

図 胎生期チメロサルばく露後の生後50日における線条体モノアミン量の比較
 妊娠9日目にチメロサル(0.01 mgHg/kg, 0.1 mgHg/kg)を投与した。コントロールは生理食塩水とした。
 生後50日仔の脳から線条体を採取し、セロトニン(A)、ドーパミン(B)、ノルアドレナリン(C)を定量した。
 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。

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 26 年度 分担研究課題： 動物実験（ばく露の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
	上田 茜	青山学院大学大学院理工学研究科 博士前期課程

研究要旨

本分担研究では、ばく露の有無を知るバイオマーカーの選定を目指し、胎生期サリドマイドばく露ラットや若齢期に ADHD 様の行動異常を呈する SAMP8 マウスなどの動物モデルを用いて、胎生期～周産期に生じた化学物質ばく露などの影響が脳の生後発達過程で顕在化する時期や脳内部位、プロセスについて検討を進めてきた。その結果、生後 2-3 週のシナプス形成期に海馬などを中心に GABA 神経伝達システムの異常として顕われる可能性が高いことが分かった。平成 26 年度は動物モデルおよび培養細胞を用いて研究を行い、以下の成果を得た：① GABA システムの異常について SAMP8 海馬で詳しく調べ、GABA 作動性神経細胞のサブタイプであるニューロペプチド Y (NPY) 陽性細胞が生後 1 週から有意に減少しており、その結果、電気生理学的な性質も変化していることを見出した。実験的甲状腺ホルモン (TH) 低下ラットでも NPY ニューロンの減少を確認した。SAMP8 では、TH 活性化酵素である 2 型脱ヨード化酵素 (DIO2) が脳内で減少しているため、局所的な TH 欠乏が起こっていると考えられる。②培養小脳顆粒細胞を用いて、輸送型 TH とされるチロキシン (T4) が、遺伝子発現調節を介さず、細胞骨格の安定性制御を介して、神経活動低下による細胞死を防ぐことを見出した。脳の発達に必須の TH シグナルについては、このような non-genomic な作用も含めた全容の解明が重要である。

A. 研究目的

複雑な構造と機能を持つ脳に対する胎生期化学物質ばく露の影響を、化学物質ごと、脳内部位ごとに、また発達期を通して調べるには膨大な時間と労力を必要とし、現実的ではない。一方、外来化学物質に対する感受性の強い時期やある時期のばく露に共通する特徴を抽出し、共通のプロセスを考察することができれば、バイオマーカーとなる遺伝子やタンパク質の選定が可能となる。

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、形成され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残ると考え、この時期を中心にモデル動物を用いた研究を行ってきた。この時期はまた、血液-脳関門が未完成なため、外来化学物質が血管から容易に脳内に到達する時期であり、同時に、脳の発達に必須のホルモンである甲状腺ホルモン (TH) の臨界期とも重なる。

ばく露の有無による差を、まず DNA マイクロアレイ法を用いた網羅的遺伝子発現解析によって抽出し、これに関わる細胞内プロセスを推定し、次いで生化学的、形態学的方法で確認する過程を通して、ばく露のバイオマーカーとなる遺伝子あるいはタンパク質を特定することを本研究の目的とする。

B. 研究方法

(1) 動物モデル：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促進モデル動物で、促進老化と短寿命を呈する SAMP 系統と正常老化を示す SAMR 系統の 2 系統から成る。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、脳に加齢変化を調べるモデルとして使用されてきた。しかしながら田代らは最近、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 (2 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., 2013a)。SAMP8 は、いわゆる甲状腺機能低下モデルとは異なり、血中 TH 濃度は正常であるにも関わらず、局所的に活性型 3,5,3'-triiodothyronine (T3) が低下することにより発達障害を引き起こす最初のモデルである。

(2) 培養細胞：初代培養小脳顆粒細胞

生後 6 日ラット小脳から採取した小脳顆粒細胞は培養下で、生理的な細胞外 K⁺濃度 (5mM; K5) では 48 時間以内に細胞死を起こすが、より高い K⁺濃度 (25mM; K25) で脱分極させることで生存する性質を持ち、脱分極、即ち神経活動に依存した細胞生存のモデル実験系とされている。本研究では、この K5 誘発細胞死に対する以下三種類の甲状腺ホルモンの効果を調べた; thyroxine (T4)、3,5,5'-triiodothyronine (T3)、3,3',5'-triiodothyronine (reverse T3; rT3)。

(3) 遺伝子およびタンパク質発現解析 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ラーター 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 β -actin を内部標準遺伝子としてデータを標準化した。

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 アクトチンを用いた。

(4) 免疫組織化学および免疫細胞化学

各週齢の動物の脳を麻酔下に 4%パラホルムアルデヒドで灌流固定後、パラフィン包埋し、厚さ 8 μ 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。

培養細胞については、4%パラホルムアルデヒド - 8%シヨ糖液で 5 分間固定後、

PBS でゆすぎ、冷メタノール (-20°C) で 2 分間固定した。0.2% Triton X-100 を含む液で細胞膜を溶解後、抗タウ抗体を用いて染色した。

(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ライオンサイエンス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

SAMP8 海馬における NPY 陽性細胞の減少とそれによる興奮性の変化：

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おり、T3 によるシグナル伝達が局所的に減弱している可能性があること、また、T3 欠乏の影響を強く受ける GABA 神経伝達システムの発達にわずかな遅れがみられること、を昨年度報告した。

