もって手順を説明する」「繰り返し練習する」という方法論を脳科学的に裏付ける目的で、発達障害児では、事前のしっかり教示をし、また事前にしっかり練習するほど、難易度の高い課題でも前頭前野機能が賦活することが明らかになった。

③疫学的アプローチ（乳歯や毛髪からの有害物質検出）（順天堂大・医・衛生・横山和仁）

これまでの3年間で、生体試料として全国の研究協力者から乳歯・毛髪を提供して頂き、鉛・カドミウムなどの重金属・有害物質の測定を行うとともに、詳細な発達歴と突き合わせ全国大

規模疫学調査計画を行ってきた。現在まで回収数は1000部を超えて現在も分析・検討中である。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。今年度の検討では毛髪中の微量元素濃度について、発達障害スコアが高い児に特定の微量元素が低値となる傾向がみられ、その元素種には男女差がみられることがわかった。

④疫学的アプローチ（子どもの発達・行動異常の疫学）（三重大学・医・公衆衛生・笠島茂）

情動・認知行動異常の発症の疫学を、疫学が専門研究領域のそうけ島茂が担当した。初年度である今年度は、発達障害児の分布状況に関する基礎資料を収集するため、特定の市町における、まず20歳以上の住民を対象とした調査を企画・実施し、調査に使用する調査を開始した。以後子どもにも対象を広げる。

<分担研究者>

田代 朋子

青山学院大学理工学部
教授

葛山 貴士

三重大学大学院医学系研究科
大学院生

成田 奈緒子

文教大学教育学部
教授

櫻本 新

三重大学大学院医学系研究科
大学院生

横山 和仁

順天堂大学医学部
教授

金井 裕彦

滋賀医科大学医学部
講師

定松 美幸

金城学院大学
教授

樋口 大樹

筑波大学大学院人間総合科学研究科
大学院生

そうけ島茂

三重大学大学院医学系研究科
教授

黒澤 美智子

順天堂大学医学部
准教授

<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

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

平田 岳史
京都大学
教授

林 英男
東京都立産業技術研究センター
研究員

神田 浩路
三重大学医学部附属病院
助教

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

確立し早期支援を開始することで、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の発生生物学的解析

妊婦の内服で四肢に奇形が生じることから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。

今年度は有機水銀 (チメロサル) に注目し研究を行った。有機水銀は一般人の日常生活には縁遠い物質と思われがちだが、通常の魚介類の摂取を通じて体内へ取り込まれる懸念、特に妊婦に対する懸念は、厚生労働省が妊婦への魚介類摂取量の目安の指針を出しているほどである。しかしながら胎児性水俣病のよう

な極めて大量の有機水銀摂取の場合は除き、有機水銀の胎児脳発達への影響、特に行動・情動面への影響は明らかにされておらず、このことが妊婦魚介類摂取指針のことをあまり知らない妊婦が多い一因とも考えられる。

有機水銀（チメロサル）／生理食塩水溶液（1 mgHg/kg）を妊娠 Wistar ラットの尻筋に筋肉注射により投与した。臍栓確認日を胎齢 0 日として、投与時期は妊娠 5 日、7 日、9 日、11 日、13 日と変えてそれぞれ投与した。コントロールは生理食塩水を同様に投与した。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を作製した。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。尾側縫線核側方部分に見られたセロトニン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。

（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のもとで行われた。

研究方法 2. ばく露に有無を知るバイオマーカー検索（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。

(1) 動物モデル

サリドマイド誘発自閉症モデルラット：

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。

老化促進モデルマウス SAMP8, SAMR1：

SAM (Senescence accelerated mouse)は京都大学で確立された促進老化を示す動物である。そのうち SAMP8 は、胎生期～周産期の脳の発達に必須のホルモンである甲状腺ホルモンの脳内での代謝異常から発達障害を引き起こす最初のモデルとして本研究で活用する。

(2) 行動解析

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。

(3) 遺伝子発現解析

今年度は、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ラー Sybr Green I を用いてリアルタイム PCR を行った（ABI 社、StepOne）。

(4) ウェスタン・ブロッティング

各個体、各組織を SDS サンプルバッファーに溶解し、SDS 電気泳動後、PVDF 膜に転写し、目的タンパク質に特異的な抗体を用いて ECL 法により定量した。内部標準として β アクチンを用いた。

