

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 23 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659211

研究課題名（和文） 尿メタボローム解析による、自閉症生物学的マーカーの探索

研究課題名（英文）：Urine metabolomics analysis for autistic spectrum disorder

研究代表者

三辺 義雄（MINABE YOSHIO）

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：60181947

研究成果の概要（和文）：

今回の研究の意義としては、仮説として脂肪酸の代謝経路に、発達障害児に健常との違いがあることを想定し、非侵襲的で簡単に採取可能な尿をもちいて、脂肪酸代謝物から、広汎性発達障害のバイオマーカーを探索することが目的であった。しかし結果として、現在尿中から測定可能なミリスチン酸、パルミチン酸、リノール酸、オレイン酸、ステアリン酸、アラキジン酸、ベヘン酸といった7種類の脂肪酸においては、バイオマーカーとしての所見が得られなかった。

研究成果の概要（英文）：

Because of its characteristics and simple non-invasive methods of collection, urine is particularly suited for metabolomic analysis even in young children. We explore urine fatty acid metabolic substance as a biomarker for autism spectrum disorder. In 32 ASD children and 24 typically developing (TD) young children (3 - 7 years old), 7 fatty acid metabolic substances (i.e., myristic acid, palmitic acid, linoleic acid, oleic acid, stearic acid, arachidic acid, behenic acid) in urine were quantified using gas chromatography-mass spectrometry. As a result, there were no significant differences in these concentrations between ASD and TD children. In addition, there were no significant correlations between cognitive performances and these concentrations.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,800,000	0	1,800,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	300,000	3,100,000

研究分野：児童精神医学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・精神神経科学

キーワード：児童・思春期精神医学、メタボローム解析

1. 研究開始当初の背景

自閉症研究では一卵性双生児の発症一致率の高さ（約 80%）から病態を規定する特定の遺伝子の存在が予想され、これまでの主たるアプローチは責任遺伝子を探求するもの

だった。しかし、それらは遺伝子がコードする蛋白質の機能研究に帰結しており、代謝産物に対してはほとんど注目されてこなかった。今回我々が注目している検体である尿は、幼児からも非侵襲的に簡単に採取できる上に、

測定可能な代謝産物が豊富に含まれており、その量的、質的なパターンは複雑な生物システムの状態を反映している。これら尿中の複雑な代謝産物のパターンは自閉症に関連する代謝の不具合を反映している可能性がある。自閉症においては近年、脂肪酸などの代謝経路に何らかの異常があることなどが報告されている。しかしながら、尿のメタボローム解析 (Metabolomic analysis ; 代謝産物を網羅的に解析する手法) は試みられていない。

自閉症児のてんかんの合併率 (4~32%) は健常児のそれ (0.5%) に比して明らかに高く、病態生理に抑制系ニューロンの未発達などの共通の要因が関与している可能性がある。感度は低いものの、その合併率の高さから、てんかん性の突発波の有無は自閉症についての最も重要な生理学的指標と言える。さらに自閉症では、発病以前からの突発波の存在が、その後のてんかんの発病の強い指標となるなど、突発波の精査は臨床的にも重要になっている。今回は非侵襲的に行える脳磁図 (MEG) 測定を行い、てんかん性突発波の有無といった生理学的側面も考慮した上で、尿メタボローム解析の診断的応用に挑戦した。

2. 研究の目的

自閉症は3歳児健診の時点で、精度の高いスクリーニングが望ましいが、現在は問診のみが診断方法であり、補助的な生物学的検査方法がなかった。これまでの主たるバイオマーカーの探索アプローチは責任遺伝子を探求するものだった。しかし、それらは遺伝子がコードする蛋白質の機能研究に帰結しており、他の代謝産物に対してはほとんど注目されてこなかった。一方で、脂質は生体膜の主な構成成分であるだけでなく、エネルギーの貯蔵や生理活性など多彩な性質を持つことから多くの生物学的プロセスに必要である。特に多価不飽和脂肪酸がヒトの中樞神経発達における重要な役割を担っていることはすでに自明である。従って脂質を含む代謝産物の網羅的測定が発達障害のバイオマーカーの検索のためには必要であると考えられる。幼児からも非侵襲的に簡単に採取できる尿は、幼児における集団的な健診に最も適した検体であると考えられる。これまで自閉症の研究ではほとんど注目されてこなかった代謝産物が、バイオリジカルマーカーとなり得るか、尿を用いて探索的に研究を行う。

