

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19H03883

研究課題名（和文）毛髪及び血中重金属、微量元素と神経発達症との関連に関わる研究

研究課題名（英文）Epidemiological study to clarify the relation between trace elements in hair and blood and developmental disorder

研究代表者

野見山 哲生（NOMIYAMA, TETSUO）

信州大学・学術研究院医学系・教授

研究者番号：70286441

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 11,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、生体内金属、微量元素と神経発達症との関連を明らかにすることである。その為、本研究では、対象集団を出生時から8歳児までフォローアップし、8歳児の高機能自閉症スペクトラム・スクリーニング質問紙（ASSQ）の高低（19点をカットオフとする）とし、毛髪中の微量元素との関連をみた出生コホート研究を実施した。また、神経発達症患者を症例群、神経発達症患者の兄弟姉妹を対照群とし、両者の毛髪中金属、微量元素の比較を行うものである。本研究により、複数の微量元素と神経発達症との関連が示唆される結果を得た。今後、機序の解明、交絡因子を考慮した検討が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経発達障害と微量元素との関連は明らかになっていない。今回の研究結果により、複数の微量元素と神経発達障害との関係が示唆された。今後、個別の微量元素と神経発達障害との機序について更なる基礎研究は必要とされ、また、疫学研究で払拭されていない、交絡因子を加味した更なる疫学研究は必要であるが、今後の研究の方向性について、一定の回答を得ることができた意義は大きいと考えられる。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study is to clarify the relationship between trace elements and neurodevelopmental disorders. Therefore, we followed up the target population from birth to 8-year-old children, evaluated the high-functioning Autism Spectrum Screening Questionnaire (ASSQ) scores of 8-year-old children (with a cutoff of 19 points) in a birth cohort study, and examined the relationship between ASSQ score positive (≥ 19) and trace elements in hair. In addition, case-control study was employed for the evaluation between neurodevelopmental disease patients as a case group and the siblings of neurodevelopmental disease patients and trace elements in the hair. These studies suggest a relationship between multiple trace elements and neurodevelopmental disorders. In the future, it is necessary to elucidate the mechanism and consider confounding factors in these relations.

研究分野：衛生学および公衆衛生学分野関連：実験系を含む

キーワード：神経発達障害 微量元素 小児 重金属 誘導結合プラズマ質量分析

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、神経発達症の診断が増加している¹⁾。神経発達症は脳の機能障害が原因とされているが、金属、微量元素の過剰な曝露がその要因^{2,3)}が示唆され、小児の神経発達症との関連として、注意欠如多動症と鉛 (Pb)⁴⁾、自閉スペクトラム症と水銀 (Hg)⁵⁾、小児の知能指数 (IQ) の低下とマンガン (Mn)⁶⁾、神経行動学的検査指標の低さと Mn⁷⁾との関連について報告されている。また、小児期は神経系の器官が未成熟で、環境中の化学物質に対する感受性は成人とは異なり、より感受性が高いと考えられており、胎児、小児の神経系の発達期における環境中の化学物質の曝露を低減することの必要性が叫ばれている。一方で、金属、微量元素と神経発達障害の関係は依然、疫学的エビデンス、機序の解明が待たれるところである。

2. 研究の目的

本研究の目的は、生体内金属、微量元素と神経発達症との関連を、出生コホート研究、症例対照研究という2つの研究手法により明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) 多元素同時測定法の確立

生体内金属、微量元素と神経発達症との関連を調べるため、生体試料の前処理および測定法について検討した。本測定法は、毛髪および血液試料を硝酸ベースの酸分解溶液とともに、マイクロ波前処理装置の密閉容器内で酸分解後、誘導結合プラズマ質量分析 (ICP-MS) を用いて内標準検量線法により測定した。毛髪試料は酸分解前に、付着する汚れ等をアセトンと超純水によって洗浄し重量測定した。一部の元素における ICP-MS 導入時のイオン化を安定させるため、測定前に酸分解溶液へ塩酸添加を検討した。確立した手法は、測定項目の各濃度が既知の二次標準物質 (血液試料 1 物質および毛髪試料 2 物質) を用いて、その保証値と同等の結果が得られることを確かめた。また本測定法は、試料分析の期間中、年 2 回の国際的なラウンドロビン試験 G-EQUAS (German External Quality Assessment Scheme) において外部精度管理を実施した。