今年度はさらに、生後初期 (1-3 週) の SAMP8、SAMR1 両系統における DIO2 の発現を調べるとともに、GABA 作動性神経細胞およびそのサブタイプの分布を両系統で免疫組織化学的に比較した。サブタイプとしては、TH 欠乏により影響を受けることが知られているパルブアルブミン(PV) 陽性細胞と、PV 細胞と似た分布を示す NPY 陽性細胞の 2 種類を抗 PV 抗体、抗 NPY 抗体を用いて、それぞれ観察した。

その結果、シナプス形成期である生後 2-3 週の時点で、SAMP8 では DIO2 タンパクがほとんど検出されないほど発現が弱いことが分かった (図 1)。グルタミン酸脱炭酸酵素 67 (GAD67) には両系統で量的な差は

みられなかった。

次いで、免疫組織化学により、各週齢の海馬における全 GABA ニューロン(GAD67 陽性細胞)、PV 陽性細胞、NPY 陽性細胞の分布を両系統で比較したところ、GABA ニューロンの総数や分布には差がなく、PV 陽性細胞についても同様であったが、NPY 陽性細胞については、SAMP8 で有意に減少していた。図 2 に 2 週齢の海馬 CA3 領域および DG 領域の染色像を示す。

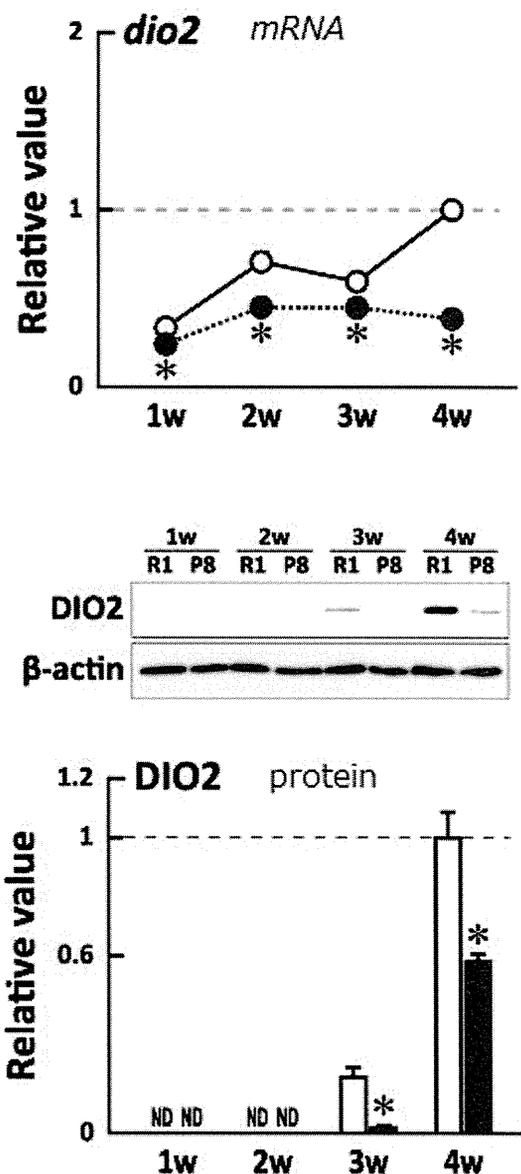


図 1. 生後初期 SAMP8、SAMR1 海馬における DIO2 の発現

SAMP8ではNPY陽性細胞の数が少ないだけでなく、個々の細胞の免疫染色強度が弱く、細胞ごとのNPY発現も低いことが分かる。

GAD67陽性細胞数は3週齢で成体レベルに達し、その後は一定であるのに対し、NPY陽性細胞は1週齢で最も多く、成長に伴って有意に減少した(図3)。一方、PV陽性細胞は成長に伴って増加していた。

NPYは内在性の抗てんかん物質として知られ、海馬では錐体細胞に発現するY2受容体を介してグルタミン酸放出を抑制するため、NPYの減少は錐体細胞の興奮性を上げると考えられる。実際、海馬切片での電気生理学的実験により、SAMP8では高頻度刺激で誘発される痙攣波が有意に長く持続するという結果を得ている。

