

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：33303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659306

研究課題名(和文)ダイオキシンによる発達障害児のメタボロミクス研究

研究課題名(英文) A metabolomics study of children with neurodevelopmental problems due to dioxin exposure

研究代表者

中川 秀昭 (NAKAGAWA, Hideaki)

金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号：00097437

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：ベトナムのダイオキシン汚染地域に在住する3歳児について、自閉症尺度ASRSを用いて調査を行い、高四塩化ダイオキシン(TCDD)暴露群のASRS得点が高く、自閉症傾向があることが考えられた。そこで、GC/MSにより尿メタボローム解析を行い、判別分析性を行った結果、尿中ヒスチジンやトリプトファンが高TCDD群と低TCDD群を判別するのに有用な指標であることが明らかとなった。また、新たなコホートを立ち上げ、6か月検診時に採取した68検体の尿中のこれらのアミノ酸を、HPLCにより測定したが、母乳中ダイオキシンと有意な関係は得られなかった。今後、長期の追跡調査と多くの対象者の尿採取が必要である。

研究成果の概要(英文)：In a hot spot of dioxin contamination in Vietnam, we examined social emotional behaviors by autism spectrum rating scale (ASRS) of 3-year-old children and found that the high TCDD exposed group showed higher ASRS scores as compared with the lower exposed groups, suggesting autistic traits. Then, we analyzed urinary metabolomes of the high TCDD group and age and gender matched low exposure groups and detected candidate compound to discriminate these high and low TCDD groups. Urinary histidine and tryptophan were selected for good negative markers and significant decreased levels of these amino acids were observed in the high TCDD group. However, no significant correlation was observed between dioxin levels in breast milk and urinary levels of histidine and tryptophan in 68 6-month-old infants living in another hot spot in Vietnam. They might be too young to detect alteration of urinary amino acids. We need to follow-up them for longer time and collect more number of urine specimens.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：ダイオキシン メタボロミクス 尿検査 脳神経発達 自閉症スペクトラム障害 早期指標 ベトナム

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病やパーキンソン病、統合失調症等の中枢神経系疾患についても、その疾患に特異的な尿中代謝物の排泄パターンが存在することが、GC/MS 等による尿や血清のメタボローム解析により、明らかにされてきており、各疾患に特異的なバイオマーカーとして、疾患の分類や早期発見に利用されるようになってきている。小児の神経系疾患についても、非侵襲的で実施しやすい検査であることから、自閉症児においても尿メタボローム解析が行われ、ニコチン酸代謝経路の変異があり、N-メチル-2ピリジン-5カルボキシアミドの尿中排泄が増加していることが、イギリスの研究グループにより報告されている。また、タウリンの排泄が多く、グルタメートの排泄が少ないという特徴もあり、アミノ酸代謝にも変異があることが示唆されている。しかし、オーストラリアの研究者は、自閉症児の尿中アミノ酸排泄がコントロールに比べ少ないことを報告しており、自閉症のバイオマーカーについての結論はまだ得られていない。また、自閉症以外の発達障害についての解析は行われていない。

これまでに、ベトナム現地行政および医療関係者と合同調査チームを編成して、汚染地を含む2つの地区でコホートを立ち上げ、母乳ダイオキシン濃度および出生児の脳神経発達を1歳まで追跡調査することができた。その結果、母乳中ダイオキシン濃度が高く、周産期のダイオキシン曝露が多い出生児ほど身体的成長が小さいことや、母乳中ダイオキシン濃度が4ヶ月齢における繊細な運動機能および認知機能や1歳時における表出言語や社会情動行動の発達と負相関を示すことなどを明らかにしてきた。また、3歳時に同じ対象者について、自閉症スペクトラム指数調査 ASRS を用いて、自閉症傾向と母乳中ダイオキシン濃度の関連について検討し、ダイオキシン高度曝露群の自閉症傾向が低曝露群に比べ強く、ダイオキシン曝露と発達障害との関連性が示唆されており、尿メタボロームにも自閉症児に近似した所見があることが予想される。

