

201329009A

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 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 成 田 正 明

平成 26 年 (2014) 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 25 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 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	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	大河原 剛	三重大学大学院医学系研究科 発生再生医学	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 発生再生医学	助教
研究協力者	澤野 恵梨香	青山学院大学・理工学部助手	
研究協力者	小柳 洸志	青山学院大学大学院理工学研究科 博士後期課程 3 年	
研究協力者	岩谷 可南子	青山学院大学大学院理工学研究科 博士前期課程 2 年	
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	平田 岳史	京都大学	教授
研究協力者	林 英男	東京都立産業技術研究センター・研究員	
研究協力者	松川 岳久	順天堂大学	助教
研究協力者	黒澤美智子	同	准教授
研究協力者	篠原 光代	同	前任准教授
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	同	講師
研究協力者	柚木 泰広	同	医員
研究協力者	神田 浩路	三重大学医学部附属病院	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物学的解析） ・・・「胎生期化学物質ばく露による情動関連神経の初期発生に関する研究」 成田 正明	9
2. 動物実験（ばく露に有無を知るバイオマーカー検索） 田代 朋子	17
3. 臨床的研究（非侵襲的脳機能評価） ・・・近赤外線酸素モニターを用いた非侵襲的脳機能評価 成田 奈緒子	25
4. 疫学的アプローチ（乳歯や毛髪からの有害物質検出） 横山 和仁	30
5. 疫学的アプローチ（子どもの発達・行動異常の疫学） 笠島 茂	64
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	67
IV. 研究成果の刊行物・別刷	69

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）

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
（現在の専門；小児神経学、発生学）

研究要旨

【序論】化学物質が発達期にばく露されると正常な発達に悪影響を及ぼす。とりわけ妊娠中の化学物質のばく露では様々な外表奇形・内臓奇形を引き起こすことはよく知られているが、児の情動や認知行動へ及ぼす影響についてはわかっていなかった。本研究では妊娠中の化学物質が児の情動や認知行動へどのような影響を及ぼすかを明らかにし、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した。

【結果】妊娠動物への化学物質ばく露実験では、サリドマイドや抗てんかん薬、有機水銀の胎生期投与により、セロトニン神経（＝情動関連神経と考えられ、自閉症での障害神経）の発生の異常を認めた。サリドマイドや有機水銀の妊娠中のばく露ではさらに、脳内ノルアドレナリンの異常も認めた。このノルアドレナリンという脳内神経伝達物質は多動症(ADHD)治療の標的となる物質であるため興味を持たれる。

ばく露の有無を知るバイオマーカー検索のための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。一方臨床的にはヒトで、近赤外線酸素モニターを用いることで、情動・認知行動の異常（アスペルガー症候群など発達障害）を鑑別し得る特徴的な所見も見出した。さらに全国からの研究協力者から提供された、抜けた乳歯・毛髪分析により、有害化学物質の生体中蓄積（毛髪中水銀濃度の測定および乳歯エナメル質中の微量元素測定）と情動認知行動異常との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。



2013年5月20日中日新聞
（研究代表者の取り組み）

<分担研究者>

田代朋子 青山学院大学理工学部 教授
（現在の専門；神経化学）

横山和仁 順天堂大学医学部衛生学 教授
（現在の専門；公衆衛生学、毒物分析）

成田奈緒子 文教大学教育学部
特別支援教育専修 教授
（現在の専門；小児科学、特別支援教育学）

そうけ島茂 三重大学大学院医学系研究科
公衆衛生学 教授
（現在の専門；疫学）

A.研究目的

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の研究に取り組んできた。この中で以下のことを発信してきた。

- ・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。
- ・クジラやイルカの食習慣ある和歌山県太地町における住民の有機水銀摂取の不安、とくに妊婦や子どもに対する影響について、厚生労働省研究班の主任研究者名で論評した（2012年6月1日読売新聞）。
- ・国民への研究成果の分かりやすい啓蒙活動として、NHKテレビ「視点論点」で意見を述べる機会を得た（「妊娠中の化学物質と子どもの発達」（2011年8月21日放映）、「化学物質ホルムアルデヒドと健康」（2012年6月15日））。
- ・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問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

