

図3 成獣ラット脳スライスでのノルアドレナリン免疫染色。ノルアドレナリン神経細胞をドーパミンβヒドロキシラーゼ(DBH)抗体を用いて可視化した。DBH陽性細胞の細胞体は青斑核や延髄のA2に局在し、海馬、大脳皮質前頭葉、頭頂葉には神経線維(矢印)が観察された。ネガティブコントロールでは青斑核に陽性細胞が観察されなかった。

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 年度分担研究課題：動物実験（ばく露に有無を知るバイオマーカー検索）

研究分担者	田代 朋子	青山学院大学・理工学部教授
研究協力者	澤野 恵梨香	青山学院大学・理工学部助手
	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
	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

研究要旨

本分担研究では、動物モデルを用いて、胎生期の化学物質ばく露によって強く影響を受ける脳内部位やプロセスを特定し、ばく露のバイオマーカー候補を探索するとともに、その妥当性を確認することを目的とする。胎生期サリドマイドばく露ラットおよび若齢期に ADHD 様の行動異常を呈する SAMP8 マウスを用いた一年目の研究で、前者では GABA 合成酵素の減少、後者では甲状腺ホルモン活性化酵素（DIO2）の減少など、生後 2～3 週を中心に海馬や大脳皮質で発達過程の異常が顕在化することを見出した。この時期は甲状腺ホルモンの臨界期や GABA 作用が興奮性から抑制性にスイッチングする時期とも重なることから、二年目では、これら二種類の動物モデルに加え、実験的甲状腺ホルモン低下ラットを用いて、GABA シナプスの発達と成熟に関わる遺伝子群のうち、バイオマーカーとして有効なものを探した。その結果、GABA 合成酵素の一つである GAD65 および GABA 作用のスイッチングを担う Cl<sup>-</sup> 排出輸送体・KCC2 を三種類のモデル動物に共通の新たなマーカー候補として同定した。また、SAMP8 マウスについては、DNA マイクロアレイ法による網羅的遺伝子発現解析で DIO2 の減少要因を探った結果、I 型インターフェロンの関与を示唆する結果を得た。化学物質ばく露から I 型インターフェロンの産生亢進につながる経路の可能性についても今後、検討を進める。

A. 研究目的

脳の発達に対する胎生期化学物質ばく露の影響を調べるには、ばく露に対して感受性の強い時期や脳内部位を特定するとともに、ばく露のバイオマーカーとなる遺伝子やタンパク質を選定し、効率的かつ高感度に異常を検出する方法を確立することが急務である。

分担研究者・田代は、生後初期のシナプス形成期に何らかの異常が生じた場合、できあがる神経回路が変化し、情動・行動な

どの高次機能に永続的な影響が生じると考え、この時期を中心にモデル動物を用いた研究を行う。具体的には、遺伝子発現解析をスタートラインとして、タンパク質レベルの発現や局在の変化を調べ、遺伝子発現から推察される毒性メカニズムを生化学的、形態学的方法で確認する。最終的にはさまざまな化学物質の胎生期ばく露による脳への影響を効率的に評価できるバイオマーカー群の発見を目指す。

## B. 研究方法

### (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) を単回経口投与することで作成した。溶媒に用いたアラビアガム水のみを投与したものを対照群とした。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。

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老化モデル動物で、促進老化を示す SAMP 系統と正常老化を示す SAMR 系統の 2 系統がある。SAMP 系統のうち SAMP8 は、身体的老化は緩やかであるが、5 カ月齢以降、進行性の学習・記憶障害など、主として中枢神経系の病態を示し、脳の加齢変化を調べるモデルとして使用されてきたが、田代らは最近、SAMP8 と対照群である SAMR1 を生後初期から比較解析し、学習・記憶障害の顕れる以前の若齢期 (1~5 ヶ月齢) の SAMP8 に顕著な多動や低不安などの行動異常が見られること、海馬において甲状腺ホルモン活性化酵素 (II 型脱ヨード化酵素) が減少し、甲状腺ホルモン・シグナルが減弱していることを見出した (Sawano et al., *J. Neurosci. Res.*, 2013)。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。

実験的甲状腺ホルモン低下ラット : 母ラットに妊娠 15 日目より授乳期を通して甲状腺ホルモン合成阻害剤メチマゾール

(MMI : 0.025%) を飲水投与することにより甲状腺ホルモン低下ラットを作成した。また、このラットに生後 1 日より毎日、甲状腺ホルモン・サイロキシン (T4 : 20ng/g 体重/日) を皮下投与し、回復群を作成した。

### (2) 遺伝子発現解析

リアルタイム定量 PCR : 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。

また、SAMP8 については、市販の大集積アレイ (44,000 プローブ ; Agilent 社) を用いた網羅的遺伝子発現解析を行った。

### (3) 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  $\beta$  アクチンを用いた。

### (4) 免疫組織化学

各週齢の動物の脳を麻酔下に 4% パラフォルムアルデヒドで灌流固定後、パラフィン包埋し、厚さ 8  $\mu$  m の切片を作製した。GAD65、GAD67、PV などに対する特異抗体を用いて ABC 法で切片を染色し、海馬を中心に GABA ニューロンの数や分布を測定した。

### (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。

## C. 研究結果

### GABA シナプスの甲状腺ホルモン応答成分：

妊娠 15 日目から母ラットに MMI を飲水投与することにより、胎生後期から生後の発育期を通して甲状腺ホルモン欠乏状態の仔ラット (hypo 群) および hypo 群に生後 1 日目より毎日、甲状腺ホルモン T4 を皮下投与した回復群を得た。対照群として MMI 非投与の母ラットから生まれた正常群を用いた。生後 4、10、15、28 日の各時点でまず、大脳皮質、海馬、線条体、中脳、小脳の 5 部位で、甲状腺ホルモンに直接応答することが知られている三つの遺伝子 (*rc3*, *hr*, *mbp*) の発現を上記三群で比較したところ、海馬の甲状腺ホルモン感受性が非常に高いことが確認された (図 1)。