2. 研究の目的

これまでの調査で把握したダイオキシン曝露による発達障害児(3歳児)について、尿メタボローム解析を行い、同じ地域に居住するが、母乳中ダイオキシン濃度の低い発達の良好な3歳児との代謝物パターンの比較を行ない、発達障害の指標となり得るバイオマーカーを検索する。この時、ダイオキシンの曝露指標としては、認知、言語、運動など一般的な脳神経発達に影響を及ぼしている総毒性指数(TEQ)と、自閉症傾向を増強させることが示唆されている2,3,7,8-四塩化ダイオキシン(TCDD)を用いる。さらに、別のベトナムのダイオキシン周産期曝露を受けた小児コホートにおいて、生後6カ月時に採

尿を行い、先の3歳児の検討で得た尿メタボロームマーカーを測定し、周産期曝露の指標である母乳中ダイオキシン濃度や、6カ月時点での脳神経発達とバイオマーカーとの関連性を検討し、発達障害の早期発見のための指標となる可能性を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

これまでに母乳中ダイオキシンを指標として曝露量を推定し、出生後から4ヶ月、1歳時にベリー乳幼児発達尺度を用いて脳神経発達を追跡調査してきた、ベトナム、ダナン市ダイオキシン高濃度汚染地区の出生児で、3歳時追跡調査に参加した122名について、調査時に採取した尿を保存してあった。また、この3歳時調査では、ベリー乳幼児発達尺度や指数調査 ASRS を行っているため、母乳中ダイオキシンの総 TEQ が 17.6 TEQ-pg/gfat 以上であり、ベリー尺度の認知や微細運動の点数が低く、脳神経発達への影響があると考えられる高 TEQ 曝露群 16 名(男女児各 8 名)を抽出した。その性、年齢、身体計測値をマッチさせたコントロールとして低 TEQ 曝露で正常発達である 16 名を選び、合計 32 名の保存尿を GC/MS により尿メタボローム解析を行い、得られたクロマトを標準化した後、SIMCA-P+にて OPLS-DA 解析を行い、高 TEQ 曝露群と低 TEQ 曝露群を最もよく判別する代謝マーカーを選定した。同時に、内部標準を尿検体に加え、定量解析も行い、クレアチニン補正した定量値や代謝物間の比を用いた相対濃度の 2 群間での比較を行った。また、同様、TCDD が高く、ベリー尺度の言語の点数低い TCDD 高曝露群(TCDD3.5 pg/gfat 以上)8 名(男女児各 4 名)と、それに性年齢のマッチした低 TCDD 群 6 名についても OPLS-DA 解析を行った。

次に、3歳児調査で、ダイオキシンによる発達障害のよい指標となることが期待される代謝物が、尿中必須アミノ酸であったため、新たにベトナム、ビエンホア市で立ち上げたダイオキシン汚染地域で出生した小児コホートの内、生後6カ月の時点で尿を採取得た68名について、尿中のアミノ酸を HPLC 法にて解析した。また、その分析結果を母乳中ダイオキシン濃度やベリー乳幼児発達尺度との相関を検討し、3歳児尿で認められた尿中アミノ酸の変化が、6カ月時点でも認められるか否かについて統計解析を行った。

4. 研究成果

尿中メタボローム解析では、高 TEQ 曝露群と低 TEQ 曝露群を判別する陽性マーカーはクレアチニンであり、陰性マーカーはヒスチジンとトリプトファンであった。また、定量分析では、ヒスチジンとトリプトファンに加え、リジン、グリシン、グルタミン、タウリンの6種のアミノ酸について、クレアチニン補正して、高 TEQ 曝露発達障害群と低曝露正常発

達群の2群間で幾何平均値を比較したところ、高TEQ暴露発達障害群のヒスチジンが有意に低かった。また、排泄量が多く、これまでに発達障害児の尿中アミノ酸で変化の報告のない、グリシンと各アミノ酸の比をとって、2群間で比較したところ、高TEQ暴露発達障害群のヒスチジンとトリプトファンのグリシン比が有意に低かった。

さらに、高TCDD暴露群8名(男児4名、女児4名)と低TCDD暴露群6名(男児3名、女児3名)を判別する代謝物マーカーを検討した。その結果、低TCDD群と高TCDDを判別する陽性マーカーは認められず、負のマーカーとして、グルタミン、リジン、ヒスチジン、トリプトファンが選ばれた。また、定量分析により、これらのアミノ酸の幾何平均値を比較したところ、クレアチニン比では、ヒスチジンとトリプトファンが2群で有意の差は認められた。また、グリシン比では、高TCDD群のリジン、ヒスチジン、トリプトファンが、低TCDD群に比べ有意に低かった。