3. 研究の方法

尿採取および脂肪酸測定：脳磁図を測定する施設 (金沢) において測定の日日に尿を採取し、-80度で保管し、それを一括して (浜松) に保冷移送してただちにGC-MS (ガ

スクロマトグラフ質量分析法) で分析した。GC-MSにより尿中の脂肪酸の測定を実施した結果ミリスチン酸、パルミチン酸、リノール酸、オレイン酸、ステアリン酸、アラキジン酸、ベヘン酸といった7種類の脂肪酸が尿中から測定できた。したがってこの7種類の脂肪酸の、発達障害のバイオマーカーとしての可能性について検討した。

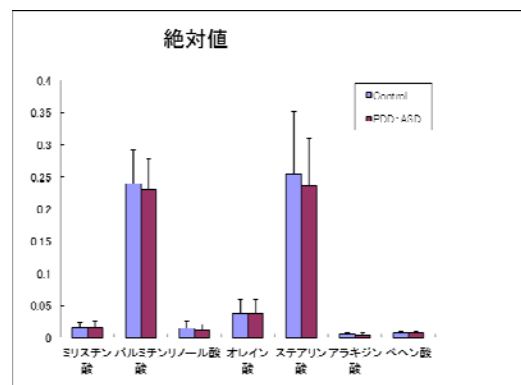
被験者：3-7歳の健常幼児24名および広汎性発達障害の幼児32名より検体を採取し、上記の尿中7種類の脂肪酸を測定した。診断については、保護者の構造化面接

(DISCO) を行った。認知機能については、K-ABCを施行して、上記の脂肪酸の量との関係を調べた。

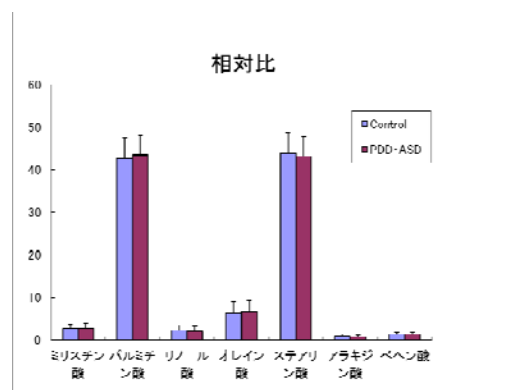
MEG測定：MEG測定には世界に先駆けてH21年に開発され、金沢大学が日本で唯一保有している小児用MEGを用いることで、より高感度で小児の脳皮質活動をすることが可能である。判読は日本臨床神経生理学認定医であり分担研究者が行った。

4. 研究成果

(図1)



(図2)



GC-MSにより測定された尿中の脂肪酸
 ミリスチン酸、パルミチン酸、リノール酸、
 オレイン酸、ステアリン酸、アラキジン酸、
 ベヘン酸の相対値（図1）と絶対値（図2）
 をもちいて、広汎性発達障害児と定型発達児
 童を、T検定にて比較した。結果、いずれの
 指標においても有意差は認められなかった
 ($p > 0.05$)。

(表1) 相関係数

	相対値						
	ミリスチン酸	パルミチン酸	リノール酸	オレイン酸	ステアリン酸	アラキジン酸	ベヘン酸
継次処理尺度	-0.061	0.050	-0.054	-0.020	-0.025	0.041	0.114
同時処理尺度	0.001	-0.007	0.013	0.044	-0.032	0.028	0.058
認知処理尺度	0.059	0.031	0.020	0.002	0.013	0.002	0.030
習得度尺度	-0.163	-0.018	0.009	-0.115	0.091	0.164	0.149

(表2) 相関係数

	絶対値						
	ミリスチン酸	パルミチン酸	リノール酸	オレイン酸	ステアリン酸	アラキジン酸	ベヘン酸
継次処理尺度	-0.076	-0.001	-0.076	-0.051	-0.053	-0.029	0.030
同時処理尺度	0.004	0.079	-0.010	0.034	-0.002	-0.010	0.047
認知処理尺度	0.060	0.026	0.053	0.031	0.033	0.043	0.007
習得度尺度	-0.150	-0.051	-0.012	-0.112	-0.011	0.063	0.051

