

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：13601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893103

研究課題名(和文) 周産期微細脳障害による発達障害の発症予測と予防方法の開発

研究課題名(英文) Prediction of pathogenesis and method of prevention of developmental disorder by minimal brain damage during the perinatal period.

研究代表者

三澤 由佳 (MISAWA, Yuka)

信州大学・医学部・助教(受託研究)

研究者番号：10738644

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：周産期微細脳障害による神経発達障害を検証するため、1歳半健診でのM-CHAT重要6項目中の不通過項目の有無、18か月での独歩開始の有無、有意語出現の有無をアウトカムとして、臍帯血中の神経障害バイオマーカーとサイトカインについて検討した。M-CHAT不通過項目あり群でMMP-9/TIMP-1とIL-17が有意に上昇していた。有意語なし群でもTIMP-1が有意に低下しIL-17が上昇していた。TIMP-1は血液脳関門障害因子のMMP-9の内因性阻害因子であり、周産期の血液脳関門の軽微な障害とIL-17を介した炎症が18か月での言語と社会性の発達に影響する可能性が示された。今後も発達を追跡する。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to clarify the association between perinatal minimal brain damages and their developments which were estimated by Modified Checklist for Autism in Toddlers (M-CHAT), motor and speech development at the age of 18 months. The perinatal minimal brain damages were evaluated by pNf-H, TIMP-1, MMP-9 and several inflammatory cytokines which were obtained from stored cord blood samples. In the "not-passed" group of M-CHAT, MMP-9/TIMP-1 and IL-17 levels were significantly higher than the "passed" group. TIMP-1 levels were significantly lower and IL-17 levels were higher in the delayed speech development group than the normal one. TIMP-1 is inhibitor of MMP-9 that is hindrance factor of blood brain barrier. These results showed that the social and speech development at the age of 18 months were influenced by the minimal injury of blood brain barrier and inflammation mediated by IL-17.

研究分野：小児保健

キーワード：発達障害 周産期脳障害 周産期ストレス バイオマーカー サイトカイン

## 1. 研究開始当初の背景

(1)自閉症スペクトラム障害(ASD)、注意欠如・多動性障害(AD/HD)、知的障害、学習障害等の総称である神経発達障害は近年増加している。その背景に、社会的認知の高まりと、診断技術の進歩が影響している可能性があるが、これらを考慮しても増加は明らかで、大きな社会問題の一つとなっている。特に、知的障害を伴わない神経発達障害児は、普通学級に在籍する児童の約6.4%に上るとの文部科学省の報告がある。これら児童は適応障害をきたしやすく、精神的ストレスに脆弱で精神疾患発症のリスクも高いとされる。他の国でも増加の一途をたどっており、この問題は精神医学的、予防医学的、医療経済学的、そして社会・教育学的にも、全世界において解決すべき喫緊の課題である。

(2)神経発達障害の原因は、遺伝医学的な側面と胎児期および周産期の環境の両面が関与しているとされている。近年、研究技術の進歩により遺伝医学的研究が進み、SHANK3やCADPS2等の神経系に発現する遺伝子とDNAメチル化修飾因子などの転写に関与する遺伝子群が発症に関与する候補遺伝子として明らかにされつつある。その一方、周産期及び胎内環境の異常やストレスが神経発達障害の原因となりうるという傍証はあるものの、明確なエビデンスを示した報告は少ない。

(3)周産期の環境による微細な脳障害が発達に及ぼす影響を詳細に検証した報告は少ない。その理由として、軽微な神経学的障害は画像診断で検知することが難しいことと、アウトカムである児の神経発達障害を評価する縦断的観察体制の構築が困難であったことが挙げられる。近年、周産期の脳障害を検知する方法として画像診断によらない高感度のバイオマーカーが開発され、その有用性が示されている。phosphorylated Neurofilament-H (pNf-H)、Matrix Metalloproteinase 9 (MMP-9)、Tissue Inhibitor of Metalloproteinases 1 (TIMP-1)などである。これらにより、中枢神経系を構成するどの細胞成分の障害が存在するののかの実証が可能である。研究代表者らは、少数例についてこれらのバイオマーカーを解析し、画像上明らかな異常のない患者でも異常値となっていることから、感度の高さと臨床的有用性を見出してきた。さらに、免疫学的指標として、各種炎症性サイトカインをフローサイトメトリーにより測定することで、どのような炎症が局所で作用しているのかを明らかにすることが可能である。

## 2. 研究の目的

市町村の1歳半検診で独歩未、有意語未出現等の発達の遅れを指摘された小児の出生時のバイオマーカーについて、遅れを指摘されなかった群と比較検討することにより、様々な周産期ストレスが、神経軸索、血液脳関門のどのレベルでの微細脳障害を起こしうる