本研究では平成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したものである。



「妊婦の魚介類摂取に関する厚労省指針」についての新聞記事（2005年）

科学的根拠



私たちの研究は、「妊婦の魚介類摂取に関する指針」について、科学的根拠を与えたといえる。（2011年9月11日、中日新聞）

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
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。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投与して
その影響をさらに調べるとともに、他の
化学物質(メチル水銀)でも共通のカス
ケードが存在するかを検討した。

多動症(ADHD)発症にも胎生期の脳
内ホルモン、特にノルアドレナリンの
関与が指摘されている。1年目は、低甲
状腺ホルモンマウスや甲状腺受容体ノッ
クアウトマウスでは、多動などの行動異
常や脳内モノアミンに違いがあることを
確認した。

そこで2年目は多動症のもととなる脳内
ホルモン(神経伝達物質)であるノルア
ドレナリンの基本動態を調べるためまず
ノルアドレナリンが脳内のどこに局在す
るかを調べた。また生後の脳内ノルアド
レナリンが胎生期の化学物質ばく露で影
響を受けるのか調べた。

このことは以下の点で大切である。即
ち、現在臨床でADHD(多動症)の治療薬
としてもっぱら使われているアトモキセ
チンは薬理的には“選択的ノルアドレ

ナリン再吸収阻害剤”であることを考え
ると、本研究は臨床医学にとっても喫緊
の課題といえる。

研究方法2；ばく露の有無を知るバイオ マーカー検索

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、ばく露のバイ
オマーカー候補となる遺伝子の絞り込
みを行った。

研究方法3；臨床的研究(非侵襲的脳機 能評価)

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
事しており、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。

これまでに、①発達障害者と定型発達
者では、ポジティブなこと(楽しかった
ことなど)を思い起こした場合の右脳左
脳の活性化の違い、②前もって手順を説
明したり、繰り返し練習すると、発達障
害者の脳活性化に有効であること、③定
型発達者なら頭を使うとされる「ワーキ
ングメモリー課題」でも自閉症児者では
脳活性化は起こりにくいことを確かめた。
そこで2年目は、この発達障害者におけ
る前頭葉賦活化の特性をさらに詳しく検
討するため、ワーキングメモリー/ノンワ
ーキングメモリーのスイッチングタスク
のデータを新たな方法で解析した。すな
わち1秒ごとの酸素化ヘモグロビン濃度
測定の数値を微分解析することにより、タ

スク開始と共に脳血流の加速度上昇率を計算し、それを二次元平面上に描出することで、ワーキングメモリタスクと、ノンワーキングメモリタスクでの前頭葉の賦活化のパターンの差異が発達障害者と定型発達者で差があることをより明確に示すことができるか、検討を行った。

研究方法4；疫学的アプローチ（乳歯や毛髪からの有害物質検出）

情動・認知行動異常の発症の疫学をおこなった。本研究は公衆衛生学、毒物分析学が専門研究領域の横山和仁が担当した。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。平成21年度より調査を開始し、25年度までに質問紙調査票を968例回収し、対象外を除く966例について集計・分析を行った。生体試料は、毛髪を852検体、歯牙を773検体収集した。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。

研究方法5；疫学的アプローチ（子どもの発達・行動異常の疫学）

研究要旨：

広汎性発達障害(PDD)、高機能広汎性発達障害(HFPDD)、注意欠格／多動性障害(ADHD)、学習障害(LD)ならびにそれらの関連要因の疫学調査（平成25年1月～3月）

を実施した。A町に居住する20歳以上60歳未満の全人口7,590人(男性3,773人、女性3,817人)に自記式質問票を配布した。回収率は65.6%である。同意が得られた4,525人(59.6%)を解析の対象とした。回答者本人が各障害を15歳までに医師から指摘された割合（本人有病率）、回答者の児が各障害を医師から指摘された割合（児有病率）、および回答者の人口学的特性、社会経済的地位(SES)、および居住地区との関連性を検討した。

