

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：16401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K18650

研究課題名（和文）発達障害の早期診断と発症要因の解明に関する研究

研究課題名（英文）Research on early diagnosis and elucidation of onset factors of developmental disorders

研究代表者

蒲生 啓司（GAMOH, KEIJI）

高知大学・教育研究部総合科学系複合領域科学部門・教授

研究者番号：90204817

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,700,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、LC/MS法によるメタボローム解析に基づいて、発達障害とりわけ自閉症スペクトラム障害を、生化学的・精神的（先天的・内因的）な視点と、生活環境中の化学物質や食物・栄養学的（後天的・外因的）な視点から解明していくことを目的として、発達障害を客観的体内物質濃度の変化として捉え、早期診断に反映される可能性を追究した。また、発達障害の特性を環境変化とストレスの観点から捉えた時に、発達障害者への適用の前段として、健常者を被験者とした環境要因としての1日の生活と運動刺激に密着して、ストレスバイオマーカーとして考えられている唾液アミラーゼの測定を行い、急性および精神的ストレス検査の可能性を追究した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、メタボローム解析に基づく自閉症スペクトラム障害等発達障害の発症要因の解明と早期発見・診断に向けたバイオマーカーの探索を目的としており、発達障害と脳科学研究における解析化学的研究である。発達障害モデルマウスであるセリンプロテアーゼ欠損ノックアウトマウスと対照としての野生型マウスを用いる血清成分のメタボローム解析によって生み出される差異物質の発見が、発達障害の早期診断法として期待される。一方、発達障害者のおかれた日常的・对人的環境が、どのようにメンタルストレスをもたらすのかを解明すべく、健常者をモデルにそのバイオマーカーとして知られる唾液アミラーゼに注目して定量的・継続的に計測した。

研究成果の概要（英文）：Autism spectrum disorder is a behaviourally-defined group of neurodevelopmental disorders characterized by impairments in social interaction and communication, and repetitive, overly focused behaviours. Whereas the syndrome has been shown to be highly heritable, various theories have been presented, suggesting the contribution of both genetic and environmental factors. Our interest was focused on the investigation of biomarkers of developmental disorders based on a LC/MS method. In the present study, serum samples of motopsin KO mice were used for the exhaustive analysis of metabolites. using an electrospray ionization LC/MS method, in addition to comparing serum metabolites between motopsin KO and WT mice. On the other hand, salivary amylase was measured in the field of the exercise that caused changes in mental state, focusing on changes in individual mental state due to the exercise load. By tracking the changes, we analyzed the environmental factors of mental stress changes.

研究分野：分離化学，天然物有機化学

キーワード：発達障害 自閉症スペクトラム障害 メタボローム解析 発達障害モデルマウス モトブシン 低分子
極性物質 アミノインデクス ストレスマーカー

1. 研究開始当初の背景

自閉症やアスペルガー障害等を含む広汎性発達障害 (PDD) は、多遺伝子疾患と考えられているが、実質的に病因は不明である。例えば ASD は、外側に現われる症状 (社会性・コミュニケーション・想像性の障害とそれらに基づく行動障害) をもって診断されるが、その発症原因には様々な可能性があると考えられている。生体内物質の観点からこれらの発達障害を見れば、定型発達児群と比較すると、ASD 児群では必須ミネラル・有害ミネラル共に有意に低値にある傾向を示したり、血漿中のオキシトシン濃度が有意に低かったりすることが知られている。申請者による本申請前の研究段階で、唾液試料中のグルタミン酸濃度が ASD 群において高値であることを報告した。このことは、個々の生体内物質において、発達障害群と定型発達群との間に明確な物質レベルの「差異」が存在することを示しており、したがって発達障害の病因を知るためには、生体内物質の網羅的解析が必要であるという結論に至った。更にこの解析によって、ASD 群と定型発達群との物質的な差違が明らかになれば、ASD の客観的な診断マーカーとして決定づけられる可能性が大きい。本研究を具体化するために、発達障害モデルマウスとして研究されてきたセリンプロテアーゼ (motopsin) が欠損したノックアウト (KO) マウスを用いて、それらの血清成分の比較から、血清成分の「差異」がメタボローム解析的に見出されるかどうかの評価を行ってきた。即ち、KO マウスと対照としてのヘテロ型 (Het) 及び野生型 (WT) マウスを分析の対象として、それらの血清中のアミノ酸を中心とした化学成分の詳細な定量を行うことで、発達障害の診断について知見を得る研究を行った。