(2) 出生コホートにおける調査

子どもの健康と環境に関する全国調査 (エコチル調査) において、研究代表者が甲信サブユニットセンター長として、平成 31 年度から開始した当該地域の学童期のエコチル調査参加者を対象とした調査である。エコチル調査では、8 歳時のコンピュータを使った精神神経発達検査を実施することから、エコチル調査に併せ、当該センターで独自に 0 歳時の毛髪中の金属、微量元素を測定した。精神神経発達検査結果の利用は、エコチル調査においてデータ固定完了後に利用できるため、現時点では、当該調査に際し独自に実施した、高機能自閉症スペクトラム・スクリーニング質問紙⁸⁾ (ASSQ) から得られたスコアを用い、毛髪中金属、微量元素との関連を評価した。

(3) 症例対照研究

症例対照研究は、神経発達症患者を症例群、神経発達症患者の兄弟姉妹を対照群とした症例対照研究である。対象者は研究期間中に小児を対象とした 1 医療施設の神経内科を受診した患者をリクルートした。コロナ禍での患者受診が圧倒的に減少したため、当初の目標数が困難であり、最終的に症例群 18 例、対照群 5 例をリクルートし、症例群と対照群における毛髪中金属、微量元素濃度を比較した。

4. 研究成果

(1) 多元素同時測定法の確立

生体内金属、微量元素と神経発達症との関連を調べるため、生体試料の前処理および測定手法について検討し、毛髪および血液試料の多元素同時測定法を確立した (表 1)。

検討した測定項目は、クロム (Cr)、Mn、鉄 (Fe)、コバルト (Co)、ニッケル (Ni)、銅 (Cu)、亜鉛 (Zn)、ヒ素 (As)、セレン (Se)、カドミウム (Cd)、Pb、Hg であった。血液試料の測定について、Cr 以外の測定項目が外部認証を受けた。

表 1. ICP-MS を用いた毛髪中の元素測定の概要 (μg/g)

項目	質量数	セルガス	塩酸添加	LOQ [§]	< LOQ (%) ^{**}
Mn	55	-	-	0.06	50.5
Fe	56	H ₂	-	4	42.0
Co	59	-	+	0.002	46.0
Ni	60	-	-	0.1	29.7
Cu	63	-	-	0.1	0.0
Zn	66	He	-	4	0.5
As	75	He	-	0.002	0.0
Se	78	He	-	0.2	54.0
Cd	111	-	-	0.001	16.0
Pb	208	He	-	0.075	6.8
Hg	201	-	+	0.002	1.0

[†] 変動係数は、標準偏差÷平均値で算出した。

[§] 定量下限 (LOQ) は、ブランクの 10σ とした。

^{**} 解析対象 424 例のうち、測定値が定量下限未満の割合

(2) 出生コホートにおける調査

解析対象者は神経発達症の診断がない 381 例、診断がある 43 例だった。ASSQ スコアのカッ

トオフ値(19点)未満の解析対象者が400例、ASSQカットオフ値以上の解析対象者が24例だった(表2)。毛髪中元素濃度との比較において、ASSQスクリーニング陽性(カットオフ ≥ 19)の男児は、毛髪中のMnおよびCo濃度が低い傾向があった(表3)。

既存の報告⁶⁾では、Mnは水や大気が曝露源となっており、フルスコアIQ(特に言語領域)と負の関連が認められているが、本研究より毛髪中濃度は高濃度だった。Mnはマンガンスーパーオキシドジムスターゼ等の酵素に関与しており、欠乏症は成長障害をきたす⁹⁾。また、CoはビタミンB₁₂の構成元素であり、欠乏症は脳の白質障害、末梢神経障害がおこる¹⁰⁾。栄養成分として、Mnは藻類や穀類、ビタミンB₁₂は魚介類に多く、MnおよびCoの欠乏は神経発達症の悪化に影響する可能性が示唆された。