次に、このヒスチジンやトリプトファンの排泄低下が、TCDDによるものなのか、発達が悪いことによるものなのかを検討するために、TCDDは低いがベリースコアの低い4名(低TCDD障害群:男児2名、女児2名)を加え、高TCDD障害群、低TCDD障害群、低TCDD正常発達群の3群間で、アミノ酸の定量分析値の比較を一元配置分散分析を用いて行った。その結果、高TCDD障害群のヒスチジンのクレアチニン比とグリシン比が最も低く、低TCDD正常群との間で有意な差が認められた。このことは、ヒスチジンの排泄低下が、発達の遅れの有無ではなく、TCDD暴露と関連していることが示唆されたと考えられた。

以上のことから、総ダイオキシンTEQ暴露レベルが高い小児では、グリシンに比べ、ヒスチジンの排泄が少なく、TCDDが高い者についても、ヒスチジンの排泄が低下していることが明らかとなった。このことは、ヒスチジンのグリシン比が、ダイオキシンによる発達障害の尿中バイオマーカーとして有用である可能性を示唆するものと考えられる。

さらに、GC/MSにて定量分析した32検体において、ヒスチジンのグリシン比とTCDDおよび総TEQとの間には有意な負の相関があったが、ベリー発達尺度の認知、言語、運動能力の得点との間には正の相関が認められることや、性差などもアミノ酸の排泄に影響があると考えられることから、ヒスチジン、トリプトファンのグリシン比を目的変数とし、TCDDあるいは総ダイオキシン毒性指数との関連を、児の月齢、出産歴、性別、ベリー発達尺度の運動得点を共変量として、重回帰分析を行った。その結果、TCDDおよび総TEQは共に、ヒスチジンおよびトリプトファンのグリシン比に有意な負の関連を示し、ダイオキシンの上昇に伴い、これらのアミノ酸の排泄が低下することが、交絡因子を調整しても認められた。

ヒスチジンはヒスタミンの前駆物質であり、ヒスタミンは神経伝達物質の一つであることから、尿中のヒスチジンの減少は、体内におけるヒスタミンの増加に伴うものと考えられる。また、ヒスタミンの増加はアレルギー反応も引き起こす可能性を示唆しており、本研究の対象児では、アトピー性皮膚炎や喘息などは認められなかったものの、以前より指摘されているダイオキシンとアレルギーとの関連性についても示唆するものと考えられた。また、トリプトファンは、セロトニンの前駆物質であり、自閉症児では、セロトニンが過剰になることで、感情のコントロールが不安定になり、症状が悪化することが報告されている。尿中の排泄減少は、体内でのセロトニン産生増加によるトリプトファンの減少を反映していると考えられ、TCDD暴露による自閉症傾向によるアミノ酸代謝の変化を示唆しているものと思われた。

次に、ビエンホア市で立ち上げたダイオキシン汚染地域で出生した小児コホートで6カ月検診を受診した186名について、ベリー発達尺度を測定し、母乳中TCDD濃度が3.5 pg/g fatであった44名を高TCDD暴露群、それ未満であった142名を低TCDD暴露群として、この2群間での認知、言語、運動機能のスコアの相違を出生時体重や在胎週数などの交絡因子を調整して検討した。その結果、高TCDD暴露群の受容言語、微細運動が有意に低く、総言語スコアも有意に低かった。このことから、TCDD暴露は、乳児期のコミュニケーションや微細運動に影響を与えていることが示された。なお、ビエンホア市コホートの母乳中ダイオキシンは、経産婦も初産婦と同様に、TCDDの総ダイオキシンTEQに占める割合が25%と高く、総TEQはダナン市より低いことが、ダナン市コホートと異なる点である。

このビエンホア市コホートの6カ月時検診受診者の内、尿を十分量採取できた68名について、ダナン市の3歳児尿の分析結果を踏まえ、HPLC法にて、尿中アミノ酸の定量分析を行った。しかし、母乳中ダイオキシンレベルとは有意な相関は認めず、6か月の現時点では、まだ、明らかな尿所見を示すまでに至っていないことが示唆された。また、TCDDが3.5 pg/g fat以上の児は16名であり、脳神経発達スコアの低下も有意な傾向を認めるのみであり、調査数が少ないことも明らかな結果を得られない一因であることが推察された。