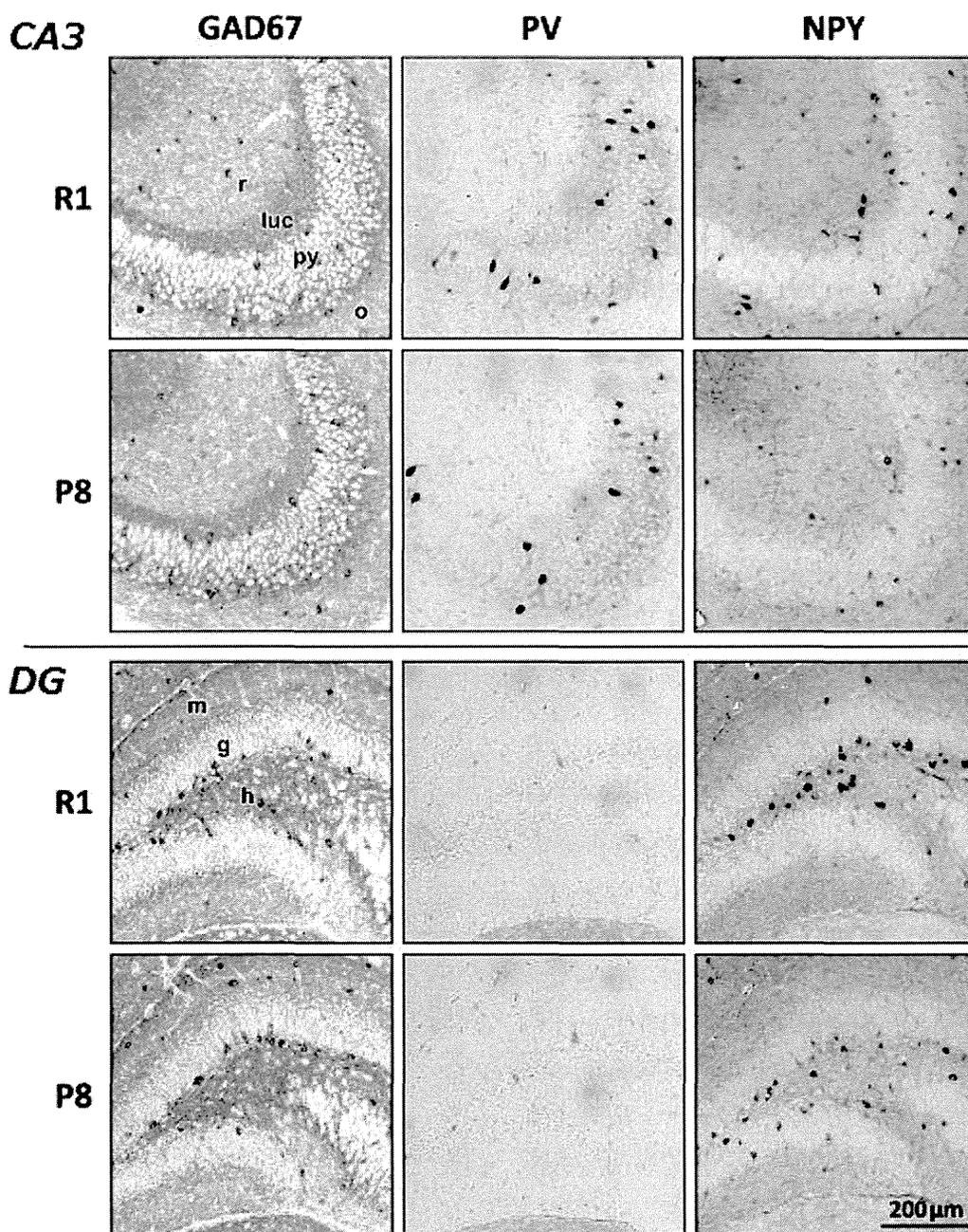


図2. SAMP8, SAMR1海馬CA3(上段)およびDG領域(下段)における全GABAニューロン(GAD67陽性細胞)、PV陽性細胞、およびNPY陽性細胞の分布。

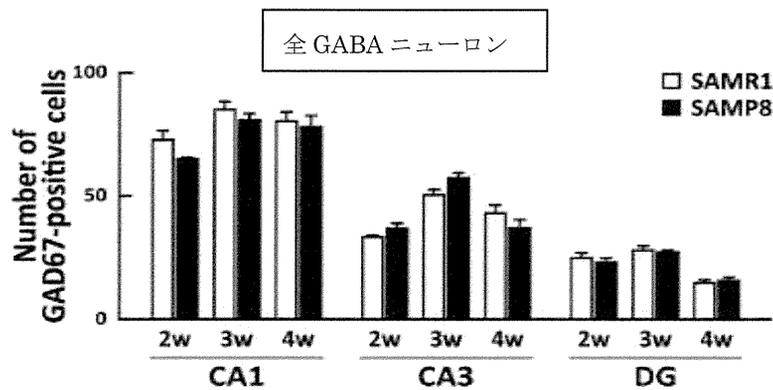
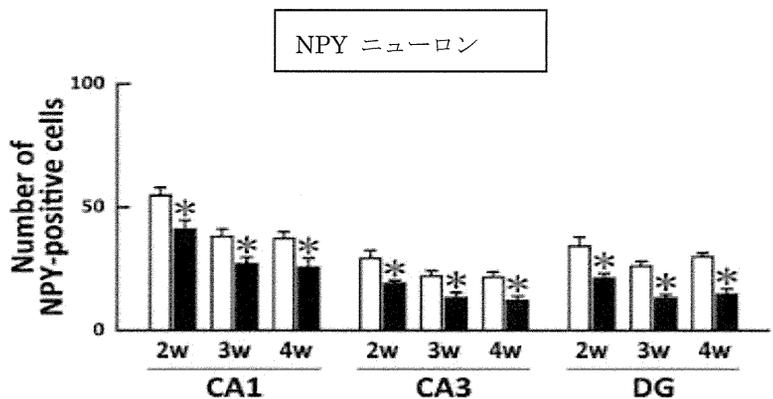


図 3.
2、3、4 週齢 SAMP8、SAMR1 海馬各領域における全 GABA ニューロン(GAD67 陽性細胞)および NPY 陽性細胞の数



培養小脳顆粒細胞に対する thyroxine (T4) の細胞死抑制効果

通常、神経細胞の初代培養には細胞外液と同様のイオン組成を持つ培養液が用いられるが、小脳顆粒細胞の場合はこの条件では 24~48 時間で細胞死を起し、生存を維持するためには、培養液のカリウム濃度を通常の 5 mM から 25 mM まで引き上げて細胞の膜電位を上昇させ、脱分極しやすい状態を作る必要がある。