（倫理面への配慮）

動物実験はすべて青山学院大学理工学部動物実験委員会の承認を得、獣医師の指導のもとに必要最低限の頭数を使用して行った。

研究方法 3. 内分泌かく乱物質と子どもの情動認知行動異常

一体内ホルモン、特に甲状腺ホルモンが情動認知行動に与える影響

本研究は滋賀医科大学動物実験委員会の承認のもとで行われた。5種類の strain、即ち TR（甲状腺ホルモン受容体） $-\alpha^{0/0}$ 、 $TR-\alpha^{0/+}$ 、 $TR-\beta^{+/+}$ 、 $TR-\beta^{-/-}$ 、及び wild type、雌雄各 5-6 個体を 3 か月齢時に行動実験に供した。実験はビデオモニタリングオープンフィールド（室町機械）を用い、5 セッション行いそれぞれ行動指標を測定した。また胎生期、出生直後に TR の発現が高度である線条体、海馬において ADHD に関連するドーパミン、セロトニン濃度の測定を high performance liquid chromatography を用いて行った。

研究方法 4. 臨床的研究（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。

今年度は、これまで経験的に教育・療育現場で試みられてきた「前もって手順を説明する」「繰り返し練習する」という方法論を脳科学的に検討するため、ワー

キングメモリタスクを遂行中の近赤外線酸素モニター測定を用いて、タスク前の教示の方法と事前の練習により発達障害児の前頭前野機能がどのように変化するかを検討した。

（倫理面への配慮）

本研究は、研究対象者に対する人権擁護上の配慮を徹底するため、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 5. 疫学的アプローチ（乳歯や毛髪からの有害物質検出）

発達障害のリスク因子（化学物質、既往歴および社会・経済・心理因子等）を明らかにする目的で、発達障害児と健常児を対象とする疫学調査を開始した。本研究では小学校就学前検診のため受診会場に来院した児童や、既に小学校に入学した生徒から、後日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を測定する。同時に保護者に対象児童の発達状況、妊娠中の薬物摂取歴、妊娠中の異常などの妊娠経過、生後の発達発育歴などについての質問紙調査を行う。平成21年度より調査を開始し、本年度までに質問紙調査票を916例回収し、除外データをのぞく914例について集計・分析を行った。生体試料は、毛髪を800検体、歯牙を725検体収集した。毛髪の微量元素は、硝酸・過酸化水素によるマイクロウェーブ分解ののち誘導結合プラズマ質量分析計を用いて測定を行った。乳歯中の微量元素はエナメル質のみをレーザーアブレーション誘導結合プラ

ズマ質量分析計で測定する方法の開発を行った。

(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。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。

研究方法 6. 疫学的アプローチ (子どもの発達・行動異常の疫学)

情動・認知行動異常の発症が特定の地域で有意に高いといった事象が認められた場合、社会経済学的な観点から情動・認知行動異常発症の検討が必要となるが、そのためにはまず地域における発達障害の分布に関する基礎資料の収集が求められる。初年度である今年度は、特定の市町における 20 歳以上の住民を対象とした調査の実施体制を構築し、調査に使用する自記式調査票を開発し、住民調査を開始した。調査票には、回答者の発達障害に関連する病歴や、20 歳未満の子どもがいる場合は彼らに関する病歴に関する情報を収集できる項目を設けて市町単位での発達障害に関する疫学情報を把握することとした。また、各回答者の社会経済学的状況も聞くことにより、回答者の勤労状態や生活環境をも含めた発症との関連も今後検討する。

(倫理面への配慮)

本研究は三重大学医学部倫理委員会の承認のもとで実施された。

C. 研究結果

結果 1, 化学物質ばく露モデル動物の発生生物学的解析

妊娠中のどの時期にチメロサルを投与すると胎仔のセロトニン神経に影響を及ぼすのかを明らかにするため、妊娠 5、7、9、11、13 日目のラットにチメロサルを一回投与し、それぞれ胎生 15 日目で展開標本を作製してセロトニン神経細胞数を比較した。その結果、胎生 5 日目のチメロサル投与ではコントロールとの差が見られなかったが、胎生 7 日目投与ではコントロールの約 1.2 倍に、胎生 9 日目投与ではコントロールの約 2 倍にセロトニン細胞数の増加が認められた。胎生 11 日目、胎生 13 日目投与でも同様に約 2 倍の増加であった。

結果 2. ばく露に有無を知るバイオマーカー検索 (DNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子解析)