また、発達障害の早期診断の開発、障害特性の解明および適切かつ効果的な教育支援の在り方をめざす研究の立場から考えれば、発達障害者のおかれた環境が、どのように精神的なストレス (メンタルストレス) をもたらすのかを追究することは、発達障害者への適切な教育支援を考える上で極めて重要な意味を持つと考えられる。すなわち、発達障害者のおかれた日常生活や運動などの環境が、どのようにメンタルストレスをもたらすのかについて、そのバイオマーカーとして知られる唾液アミラーゼに注目して測定し、その測定結果を考察することによって、教育支援の提案に繋げていくことができるのではないかと考えられる。発達障害者への教育支援は、発達段階と障害の特性に応じて個別に教育支援を行っていくことが基本である。そもそも精神的・肉体的ストレスを追跡 (モニター) することが可能なのであろうか。例えば、日常的に取入れる立場であれスペシャリストの立場であれ、運動を考えた時に、その質と量の観点から、運動による肉体的ストレスと求められる運動の形態に応じた精神的ストレスの両面を持っている。運動も含めて、人は様々な環境におかれた時に、その人の感情変化によって変動し、急性もしくは慢性的に生体に表れるストレス反応であるメンタルストレスを、サンプリングの容易な唾液中のバイオマーカーで追究できるのではないかと考えている。

2. 研究の目的

自閉症スペクトラム障害、社交不安障害および統合失調症等、種々の精神疾患においては社会性に問題が生じるが、社会行動を制御する脳内のメカニズムについては未だ不明な点が多い。これまでの三井らによる脳内セリンプロテアーゼ motopsin の機能解析および遺伝子欠損マウスの解析の結果から、脳内に発現している motopsin が社会行動を制御していることが明らかになり、更に遺伝子変異による motopsin の機能欠損が、重篤な知的発達障害をもたらすことも明らかになってきた。これらの発達障害における明確な病因は解明されていないことから、早期発見・早期診断が困難とされている。これまでの我々の研究では、motopsin による社会行動制御の脳内機構を明らかにする目的から、motopsin ホモ欠損 (KO) マウス、ヘテロ型 (Het) マウスおよび野生型 (WT) マウスの血清を用いて、LC/MS 法によるアミノ酸等の生体関連物質の成分分析を行い、成分濃度の違いと社会行動変化の違いについてその関連性を追究してきた。しかしながら検体数が少ないこともあり、これまで進めてきた遊離型アミノ酸での分析では、分離の不十分さや定量性及び再現性に課題が残っている。本研究では、血清成分の定量に基づく社会行動異常と生体内物質の関係についての知見を獲得し、社会行動制御に関わる脳内メカニズム及び発達障害の診断マーカーとしての可能性を追究することを目的として、LC/MS 法によるアミノ酸分析における遊離型と誘導体との比較及び LC/MS 装置間の比較を行うことで、アミノ酸定量における最適条件を得る検討を行った (研究 I とする)。

運動による刺激は、ストレスとして様々な影響を及ぼすことが知られている。先行研究によれば、運動前後の精神的変化と唾液中のストレス応答物質の関連から、運動負荷によるそれらの物質の変化は、運動強度に依存するだけでなく、運動前後の精神状態にも影響されることが示唆されている。教員や介護職などの感情労働者のストレスは高く情緒的消耗状態等に陥りやすい