本研究ではまず、未成熟な顆粒細胞が外顆粒層に存在する生後 1 日目 (P1)、および顆粒細胞が内顆粒層への遊走を開始している生後 6 日目 (P6)、の二時点でラット小脳より細胞を採取し、poly-L-lysine でコーティングしたディッシュに撒き、10% ウ

シ胎仔血清 (FBS)、25 mM KCl を含む培養液で 48 時間培養した後、FBS を除去し、25 mM KCl を含む培養液 (K25) または 5mM KCl を含む培養液 (K5) に交換して、さらに 48 時間培養後の細胞生存率を MTT 法で比較した。その結果、P6 採取細胞でのみ細胞死が観察された。P7 小脳の切片を K5 で 48 時間培養した場合、死細胞のほとんどが内顆粒層に検出されることから、生存に神経活動を必要とするのは遊走後の顆粒細胞であることが明らかになった。

このように K5 条件下で細胞死を起す P6 採取細胞を以後の実験に使い、この低カリウム誘発細胞死に対する甲状腺ホルモンの影響を調べた。甲状腺ホルモンは、4 個のヨウ素原子を含む thyroxine (T4) とし

て合成された後、位置特異的な酵素的脱ヨード化により、複数の種類が生成される。

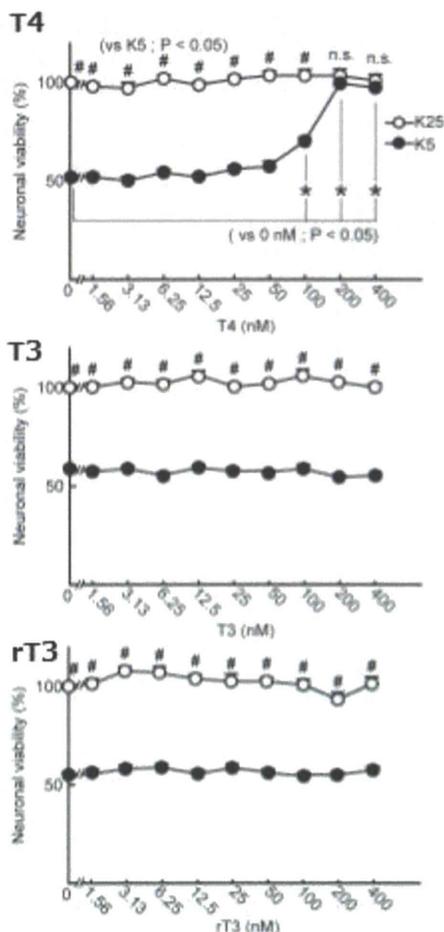


図4. 小脳顆粒細胞の低カリウム誘発細胞死に対する T4、T3、rT3 の効果

ここでは、血中に最も高濃度 (約 100 nM) に存在する T4、T4 内環の脱ヨード化により生成する T3、T4 外環の脱ヨード化によって生成する rT3 について検討した。T3 は、血中濃度が T4 の 1/10 であるが、甲状腺ホルモン核内受容体に強い親和性を持つ活性型ホルモンである。様々な濃度の T4、T3 または rT3 を含む K5 で 48 時間培養したところ、T4 を添加した場合のみ、100 nM 以上で細胞死抑制効果がみられ、200nM で細胞死は完全に抑制された。T3、rT3 では同程度あるいはそれ以上の濃度でも細胞死抑制効果は見られなかった。

微小管結合タンパク・タウに対する抗体を用いた蛍光抗体法によって観察した結果、200 nM T4 を添加した K5 培養液 (K5+T4) 中では神経突起が K25 培養液 (K25) 中と同等に伸展し、維持されており、K25 に T4 を添加した培養液 (K25+T4) 中では突起の密度がさらに増加していた (図5)。微小管とそのサブユニット・チューブリンを超速心によって分別定量してその重合状態を調べた結果、K25 と比較して、K25+T4 でチューブリン重合が有意に促進されており、K5+T4 でも重合促進傾向が観察された。

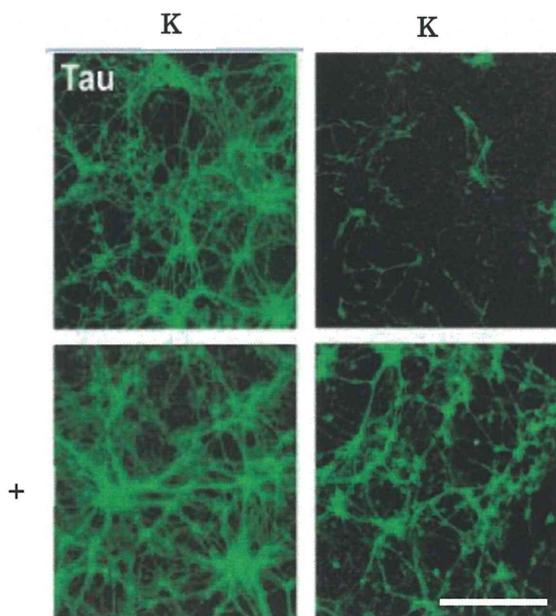


図5. K25、K5、K25+T4、K5+T4 の各培養条件で 48 時間培養後の小脳顆粒細胞の突起形態。

チューブリン重合および微小管の安定性を調節する重要な因子は微小管結合タンパク(MAPs)である。MAPs の微小管への結合力はリン酸化によって低下するため、過度なリン酸化は微小管の安定性を損なうが、重合 - 脱重合による微小管のダイナミックな変換を伴う突起伸展には MAPs の適度なリン酸化が必要である。顆粒細胞の生存が維持される三種の培養条件下 (K25、K5+T4、