次いで、甲状腺ホルモン欠乏の影響が大きいとされる GABA 作動性シナプスの生後発達過程をこれら三群の海馬で比較した結果、シナプス前終末および後終末の構成タンパク質のうち、GAD65 と KCC2 の二つが甲状腺ホルモン応答性を示すことが分かった。

GABA 合成の律速酵素である二種類のグルタミン酸脱炭酸酵素 (GAD) のうち、GAD65 は hypo 群では正常群の 50% に減少し、回復群では正常レベルまで回復していた (図 2A)。免疫組織化学的にも、GAD65 陽性細胞数が hypo 群で 37% 減少しており、GAD65 陽性の神経突起も減少していた (図

3)。これに対して、もう一つの GAD、GAD67、の発現は甲状腺ホルモン・レベルに影響されなかった (図 2B)。一方、K<sup>+</sup>、Cl<sup>-</sup> 共輸送体である *kcc2* の mRNA レベルには、正常群では生後 10 日をピークとする一過性の大きな発現上昇がみられるが hypo 群ではこれが消失しており、生後 15 日目における KCC2 タンパク量は正常群の 20% に留まっていた (図 4)。KCC2 は、Cl<sup>-</sup> を細胞外に排出し、細胞内 Cl<sup>-</sup> 濃度を低下させることで GABA の作用を発育初期の興奮性から抑制性へと変換する重要な因子である。甲状腺ホルモンはこれら二つのタンパク質の発現を介して GABA 作動性システムの発達と成熟に深く関与している。

### サリドマイド誘発自閉症モデルラット大脳皮質における GAD および KCC2 の発現：

生後 14 日の時点で、大脳皮質の GAD67 タンパク量が THA 群では CTL 群の 40~50% に減少し、GAD65 についても減少傾向がみられることを昨年報告した。さらに、KCC2 について調べた結果、やはり生後 14 日で減少傾向が確認された。

### SAMP8 マウス海馬における GAD および KCC2 の発現：

SAMP8、SAMR1 とともに血中甲状腺ホルモン濃度は、輸送型であるサイロキシン (T4)、活性型である 3, 5, 3'-トリヨードサイロニン (T3) とともに正常であるが、これまでの研究で、SAMP8 海馬や大脳皮質では甲状腺ホルモン活性化酵素である II 型脱ヨード化酵素 (DIO2) が 1 カ月齢から大幅に減少していることが判明した。脳内 T3 の 80% は DIO2 が触媒する T4 の脱ヨード化により局所的に産生されるため、SAMP8 海馬では T3 が減少している可能性が考え

られる。

SAMP8 海馬でも発達期の GABA シナプス構成タンパクについて対照群である SAMR1 と比較した結果、生後 2 週の時点で、GAD65 には減少傾向、KCC2 には有意な減少がみられた。これら二種類のタンパクは、両群に共通して生後 1 週から 3 週にかけて増加するが、SAMP8 では 2 週での増加が少なく、3 週では SAMR1 と同レベルに回復していた。

現在、GAD 陽性細胞の分布を両群で免疫組織化学的に比較検討中である。

SAMP8 マウス海馬および大脳皮質における DIO2 減少要因の探索：

1 カ月齢 SAMP8 および SAMR1 の海馬と大脳皮質における遺伝子発現を DNA マイクロアレイ法により網羅的に解析した結果、両部位に共通して SAMP8 で大幅な発現上昇がみられた上位 30 遺伝子中に、I 型インターフェロン (IFN) に誘導される遺伝子 (*Gvin, ifi2712a, usp18, eif2aka, isg15*) や IFN シグナルの調節に関わる遺伝子 (*spry2*) が多数含まれていた。また、ケモカインの一種 *cel19* が大幅に上昇しており、ミクログリアに特徴的な遺伝子 (*slc2a5, glucose transporter 5*) の上昇もみられた。実際、I 型 IFN の IFN  $\alpha$ 、 $\beta$  および II 型の IFN  $\gamma$  について、その発現を PCR 法で調べたところ、SAMP8 海馬で IFN  $\alpha$  の有意な発現上昇が確認されたことから、IFN  $\alpha$  が SAMP8 における Dio2 の減少に関与する可能性が示唆された。一方、小胞体ストレス応答遺伝子の発現には SAMP8 と SAMR1 で差がなかった。

## D. 考察

マーカー候補としての GAD65 および KCC2

三種類のモデル動物に共通して生後 2 週の時点で GAD65 および KCC2 の発現が一過性に減少していたことは、GABA システムの発達になんらかの異常や遅れがある場合は、この時期にこれらのタンパクを指標にして検出できる可能性を示している。

二種類の GAD のうち、全ての GABA ニューロン細胞体に存在し、GABA の基本的な生産を担う GAD67 には差がなかったことから、GABA ニューロンの分化そのものには影響は少ないと考えられる。これに対して、神経突起やシナプスに局在し、刺激に応じた GABA の放出を担う GAD65 の低下は、GABA シナプスの量的減少やネットワーク発達の遅れを反映する可能性が高い。

一方、KCC2 はポスト・シナプス細胞に発現し、細胞内 Cl<sup>-</sup> 濃度を下げることで GABA 作用を興奮性から抑制性に変換させる重要な因子である。KCC2 の発現は周囲の状況によって変化し、シナプス可塑性や傷害後の修復過程にも重要な役割を果たすことが知られており、GABA システムの状態を反映する有力なマーカー候補と考えられる。