〈倫理面への配慮〉

ヒトを対象とする研究に当たっては各施設で研究倫理委員会の承認のもとで行った。動物実験は各施設で動物実験委員会の承認のもとで行った。

C.研究結果

研究結果 1; 化学物質ばく露モデル動物の発生生物学的解析

化学物質ばく露モデル動物（＝上述の自閉症モデルラット＝情動認知行動異常を伴う）での、セロトニン系（＝情動に深く関連する神経）の異常のほか、他の脳内物質（ドーパミン）の異常も確認した。

多動性衝動性のもととなる脳内ホルモン

（神経伝達物質）であるノルアドレナリンが脳内でどう局在しているかをラット脳で明らかにした。胎生期の化学物質（サリドマイドやチメロサル＝有機水銀）ばく露で、生後のノルアドレナリンの脳内発現が大きく変化することも見出した。

これまでの成果は次のような形で国民に公表してきた。

- ・ 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）。

研究結果 2; ばく露に有無を知るバイオマーカー検索

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）を確立した田代は、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。1年目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。

2年目はさらに、発達の障害を呈する“実験的甲状腺ホルモン低下ラット”を加え、GABAシステムの構成要素であるGAD65およびKCC2が生後2週～3週での発達の遅滞を反映する有効なマーカー遺伝子であることを確認した。

研究結果3; 臨床的研究（非侵襲的脳機能評価）

1年目はこれまで教育・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

することを明らかにした。

2年目は、昨年度までに得られた近赤外線酸素モニターで採取したデータを新たな方法で解析した。すなわち1秒ごとの酸素化ヘモグロビン濃度測定の数値を微分解析することにより、特に記憶想起の時間内に集中して前頭前野に賦活が行われ、課題が終了すると速やかに血流が低下する傾向が、定型発達者でより明確にみられるかどうか検証した。

その結果、定型発達者では、ワーキングメモリタスクとノンワーキングメモリタスクでの差異が明確であり、発達障害者では、ワーキングメモリタスクとノンワーキングメモリタスクでの差異が明確ではなかった。すなわち定型発達者では、図1のように、ワーキングメモリタスクを施行中には速やかな血流上昇を反映した微分値の分布（赤線）が見られ、ノンワーキングメモリタスクを施行中（青線）とは分離された平面にデータが存在する確率が高く、分離度は1.20であった。これに対し図2に示すように発達障害者では、ワーキングメモリタスクとノンワーキングメモリタスクでの差異が明確ではなく、分離度は0.0248であった。

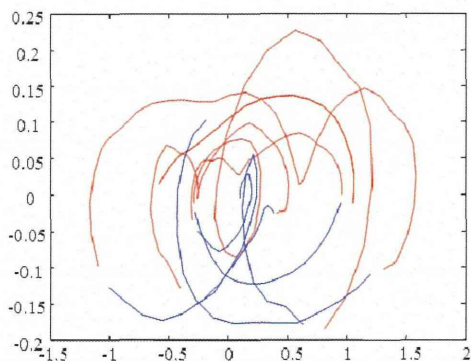


図1：典型発達者におけるチャンネル1解析結果

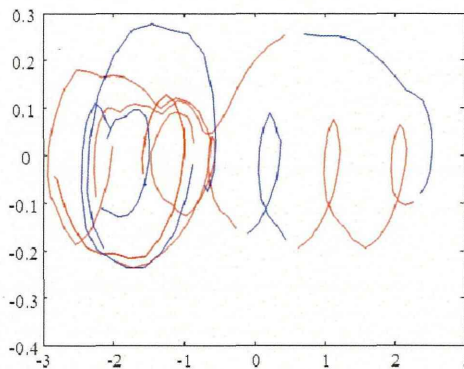


図2：発達障害者におけるチャンネル1解析結果

今後の展望として、課題の切り替えに呼応した前頭前野血流変化をさらに確かめる。即ち、前年度までの実験タスクを改変して4個の色と形が異なる図形を記憶させるワーキングメモリ課題と、対応するノンワーキングメモリ課題を交互に数回繰り返して行うタスクを新たに考案した。これを用いることでよりの確に発達障害者の前頭葉機能を評価できると考えている。