か、その結果どのような発達障害を発症しうるかを明らかにする。さらにその障害にサイトカインや免疫担当細胞が関与するかどうかを検討する。これらの結果は、周産期の診療情報と合わせて解析することによって医療現場へフィードバックされ、急増している発達障害の予防の一つの手立てになりうると思われる。

## 3. 研究の方法

### (1)調査対象

本調査は、こどもの健康と環境に関する全国調査(エコチル調査)の、信州サブユニットにおける追加調査として行った。2013年8月から2014年5月までに伊那中央病院で出生した児のうち、以下の条件を満たした児、227名を対象とした。

あらかじめ本研究参加の保護者の同意が得られ、分娩時臍帯血を採取し24時間以内に血清分離後、冷凍保存できた児。

1歳半健診のデータ取得に保護者が同意された児。

### (2)調査方法

分娩時に臍帯血を採取し、速やかに血清を遠心分離し、-30℃で測定時まで保存した。

保存血清を用い、以下の神経障害バイオマーカーをELISAキットを用いて測定した。測定はそれぞれのキットのマニュアルに従った。

なお、pNf-Hは神経軸索障害マーカー、MMP-9は中枢神経系の炎症時に破綻するとされている血液脳関門の障害因子、TIMP-1はMMP-9の内因性阻害物質である。

pNf-H: BioVender社 Human Phosphorylated Neurofilament H ELISA

MMP-9: GE Healthcare社 Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9),

Human, Biotrak ELISA System

TIMP-1: R&Dsystem社 Human TIMP-1

Quantikine ELISA Kit

保存血清を用い、サイトカイン(IL-2、IL-4、IL-6、IL-8、IL-10、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-17A)をCytometric Bead Array法にて測定した。

対象児の1歳半健診の以下のデータを市町村より取得した。検診日、日本語版M-CHAT(乳幼児期自閉症チェックリスト)による評価、独歩開始時期、有意語出現の有無と語彙数、医師診察所見など。

上記のデータをを用い、統計解析を行った。

### (3)統計解析

1歳半健診時のM-CHAT重要6項目について、不通過項目がない群と1項目以上ある群の2群に分けて比較検討した。独歩開始時期を18か月未満と18か月時点で未獲得の2群に分けて比較検討した。1歳半健診時の有意語出現の有無について、なし群とあり群の2群に

分けて比較検討した。群間比較には、カイ二乗検定または Mann-Whitney の U 検定を用いた。全ての統計解析は、有意確率 5%未満を有意とした。統計ソフトは IBM SPSS Statistics 23 を用いた。

(4)倫理的配慮

対象児の臍帯血の保存および使用、1 歳半健診のデータの取得および使用は保護者に説明した上、同意を取得した。本研究は信州大学医学部医倫理委員会の承認を得て実施した。

4. 研究成果

(1)対象児の概要

表 1. 対象児の男女内訳

	男	女	計	
n(%)	122(53.7)	105(46.3)	227	p=0.259

男女の内訳は、男児 122 名、女児 105 名であった。

表 2. 1 歳半健診時の月齢

	17か月	18か月	19か月	20か月	21か月	計
n(%)	3(1.3)	120(52.9)	94(41.4)	9(4.0)	1(0.4)	227

1 歳半健診時の月齢は、17 か月から 21 か月であった。平均 18.5 か月。

表 3. 1 歳半健診時の M-CHAT 重要 6 項目の不通過数

M-CHAT重要6項目不通過数	0	1項目以上	計	
n(%)	214(94.3)	13(5.7)	227	
		1	2	3
n(%)		9(4.0)	3(1.3)	1(0.1)