K25+T4) で神経軸索の代表的 MAPs であるタウの発現量を比較したところ、T4 添加 2 日後には K25 + T4 および K5 + T4 でタウの発現量が K25 の約 2 倍に増加していた。T4 添加 4 日後には K5+T4 のタウ発現量は K25 のレベルに低下したが、K25+T4 では増加したままであった。次いで、タウの多数のリン酸化サイトのうち、発達期に限定したリン酸化のみられる Ser422 および Ser199 のリン酸化をリン酸化特異的抗体によって調べた。リン酸化 Ser422 を含むタウは、T4 添加 2 日後の K25+T4、K5+T4 において一過性に増加し、T4 添加 4 日後には K25 に比べて減少していた。K5+T4 における減少は特に顕著であった。一方、リン酸化 Ser199 を含むタウには三種の培養条件間で量的な差がみられなかったが、前述のように T4 添加によってタウの総量が増加するため、K25+T4、K5+T4 では相対的に Ser199 のリン酸化レベルが低下していた。

以上の結果から、脱分極効果により生存している場合 (K25) と比較して、T4 添加により生存している場合 (K5+T4) には、タウのリン酸化が大幅に抑制されることによる微小管の安定化が突起の維持に寄与しており、脱分極効果と T4 添加が共存する場合 (K25+T4) には、タウの増量とリン酸化レベルの相対的低下によってチューブリン重合が促進されていることが分かった。

D. 考察

発達異常のマーカーとしての GABA システム :

平成 24、25 年度の研究で、GABA システム構成要素のうち、GAD65 および KCC2

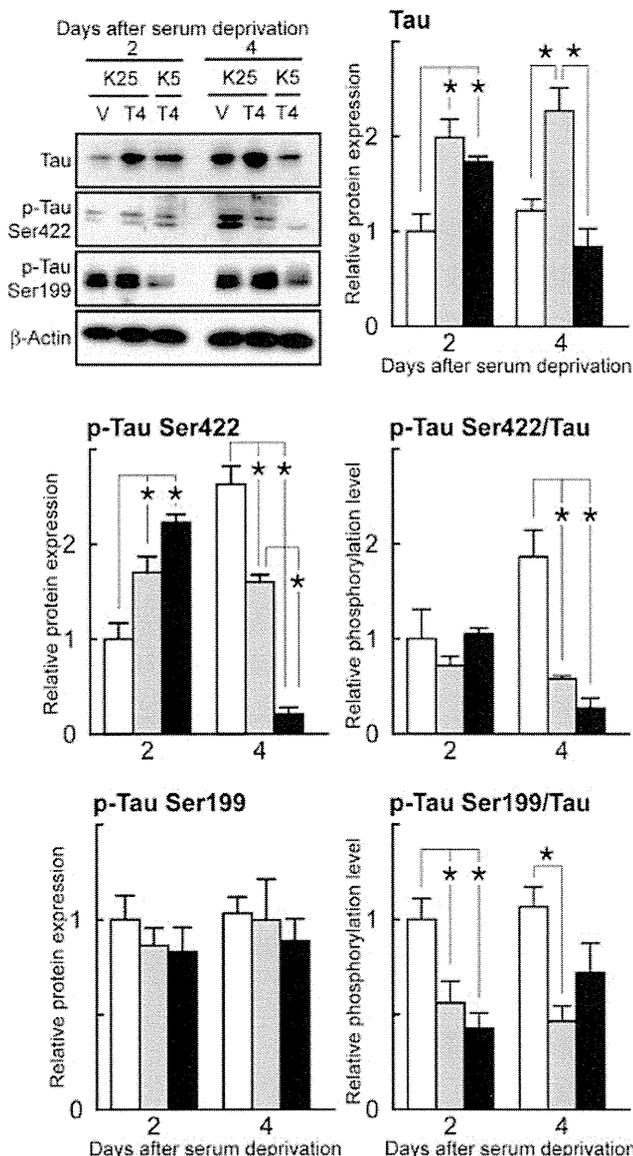


図 6. K25、K25+T4、K5+T4 の各条件でのタウの総量および Ser422、Ser199 のリン酸化。

が三種類のモデル動物脳に共通して発達の遅れや異常を反映することが分かった。本年度の研究で、NPY あるいは NPY ニューロンの減少が新たなマーカー候補として検出された。

NPY は高頻度刺激に応じて分泌される内在性の抗てんかん物質として知られ、海馬では錐体細胞に発現する Y2 受容体に作用してグルタミン酸の放出を抑制することで興奮性を制御する。実際、SAMP8 海馬切片で高頻度刺激後の痙攣波が延長していることは、NPY 作用の減弱を反映するものと考えられる。近年、統合失調症患者の前頭野で NPY が減少していること、抗精神病薬により NPY レベルが回復すること、NPY プロモーター領域の遺伝子多型と統合失調症との関連など、NPY と精神疾患の関連が示唆されている。