表2. ASSQスコアと医師の診断

	ASSQスコア		p値
	<19	19	
男児			
神経発達症の診断			
なし	166 (90.2)	9 (45.0)	<0.001
あり	18 (9.8)	11 (55.0)	
女児			
神経発達症の診断			
なし	203 (94.0)	3 (75.0)	0.233
あり	13 (6.0)	1 (25.0)	

表3. ASSQスクリーニング陽性(カットオフ19)に対する毛髪中元素濃度の性別ごとの比較

測定項目 ($\mu\text{g/g}$)	ASSQスコア								p値†
	<19				19				
	度数	平均値	標準偏差	中央値	度数	平均値	標準偏差	中央値	
男児									
Mn	184	0.94	1.89	0.10	20	0.36	1.07	0.04	0.052
Fe	184	103	193	14	20	84	229	3	0.210
Co	184	0.072	0.190	0.013	20	0.031	0.094	0.001	0.052
Ni	184	4.7	9.9	0.8	20	8.7	31.5	0.7	0.952
Cu	184	27.2	26.1	18.0	20	27.7	23.3	25.4	0.412
Zn	184	238	184	190	20	248	349	160	0.728
As	184	0.195	0.768	0.111	20	0.135	0.143	0.092	0.751
Se	184	0.4	0.5	0.1	20	0.3	0.4	0.1	0.302
Cd	184	0.077	0.526	0.010	20	0.025	0.036	0.010	0.675
Pb	184	1.75	2.10	1.03	20	1.72	2.05	1.19	0.839
Hg	184	3.828	2.828	3.132	20	3.430	2.195	2.845	0.839
女児									
Mn	216	0.80	2.21	0.04	4	0.52	0.89	0.10	0.976
Fe	216	84	169	11	4	65	102	20	0.601
Co	216	0.045	0.107	0.012	4	0.036	0.030	0.034	0.612
Ni	216	3.8	7.1	1.1	4	2.0	0.9	1.9	0.907
Cu	216	35.0	31.9	24.9	4	43.8	21.9	49.5	0.322
Zn	216	243	193	192	4	268	87	226	0.251
As	216	0.112	0.103	0.082	4	0.111	0.069	0.100	0.896
Se	216	0.4	0.4	0.1	4	0.3	0.3	0.1	0.794
Cd	216	0.023	0.066	0.009	4	0.022	0.018	0.015	0.323
Pb	216	1.51	1.79	0.94	4	1.11	0.77	0.91	0.849
Hg	216	3.582	2.558	3.032	4	2.215	1.696	1.580	0.163

†、開始シード1487459085を伴う10000サンプルテーブルに基づくモンテカルロ有意確率

(3) 症例対照研究

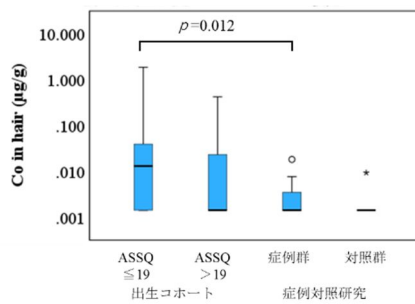
症例群は18例(男15例、女3例)で平均年齢9.2(範囲6-12)歳だった。対照群5例(男1例、女4例)で平均年齢7.2(範囲5-11)歳だった。症例群は、神経発達症について、自閉スペクトラム症、注意欠如多動症、限局性学習症、知的能力障害、発達性協調運動症の単一または重複した診断を受けていた(各々の症例数はのべ16例、9例、3例、4例、4例)。症例群と対照群の間には毛髪中の元素濃度に有意な差はなかった。

症例対照研究と出生コホートとの毛髪中の元素測定値の比較を示した(図1)。症例対照研究の集団は、出生コホートの集団と比し、毛髪中のCo、Hg、Cd、Niが低く、Mn、Seが高かった。その他の元素は有意な差が見られなかった。