今後、観察期間を延長し、脳神経発達や自閉症傾向などの所見が明らかになる前に、これらの尿中アミノ酸の排泄に変化が生じるか否かについて、全数について検討する必要があると考えられた。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

西条旨子、Tai PT, Anh NTN, Tran Ngoc Nghi
中川秀昭、城戸照彦、西条寿夫：ベトナムの
高汚染地域に居住する3歳児におけるダイオ
キシン暴露と自閉症傾向。第84回日本衛生
学会総会2014年5月27日、岡山コンベンシ
ョンセンター(岡山市)

Nghi NN, Manh HD, Tai PT, Nishijo M, Anh
NTN, Maruzeni S, Nakagawa H, Kido T,
Nishijo H. High TCDD levels in breast milk
of mothers living in a dioxin hot spot in
Bien Hoa city, Vietnam. 第84回日本衛生
学会総会2014年5月27日、岡山コンベンシ
ョンセンター(岡山市)

Nishijo M, Nghi TN, Manh HD, Tai PT, Anh
NTN, Vu PHA, Nguyen NT, Hung NX, Hoan HM,
Hai HC, Nishijo H, Hai-Anh T, Luong HV,
Kido T, Okamoto R, Son LK, Nakagawa H:
Dioxin concentration in breast milk of
primipara mothers in Bien Hoa, a hot spot
area in Vietnam - A preliminary study in
2012 - . 33rd international Symposium on
Halogenated Persistent Organic pollutants,
2013年8月27日、大邱(韓国)

Tai PT, Nishijo M, Anh NTN, Maruzeni S,
Nakagawa H, Luong HV, Anh TH, Nhat TV,
Thanh TT, Phuong PT, Son LK, Morikawa Y,
Kido T, Nishijo H: Perinatal dioxin
exposure and neurodevelopment of children
aged 3 years - A follow up study in Vietnam.
33rd international Symposium on
Halogenated Persistent Organic pollutants,
2013年8月29日、大邱(韓国)

Nguyen Thi Nguyet Anh, Pham The Tai,
Nishijo M, Maruzeni S, Anh TH, Dam N, Luong
HV, Morikawa Y, Nakagawa H, Nishijo H.
Relationships between food intake and
dioxin concentrations in breast milk of
mothers living in a hot spot of dioxin
contamination in Vietnam. 第83回日本衛生
学会総会, 金沢市2013年3月26日

Tran Ngoc Nghi, Pham The Tai, Nguyen Thi
Nguyet Anh, Maruzeni S, Nishijo M, Honda
R, Nishijo H, Morikawa Y, Nakagawa H.
Effects of perinatal exposure to dioxins
on neurodevelopment in Vietnamese
children at 3 years of age. 第83回日本衛
生学会総会, 金沢市2013年3月26日

西条旨子、Pham The Tai, Nguyen Thi Nguyet
Anh, Tran Ngoc Nghi, 丸銭笑子, 中川秀昭,
森河裕子, 岡本理恵, 城戸照彦, Hoang Van
Luong, Tran Hai Anh, Phan Thanh Phuong,
西条寿夫。ダイオキシン環境曝露の出生児
の脳神経発達に与える影響：ベトナムにおけ
る小児コホート3年間の追跡。第23回日本
疫学会学術総会, 吹田市2013年1月26日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中川 秀昭 (NAKAGAWA, Hideaki)
金沢医科大学・医学部・教授
研究者番号：00097437

(2) 研究分担者

西条 旨子 (NISHIJO, Muneko)
金沢医科大学・医学部・准教授
研究者番号：40198461

(3) 連携研究者

森河 裕子 (MORIKAWA, Yuko)
金沢医科大学・看護学部・教授
研究者番号：20210156

中村 幸志 (NAKAMURA, Kousi)
金沢医科大学・医学部・准教授
研究者番号：80422898

櫻井 勝 (SAKURAI, Masaru)
金沢医科大学・医学部・准教授
研究者番号：90397216