また、K-ABCにより測定された、認知機能尺
 度である継次処理尺度、同時処理尺度、認知
 処理尺度、習得度尺度と、それぞれの尿中の
 7種類の脂肪酸の相対量（表1）、絶対量（表
 2）との相関係数をしらべた。発達障害児と
 定型発達群では、それぞれ異なる関係が認め
 られる可能性があるため、別々に相関を求め
 た。その結果、表に示すように、いずれも有
 意な相関関係は認められなかった ($p > 0.05$)。

MEGを記録した42名の児童のうち、あき
 らかなてんかん波（無症候性）を呈したのは
 2名であり、尿中の脂質代謝との関係を調べ
 るには不十分な数であった。

今回、仮説として脂肪酸の代謝経路に、発
 達障害児に健常との違いがあることを想定し
 、非侵襲的で簡単に採取のうな尿をもちい
 て、脂肪酸代謝物から、広汎性発達障害のバ
 イオマーカーを探索することが目的であった
 。しかし結果として、現在尿中から測定可能
 なミリスチン酸、パルミチン酸、リノール酸
 、オレイン酸、ステアリン酸、アラキジン酸
 、ベヘン酸といった7種類の脂肪酸からは、
 バイオマーカーとしての所見が得られなかつ
 た。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に
 は下線)

[雑誌論文] (計16件)

- ① Ueno S, Okumura E, Remijn GB, Yoshimura Y, Kikuchi M, Shitamichi K, Nagao K, Mochiduki M, Haruta Y, Hayashi N, Munesue T, Tsubokawa T, Oi M, Nakatani H, Higashida H, Minabe Y. Spatiotemporal frequency characteristics of cerebral oscillations during the perception of fundamental frequency contour changes in one-syllable intonation. *Neurosci Lett*. 2012 May 2;515(2):141-6. 査読有
- ② Yoshimura Y, Kikuchi M, Shitamichi K, Ueno S, Remijn GB, Haruta Y, Oi M, Munesue T, Tsubokawa T, Higashida H, Minabe Y. Language performance and auditory evoked fields in 2- to 5-year-old children. *Eur J Neurosci*. 2012 Feb;35(4):644-50. 査読有
- ③ Hayashi N, Kikuchi M, Sanada S, Minabe Y, Miyati T, Hachiman Y, Arishita T, Iida H, Matsui O. Algorithm for estimation of brain structural location from head surface shape in young children. *Neuroreport*. 2012 Mar 28;23(5):299-303. 査読有
- ④ Kikuchi M, Shitamichi K, Yoshimura Y, Ueno S, Remijn GB, Hirosawa T, Munesue T, Tsubokawa T, Haruta Y, Oi M, Higashida H, Minabe Y. Lateralized theta wave connectivity and language performance in 2- to 5-year-old children. *J Neurosci*. 2011 Oct 19;31(42):14984-8. 査読有
- ⑤ Higashida H, Yokoyama S, Munesue T, Kikuchi M, Minabe Y, Lopatina O. CD38 gene knockout juvenile mice: a model of oxytocin signal defects in autism. *Biol Pharm Bull*. 2011;34(9):1369-72. 査読有
- ⑥ Kikuchi M, Hirosawa T, Yokokura M, Yagi S, Mori N, Yoshikawa E, Yoshihara Y, Sugihara G, Takebayashi K, Iwata Y, Suzuki K, Nakamura K, Ueki T, Minabe Y, Ouchi Y. Effects of brain amyloid deposition and reduced glucose metabolism on the default mode of brain function in normal aging. *J Neurosci*. 2011 Aug 3;31(31):11193-9. 査読有
- ⑦ Kikuchi M, Hashimoto T, Nagasawa T, Hirosawa T, Minabe Y, Yoshimura M, Strik W, Dierks T, Koenig T. Frontal areas contribute to reduced global