甲状腺ホルモン活性化酵素の局所的低下に起因する発達傷害の可能性

SAMP8 の血中ホルモン濃度は正常で、身体発育の差は小さく (体重差 10%程度)、脳の構造に異常は認められないが、若齢期からの顕著な行動異常および脳内甲状腺ホルモン活性化酵素の減少を我々は見出している (Sawano et al., 2013)。代表的な甲状

腺ホルモン応答遺伝子の発現も低下しており、局所的な T3 欠乏が裏付けられる。

ヒトでも、早産で生まれた新生児では一過性の甲状腺ホルモン欠乏により、ADHD を高率に発症することが報告されている。また、 $\beta$ 型甲状腺ホルモン受容体の変異による「甲状腺ホルモン不応症」の児童の多くに ADHD が認められている。SAMP8 のように、DIO2 の変動による局所的甲状腺ホルモン・シグナルの低下がヒト発達障害に関わる可能性について、原因となり得る化学物質を含めて、今後、検討を進める。

#### I型インターフェロンと甲状腺ホルモン活性化酵素

DNA マイクロアレイによる発現解析の結果、SAMP8 海馬および小脳では I 型インターフェロンとそのシグナルが亢進している可能性が示された。発達障害要因の一つとして、胎児期の母体の感染や生後初期の感染が問題になっており、Dio2 の減少による活性型甲状腺ホルモンの減少は、感染から発達異常に至る新たな経路として詳細に検討する必要がある。また、SAMP8 の場合のように、感染によらず I 型インターフェロンが増加する経路についても検討を進める。

#### E. 結論

三種類のモデル動物に共通して、生後 2 週の時点でみられる GAD65 および KCC2 の一過性の減少は、この時期が異常が顕在化する時期であること、また、この二つの遺伝子が mRNA レベルでもタンパク・レベルでも脳発達過程における異常のバイオマーカーの有力候補であることを示唆する。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Sawano E, Takahashi M, Negishi T, Tashiro T: “Thyroid hormone-dependent development of the GABAergic pre- and post-synaptic components in the rat hippocampus.” Int. J. Devl. Neuroscience, 31, 751-761 (2013)

2) Negishi T, Matsunaga Y, Kobayashi Y, Hirano S, Tashiro T. “Developmental subchronic exposure to diphenylarsinic acid induced increased exploratory behavior, impaired learning behavior, and decreased cerebellar glutathione concentration in rats.” Toxicol. Sci., 136: 478-486 (2013)

##### 2. 学会発表

###### 1) 田代 朋子

「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」、第 118 回日本解剖学会総会・全国学術総会シンポジウム 2013 年 3 月 28 日、香川

###### 2) 澤野 恵梨香、根岸 隆之、田代 朋子

“Specific down regulation of type 2 deiodinase in the SAMP8 hippocampus during development: implications for the cause and effect of subclinical hypothyroidism”, NEURO 2013、2013 年 6 月、京都

###### 3) 岩谷可南子、澤野 恵梨香、根岸孝之、

田代 朋子

“Development of the GABAergic system  
in the hippocampus of  
senescence-accelerated SAMP8 mice”,  
NEURO 2013、2013年6月、京都