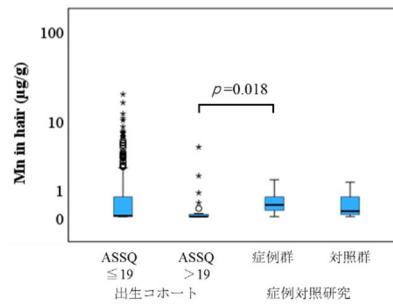
症例対照研究の対象者の背景要因を確認したところ、Se含有シャンプーの使用はなく、毛髪採取前3か月間の下痢症状の有無、対象者の周囲における喫煙の有無についての比較では、有意な差はみられなかった。たばこは、Pb、Cd、Co、Mn等の曝露源の一つであるが、喫煙あり3例でいずれも子どもへの曝露を配慮していたため、影響がみられなかったと考えられる。一方で、神経小児科での処方された薬がある場合、毛髪中Hgが有意に高かった($p=0.019$)。処方薬は、コンサータ、ストラテラ、エビリファイ、メラトベル、酸化マグネシウムだった。通常、医薬品には有害物質は含まれないため、処方薬を必要とする症例が水銀曝露を受けやすい環境にいる可能性、水銀曝露を受けているので、処方薬を必要とするような症状をきたすことが考えられた。また、偏食がある場合、毛髪中SeおよびCdが有意に低かった(各々 $p=0.043$ 、 $p=0.024$)。食生活や水環境の違いが考えられた。また、測定した毛髪中金属、微量元素濃度は居住地や社会経済的状況により異なる傾向がみられた。今後、これらの交絡要因を考慮した検討の必要性がある。

本研究は、いずれの調査も横断研究であり、症例対照研究においてはサンプルサイズが限られたため、結果の解釈に注意が必要である。しかしながら、本研究により、当該地域における8歳時点の学童期調査参加者の毛髪中の金属、微量元素濃度が明らかになった。エコチル調査の出生コホートについては、本研究結果をベースラインとし、縦断研究として、今後継続して追跡調査し、毛髪中の元素と神経発達症の因果関係を明らかにする。

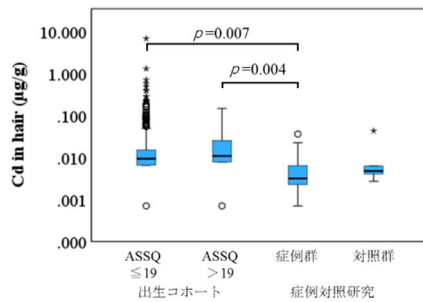
A) コバルト



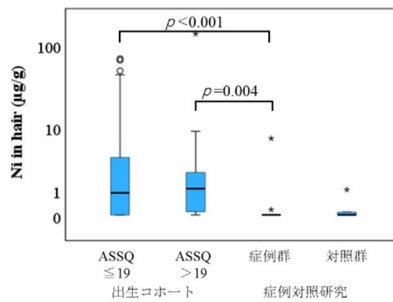
B) マンガン



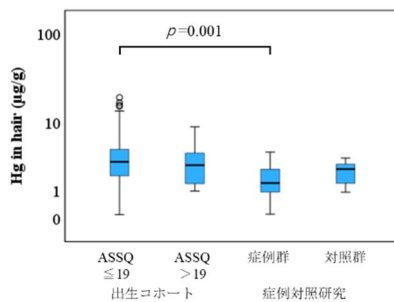
C) カドミウム



D) ニッケル



E) 水銀



F) セレン

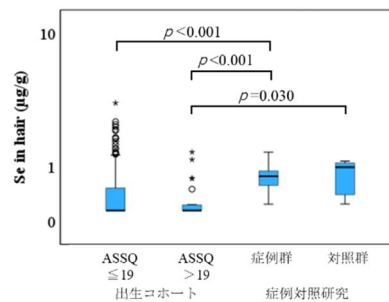


図1. 症例対照研究とエコチル追加調査の毛髪中の元素測定値の比較(続き)
各群の分布について、クラスカルウォリス検定により比較した。p値はボンフェローニ調整した。