(1) 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(2) 若齢期に注意欠陥多動性障害(ADHD) 様の多動・低不安を呈する SAMP8 マウス、の二つの動物モデルについて研究を進めた。(1) では、これまでの遺伝子発現解析の結果に基づいてタンパク質レベルでの発現解析を行った。その結果、サリドマイドばく露群では生後 14 日を中心に主要なシナプス局在タンパクの有意な減少がみら

れ、生後 40 日には正常群と同じレベルまで増加することから、シナプス形成開始時期の遅れを示すと考えられる。若齢期に注意欠陥多動性障害(ADHD) 様の多動・低不安を呈する SAMP8 では、局所的な活性型甲状腺ホルモンの低下が関与することを確認し、発達期脳における新たな化学物質作用点として、II 型脱ヨード化酵素を考える必要性を示した。

結果 3. 内分泌かく乱物質と子どもの情動認知行動異常

一体内ホルモン、特に甲状腺ホルモンが情動認知行動に与える影響

行動観察では甲状腺ホルモン受容体ノックアウトマウスのうち、TR- $\alpha^{0/0}$ マウスは探索行動、立ち上がりなどでワイルドタイプと比較して有意な差を認めなかった。新規環境における行動潜時についてのみ若干潜時が長い傾向が認められた。TR- $\alpha^{0/0}$ マウスとは対照的に、TR- $\beta^{+/-}$ 、TR- $\beta^{-/-}$ マウスはワイルドタイプに対して有意に行動量の増加を認めた。脳内ドーパミン、セロトニン濃度について検討した結果、セロトニンは線条体、海馬いずれでも、また TRKO (甲状腺ホルモン受容体ノックアウトマウス) の 4 系列すべてにおいて、ワイルドタイプと有意な差は認められなかった。ドーパミンについては、海馬ではいずれも有意な差は認められなかったが、線条体において TR- $\beta^{+/-}$ 、TR- $\beta^{-/-}$ マウスでは有意に上昇していることが明らかになった。

結果 4. 臨床的研究(非侵襲的脳機能評価)

課題前の教示の方法と事前の練習により発達障害児の前頭前野機能がどのように変化するかを検討した。その結果、発達障害児では、事前の教示がないほど、また事前の練習があるほど、難易度の高いタスクに呼応した前頭前野機能の賦活が見られやすい傾向が認められた。これは、これまで教育・療育現場で経験的に試みられてきた「前もって手順を説明する」「繰り返し練習する」という方法論を脳科学的に裏付けたことになる

結果 5. 疫学的アプローチ(乳歯や毛髪からの有害物質検出)

質問紙調査票の分析では、(1) 対象者の属性 (2) PARS (Pervasive Developmental Disorders Autism Society Japan Rating Scale, 広汎性発達障害日本自閉症協会評定尺度) 短縮版の得点分布と短縮版構成各 12 項目の回答別人数(%), (3) PARS ピーク時 5 点以上 (広汎性発達障害が疑われる) の児童の特徴、を行った。本文で詳述する。

生体試料の測定では、(1) 毛髪試料の ICP-MS (誘導結合プラズマ質量分析) による測定結果、(2) 毛髪試料の Hg 測定結果、(3) 歯牙試料の ICP-MS 測定結果、(4) 歯牙試料の LA (レーザーアブレーション) -ICP-MS 測定結果を行った。本文で詳述する。

その他、興味深い結果としては PARS ピーク時 5 点以上の児童の母親は子育てに困難を感じていることや、また、PARS5 点以上の児童は外遊びを好まず、身体症状を訴えることが多く、朝の寝

起きの機嫌が悪いという特徴なども浮き彫りになった。ほかにも興味深いデータが多くあり、こちらでも本文で詳述する。

結果 6. 疫学的アプローチ（子どもの発達・行動異常の疫学）

回答者が 20 歳以上に限定されているが、各回答者の家族構成を把握することができ、かつ 20 歳未満の子どもについても情動・認知行動異常に関する情報を正確に得ることができる調査票を開発することができた。とくに、町内における広汎性発達障害、高機能広汎性発達障害、注意欠格／多動性障害、学習障害の状況を正確に把握できるだけでなく、家族構成や学歴、勤務状況などの人口学的情報や、産業別や事業所別の属性、患者やその家族の QOL も定量的に収集することにより、発達障害児を持つ家庭の健康や生活環境をも評価できる体制を構築した。以後子どもにも対象を広げる。