1 歳半健診時の M-CHAT 重要 6 項目のうち、不通過が 1 項目以上あった児は 13 名(5.7%)であった。

表 4. 独歩開始時期

独歩の時期	18か月前	18か月以降	計
n(%)	220(96.9)	7(3.1)	227

独歩の開始時期が 18 か月より前であった児は 220 名、18 か月時点で未獲得の児は 7 名(3.1%)であった。

表 5 1 歳半健診時の有意語出現の有無

健診時有意語の有無	あり	なし	計
n(%)	212(93.4)	15(6.6)	227

1 歳半健診時に有意語がみられなかった児は 15 名(6.6%)であった。

表 6 1 歳半健診時の有意語数

健診時有意語数	5語以上	4語以下	計
n(%)	150(66.1)	77(33.9)	227

1 歳半健診時に有意語が 5 語以上みられた児は 150 名(66.1%)であり、4 語以下の児は 77 名(33.9%)であった。

(2)1 歳半健診時の M-CHAT 重要 6 項目とバイオマーカー、サイトカインの関連

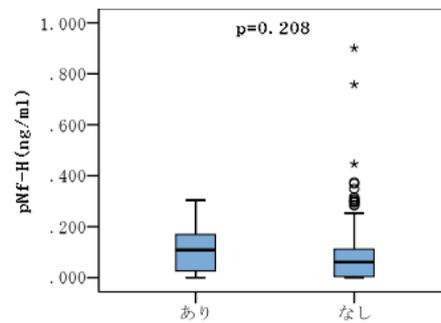


図1 M-CHAT重要6項目中不通過項目の有無と臍帯血清pNf-H値

M-CHAT重要6項目中不通過項目ありの群では  $0.108 \pm 0.091$  ng/ml、なしの群では  $0.085 \pm 0.112$  ng/ml (平均  $\pm$  標準偏差、以下同様)、であった (図1)。両群の出生時臍帯血清中の pNf-H 濃度に、有意差はみられなかった。

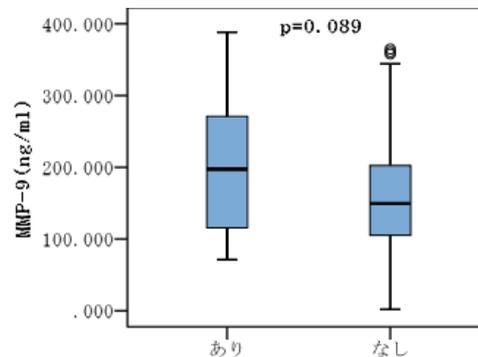


図 2 M-CHAT 重要 6 項目中不通過項目の有無と臍帯血清 MMP-9 値

M-CHAT 重要 6 項目中不通過ありの群では  $203.8 \pm 97.3$  ng/ml、なしの群では  $154.9 \pm 76.0$  ng/ml で、両群間に有意差はみられなかった(図 2)。

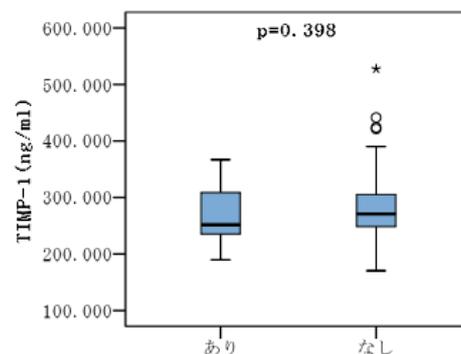


図 3 M-CHAT 重要 6 項目中不通過項目の有無と臍帯血清 TIMP-1 値

M-CHAT 重要 6 項目中不通過ありの群では  $268.3 \pm 50.4$  ng/ml、なしの群では  $277.9 \pm 47.2$  ng/ml で、両群の出生時臍帯血清中の TIMP-1 濃度に有意差はみられなかつ

た(図3)。

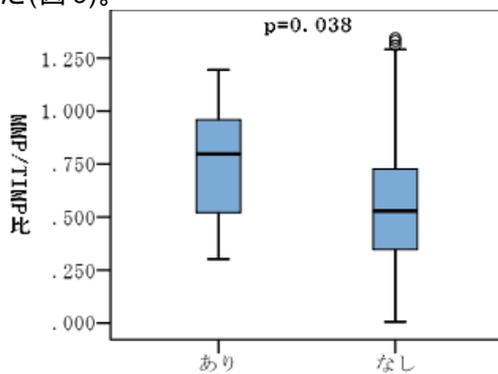


図4 M-CHAT 重要6項目中不通過項目の有無と臍帯血清 MMP-9/TIMP-1 比

M-CHAT 重要6項目中不通過項目の有無と出生時臍帯血清中の MMP-9/TIMP-1 比に有意な差がみられた。不通過ありの群では  $0.75 \pm 0.30$ 、なしの群では  $0.57 \pm 0.29$  であった(図4)。

表7 M-CHAT 重要6項目中不通過項目の有無と臍帯血清サイトカイン濃度

	あり	なし	p値
IL-2	1.40 ± 1.96	2.97 ± 2.55	0.023 *
IL-4	2.20 ± 2.16	3.50 ± 2.03	0.053
IL-6	66.93 ± 139.34	46.75 ± 196.46	0.808
IL-10	2.75 ± 3.97	6.31 ± 11.09	0.283
TNF-	5.22 ± 1.79	4.10 ± 1.83	0.069
IFN-	2.75 ± 2.14	4.36 ± 2.16	0.011 *
IL-17	18.34 ± 24.30	8.55 ± 19.43	0.037 *

平均 ± 標準偏差  
いずれも単位はpg/ml

IL-2、IFN- が M-CHAT 重要6項目中不通過なしの群で有意に上昇、IL-17 がありの群で有意に上昇していた。そのほかのサイトカインでは両群間に有意差を認めなかった(表7)。