ため、ストレスを客観的に評価することができればその軽減に向けた対策も考えられる。本研究では、運動者（＝被験者）の置かれた環境や運動の種類によるストレスの違いに着目し、分析試料として入手し易い唾液試料を用いて、 α -アミラーゼ（以下アミラーゼ）やコルチゾール等のストレス応答物質の濃度変化とストレス負荷の関係性を追究することを目的とした。ストレスマーカーをモニターしている研究は数多くあるが、日常の生活と共に、同一被験者が運動種別の違いや特殊な運動環境下で長期間にわたって計測を続けるという事例はこれまで見られなかった。本研究では、同一被験者におけるメンタルストレスと精神状態の変化を唾液成分から観察・追跡した。運動負荷や運動環境の変化による刺激は、ストレスとして様々な影響を及ぼすことが知られているが、メンタルストレスが唾液中のストレス応答物質の変化となって反映されることを、精神状態との関係において考察することとした。ストレス応答物質としてはアミラーゼを主に計測し、ステロイドについても併せて計測の対象とした（研究Ⅱとする）。

3. 研究の方法

3-1 研究Ⅰにおけるアミノ酸等低分子極性化合物の測定方法

LC/MS は、Orbitrap Exactive (Thermo Fisher Scientific 社製) 及び LC/MS/MS は、QTRAP4500 (SCIEX 社製) を使用し、装置間の比較としてアミノ酸等被測定物質の遊離型及び誘導体での測定を双方で行った。遊離型アミノ酸の測定は、Intrada Amino Acid カラム (Imtakt 社製, 3 mm i.d. x 100 mm L.) を用い、移動相は A 液: 0.3 % ギ酸含有アセトニトリル, B 液: アセトニトリルと 100 mmol/L ギ酸アンモニウム水溶液の混合液 (20:80) を使用した。アミノ酸誘導体の測定は、3-アミノピリジル-N-ヒドロキシスクシンイミジルカルバメートによる誘導体化法を行い、Wakopak Ultra APDSTAG カラム (和光純薬製, 2.1 mm i.d. x 100 mm L.) を用い、移動相は A 液: APDS タグワコー用移動相, B 液: 60 % アセトニトリル水溶液を使用した。タンパク質構成アミノ酸 20 成分および神経伝達物質 11 成分を標準試料として、各 LC/MS による測定条件の設定を行い最適化を図った。血清試料は、KO マウス、Het マウスおよび WT マウスより採取し、除タンパク及び固相抽出等の前処理を施して分析試料とし、¹⁵N-Phe を内部標準として定量を行い、検体毎のアミノ酸および神経伝達物質の濃度の比較を行うと共に、統計的に有意差のある物質を確認した。

3-2 研究Ⅱにおけるアミラーゼの測定方法

研究者本人が被験者となって平常時及び運動前後の唾液を採取し、アミラーゼ及びステロイドを測定し、運動環境や運動種によるこれら唾液成分の違いを比較検討した: 1) 唾液中のアミラーゼの測定には、酵素分析装置唾液アミラーゼモニター (NIPRO), 唾液アミラーゼモニターチップ (NIPRO) を用いた。これは、使用環境に左右されず、迅速に交感神経の興奮・沈静を検査するための、唾液アミラーゼ活性による携帯式の交感神経モニターを可能にした酵素分析装置である。測定は、初めに専用のドライチップを舌下部に入れて唾液を含浸させ、一定時間 (約 30 秒) 後チップを取出してモニター器に挿入する。1 分後には唾液中のアミラーゼ活性が KIU/L の単位で表示されて終了する。これによって平常時と運動前後のアミラーゼ濃度測定を行った。2) また、LC/MS を用いた唾液中ステロイドの定量及び被測定物質の回収率の検討を行った。平常時のモニターとして朝食前と就寝前を、運動種別として柔道、ランニング及び水泳を、運動種を柔道とした時の運動環境別として試合当日、合同練習及び通常練習とした。