D. 研究考察

考察 1, 化学物質ばく露モデル動物の発生物学的解析

胎生期有機水銀ばく露ラットで情動系の神経であるセロトニン神経の初期発生異常及び長期の異常を認めている。その影響はばく露時期にも関連があるといえる。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のほか、化学物質の種類とばく露時期との関係を明らかにする必要がある。

考察 2. ばく露に有無を知るバイオマーカー検索（DNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子解析）

(1) 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(2) 若齢期に注意欠陥多動性障害(ADHD) 様の多動・低不安を呈する SAMP8 マウス、の二つの動物モデルについて研究を進めた。(1) では、これまでの遺伝子発現解析の結果に基づいてタンパク質レベルでの発現解析を行った。その結果、サリドマイドばく露群では生後 14 日を中心に主要なシナプス局在タンパクの有意な減少がみられ、生後 40 日には正常群と同じレベルまで増加することから、シナプス形成開始時期の遅れを示すと考えられる。若齢期に注意欠陥多動性障害(ADHD) 様の多動・低不安を呈する SAMP8 では、局所的な活性型甲状腺ホルモンの低下が関与することを確認し、発達期脳における新たな化学物質作用点として、II 型脱ヨード化酵素を考える必要性を示した。

(1) 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(2) 若齢期に注意欠陥多動性障害(ADHD) 様の多動・低不安を呈する SAMP8 マウス、の二つの動物モデルについて研究を進めた。(1) では、これまでの遺伝子発現解析の結果に基づいてタンパク質レベルでの発現解析を行った。その結果、サリドマイドばく露群では生後 14 日を中心に主要なシナプス局在タンパクの有意な減少がみられることが分かった。生後 40 日には正常群

と同じレベルまで増加することから、シナプス形成開始時期の遅れを示すと考えられる。(2) 老化促進モデルマウスである SAMP8 の若齢期の行動異常に脳内甲状腺ホルモン代謝の異常による局所的な活性化型甲状腺ホルモンの低下が関与することを確認し、発達期脳における新たな化学物質作用点として、II型脱ヨード化酵素を考える必要性を示した。

考察 3. 内分泌かく乱物質と子どもの情動認知行動異常

一体内ホルモン、特に甲状腺ホルモンが情動認知行動に与える影響

出生直後に低甲状腺ホルモン状態においたラットの示す行動異常と甲状腺ホルモン受容体 β ノックアウトマウスの示す行動異常はいずれもドーパミンの関与を示すもので、ADHDの行動異常の発症機序に甲状腺ホルモンがかかわっている可能性を示唆するものである。行動異常にはホルモン異常の観点も必要と思われる。

考察 4. 臨床的研究(非侵襲的脳機能評価)

これまでの研究で、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。

今年度新たに、ワーキングメモリタスクを遂行中の近赤外線酸素モニター測定を用いて、タスク前の教示の方法と事前

の練習により発達障害児の前頭前野機能がどのように変化するかを検討したところ、発達障害児では、事前の教示があるほど、また事前の練習があるほど、難易度の高いタスクに呼応した前頭前野機能の賦活が見られやすい傾向が認められた。このことは発達障害児では前頭葉の特異的な機能の存在を示唆し、これまで教育・療育現場で経験的に試みられてきた「前もって手順を説明する」「繰り返し練習する」という方法論を脳科学的に裏付けることになる。

今後これらの情報を統合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。

考察 5. 疫学的アプローチ(乳歯や毛髪からの有害物質検出)

平成 21~24 年度に回収された調査票、計 914 例を分析した。対象児全員の PARS 短縮版 12 項目のピーク時 5 点以上(広汎性発達障害が疑われる)児は就学前幼児で 214 例中 30 例(14.0%)、児童(小学生)では 699 例中 130 例(18.6%)、合計 914 例中 160 例(17.5%)であった。幼児(就学前)のみの現在評定結果では 7 点以上(広汎性発達障害が疑われる)は 214 例中 3 例(1.4%)であった。

PARS ピーク時 5 点以上児の特徴は男児にやや多く、出生順位は 1 番目が最も多かった。出産時の平均妊娠週数は短く、出生時の平均体重は女児で低かった。

母親が妊娠前、妊娠中に幹線道路の近くに居住していたか、化学物質を扱う仕

事に従事していたか、1週間の魚摂取頻度と PARS 得点に関連は認められなかった。妊娠前の定期的な薬の服用と妊娠前・中の喫煙習慣は有意な関連が認められなかった。

妊娠中の貧血による鉄剤服用と PARS 得点に関連は認められなかった。食事制限、つわり以外の異常あり、鉄剤以外の薬の服用ありでは PARS5 点以上の割合が高かった。今後、妊娠中の異常や服用した薬剤について詳細な分析を行う。