NPY はまた、神経幹細胞の増殖を促すとともに、新生神経細胞に対する保護作用を持ち、海馬歯状回 (DG) での神経新生に対して正の調節因子として働くことが知られている。SAMP8 海馬 DG での NPY ニューロンの大幅な減少は、神経新生を抑制し、学習・記憶障害の一因としても有力である。2 型脱ヨード化酵素 (DIO2) の発現低下による局所的甲状腺ホルモン・シグナルの減弱と発達障害:

甲状腺ホルモンの主要な作用は、核内受容体に高い親和性を持つ T3 による遺伝子発現の制御である。脳内 T3 の 80% はアストロサイトに局在する DIO2 により T4 から局所的に産生されていることから、DIO2 活性が T3 シグナルの強さを決めると言っても過言ではない。しかしながら、DIO2 の発現や活性調節機構については未解明の

部分が多く、これに影響を与える化学物質についての研究はなされていない。血中ホルモン濃度は正常でありながら、DIO2 の減少による発達異常がみられる SAMP8 は、甲状腺ホルモン・システムを攪乱する新たな種類の化学物質の発見につながる重要な動物モデルと考えられる。

甲状腺ホルモン T4 による新たな non-genomic 作用:

一方、T3 による遺伝子の発現制御に対して、T4 や rT3 による、遺伝子発現制御を介さない non-genomic action も近年、見出され、注目されている。本研究で見出した細胞骨格制御を介した T4 の作用は、神経細胞の遊走、神経突起伸展、シナプス形成など、神経回路形成に直接関わる、新たな non-genomic 作用として重要な意味を持つ。

E. 結論

脳発達過程における異常は、げっ歯類では生後 2-3 週のシナプス形成期に GABA システムの異常として顕在化する場合が多い。また、GABA システム構成要素のなかでは昨年報告した GAD65 および KCC2 に加えて NPY もバイオマーカーの候補と考えられる。一方、異常の原因となるプロセスの一つである甲状腺ホルモン・システムについては、その代謝酵素や nongenomic 作用も含めた全容の解明が急務である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Oyanagi K, Negishi T, Tashiro T:
“Action of thyroxine (T4) on the
survival and neurite maintenance of
cerebellar granule neurons in culture.”
J. Neurosci. Res., 印刷中 (2015)

2. 学会発表

1) 澤野 恵梨香、岩谷可南子、上田茜、田
代朋子:「老化促進モデルマウス(SAMP8)
海馬における GABA 作動性神経伝達機構
の発達異常」第 29 回 老化促進モデルマ
ウス(SAM)研究協議会、2014年7月6日、
東京

2) 澤野 恵梨香、岩谷可南子、田代朋子:
“Reduction in NPY-positive neurons in
the hippocampus of senescence-
accelerated mouse prone 8 (SAMP8).”
第 57 回日本神経化学学会大会、2014 年 9
月 29 日、奈良

3) 上田茜、澤野 恵梨香、田代朋子:
“Impaired tau phosphorylation in the

developing hippocampus of
senescence-accelerated mouse prone 8.”
第 57 回日本神経化学学会大会、2014 年 9
月 30 日、奈良

4) 川越佑太、畠山明宗、宇野健史、澤野 恵
梨香、田代朋子:“Enhanced type I
interferon signaling and reduced
microglia in the hippocampus of
diabetic GK rats.” 第 57 回日本神経化学
学会大会、2014 年 9 月 30 日、奈良

5) 小柳洸志、根岸隆之、田代朋子:“Effect
of thyroxine on the survival and
neurite maintenance of cultured
cerebellar granule neurons.” 第 57 回日
本神経化学学会大会、2014 年 9 月 30 日、
奈良

H. 知的財産権の出願・登録状況
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 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 26 年度分担研究課題：臨床的研究（非侵襲的脳機能評価）

研究課題名：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、2 年目と、非侵襲的な脳機能評価ツールである近赤外線酸素モニターを用いた ASD 者の脳機能の客観的評価指標の確立に向け、最適な負荷環境、および得られた数値データの解析方法の研究を行ってきた。これにより、近赤外線酸素モニターで得られた 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変化が評価指標として有用であることが確認された。

そこで 3 年目は、定型発達者と ASD 者の分離度をより実情に即し正確に評価するために、存在する象限の妥当性を点数に反映できるように計算式を工夫した「重み付分離度」の計算式を新たに考案し、これにより ASD 者と定型発達者の評価間に有意差を認めることができた。

以上より、これまで客観的数値指標を用いた評価が困難であった近赤外線酸素モニターを用いた脳機能変動を、微分値を応用した重み付分離度により定量的・近似的に表す手法が今後応用できる可能性が示唆され、ASD 者における非侵襲的機能評価として役立てていけると考えられる。

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 Infrared 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 O₂Hb 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。

初年度は、これまで得られた NIRS 上の特性を考慮して、ワーキングメモリタスクを処理する際に、どのような条件下で最も効率的に前頭葉を賦活することが可能なのかを、ASD 者と健常者とで比較することにより、より支援的な応用の可能性を模索した。

さらに 2 年目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 패턴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 패턴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。

そして 3 年目は、定型発達者と ASD 者の分離度をより実情に即し正確に評価するために、存在する象限の妥当性を点数に反映できるように計算式を工夫した「重み付分離度」の計算式を新たに考案し、これを用いてこれまでの ASD 者と定型発達者のデータを再度分析することにより、さらなる両者の差異を検討するところにした。