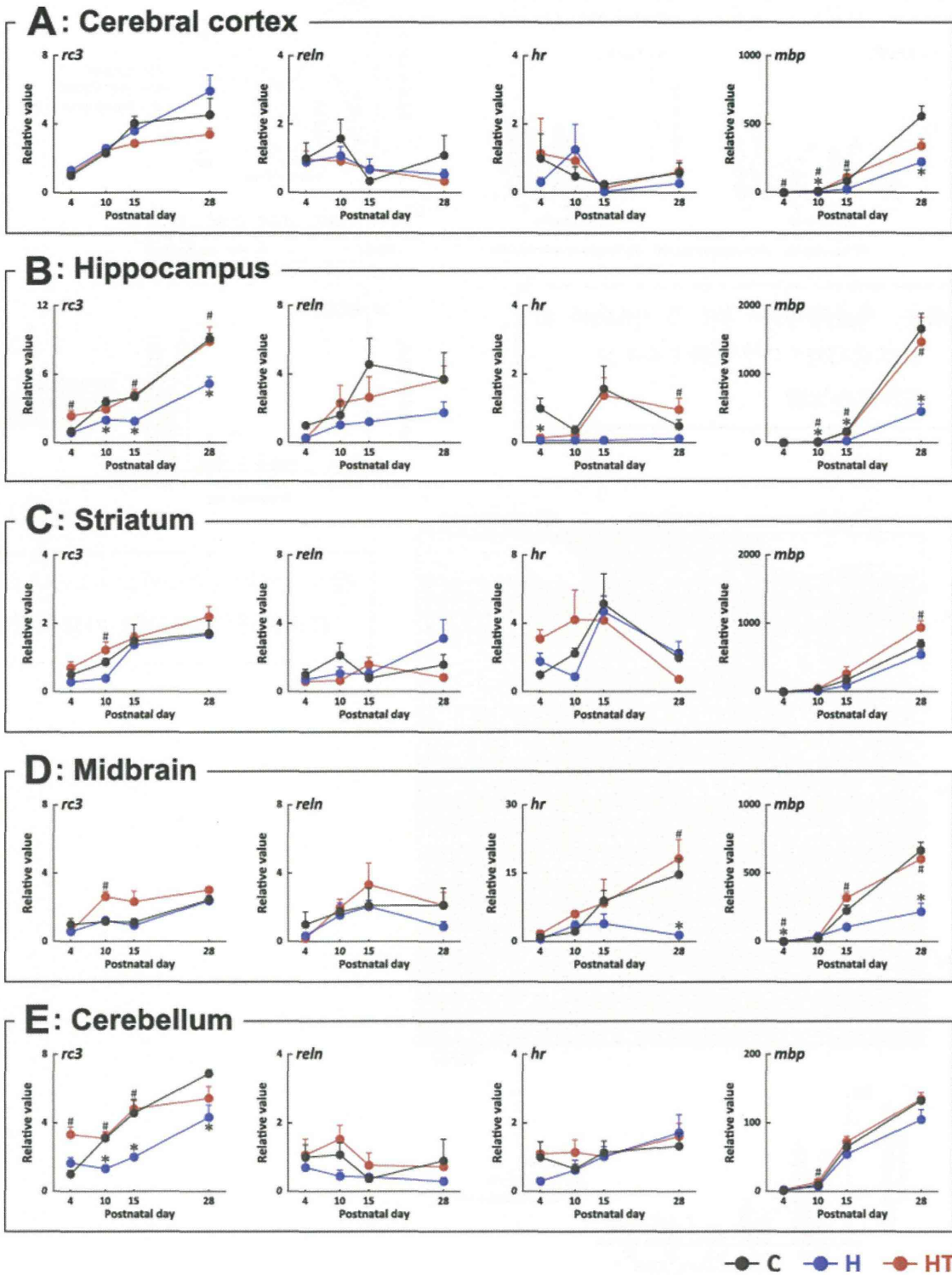
4) 澤野 恵梨香、上田茜、田代朋子

「老化促進モデルマウス（SAMP8）海馬  
における発達期からの甲状腺ホルモン活  
性化酵素（D2）減少要因の探索」（第28  
回 老化促進モデルマウス SAM)研究協議  
会、2013年7月、名古屋

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

図1. 脳内5部位における発達期の甲状腺ホルモン応答性の比較





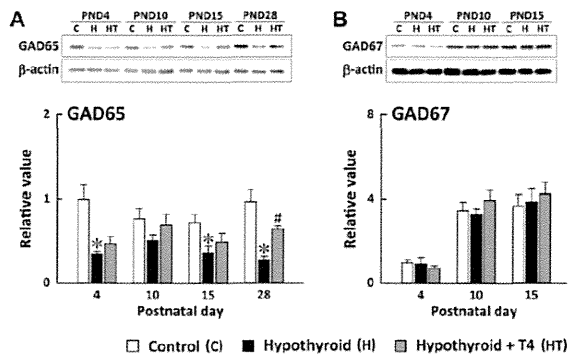


図 2. 発達期海馬における GAD65 および GAD67 の甲状腺ホルモン応答性の比較

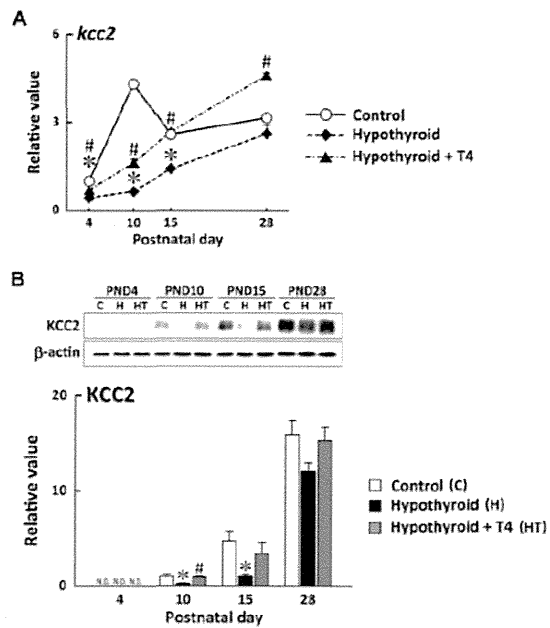


図 4. 甲状腺ホルモン・レベルによる Cl<sup>-</sup> 排出輸送体・KCC2 の発現変化

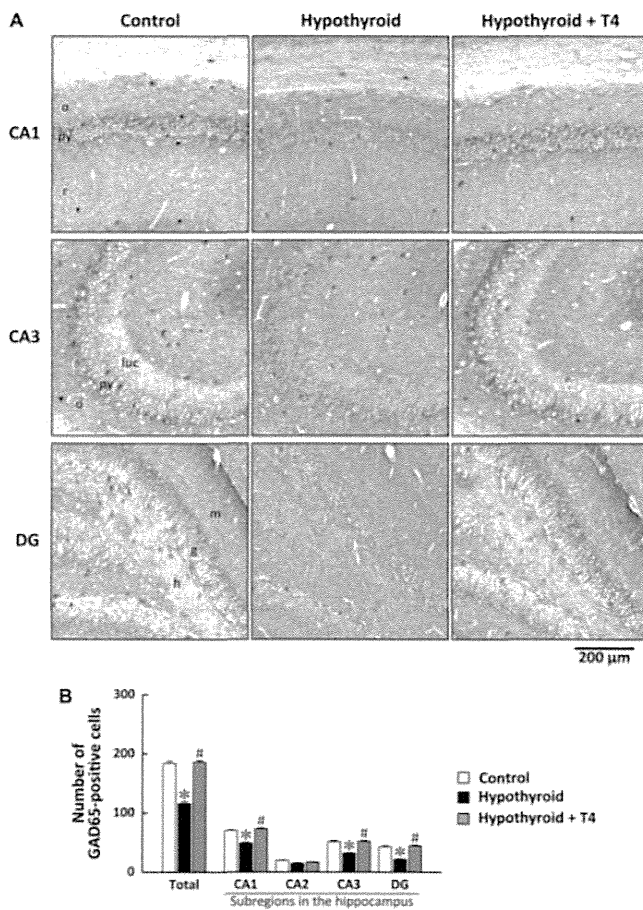


図 3. 甲状腺ホルモン・レベルに応じた海馬 GAD65 陽性細胞数の変化

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 年度分担研究課題：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