研究結果4: 疫学的アプローチ（乳歯や毛髪からの有害物質検出）

平成21～25年度に回収された調査票、計966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224例中32例（14.3%）、児童（小学生）では741例中138例（18.6%）、合計965例中170例（17.6%）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224例中5例（2.2%）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、化学物質を扱う仕事に従事、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。

また、本調査の母親の妊娠前の喫煙率は 31.4%と日本の女性の喫煙率よりも高かった。

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が、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 PAR5 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、PAR5 点以上児は外遊びを好まず、身体症状を訴えることが多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。

研究結果 5; 疫学的アプローチ (子どもの発達・行動異常の疫学)

20 歳以上 40 歳未満の 1,927 人における本人有病率は、PDD で男性千人対 9.9、女性千人対 3.9、以下同様に HFPDD で 4.4、2.0、ADHD で 3.3、0.98、LD で 3.3、3.0 であった。年齢が 20 歳以上 60 歳未満である親 4,378 人における各障害の児有病率 (障害児を持つ親の割合) は、父親では、PDD で有業者千人対 13.4、無業者千人対 147.1、以下同様に、HFPDD で 2.4、62.5、ADHD で 5.5、31.3、LD で 6.3、93.8 であった。母

親では、PDD で有業者千人対 10.9、無業者千人対 25.3、以下同様に、HFPDD で 2.5、2.5、ADHD で 5.0、5.1、LD で 6.3、2.5 であった。いずれかの児に PDD の病歴があるかを、父親の PDD の病歴、職業の有無、年齢による多重ロジスティックモデルで回帰したところ、児の PDD の病歴に関する父親の PDD の病歴のオッズ比は 33.2 (95%信頼区間: 2.84-388、 $p=0.005$)、父親の職業 (無業) のオッズ比は 10.0 (2.51-40.3、 $p=0.001$) であった。一方、母親についての同様のモデルでは関連性は認められなかった。児の PDD と父親の PDD の病歴、職業の有無、および居住地区との間に関連性が示された。今後、これらの関連性の再現性ならびに既知の要因との交絡の有無を検討する必要がある。

D. E. 考察及び結論

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。早期発見、早期支援の必要性の裏付け研究が求められる。

F. 研究発表

分担研究報告書に分担研究者ごとに記載

G. H. 健康危険情報、知的財産権の出願・
登録状況（予定を含む

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 25 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）
胎生期化学物質ばく露による情動関連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
研究協力者	大河原 剛	三重大学大学院医学系研究科	講師

研究要旨

発達期の化学物質のばく露は子どもの正常な発達に悪影響を及ぼし得る。なかでも妊娠中の化学物質のばく露は様々な外表奇形・内臓奇形を引き起こすことはよく知られているが、情動や認知行動への影響についての詳細はわかっていなかった。本分担研究報告は、化学物質ばく露モデル動物の解析、ばく露の有無を知るバイオマーカー検索、臨床的研究として非侵襲的脳機能評価、乳歯や毛髪からの有害物質検出による疫学的アプローチ、のうち“化学物質ばく露モデル動物の解析”に関するものである。

これまでにサリドマイドや抗てんかん薬、有機水銀の胎生期投与により、セロトニン神経（情動関連神経と考えられ、自閉症での障害神経）の発生の異常を認めたことを明らかにしている。本年度さらにサリドマイドや有機水銀の胎生期ばく露では、ノルアドレナリンの異常も認めた。このノルアドレナリンという脳内神経伝達物質は多動症(ADHD)治療の標的となる物質でもあり重要である。胎生期のことが原因で生後の脳内ノルアドレナリン濃度が変動する一つの機序が明らかになったのは初めてと思われる。

以上を基に今後は早期発見、早期支援の必要性の裏付け研究が求められる。

A.研究目的

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。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投与してその影響をさらに調べるとともに、他の化学物質(メチル水銀)でも共通のカスケー