B. 方法

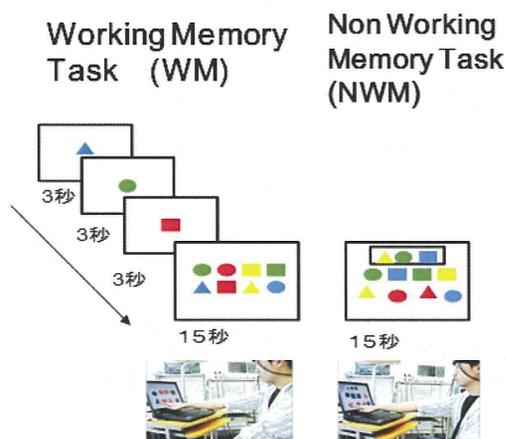


図 1 : WM と NWM タスクの概要

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 (図 1)。

今回の再解析は、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。

さらに、このデータをさらに数数学的に正確に分析することを目的に、

oxy-Hb

値の分離度測定を試みた。すなわち、脳活動の特徴を定量的に判定する指標として、oxy-Hb とその微分値による位相平面における特徴分離性を示す重み付分離度 (WS) の計算式を考案した (図 2)。

そもそも、分離度は図 3 に示すように、一回ごとのタスクにおける重心点を求めてその位置する象限が WM、NWM 間で差異がある、つまり分離していることを評価する計算式である。さらに WM タスクと NWM タスクの切り替えにより、前頭葉での脳血流に大きく変化が起こった際に、その微分値が存在する座標平面が理想的であるかどうかを精査することを分離度にさらに重みづけの係数をかけることで求められるのが WS である。WS が大きいほど、タスクスイッチングに呼応した前頭葉賦活が効率的に行われていることになる。この計算式を用いて、これまでに得られていた健常者 21 名と ASD 者 11 名のデータを再解析することにした。

$$\boxed{\text{分離度}} = \frac{\text{クラス間分散}}{\text{クラス内分散}}$$

これを位相平面での重心点の位置に応じ重み付けをする

$$\boxed{\text{重み付分離度 WS}} = \boxed{\text{加えられる重心点の数+1}} \times \frac{1}{\boxed{\text{減点される重心点の数+1}}} \times \boxed{\text{分離度}}$$

図 2 : 重み付分離度計算式

(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

WM/NWM スイッチングタスク施行中の前頭葉酸素化ヘモグロビン値の

変化とその微分値をグラフに表したものを図3、図4に示す。図3は定型発達者の1例の結果である。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(図2)を算出したところ、1.20であった。これに対し図6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。

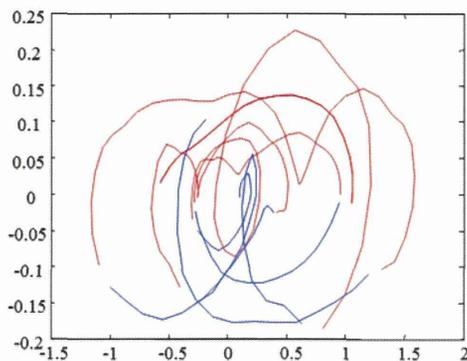


図3：定型発達者におけるチャンネル1解析結果

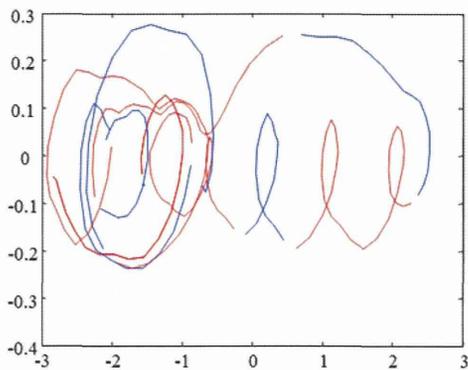


図4：ASD者におけるチャンネル1解析

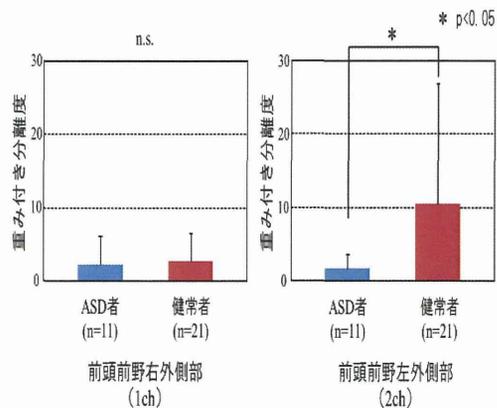


図5：スイッチングタスク施行による定型発達者とASD者でのWS値

このデータをさらに数理的に正確に分析することを目的に、WSの計算式を用いて、これまでに得られていた健常者21名とASD者11名のデータを再解析し、その平均値を求めたところ、図5に示すように左側前頭前野外側部におけるスイッチングタスクに呼応した脳血流の分離度は、健常者群ではASD群に対し、有意に高いという結果が得られた。

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。特に、タスクが変更された際にその変化に即座に対応することが困難である場面は臨床的にはよく観察されることであり、これをもとにスイッチングタスク実験、すなわちWMタスクとNWMタスクを交互に提示する実験を行った。今回、その際の前頭葉酸素化ヘモグロビン濃度の上昇・下降の傾向を微分値を用い解析する