研究分担者：成田奈緒子 文教大学教育学部特別支援教育専修 教授

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 修士課程

研究要旨：

小児科専門医として長く自閉症スペクトラム (Autism Spectrum Disorders; ASD) を含む発達障害児の診療に従事してきており、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。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、ASD 者では、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、前年度までに得られた結果を用いて、さらに ASD 者における前頭葉賦活化の特性を検討することとした。このため今年度はまず、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再解析しなおすことにした。1 秒ごとの酸素化ヘモグロビン濃度 (oxy-Hb) の数値を微分解析することにより、タスクに呼応して変化する oxy-Hb の位相が出現する象限の分布の傾向を観察した。その結果、定型発達者ではワーキングメモリ (WM) タスク探索時間では第一・二象限に微分値が多く出現し、ノンワーキングメモリ (NWM) タスク開始と共に微分値は第三・四象限に移行し、結果として高い分離度を示す傾向が認められた。一方 ASD 者における同解析では、微分値の分離度は低く、両者の差異が観察された。

A. 序論

分担研究者は、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を、近赤外線酸素モニター近赤外線酸素モニター (Near Infra-Red Spectroscopy; NIRS) を用いて評価する方法について検討してきた。

ASD 者においては、社会性の障害、コミュニケーションの障害、そして常同性の保持、という先天性の脳機能障害に基づく異常が様々な程度に存在する。これにより、ASD 者においては高い不安と高次脳機能の様々な程度の障害がその社会生活の困難さが生じ、気分障害や他家各

障害、種々の心身症といった二次障害を  
発症させる原因となっている。

この、ASD 者における様々な程度の脳  
機能障害を非侵襲的かつ的確に診断する  
ための補助診断ツールとして用いられる  
ことを目的として、これまで分担研究者  
は、NIRS を用いて ASD 者と定型発達者  
を被験者とした様々な実験を行ってきた。

その結果、以下の 2 点が示唆された。

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。  
特に不安の高い個体においては、右側有  
意の前頭葉賦活が起こりやすい。②ASD  
者においては、図形や人の表情刺激を用  
いた WM タスクを処理する際に、前頭葉  
ではなく側頭葉を用いて処理する異所性  
神経ネットワークが存在する可能性が示  
唆された。また、タスクの切り替えに呼  
応した前頭葉賦活の切り替えが遅延する  
傾向が認められる。

以上より、ASD 者に情動想起刺激や  
WM タスクなど複数のタスクを施行し、  
その際の NIRS による前頭葉血流内  
O<sub>2</sub>Hb 濃度測定を行うことで、補助診断  
ツールとしての有用性を期待できると考  
えられた。

そのため、本年度はこれまでに作成し  
た WM/NWM のスイッチングタスクを  
施行し近赤外線酸素モニターで採取した  
データの再解析を試みた。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、タスク開始に伴う脳  
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、WM タス  
クと、NWM タスクでの前頭葉の賦活化  
のパターンの差異が ASD 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、検討を行い、WM タスクと  
NWM タスクを処理する際の前頭葉の賦  
活のパターンによる、ASD 者と定型発達  
者の差異を診断レベルにまで引き上げる  
ことを目標とした。

## B. 方法

これまでに行った WM/NWM のス  
イッチングタスクは以下の通りである。

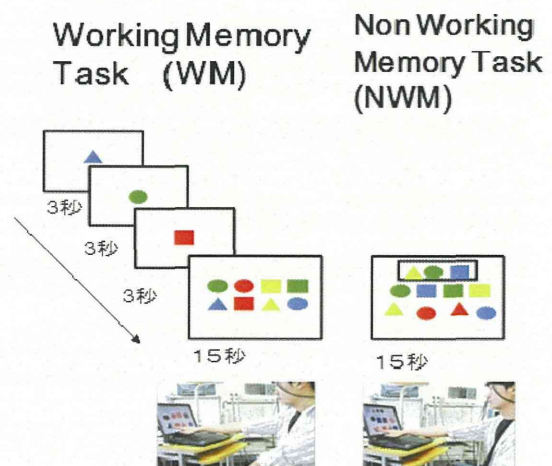


図 1：WM と NWM タスクの概要

対象は定型発達被験者 22 名 (19~51  
歳、男性 6 名、女性 16 名：平均年齢 25.2  
歳) と ASD 者 11 名 (14~46 歳、男性 3  
名、女性 8 名：平均年齢 29.5 歳) である。  
WM と NWM の順番で課題が交互に出さ  
れ、WM タスクでは、3 秒間ごとに矢印  
の順に提示される青い三角形、緑の丸、  
赤の四角形の色と形を順番通りに覚え、  
その後、15 秒間の図形探索として、ラン  
ダムに提示される図形の中から、覚えた  
図形の色と形を順番どおりに利き手で  
触っていく。NWM タスクは、15 秒間、  
上の枠に提示された見本の黄色の三角形、  
緑の丸、青の四角形の図形を見ながら、

下の枠からランダムに提示された図形の中から色と形を順番どおりに利き手で触っていく。

解析は、このタスク施行中の1秒ごとの前頭葉 oxy-Hb 濃度測定を NIRO-200 で行い、得られた数値を微分解析することにより行った。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 ASD 者と典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。

#### (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。被験者には、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。

### C. 結果

図2に、定型発達者の1例の結果を示す。WM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)が主に第一・第三象限に見られたが、NWMタスクを施行中(青線)には、主に第二・第四象限と分離された平面にデータが存在する確率が高く、これを中心からの距離を基に分離度を算出したところ、1.20であった。これに対し図3に示すASD者の一例の結果では、WMタスクとNWMタスクでの微分値の出現象限