<引用文献>

- 1) Willcutt EG et al. The prevalence of DSM-IV attention-deficit/hyperactivity disorder: a meta-analytic review. *Neurotherapeutics*. 2012 Jul;9(3):490-499.
- 2) Li C et al. Lead exposure suppressed ALAD transcription by increasing methylation level of the promoter CpG islands. *Toxicol Lett*. 2011 May 30;203(1):48-53.
- 3) De Rubeis S et al. Synaptic, transcriptional and chromatin genes disrupted in autism. *Nature*. 2014 Nov 13;515(7526):209-215.
- 4) Huang, S et al. Childhood Blood Lead Levels and Symptoms of Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD): A Cross-Sectional Study of Mexican Children. *Environ. Health Perspect*. 2016, 124, 868-874.
- 5) Yoshimasu et al. A meta-analysis of the evidence on the impact of prenatal and early infancy exposures to mercury on autism and attention deficit/hyperactivity disorder in the childhood. *Neurotoxicology* 2014, 44, 121-131.
- 6) Rodriguez-Barranco, M et al. Association of arsenic, cadmium and manganese exposure with neurodevelopment and behavioural disorders in children: A systematic review and meta-analysis. *Sci. Total Environ*. 2013, 454, 562-577.
- 7) Menezes-Filho JA et al. Manganese exposure and the neuropsychological effect on children and adolescents: a review. *Rev Panam Salud Publica*. 2009 26:541-548.
- 8) 井伊智子、林恵津子、廣瀬由美子、東條吉邦、高機能自閉症スペクトラム・スクリーニング質問紙 (ASSQ) について、自閉症と ADHD の子どもたちへの教育支援とアセスメント 39-45, 2003
- 9) マンガン (Mn)、日本人の食事摂取基準 (2015年版)、菱田明、佐々木敏監修、初版第2刷、第一出版、東京、pp.303-305. 2014
- 10) ビタミン B₁₂、日本人の食事摂取基準 (2015年版)、菱田明、佐々木敏監修、初版第2刷、第一出版、東京、pp.211-214. 2014

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Atagi T, Hasegawa K, Motoki N, Inaba Y, Toubou H, Shibazaki T, Nakayama FS, Kamijima M, Tsukahara T, Nomiya T, the Japan Environment, Children's Study (JECS) Group.	4. 巻 240
2. 論文標題 Associations between prenatal exposure to per- and polyfluoroalkyl substances and wheezing and asthma symptoms in 4-year-old children: The Japan Environment and Children's Study.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Environ Res	6. 最初と最後の頁 117499
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.envres.2023.117499	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Motoki N, Inaba Y, Toubou H, Hasegawa K, Shibazaki T, Tsukahara T, Nomiya T; Japan Environment and Children's Study (JECS) Group.	4. 巻 23
2. 論文標題 Impact of dog and/or cat ownership on functional constipation at 3 years of age: the Japan Environment and Children's study.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 BMC Pediatrics	6. 最初と最後の頁 595
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12887-023-04412-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Motoki N, Inaba Y, Toubou H, Hasegawa K, Shibazaki T, Tsukahara T, Nomiya T; Japan Environment and Children's Study (JECS) Group.	4. 巻 18
2. 論文標題 Impact of breastfeeding during infancy on functional constipation at 3 years of age: the Japan Environment and Children's Study.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Breastfeeding Journal	6. 最初と最後の頁 57
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13006-023-00592-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	當房 浩一 (Toubou Hirokazu) (10741027)	信州大学・学術研究院医学系・助教 (13601)	

6. 研究組織（つづき）

	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 分 担 者	稲葉 雄二 (Inaba Yuji) (30334890)	信州大学・医学部・特任教授 (13601)	
研究 分 担 者	塚原 照臣 (Tsukahara Teruomi) (50377652)	信州大学・医学部・教授（特定雇用） (13601)	

	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	竹内 史穂子 (Takeuchi Shihoko)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関