4. 研究成果

4-1 研究Ⅰにおける分析結果と統計解析

遊離型及び誘導体測定は、既に装置メーカー及びカラムメーカーによって実施されており、実用化されているものではあるが、ユーザーサイドではその公表通りのデータが再現し難いため定量的な情報が得られていない。基礎データを得るために改めて遊離型 50 μ mol/L の標準試料を用いて、測定時の面積値を LC/MS, LC/MS/MS の装置間で比較した。その結果、両装置共に標準試料を用いた測定では、アミノ酸 20 成分と神経伝達物質 11 成分を分離、検出することができた。また、アミノ酸及び神経伝達物質の種類によっては、LC/MS/MS の測定面積値が LC/MS の測定面積値よりも数倍～数百倍程度増加傾向となった。各標準物質を 0.1～50 μ mol/L の範囲で混合し、LC/MS で内部標準法による検量線を作成した。その結果、アミノ酸及び神経伝達物質 31 成分中 24 成分が、相関係数 0.99 以上の関係が得られた。また、検量線各濃度の繰り返し測定 (n=3) を行い、再現性を確認した。検量線を作成した範囲内で変動係数の最大値が 30% 以内であったものは、Pro, Phe, Leu, Ile のみであった。誘導体化による測定では、各標準物質を 1～200 μ mol/L の範囲で混合し、内部標準法による検量線を作成した。その結果、ア

ミノ酸及び神経伝達物質 31 成分中 11 成分が、0.99 以上の相関が得られた。また、50 $\mu\text{mol/L}$ に調製した標準試料測定時の面積値を用い、LC/MS による誘導体化測定と遊離型測定の比較を行った結果、Gly のみ誘導体化による測定的面積値が遊離型測定よりも増加しており、その他の化合物では、面積値が低下傾向にあった。

定量性及び再現性に問題が残るものの、マウス血清試料中のアミノ酸等成分の定量を行った。KO マウス、Het マウス及び WT マウスの血清成分には、成分濃度及び成分分布の違いが観察され、一方で遺伝子型や雌雄の違いによる神経伝達関連物質の違いやアミノ酸の存在比の違い等が観察された。KO マウスと WT マウスの血清を用いて同様に測定した結果、雌雄に関わらず、WT マウスよりも KO マウスの方がエピネフリンの濃度が高く、Phe, Trp, Leu, His, セロトニンの濃度が低いことがわかった。神経伝達物質である Glu, Gly, Asp, 神経細胞や核酸と関わる Ser, 神経伝達物質であるヒスタミンの材料である His, アドレナリン作動性神経伝達物質の基となる Phe, その生成物、代謝物であるエピネフリン, HVA, 社会行動や感情規制に関与しているセロトニン, その原料である Trp, 持久的な運動のエネルギー源となる Leu, Ile, Ala などが、雌雄に関わらず遺伝子型によって同様の傾向を示していたことから、社会行動制御に関わる脳内メカニズムの解明に関わる、或いは発達障害の診断マーカーとしての可能性が示唆された。今後 motopsin 欠損マウスの血清成分の分析結果から得られる詳細な情報を基に、motopsin が社会行動を制御する脳内メカニズムと生体関連物質との関係を明らかにしていきたい。