には明確な区分は現れず、分離度を算出したところ0.0248であった。

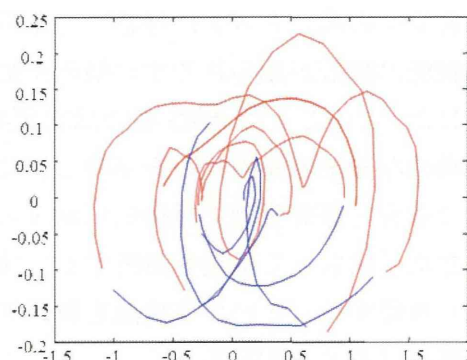


図2：典型発達者におけるチャンネル1解析結果

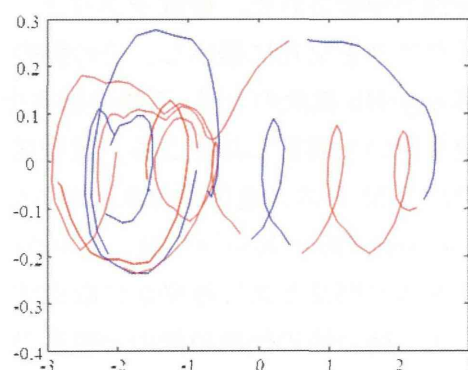


図3：ASD者におけるチャンネル1解析結果

### D. 考察

これまでの研究で、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。また、WM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ASD者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、ASD 者では、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 ASD 者では前頭葉の特異的な機能障害の存在を示唆し、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。

そしてさらに今年度の新たな解析からは、ASD 者と定型発達者のタスク遂行時の前頭葉機能の差異をさらに明確にできる可能性が示唆された。WM タスクと NWM タスクを交互に提示し、その際の前頭葉 oxy-Hb 濃度の上昇・下降の傾向を微分値を用いて解析したところ、定型発達者では WM タスク遂行開始直後からの速やかな oxy-Hb 上昇がみられ、これが NWM タスク開始と共に速やかに収束することが、微分値の出現象限の分離度が高いことから示唆された。一方 ASD 者ではこの傾向は見られず、分離度は低かった。現在、数値の処理方法をさらに検討することにより、より明確・効率的に ASD 者と定型発達者の差異が提示できる計算式を開発中であり、また、他の被験者での解析も進めているところである。今後これらの情報を統合していくことにより、ASD 者への非侵襲的なのうきのうひょうかの診断補助ツールとして応用していくことが期待される。

## E. 結論

ASD 者において、タスクに呼応する前頭葉機能賦活の位相を微分解析により詳

細に検討したところ、定型発達者との差異が明らかになった。

## F. 健康危険情報 なし

## G. 研究発表

### 論文発表

1) 成田 奈緒子, 成田 正明, 田副 真美

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  
日本小児心身医学会雑誌 2013, 22(3): 175-182

2) 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

3) 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

1) 北村くるみ、佐藤佳奈、小澤有希、小関英里圭、今泉奈津季、岡戸奈都子、樋口大樹、若林祐子、田副真美、成田正明、成田奈緒子 キャンプを用いた発達障害児の家族支援(3) ~継続施行による

効果の総合的評価の試み～

第48回日本発達障害学会研究大会  
2013.8.24 - 25 東京

2) 成田奈緒子 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

第118回日本解剖学会総会・全国学術集会  
シンポジウム 2013.3.28-30 高松

3) 成田奈緒子、柳澤 一機、綱島 均、

酒谷 薫 近赤外線分光法を用いた自  
閉症スペクトラムの補助診断と病態把握  
の試み 第20回医用近赤外線分光法研究  
会 2013.10.12 東京

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

## 厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

平成 25 年度分担研究課題；疫学的アプローチ（乳歯や毛髪からの有害物質検出）

分担研究者 横山 和仁 順天堂大学医学部 教授

### 研究要旨

目的と方法：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、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。

結果；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、を行い、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、身体の症状を訴えることが多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、こちらも本文で詳述する。2年目は、新たに返送されてきた調査票の結果を追加して解析を進めるとともに、1年目までに測定ができていなかった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方法の検討を進めている。

### 研究協力者

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

松川 岳久・順天堂大学 助教

黒澤美智子・同 准教授

篠原 光代・同 前任准教授

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・同 講師  
柚木 泰広・同 医員

## A. 本研究の目的

精神・知能的な障害や身体的な障害を伴う発達遅延は発達障害と呼ばれる。このうち、社会性やコミュニケーションの障害、ならびに常同的行動、興味、あるいは活動の存在を特徴とする障害は広汎性発達障害と定義され、自閉性障害（自閉症）、レット障害、小児期崩壊性障害、アスペルガー障害、および特定不能の広汎性発達障害が含まれる。なお、知能指数が高いものは高機能広汎性発達障害と呼ばれることがある。

本研究の目的は、発達障害のリスク要因（化学物質および社会心理学的因子）を疫学調査により明らかにすることにある。

## B. 方法

### 1. 発達に関する質問紙調査票の配布、歯や毛髪の収集

本研究は順天堂大学医学部倫理委員会（承認番号 2012155、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、）にて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の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。

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968例回収し、対象外データをのぞく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。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。

2年目は、誘導結合プラズマ質量分析計で測定することが困難な水銀について加熱気化原子吸光光度計による測定を進めるとともに、乳歯中微量元素濃度の測定に関する検討を進めた。

H21～25 年度に協力が得られた施設は以下の通りである。中富良野保育園、宇文小学校（北海道）、水沢小学校、松代小学校、馬場小学校(以上新潟県)、メリーランド保育園、牧が丘幼稚園、萌丘幼稚園、にのみや幼稚園、久下田小学校、真岡西小学校、亀山小学校、真岡小学校(以上栃木県)、真壁保育園、みくに保育園、結城明照保育園、まつばら保育園、いしだ保育園、しろはと保育園、ちよかわ幼稚園、高道祖幼稚園、豊加美幼稚園、騰波ノ江幼稚園、上妻幼稚園、新利根つばさ幼稚園、絹西保育園、きぬふたば文化幼稚園、ふたば文化幼稚園、しらはね保育園、たちばな幼稚園、石下幼稚園、ケアーズ保育園、石下保育園、大宝保育園、あいの家、まつやま中央保育園、ひかり幼稚園、河和田幼稚園、もみの木保育園、川島第