PARS ピーク時 5 点以上の児童の母親は子育てに困難を感じていることが確認された。また、PARS5 点以上児は外遊びを好まず、身体の症状を訴えることが多く、朝の寝起きの機嫌が悪いという特徴が認められた。

毛髪中の微量元素について、PARS ピーク時点数と相関がみられた元素種には性差があることが示唆された。歯牙中の微量元素については LA-ICP-MS 法によるエナメル質中の微量元素濃度分析法を検討した。

考察 6. 疫学的アプローチ（子どもの発達・行動異常の疫学）

各回答者の社会経済学的状況も聞くことにより、回答者の勤労状態や生活環境をも含めた発症との関連も今後検討する。本研究では有害化学物質の地域分布を把握するための更なる情報を獲得することができ、情動・認知行動異常との関連を検討することができるだろう。

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

平成 24 年度研究課題: 動物実験 (化学物質ばく露モデル動物の発生生物学的解析)
胎生期有機水銀ばく露による情動関連神経 (セロトニン神経) の初期発生に関する研究

| | | | |
|-------|--------|---------------|----|
| 研究代表者 | 成田 正明 | 三重大学大学院医学系研究科 | 教授 |
| 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 |

研究要旨:

有機水銀の一種であるチメロサルは、予防接種の防腐剤として広く一般に使用されているが、人体、特に妊婦の母体を介した胎児に対する悪影響が懸念されている。我々の研究班でのこれまでの研究で、妊娠ラットを用いて胎生期のチメロサルばく露が胎仔のセロトニン神経初期発生異常を引き起こすこと、その影響、即ち脳内のセロトニン濃度の変化は生後長期にも及ぶこと、セロトニンだけでなくドーパミン神経にも絵お経を与えることを明らかにし、論文報告した。今年度は妊娠中のどの時期にチメロサルを投与すると胎仔のセロトニン神経に影響を及ぼすのかに着目した。妊娠 5、7、9、11、13 日目のラットにチメロサルを一回投与し、それぞれ胎生 15 日目で展開標本を作製してセロトニン神経細胞数を比較した。その結果、胎生 5 日目のチメロサル投与ではコントロールとの差が見られなかったが、胎生 7 日目投与ではコントロールの約 1.2 倍に、胎生 9 日目投与ではコントロールの約 2 倍にセロトニン細胞数の増加が認められた。胎生 11 日目、胎生 13 日目投与でも同様に約 2 倍の増加であった。このことは胎生期の有機水銀ばく露がセロトニン神経の初期発生に与える影響はばく露時期依存性であることを示唆する。

A. 研究目的

有機水銀は水俣病の原因として有名なメチル水銀に代表される有機化学物質であり、神経障害を引き起こす。メチル水銀やエチル水銀は、血液脳関門を通り抜け、神経毒性を示す。また、胎児期でのばく露は、胎盤を通じて妊婦から容易に胎児へ移行し、胎児性水俣病としてより重篤な神経障害を引き起こす。

有機水銀の一種であるチメロサルは、体内に取り込まれるとチオサリチル酸とエチル水銀に分解される。チメロサルには殺菌作用があることから防腐剤として古くから知られており、現在でもワクチンの開封後細菌汚染防止に広く用いられている。なかでも特に小児における頻回投与による体内への蓄積や、妊娠期における胎児への影響について懸念されて

いる。

チメロサールの生体に対する影響については生後幼若期のばく露で痛みに対する感受性の変化、海馬における神経変性、ドーパミン神経系の変化と行動異常についての報告があるが、胎生期ばく露での報告はこれまでされていなかった。我々はこれまでの研究で、胎生期にチメロサールをばく露するとその後の胎仔セロトニン神経の発達に異常が見られることを明らかにし、論文報告した (Ida-Eto, et al., *Neuroscience Letters*, 505: 61-64: 2011)。平成 23 年度は、この胎生期チメロサールばく露による神経発達異常が、一時的に胎生期のみに見られるのか、あるいは生後にわたって長期的に見られるのかを検討し、胎生期のラットにチメロサールをばく露することで、生後の海馬セロトニン量および線条体ドーパミン量の増加が見られ、チメロサールの胎生期ばく露の影響は胎生期から生後にわたって続いていることを報告した (Ida-Eto, et al., *Brain and Development*, in press)。