ドが存在するかを検討した。

また多動性衝動性行動のもととなる脳内ホルモン（神経伝達物質）であるノルアドレナリンの脳内のどこに局在するかを調べた。また生後のノルアドレナリンが胎生期の化学物質（サリドマイドやチメロサル＝有機水銀）ばく露で影響を受けるのか調べた。

B.研究方法

胎生期化学物質ばく露ラットの作製

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。

チメロサルばく露ラットは以下の方法で作製した。チメロサル／生理食塩水溶液（0.1 mgHg/kg、0.01 mgHg/kg）を妊娠9日目のWistarラット（膣栓確認日を胎齢1日目とした）の大臀筋に筋肉注射で投与した。コントロールは生理食塩水のみを同様に投与した。妊娠を継続させ、出産後、生後50日の仔（雄のみ）を実験に供した。

サリドマイドばく露ラットは以下の方法で作製した。サリドマイド 500 mg/kgを5%アラビアゴム水溶液に溶解し、妊娠9日目と10日目に一回ずつ、栄養カテーテルを用いて無麻酔下で経口投与した。コントロールは5%アラビアゴムのみを同様に投与した。妊娠を継続させ、出産後、生後50日の仔（雄のみ）を実験に供した。

脳スライスの作成と免疫組織染色

7週齢の雄ラットを麻酔後4%パラホ

ルムアルデヒドで灌流固定し、スクロース液に置換後OTCコンパウンドに包埋して凍結ブロックを作製した。クライオスタットを用いて厚さ50 μmに薄切してTBSに取り、脳スライスを作製した。脳スライスは浮遊の状態免疫染色を行い、抗ドーパミンβヒドロキシラーゼ（DBH）抗体でABC法によりDABでノルアドレナリン神経細胞を可視化した。染色した脳スライスをスライドグラス上に載せ、風乾後、脱水・透徹しエントランで封入を行った。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。

HPLCによるモノアミンの定量

生後1週、2週、3週、4週および7週の雄ラットより小脳、橋・延髄、中脳、視床、海馬、線条体、大脳皮質前頭葉、大脳皮質頭頂葉・後頭葉を採取し、液体窒素で凍結した。重量を測定後、5倍容の0.2 M過塩素酸、100 μM EDTA溶液でソニケーションし除タンパクを行ってモノアミンを抽出した。内部標準として200 ngのイソプロテレノール塩酸塩を用いた。SC-5 ODSカラム（エイコム）を用いてHPLCによりモノアミン量を測定した。

C.研究結果

生後の発達に伴う脳内ノルアドレナリンの変化

中枢神経系のノルアドレナリン神経の働きは突発的な刺激などの環境変化

に対して反応するものであり、覚醒や注意、ストレス行動、認知機能など様々な役割を果たしており、中枢神経系において広く投射している。脳の各領域において、ノルアドレナリン神経がどのように発達しているのかを明らかにするため、HPLC を用いて各脳領域におけるノルアドレナリンの定量を行った。小脳、橋・延髄、中脳、視床、海馬、線条体、前頭葉、頭頂葉-側頭葉-後頭葉の8箇所に分け、生後1週、2週、3週、4週および7週(各n=6)で比較した。(図1)ノルアドレナリンが多く含まれているのは橋・延髄、中脳、視床であった。この3領域はノルアドレナリン神経細胞体が多く存在し、かつ主要な線維束(背側束、腹側束、内側前脳束)が走行しているためと考えられる。この3領域は生後3週でほぼプラトーに達していた。一方、海馬、前頭葉、頭頂葉-側頭葉-後頭葉の3領域は、生後1週でのノルアドレナリン量は少ないものの、その後発達に伴ってノルアドレナリン量は増加の一途をたどった。生後1週に対する生後7週の増加率を比較すると、橋・延髄、中脳、視床は平均して約2倍であるのに対し、海馬、前頭葉、頭頂葉-側頭葉-後頭葉は平均して約5倍と大きく増加していた。このことは、脳の発達に伴い、ノルアドレナリン神経細胞体が成熟し、海馬や大脳皮質へと投射して神経ネットワークの形成が生後2ヶ月の長い時間をかけて徐々に成熟していくことを示している。