二保育園、八千代ひかり幼稚園、法泉寺保育園、ふたば保育園、明野保育園、はぐるま保育園、つくば保育園、白山保育所、みどりが丘保育園、梅ヶ丘小学校、古里小学校、川島小学校、新治小学校、大村小学校、関城東小学校、関城西小学校、小栗小学校、村田小学校、大田小学校、中小学校、下館小学校、高道祖小学校、総上小学校、東小学校、小田小学校、北条小学校、つくば養護学校、梅ヶ丘小学校、騰波ノ江小学校、取手小学校、豊加美小学校、宗道小学校、大宝小学校、大形小学校、下妻小学校、伊讃小学校、下結城小学校、上妻小学校、上辺見小学校、五所小学校、茨城県発達障害者支援センター（以上茨城県）、八幡幼稚園、東伊興小学校、保田しおさい学校（特別支援）、千住保育園、光徳保育園、桜田北保育園、東日暮里保育園、第三狭田小学校、第七狭田小学校、第二日暮里小学校、赤羽小学校、東十条小学校、なでしこ小学校、東加平小学校、清水台小学校、小名木川小学校、南篠崎小学校、丸山小学校、舎人小学校、千寿第八小学校、第五砂町小学校、三谷小学校、高井戸第四小学校、桃井第四小学校(以上東京都)、こぐま保育園、めだか保育園、八木郷小学校、上青木南小学校、尾間木小学校、中尾小学校(以上埼玉県)、きかり幼稚園、純真保育園、小倉台小学校、大森小学校(以上千葉県)、つばさ保育園（神奈川県）、ささふえ保育園、みどり保育園、ほうりん保育園、高岡ほうりん保育園、長沢保育園、双葉幼稚園、旭ヶ丘幼稚園、長太の浦保育園、なりひら保育所、さつき保育園、暁幼稚園、斎宮幼稚園、曙幼稚園、白塚幼稚園、

一身田小学校、白塚小学校、南が丘小学校、西が丘小学校、斎宮小学校 かしのみ保育園(以上三重県)、高室保育園、観音寺中部保育園（以上香川県）、廿日市市（広島県）るんびに保育園（福岡県）、堇が丘幼稚園、ひとみ保育園、ルンビニ保育園、佐世保中央保育園、江永保育園、花高保育園、大黒保育所(以上長崎県)、新明保育園（以上熊本県）、風のうた保育園(沖縄県)、であった。

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。質問紙調査票（文末に添付）は保護者および児童の属性、母親の妊娠前・妊娠中の化学物質曝露状況、妊娠中の経過、対象児の発達状況（PARS, Pervasive Developmental Disorders Autism Society Japan Rating Scale）等の項目から構成されている。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 SPSS Ver.19.0 により集計・分析した。生体試料（歯および毛髪）については、測定まで室温にて保管した。

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、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。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、対象児の属性、母親の妊娠前・妊娠中の状況について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、幹線道路から居住地までの距離については対応のないt検定を行った。

## 2. 生体試料の分析

毛髪もしくは歯牙中の無機元素をそれぞれ以下の方法に従って分析した。毛髪中の元素濃度は、誘導結合プラズマ質量分析(ICP-MS)にて定量分析を行った。測定対象とした元素はLi, Al, Pb, Mn, As, Cu, Zn, Se, Na, Mg, K, Ca, Sr, Ba, Cd, B, Cr, CoおよびNiである。送付された毛髪を非イオン系界面活性剤により超音波洗浄後、超純水にて水洗し、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。毛髪は平成25年1月31日時点で737例の測定を行った。

毛髪のHgに関してはICP-MSでの測定においてキャリーオーバーが著しいため、上記の方法とは別に毛髪を直接、加熱気化全自動水銀測定装置(MA-200、日本インスツルメンツ)により分析をおこなった。

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、その後粉碎して毛髪と同様に分解を行った。

また、歯牙をLA-ICP-MSで測定するため乾燥したのちテクノビット4071(マルトー社製)にて包埋した。分析のための試験歯片は、試験台に包埋した歯を固定し、硬組織切断機により、歯の唇舌的長軸に沿って唇側の遠心的中央より厚さ約150 $\mu$ mの縦断切片を作成した。LA-ICP-MSは、固定したLA試料に対して、光学顕微鏡下で観察できるエナメル質の各500 $\mu$ m $\times$ 250 $\mu$ mに対して直径約5 $\mu$ mのレーザーを当てて走査的にサンプリングを行いICP-MSにて元素量の測定を行った。妥当な分析方法の検討のためLA-ICP-MS(磁場型)とLA-ICP-TOF-MS(時間分離型)の両方について比較検討を行った。

LAによりサンプリングする範囲の妥当性、用いるレーザー光の波長、出力ならび

に ICP の最適条件、定量の基準となる認証標準品の選択等の基礎検討を行なった。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。

## C. 結果

### 1. 質問紙調査票の分析結果

平成 21-25 年度の質問紙調査票配布数は 18218 部、回収数 968 (配布数の 5.3%) であった。ただし、分析対象は未成年と思われる対象児の兄が回答した 2 例を除いた。