そこで今年度は有機水銀のばく露時期の臨界期について即ちこれらの影響が妊娠中のどの時期に有機水銀にばく露されたかによって違いがあるのかに着目し検討した。

B. 研究方法

チメロサール／生理食塩水溶液 (1 mgHg/kg) を妊娠 Wistar ラットの大腿筋に筋肉注射により投与した。臍栓確認日を胎齢 0 日として、投与時期は妊娠 5 日、7 日、9 日、11 日、13 日と変えてそれぞれ投与した。コントロールは生理食塩水を同様に投与した。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を作製した。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。尾側縫線核側方部分に見られたセロトニン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。

(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のもとで行われた。

C. 研究結果

ラット胎仔の脳幹展開標本は、セロトニン系の神経核や線維を空間的に把握することができる優れた方法である。本研究では、妊娠中のどの時期にチメロサールを投与すると胎仔のセロトニン神経に影響を及ぼすのかを明らかにするため、妊娠 5、7、9、11、13 日目のラットにチメロサールを一回投与し、それぞれ胎生 15 日目で展開標本を作製してセロトニン神経細胞数を比較した。その結果、胎生 5 日目のチメロサール投与ではコントロールとの差が見られなかったが、胎生 7 日目投与ではコントロールの約 1.2 倍に、胎生 9 日目投与ではコントロールの約 2 倍にセロトニン細胞数の増加が認められた。胎生 11 日目、胎生 13 日目投与でも同様に約 2 倍の増加であった (図)。

D. 考察

チメロサールは有機水銀の一種であり、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。平成22年度は、妊娠ラットにチメロサルをばく露したのちに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、セロトニン神経の初期発生に影響を及ぼすことを初めて示した。平成23年度は、胎生期に見られたセロトニン神経の異常が生後にまで見られるかどうか、また他のモノアミンについて異常が見られるかについて検討したところ、胎生9日目にチメロサルばく露を受けた生後50日のラット海馬のセロトニン濃度はコントロールと比較して約1.2倍の増加が見られた。このことは、胎生期チメロサルばく露による胎生15日縫線核セロトニン神経細胞の増加（平成22年度の成果）と矛盾しない結果であった。さらに他のモノアミンについて分析したところ、線条体ドーパミン量もまたチメロサルばく露群で約1.2倍に増加していた。セロトニン神経およびドーパミン神経はいずれも共通の幹細胞である神経上皮細胞がShhおよびFGF8の刺激を受けてそれぞれの前駆細胞から分化・成熟することが知られている。

以上のデータに加え、本年度は、チメロサルの投与時期の検討を行ったところ、これまで確認された胎生9日目にばく露された群の変化（＝胎生15日目で展開標本を作製してセロトニン神経細胞数の増加）は、胎生11日目、胎生13日目投与でも見られる一方、胎生7日目では影響が少なく、胎生5日目投与ではチメロサルばく露の影響がみられなかった。このことは胎生期の有機水銀ばく露がセロトニン神経初期発生に与える影響はばく露される妊娠日齢によって異なる

ことを示唆するものである。今後は胎生期チメロサルばく露が胎児セロトニン神経の初期発生に与える影響についてさらに細かく調べる必要がある。また化学物質の胎生期のばく露がセロトニン神経の初期発生に影響を与えとしても、その機序がサリドマイド、バルプロ酸、チメロサルと異なる可能性があり、今後慎重に調べていく必要がある。

F. 結論

胎生期の有機水銀のばく露はセロトニン神経（そしてドーパミン神経も）の初期発生に影響を与えその影響は生後長く続くが、ばく露される妊娠時期により影響の大きさは異なる、即ちばく露時期特異的な影響といえる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

(1) Impaired prefrontal cortical response by switching stimuli in autism spectrum disorders. Naoko Narita, Akiyuki Saotome, Hiroki Higuchi, Masaaki Narita, Mami Tazoe, and Kaoru Sakatani. *Journal of Pediatric Neurology*, 10; 87-94: 2012

(2) Morphology of the facial motor nuclei in a rat model of autism during early development. Akiko Oyabu, Yasura Tashiro, Takahiro Oyama, Kensaku Ujihara, Takeshi Ohkawara, Michiru Ida-Eto, Masaaki Narita *International Journal of*