4-2 研究 II における分析結果

個々の状況に応じて測定した結果及び考察を以下に記した：[朝食前・就寝前]の結果より、朝食前に比べて就寝前のアミラーゼ値が高かった。これは、夕方以降の運動或いは夕食に関係していると考えられる。[睡眠時間と朝食前アミラーゼ濃度]の結果より、睡眠時間とアミラーゼ濃度の値には関係性は認められなかった。[柔道前後の環境別アミラーゼ濃度]の結果より、試合という環境の違いによるストレス濃度の増加が顕著に表れた。これは、緊張やプレッシャーからくるストレスの上昇と考えられる。[運動種別]の結果より、柔道の前後共に最もアミラーゼ濃度が高かった。相手の力が加わるため、想定外の動きや体への負荷によるストレス負荷によるものと考えられる。競技時間を 60 分に換算すると、水泳が一番濃度を高めたが、運動者が水泳に慣れていないことによる心理的なストレス負荷によるものと考えられる。運動前後に唾液を採取するのは精神的なストレスがかかり、競技自体に集中できなくなるなどの支障もあるが、被験者の実感として、一定の時期が来ると（＝ルーティン化してしまうと）ストレス負荷としての影響は少なくなったと考えられる。一方でこのことが被験者を増やせない理由として考えられる。本研究では、運動の前後（＝ストレスの違い）で唾液量自体の測定はしていないが、被験者として、試合直前や激しい運動直後は唾液量が少ないということを実感している。アミラーゼの濃度が、環境別データの試合と練習を比べると、長時間の運動である練習よりも、短時間の運動である試合の方が高かったのは、試合に直面した精神的なストレスが大きいこと、練習よりも試合になると踏ん張るなど、100%に近い力を出す場面が多いことがあげられる。また、運動別データの中で 60 分に換算してみると、水泳が一番高い値を示したのは、（柔道の環境別からもみてとれるように）短時間で一気に負荷をかけた運動の方がよりストレスが大きくなると考えられる。また同じ運動をしていても、一気に負荷をかけた方がよりストレスがかかっていると実感できる。運動種とストレスの観点からは、ランニングよりも怪我等の可能性が高い格闘技などの対人競技の方が、精神的にもストレスを感じ易いと考えられる。一般的に、柔道は運動強度として非常に高いものとされている。体型の違いによる運動に対する抵抗感等は、メンタルストレスを高めると考えられる。すなわち、普段運動をしないことによって体重が増加している人は、精神的にストレスを感じる可能性は大きいと考えられる。

アミラーゼ濃度における有意差については統計解析をしなければならないが、被験者としての実感からは、アミラーゼ濃度が 10~15 KIU/L 程度違えば、ストレスの増減に関わると言えるのではないかと考えている。これまでのアミラーゼ濃度測定の結果より、運動者の置かれた環境や運動種によって、ストレス負荷の違いがあることが明らかとなった。個人の精神状態の変化をもたらす運動の場でアミラーゼの変化を追跡することで、アミラーゼがストレス変化を反映することが明らかとなった。今後の研究として、運動中にわざと精神的苦痛を与えた場合に、どのようなアミラーゼ変動が起こるのかも調べてみたい。併せて、唾液中のステロイドも計測しアミラーゼとの相関を計測したいと考えている。更に、アミラーゼモニターがストレス指標としての可能性・実用性が高くなれば、発達障害や強度行動障害等でのモニタリングを行っていきたいと考えている。