- coordination of resting-state gamma activities in drug-naïve patients with schizophrenia. *Schizophr Res.* 2011 Aug;130(1-3):187-94. 査読有
- ⑧ Kikuchi M, Koenig T, Munesue T, Hanaoka A, Strik W, Dierks T, Koshino Y, Minabe Y. EEG microstate analysis in drug-naïve patients with panic disorder. *PLoS One.* 2011;6(7):e22912. Epub 2011 Jul 29. 査読有
- ⑨ Tochimoto S, Kurata K, Munesue T. 'Time slip' phenomenon in adolescents and adults with autism spectrum disorders: Case series. *Psychiatry Clin Neurosci.* 2011 Apr 14. 査読有
- ⑩ Remijn GB, Kikuchi M, Yoshimura Y, Shitamichi K, Ueno S, Nagao K, Munesue T, Kojima H, Minabe Y. Hemodynamic responses to visual stimuli in cortex of adults and 3- to 4-year-old children. *Brain Res.* 2011 Feb 2. 査読有
- ⑪ Higashida H, Lopatina O, Yoshihara T, Pichugina YA, Soumarokov AA, Munesue T, Minabe Y, Kikuchi M, Ono Y, Korshunova N, Salmina AB. Oxytocin signal and social behaviour: comparison among adult and infant oxytocin, oxytocin receptor and CD38 gene knockout mice. *J Neuroendocrinol.* 2010 May;22(5):373-9. 査読有
- ⑫ Munesue T, Yokoyama S, Nakamura K, Anitha A, Yamada K, Hayashi K, Asaka T, Liu HX, Jin D, Koizumi K, Islam MS, Huang JJ, Ma WJ, Kim UH, Kim SJ, Park K, Kim D, Kikuchi M, Ono Y, Nakatani H, Suda S, Miyachi T, Hirai H, Salmina A, Pichugina YA, Soumarokov AA, Takei N, Mori N, Tsujii M, Sugiyama T, Yagi K, Yamagishi M, Sasaki T, Yamasue H, Kato N, Hashimoto R, Taniike M, Hayashi Y, Hamada J, Suzuki S, Ooi A, Noda M, Kamiyama Y, Kido MA, Lopatina O, Hashii M, Amina S, Malavasi F, Huang EJ, Zhang J, Shimizu N, Yoshikawa T, Matsushima A, Minabe Y, Higashida H. Two genetic variants of CD38 in subjects with autism spectrum disorder and controls. *Neurosci Res.* 2010 Jun;67(2):181-91. 査読有
- ⑬ 棟居俊夫, 青年期双極性障害と自閉症スペクトラム障害との併存、そしてその薬物療法, *臨床精神薬理*, 2010年13巻910-919. 査読無
- ⑭ Suzuki K, Sugihara G, Ouchi Y, Nakamura K, Tsujii M, Futatsubashi M, Iwata Y, Tsuchiya KJ, Matsumoto K, Takebayashi K, Wakuda T, Yoshihara Y, Suda S, Kikuchi M, Takei N, Sugiyama T, Irie T, Mori N. Reduced acetylcholinesterase activity in the fusiform gyrus in adults with autism spectrum disorders. *Arch Gen Psychiatry.* 2011 Mar;68(3):306-13. 査読有
- ⑮ Kosaka H, Omori M, Munesue T, Ishitobi M, Matsumura Y, Takahashi T, Narita K, Murata T, Saito DN, Uchiyama H, Morita T, Kikuchi M, Mizukami K, Okazawa H, Sadato N, Wada Y. Smaller insula and inferior frontal volumes in young adults with pervasive developmental disorders. *Neuroimage.* 2010 May 1;50(4):1357-63. 査読有
- ⑯ Kikuchi M, Shitamichi K, Ueno S, Yoshimura Y, Remijn BG, Nagao K, Munesue T, Iiyama K, Tsubokawa T, Haruta Y, Inoue Y, Watanabe K, Hashimoto T, Higashida H, Minabe Y. Neurovascular coupling in the human somatosensory cortex: a single trial study. *NeuroReport* 2010 21: 1106-1110. 査読有

[学会発表] (計 13 件)

- ① 三辺 義雄, 2~5 歳児の脳内機能結合と言語発達、第 38 回日本脳科学会、H23 年 10 月 8 日、沖縄県市町村自治会館
- ② Kikuchi M et al., Lateralized theta wave MEG coherence and language performance in 2- to 5-year-old children. Exploring Autism Research Collaboration between Japan and United States: Joint Academic Conference on Autism Spectrum Disorders. H23 年 12 月 2 日日本財団ビル (東京)
- ③ 三辺 義雄, 広汎性発達障害の診断・治療・経過観察総合システムの開発, 第 2 回金沢大学子どものこころサミット, H23 年 3 月 16 日、金沢大学病院「宝ホール」金沢市 (石川県)
- ④ 菊知 充, 2~5 歳児の脳内機能結合と言