#### 1-(1) 対象者の属性

表 1 に平成 21~25 年度に幼稚園・保育園、小学校の保護者を対象に行った質問紙調査票回収数を年度別に示す。就学前児童は 224 例、小学生以上は 741 例、不明 1 例であった。回答者の居住県は北海道 12 例、栃木 16 例、茨城 374 例、埼玉 56 例、千葉 38 例、東京 321 例、神奈川 2 例、新潟 21 例、三重 61 例、京都 1 例、広島、16 例、香川 7 例、福岡 4 例、長崎 19 例、熊本 9 例、沖縄 3 例、不明 6 例であった。質問紙調査票の回答者は母親 923 例(95.5%)、父親 32 例(3.3%)、その他 8 例(0.8%)、無回答 2 例(0.2%)であった。対象児の性別は男児 579 例 (59.9%)、女児 385 例 (39.9%)、無回答 2 例( 0.2%)、所属は保育園 (保育所) 131 例 (13.6%)、幼稚園 66 例(6.8%)、小学校 705 例 (73.0%)、中学校 5 例(0.5%)、その他・記載なし 59 例 (6.0%) であった。出生順位は第 1 子が 500 例 (51.8%)、2 番目 342 例(35.4%)、3 番目 104 例(10.8%)、4 番目 13 例(1.3%)、

5 番目 2 例 ( 0.2%)、6 番目 1 例(0.1%)、無回答 4 例 ( 0.4%) であった。

対象児の年齢は 0 歳 1 例(0.1%)、2 歳 3 例 (0.3%)、3 歳 1 例 (0.1%)、4 歳 6 例 (0.7%)、5 歳 61 例 (6.3%)、6 歳 215 例 (22.3%)、7 歳 155 例 (16.0%)、8 歳 159 例 (16.5%)、9 歳 116 (12.0%)、10 歳 103 例 (10.7%)、11 歳 87 例 (9.0%)、12 歳 42 例(4.3%)、13 歳 1 例(0.1%)、14 歳 2 例(0.2%)、不明 14 例 (1.4%) であった。

対象児の出生時平均体重は男児 3,089g ( $\pm 453.6$ )、女児 2,993g ( $\pm 401.0$ )、出生時の妊娠週数は平均 38.9 週( $\pm 1.93$ )であった。これまでに発達上の問題を指摘されたことがあるのは 73 例 (7.6%) で、内容は 0 歳時 (黄疸 2 例、脳性麻痺 2 例、アトピー 2 例、停留睾丸、水腎症、超未熟児、先天性の病気・両足内反足と弱視・低音聞きとりづらい、発達異常、低酸素性脳症後遺症、眼球腫瘍、低身長、内容不明)、1 歳時 (脳質周囲白質軟化症: PVL、知的障害・発達障害、自閉症、停留睾丸、アトピー性皮膚炎、言葉の遅れ、発達障害、内容不明 2 例)、2 歳時 (言葉が遅い・学習障害、発達障害、言葉の遅れ、広汎性発達障害 2 例、アスペルガー、多動、発達・発育遅延、内容不明 2 例)、3 歳時 (言葉の遅れ 3 例、自閉症 2 例、発達障害、多動性、弱視、停留睾丸、移動性睾丸、成長ホルモン不足)、4 歳時 (広汎性発達障害、発達障害、場面かん黙、遠視性弱視、滑舌がよくない、肥満、グレーゾーン)、5 歳時(発達障害、ADHD)、6 歳時(斜視 2 例、ADHD・自閉症、知的発達障害、内容不明)、7 歳時(ADHD、アス

ペルガー、内容不明)、8歳時(ADHD)、年齢不明(発達障害・知的障害)、10歳時(ADHD)であった。

#### 1-(2) PARS (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(%)

表2に対象児のPARSピーク時の得点別人数と割合(%)を示す(対象児の所属無記入の場合は年齢で判断した)。PARS得点は0点が最も多く、全体の29.6%であった。広汎性発達障害が強く疑われるPARS5点以上は就学前児童(幼児)で224例中32例(14.3%)、小学生以上(児童)では741例中138例(18.6%)、合計965例中170例(17.6%)に認められた。

本調査票は幼児期現在評定項目を用いているので、就学前児童(幼児)のみの現在評定結果を表3に示す。PARS得点不明を除き、広汎性発達障害が強く疑われるPARS7点以上は224例中5例(2.2%)であった。

以下にPARS短縮版各12項目について全対象児、幼児対象者のみ、及び幼児対象者の現在評定の回答選択肢別人数と割合を示す。

PARS1: お子さんはいままでに視線(目)が合いにくいことがありましたか? (怒られているときに目を合わせないのは除く。)

1.なし 889(92.0%) 2.時々あり 53(5.3%)  
3.あり 14(1.4%) 4.不明 10(1.0%)

PARS1: 幼児のみ

1.なし 213(95.1%) 2.時々あり 7(3.1%)  
3.あり 1(0.4%) 4.不明 3(1.3%)

PARS1 現在評定: 上記で2.または3.と回答した24例の現在の状況

1.なし 4(50.0%) 2.時々あり 4(50.0%)  
3.あり 0(0.0%)

PARS2: 今までに他の子どもに興味(他の子どもをすることに興味を持ったり、まねをしたりする)を示さないことがあったか。

1.なし 796(82.4%) 2.時々あり 143(14.8%)  
3.あり 21(2.2%) 4.不明 6(0.6%)

PARS2: 幼児のみ

1.なし 199(88.8%) 2.時々あり 21(9.4%)  
3.あり 3(1.3%) 4.不明 1(0.4%)

PARS2 現在評定: 上記で2.または3.と回答した24例の現在の状況

1.なし 14(58.3%) 2.時々あり 10(41.7%)  
3.あり 0(0.0%)

PARS3: お子さんはいままでに名前を呼んでも振り向かないことがあったか。

1.なし 849(87.9%) 2.時々あり 104(10.8%)  
3.あり 9(0.9%) 4.不明 4(0.4%)

PARS3: 幼児のみ

1.なし 200(89.3%) 2.時々あり 23(10.3%)  
3.あり 0(0.0%) 4.不明 1(0.4%)

PARS3 現在評定: 上記で2.または3.と回答した23例の、現在の状況