<引用文献>

- 1) H. Yasuda, *et al.*: Mineral Imbalance in Children with Autistic Disorders, *Biomed. Res. Trace Elements*, **16(4)**, 285-292 (2005).
- 2) C. Modahl, *et al.*: Plasma oxytocin levels in autistic children, *Biol. Psychiatry*, **43**, 270-277 (1998).
- 3) 蒲生啓司 (研究代表): 科学研究費助成事業挑戦的萌芽研究(2014~2016), 課題番号: 26590259, 研究課題名: 自閉症スペクトラム障害におけるメタボローム解析.
- 4) 蒲生啓司他: 唾液中の代謝物濃度の比較分析に基づく ASD スペクトラム障害のバイオマーカー, *高知大学学術研究報告*, **63**, 183-191 (2014).
- 5) S. Mitsui *et al.*: A mental retardation gene, motopsin/prss12, modulates cell morphology by interaction with seizure-related gene 6, *Biochemical Biophysical Research Communications*, **436**, 638-644 (2013).
- 6) B.K. Pedersen *et al.*: Exercise and the Immune System: Regulation, Integration, and Adaptation, *Physiol Rev.*, **80 (3)**, 1055-1081 (2000).
- 7) 山口昌樹: 唾液マーカーでストレスを測る, *日薬理誌(Folia Pharmacol. Jpn.)* **129**, 80-84 (2007).
- 8) P. Groza *et al.*: Postoperative salivary amylase changes in children, *Rev. Roum. Physiol.*, **8**, 307-312 (1971).
- 9) 山口昌樹他: 唾液アミラーゼ活性はストレス推定の指標になり得るか, *医用電子と生体工学*, **39 (3)**, 234-239 (2001).
- 10) N. Takai *et al.*: Effect of psychological stress on the salivary cortisol and amylase levels in healthy young adults, *Arch. Oral Biol.*, **49**, 963-968 (2004).
- 11) M. Yamaguchi *et al.*: Hand-held monitor of sympathetic nervous system using salivary amylase activity and its validation by driver fatigue assessment, *Biosens. Bioelectron.*, **21**, 1007-1014 (2006).
- 12) 下村弘治他: 教育現場でのストレスマーカーとしての唾液アミラーゼと唾液コルチゾール測定の有効性について, *生物試料分析*, **33(3)**, 247-254 (2010).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 蒲生啓司, 大野敬太	4. 巻 第80号
2. 論文標題 唾液アミラーゼを用いるメンタルストレスに及ぼす環境要因の分析	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 高知大学教育学部研究報告	6. 最初と最後の頁 19-25
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 蒲生啓司, 西村 舞, 西脇芳典, 三井真一
2. 発表標題 発達障害マウスの社会行動変化を血清中アミノ酸濃度との関係から考察する
3. 学会等名 第78回分析化学討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Keiji GAMOH, Mai NISHIMURA, Takumi AKASHI, Yoshinori NISHIWAKI, Taiki KASHIO, Shinichi MITSUI
2. 発表標題 An Investigation of Biomarkers in the Serum of Developmental Disorders Using an Intellectual Disability Model Mouse, Which Show Impaired Social Behaviours
3. 学会等名 The 22nd International Mass Spectrometry Conference (IMSC 2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 蒲生啓司, 大野敬太
2. 発表標題 運動や環境によるストレス変化を唾液成分から追跡できるのか
3. 学会等名 第79回分析化学討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 蒲生啓司, 三井真一
2. 発表標題 Motopsin欠損マウスの血清アミノ酸分析
3. 学会等名 第65回質量分析総合討論会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 蒲生啓司, 明石拓実, 西脇芳典, 三井真一
2. 発表標題 モトブシン欠損マウスを用いた社会行動変化と血清中アミノ酸濃度との関係に関する研究
3. 学会等名 第77回分析化学討論会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 西村 舞, 明石拓実, 三井真一, 蒲生啓司
2. 発表標題 発達障害モデルマウスを用いた社会行動異常と生体内物質の関係についての研究
3. 学会等名 日本化学会中国四国支部大会2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 前田武晴, 公文俊佑, 美濃厚志, 蒲生啓司, 三井真一
2. 発表標題 Motopsin欠損KOマウスの血清中アミノ酸等分析の比較検討
3. 学会等名 日本分析化学会第68年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 蒲生啓司, 公文俊佑, 前田武晴, 美濃厚志
2. 発表標題 唾液成分からメンタルストレス変化を診る
3. 学会等名 日本分析化学会第68年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 前田武晴, 公文俊佑, 美濃厚志, 三井真一, 蒲生啓司
2. 発表標題 Motopsin欠損マウスの社会行動制御と生体内物質に関する研究
3. 学会等名 日本化学会中国四国支部大会2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 公文俊佑, 前田武晴, 美濃厚志, 蒲生啓司
2. 発表標題 メンタルストレス変化を生体成分から診る
3. 学会等名 日本化学会中国四国支部大会2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 蒲生啓司, 三井真一, 前田武晴, 公文俊佑, 美濃厚志
2. 発表標題 発達障害モデルとしてのMotopsin欠損KOマウスの血清中アミノ酸分析
3. 学会等名 第80回分析化学討論会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	三井 真一 (MITSUI SHINICHI)	群馬大学大学院・保健学研究科・教授	
研究協力者	寺田 信一 (TERADA SHINICHI)	高知大学教育研究部・人文社会科学系教育学部門・教授	