- 語発達、そして広汎性発達障害早期診断への試み、第20回海馬と高次脳機能学会、H23年10月9日金沢市湯湧創作の森(石川県)
- ⑤ 三辺 義雄、Bambi plan: Project with NIRS/MEG integrated device for the early detection of autism spectrum disorder in preschool children. 第37回日本脳科学会、平成22年10月17日天津医科大学 国際会議センター(中国)
- ⑥ 三辺 義雄、Bambi Plan: project with NIRS/MEG integrated device for the early detection of autism spectrum disorder in preschool children. 2010Kanazawa-Chonbuk Symposium Speakers. 平成22年10月28日 Symposium in Chonbuk University (Chonbuk, Korea).
- ⑦ 三辺 義雄、バンビプラン-広汎性発達障害の早期診断にむけて- 第一回金沢大学子どものこころサミット平成22年11月27日金沢大学病院「宝ホール」金沢市(石川県)
- ⑧ 棟居俊夫、東田陽博、オキシトシン放出を制御する CD38 と自閉症との関係: Syntocinonの個人使用を含めて. 第3回発達障害の病態と治療研究ネットワーク平成22年10月9日小倉
- ⑨ Remijn, G. B., Kikuchi, M., Yoshimura, Y., Shitamichi, K., Ueno, S., Nagao, K., Kojima, H., Minabe, Y. NIRS-measurements of cortical hemodynamic activity in adults and preschool infants in response to static and motion stimuli. International Congress of Clinical Neurophysiology (ICCN2010) 平成22年10月29日神戸国際会議場 神戸市(兵庫県)
- ⑩ Yoshimura Y. Kikuchi, M., Shitamichi, K., Ueno, S., Nagao, K. Minabe, Y. Auditory evoked response of speech stimuli in 3- to 4-year-old children: a magnetoencephalography study. International Congress of Clinical Neurophysiology (ICCN2010) 平成22年11月1日神戸国際会議場 神戸市(兵庫県)
- ⑪ Nagao, K. Kikuchi, M., oshimura Y. Shitamichi, K., Ueno, S. Minabe, Y. Correlations between the development of cognitive functions and spontaneous MEG responses of healthy 3- to 4-year-old infants. International Congress of Clinical Neurophysiology (ICCN2010) 平成22年11月1日神戸国際会議場 神戸市(兵庫県)
- ⑫ Hayashi, N Sanada, S Miyati T, Suzuki M, Kikuchi M, Matsui O, Minabe Y, Yamamoto T, Minehiro K, Sakuta K, Takanaga M, Kawashima H, Advantages and pitfalls of segmentation methods using texture, anatomical features, and VBM on brain MR images. Radiological Society of North America 2010 96th Scientific Assembly and Annual Meeting 平成22年11月30日 Chicago(USA)
- ⑬ 菊知充、渡邊克巳、鈴木道雄、春田康博、井上芳浩、三邊義雄 子どもに優しい脳発達研究プロジェクト:バンビプラン、第19回海馬と高次脳機能学会、平成22年11月20日金沢市(石川県)
- 〔図書〕(計2件)
- ① 棟居俊夫、中山書店。双極性障害:齊藤万比古総編集、松本英夫、飯田順三責任編集:子どもの心の診療シリーズ4:子どもの不安障害と抑うつ。2010年 280-290
- ② 棟居俊夫、シナジー出版、脳とこころのプライマリ・ケア 第4巻:子どもの発達と行動:双極性障害。2010年 541-547
- 〔その他〕
ホームページ等
<http://kokorosummit.w3.kanazawa-u.ac.jp/program.html>
6. 研究組織
(1) 研究代表者
三辺 義雄 (Minabe Yoshio)
金沢大学・医学系・教授
研究者番号: 60181947
- (2) 研究分担者
棟居 俊夫 (Munesue Toshio)
金沢大学・子どものこころの発達研究センター・特任教授
研究者番号: 50293353
- 菊知 充 (Kikuchi Mitsuru)
金沢大学・子どものこころの発達研究センター・特任准教授
研究者番号: 00377384
- 松崎秀夫 (Matsuzaki Hideo)
浜松医科大学 子どもこころの発達研究センター・特任准教授
研究者番号: 00334970