胎生期化学物質ばく露による海馬ノルアドレナリンの変化

妊娠9日目にチメロサルを投与し、仔の海馬ノルアドレナリン量をHPLCで定量したところ、コントロール群と比較してチメロサル量0.01 mgHg/kgでは約1.43倍、チメロサル量0.1 mgHg/kgでは約1.53倍に増加していた(いずれも $p < 0.01$) (図2A)。また、妊娠9日目・10日目にサリドマイドを投与し、仔の海馬ノルアドレナリンを同様に定量したところ、コントロール群と比較してサリドマイド群はわずかに1.16倍ではあるが有意差($p < 0.01$)を持って増加していた。(図2B)

ノルアドレナリン神経細胞の分布

中枢神経系のノルアドレナリン神経細胞はA1~A7として脳幹に存在し、中でも主要なものとして橋の背外側部に存在する青斑核(A6)がある。ここから大脳皮質、海馬、視床、小脳、脊髄など広い領域へと投射し、多様な脳機能を司っている。ノルアドレナリンはドーパミンを基質としてドーパミンβヒドロキシラーゼ(DBH)の酵素反応により生合成されることから、DBHはノルアドレナリン産生細胞の良いマーカーとなる。ノルアドレナリン神経を可視化するため、成獣ラット脳スライスを作製し免疫染色を行った(図3)。青斑核に多くのDBH陽性の神経細胞体が見られ、脳幹のA2にもDBH陽性細胞体が存在していた。DBH陽性の神経線維は海馬、大脳皮質(前頭葉、頭頂葉)など脳の他の領域にも見られ(図矢印)、ノルアド

レナリン神経が脳全体に投射していることが観察された。

D. E. 考察及び結論

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。

F. 研究発表

原著論文

Kouhei Nishikawa, Norihito Soga, Kenichiro Ishii, Manabu Kato, Yoichi Iwamoto, Yasuhide Hori, Michiru Etoh, Takeshi Ohkawara, Tomomi Yamada, Katsunori Uchida, Hideaki Kise, Kiminobu Arima, Masaaki Narita, Taizo Shiraishi, Yoshiki Sugimura
Manserin as a novel histochemical neuroendocrine marker in prostate cancer.
Urologic Oncology, 31, 787-795, 2013

Michiru Ida-Eto, Akiko Oyabu, Takeshi Ohkawara, Yasura Tashiro, Naoko Narita, Masaaki Narita Prenatal exposure to organomercury, thimerosal, persistently impairs the serotonergic and

dopaminergic systems in the rat brain: Implications for association with developmental disorders
Brain and Development 35, 261-264, 2013

Subtype-specific parafollicular localization of the neuropeptide manserin in the rat thyroid gland
Takeshi Ohkawara, Akiko Oyabu, Michiru Ida-Eto, Yasura Tashiro, Naoko Narita, Masaaki Narita
Acta Histochemica 115(2): 190-194, 2013

Akiko Oyabu, Yasura Tashiro, Takahiro Oyama, Kensaku Ujihara, Takeshi Ohkawara, Michiru Ida-Eto, Masaaki Narita
Morphology of the facial motor nuclei in a rat model of autism during early development. International Journal of Developmental Neuroscience
31(2)138-144, 2013

Localization of manserin, a secretogranin II-derived neuropeptide, in the reproductive tract of female rats
Michiru Ida-Eto, Makiko Nomura, Takeshi Ohkawara, Naoko Narita, and Masaaki Narita Acta Histochemica, *in press*

自閉症スペクトラム児における統合型—HTP法を用いた描画の経時的変化
成田奈緒子、成田正明、田副真美

日本小児心身医学会雑誌、22(3),
175-182, 2013

自閉症スペクトラム児における統合型
—HTP法を用いた描画の経時的変化
成田奈緒子、成田正明、田副真美
日本小児心身医学会雑誌、22(3),
175-182, 2013、