方法を新たに用いたが、これは、タスク刺激が入ってからの前頭前野の反応の速度を反映できるもので、観察から得られた ASD 者の特徴をよく評価できるものである。

実際、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、微分値の重心点の出現象限を第一・第三象限に分離原曲して存在させる結果となり、数値としての分離度が高いことで明確に提示できるようになった。一方 ASD 者では出現象限が分離されず、また分布領域も広がるため、分離度は低値となる傾向が認められた。

しかしながら、単純に重心点の出現象限を評価する分離度では、加速が行われるのが期待される時間帯と逆の変化、すなわちタスク負荷中に酸素化ヘモグロビン値が低下して、逆に負荷終了時に上昇する変動パターンであっても分離度としては大きい値を示す。

そのため、今年度はこの分離度をさらに出現象限の整合性を加味した重み付の分離度 WS として算出方法を考案して、再度定型発達者と ASD 者でのデータ解析を行った。その結果、きわめて正確に起こっている酸素化ヘモグロビン濃度変化を反映した数値評価が可能になり、特に左側前頭前野における重み付分離度が定型発達者では高値を示したのに対し、ASD 者では低く、両者に有意差が認められた。今回の解析結果からは、新たに開発した解析法を用いることにより、ASD 者と定型発達者のタスク遂行時の前頭葉

機能の差異を正確、かつ明確に評価できる可能性が示唆された。今後これらの情報を精査・統合していくことにより、ASD 者への非侵襲的な脳機能評価の診断補助ツールとして、これらタスクが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

学会発表

成田奈緒子（招待講演）親学び講座「肝心かなめの1年生塾」石川県教育委員会主催 2014.8.26-27 石川県

脳科学に基づいた発達支援 成田奈緒子（招待講演）

日本学校心理士会2014年大会 2014.8.31 越谷

睡眠と食事のリズムが脳を育てる 成田奈緒子（招待講演）

第29回食と健康を考えるシンポジウム 2014.7.19-20 東京

NIRS信号による発達障害の診断補助指標の開発

発表者：柳澤一機（日本大学生産工学部），中村のぞみ（日本大学大学院生産工学研

究科)，網島均（日本大学生産工学部），
成田奈緒子（文教大学教育学部），酒谷
薫（日本大学工学部）

第17回一般社団法人 日本光脳機能イ
メージング学会学術集会2014年7月26日
東京

成田奈緒子、柳澤 一機、網島 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4回NU-Brainシンポジウム（招待講演）
2014.3.8 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
3. その他 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 26 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した。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なった。平成 21 年度より調査を開始し、26 年度までに質問紙調査票を 976 例回収した。生体試料は、毛髪を 860 検体、歯牙を 781 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（ICP-MS）を用いて測定を行った。乳歯は、切断した一部を毛髪と同様に分解後に ICP-MS にて分析し、残りについて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前処理を実施した。

結果：質問紙調査票の分析では、昨年度まで(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）の児童の特徴の解析を行い、今年度は(4) 広汎性発達障害が強く疑われる PARS ピーク時評定スコア(5 点以上/5 点未満)に影響する要因について多重ロジスティックモデルを用いて分析した。その際調査票の「(妊娠中の)食事制限」、「つわり以外の異常」、「鉄剤以外の薬服用」に記載された具体的な内容を分類し、塩分制限、カロリー制限、妊娠中の貧血、切迫流産、妊娠中毒症、お腹の張り止め薬服用を各変数として追加した。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 測定結果について本文で詳述する。3 年目は、1 - 2 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を進めた。

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 先任准教授

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976例回収した。生体試料は、毛髪を860検体、歯牙を781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。

3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度計による測定を進めるとともに、乳歯中微量元素濃度をICP-MSにて測定した。また、LA-ICP-MS測定に関する検討を進めた。

H21～26 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。

昨年度は入力された 968 例のうち、対象外を除く 966 例について、広汎性発達障害日本自閉症協会評定尺度(PARS)のピーク時評定スコアと幼児期現在評定スコアの分布を確認し、広汎性発達障害が強く疑われる幼児期ピーク得点 5 点以上の割合を示した。そして PARS ピーク時評定スコア 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報告した。

今年度は昨年度データから脳性麻痺、超未熟児の 5 例を除く 963 例を用いて、PARS ピーク時評定スコア(5 点以上/5 点未満)に影響する要因を、多重ロジスティックモデルを用いて分析した。結果(目的)変数を PARS ピーク時評定スコア(5 点以上/5 点未満)、説明変数を母親の妊娠前の状況(最も長く生活していた県、化学物質を扱う仕事、魚の摂取頻度、薬の服用、喫煙習慣)、妊娠中の状況(居住県、魚の摂取頻度、喫煙習慣、食事制限の有無、つわり以外の異常、薬の服用)、出生時体重、

出生時妊娠週数、出生順位とし、性と年齢を調整した上で、オッズ比と 95%信頼区間(95%CI)を求めた。母親が最も長く生活していた県は東～北(新潟、群馬、埼玉、東京、神奈川より東または北)と西～南(富山、長野、山梨、静岡より西または南)に分けた。

今回、調査票の妊娠中の「食事制限」、「つわり以外の異常」、「鉄剤以外の薬服用」に記載された具体的な内容を分類し、「食事制限」の中から塩分制限、カロリー制限、「つわり以外の異常」から貧血、切迫流早産、妊娠中毒症、「鉄剤以外の薬服用」から「お腹の張り止め」を各変数として追加し、同様の分析を行った。

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