キャンプを用いた発達障害児の家族支
援(1)
—児の前頭葉抑制機能変化に関する因子—
小澤有希、小関英里圭、今泉奈津季、岡
戸奈都子、樋口大樹、田副真美、成田正
明、成田奈緒子 発達障害研究
35(4)334-340, 2013

キャンプを用いた発達障害児の家族支
援(2)
—保護者の心理的効果とそれに関連する
生活習慣—
今泉奈津季、岡戸奈都子、小澤有希、小
関英里圭、樋口大樹、田副真美、成田正
明、成田奈緒子 発達障害研究
35(4)341-347, 2013

学会発表

第118回日本解剖学会総会・全国学
術総会シンポジウム香2013年3月28
日香川

「胎生期の化学物質ばく露による情
動認知行動異常に関する基礎的研究
—厚生労働省研究班の研究より—」

(1)「胎生期の化学物質ばく露による
情動認知行動異常に関する基礎的研

究」成田正明

(2)「小児の毛髪中微量元素と情
動・認知行動との関連」横山和仁、
松川岳久

(3)「遺伝子発現プロファイルによ
る胎生期化学物質ばく露の影響評価」
田代朋子

(4)「有機水銀の胎内ばく露による
モノアミン神経系への影響」江藤み
ちる

(5)「近赤外線酸素モニター等を応
用した情動・認知行動の多角的評価
の試み」成田奈緒子

(6)「胎内でのウイルス感染モデル
によるセロトニン神経系への影響—
化学物質ばく露とのメカニズムの違
い」大河原剛

「さまざまな言語活動を行わせた際
の脳活動の可視化の試み—睡眠不足
の影響」成田正明、江藤みちる
第9回日本疲労学会総会ミニシンプ
ジウム、2013年6月7,8日秋田

「自閉症モデルラットにおける小脳
のPurkinje細胞数の減少」

大河原 剛、江藤 みちる、成田 正明
日本神経科学会 2013年7月 京都

「妊娠中の有機水銀ばく露とセロト
ニン神経の発達異常」江藤みちる、
大河原剛、成田正明

第53回日本先天異常学会総会
2013年7月21-23日

「妊娠中のウイルス感染による胎児
の情動神経への影響」

大河原剛、葛山貴士、江藤みちる、
成田正明
第 53 回日本先天異常学会総会
2013 年 7 月 21-23 日

「母体内感染が脳セロトニン神経
系の発達に及ぼす影響—ウイルス
感染モデル動物に与える影響」
大河原剛、葛山貴士、江藤みちる、
成田正明
第 17 回活性アミンに関するワーク
ショップ 2013 年 8 月 24 日、福井

「キャンプを用いた発達障害時の
家族支援（3）—継続施行による効
果の総合的評価の試み—」
佐藤佳奈、北村くるみ、小澤有希、
小関英里圭、今泉奈津季、岡戸奈津
子、樋口大樹、若林祐子、田副真美、
成田正明、成田奈緒子 2013 年 8
月 24—25 日 日本発達障害学会
第 48 回研究大会、早稲田大学

「ラット卵管における神経ペプチ
ドマンセリンの役割」
野村真希子、江藤みちる、大河原剛、
成田正明 第 73 回日本解剖学会中部
支部会 2013 年 10 月 5-6 日 甲府

「基礎研究から見た小児神経疾患
の病態—臨床への応用を目指して」
第 40 回日本小児神経学会東海地方
会 特別講演
平成 26 年 1 月 25 日、名古屋

「妊娠中のサリドマイドと生後の
発達障害—妊娠ラットへのサリド
マイド投与による自閉症モデル動
物」

第 30 回日本毒性病理学会総会シン
ポジウム 平成 26 年 1 月 30 日—31
日、徳島

「セロトニンと SIDS」
第 20 回日本 SIDS・乳幼児突然死予
防学会教育講演
平成 26 年 3 月 7, 8 日大宮

「妊娠中のウイルス感染は SIDS 発
症の危険因子になりうるか」
大河原剛、江藤みちる、成田正明
第 20 回日本 SIDS・乳幼児突然死予
防学会
平成 26 年 3 月 7, 8 日大宮

「妊娠中のウイルス感染がセロト
ニン神経系へ与える影響 — 臨
界期の検討」
大河原剛、江藤みちる、成田正明
第 119 回日本解剖学会総会 2013
年 3 月 27-29 日栃木

「ラット脳モノアミンの生後脳発
達依存的な変化」
江藤みちる大河原剛、成田正明
第 119 回日本解剖学会総会 2013
年 3 月 27-29 日、栃木

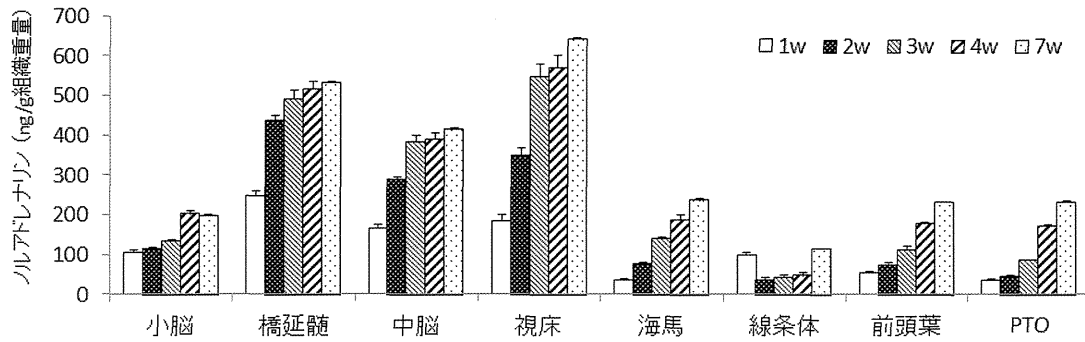
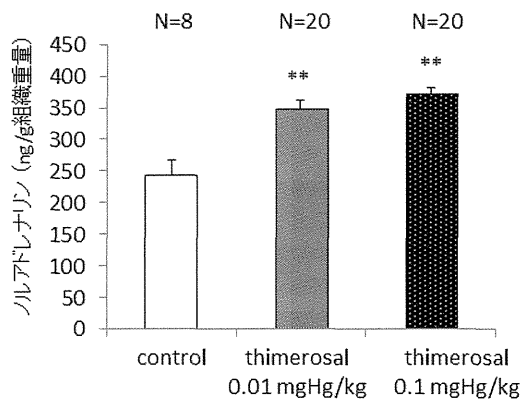


図1 脳各領域におけるノルアドレナリン量の生後の発達に伴う変化の比較。
それぞれn=6。単位はng/g組織重量。平均値±SEM(n=6)。PTO, Parietal-Temporal-Occipital(頭頂葉-側頭葉-後頭葉)。

(A) チメロサル



(B) サリドマイド

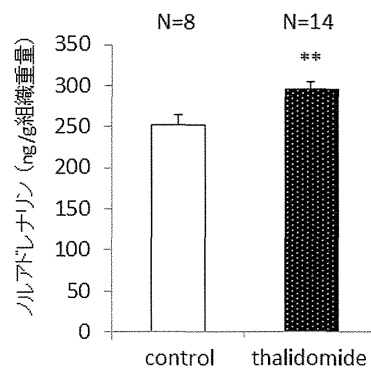


図2 胎生期の化学物質ばく露後の、生後50日における海馬ノルアドレナリン量の比較。
(A) 妊娠9日目にチメロサル(0.01 mgHg/kg, 0.1 mgHg/kg)をばく露し、コントロールは生理食塩水とした。
(B) 妊娠9日目、10日目にサリドマイドをばく露し、コントロールはアラビアゴム水溶液とした。
単位はng/g組織重量。平均値±SEMで示した。** p < 0.01 vs. コントロール。