### (3) 独歩開始時期とバイオマーカー、サイトカインの関連

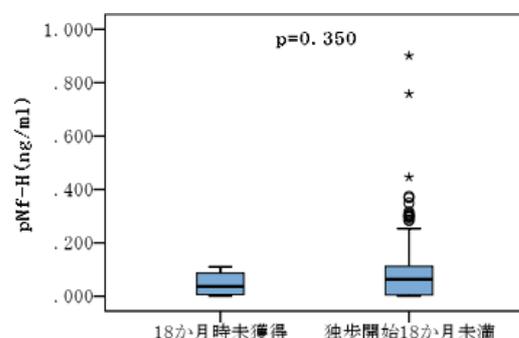


図5 独歩開始時期と臍帯血清 pNf-H 値

18 か月時点で独歩未獲得の群では  $0.048 \pm 0.048$  ng/ml、独歩開始が 18 か月未満の群では  $0.088 \pm 0.112$  ng/ml であり有意差はみられなかった(図5)が、18 か月未満の群では明らかな異常高値例を認めた。

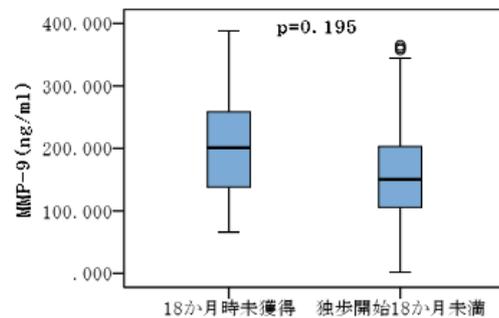


図6 独歩開始時期と臍帯血清 MMP-9 値

18 か月時点で独歩未獲得の群では  $207.0 \pm 111.7$  ng/ml、独歩開始時期が 18 か月未満の群では  $155.9 \pm 76.3$  ng/ml、であり両群の出生時臍帯血清中の MMP-9 濃度に有意差はみられなかった(図6)。

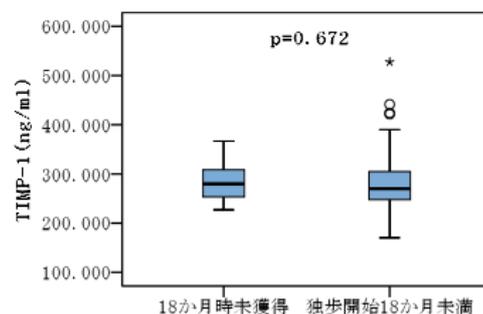


図7 独歩開始時期と臍帯血清 TIMP-1 値

18 か月時点で独歩未獲得の群では  $285.3 \pm 48.5$  ng/ml、独歩開始時期が 18 か月未満の群では  $277.1 \pm 47.3$  ng/ml であり、両群間に有意差はみられなかった(図7)。

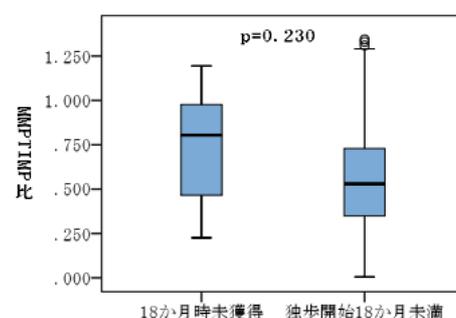


図8 独歩開始時期と臍帯血清 MMP-9/TIMP-1 比

18 か月時点で独歩未獲得の群では  $0.73 \pm 0.37$ 、独歩開始が 18 か月未満の群では  $0.57 \pm 0.29$  であり両群間に有意差はみられなかった(図8)。

表 8 独歩開始時期と臍帯血清サイトカイン濃度

	18か月時未獲得	独歩開始18か月未満	p値
IL-2	1.25 ± 1.82	2.93 ± 2.55	0.061
IL-4	1.81 ± 2.30	3.47 ± 2.03	0.096
IL-6	64.2 ± 148.7	47.3 ± 195.0	0.777
IL-10	4.13 ± 2.83	6.31 ± 10.97	0.243
TNF-	2.63 ± 1.98	4.09 ± 1.82	0.044 *
IFN-	2.86 ± 2.13	4.31 ± 2.18	0.074
IL-17	19.5 ± 29.3	8.8 ± 19.4	0.171

平均 ± 標準偏差  
いずれも単位はpg/ml

独歩開始が18か月未満群のTNF-が有意に上昇していた。そのほかのサイトカインでは両群間に有意差を認めなかった(表8)。

(4)1歳半健診時の有意語出現の有無とバイオマーカー、サイトカインの関連

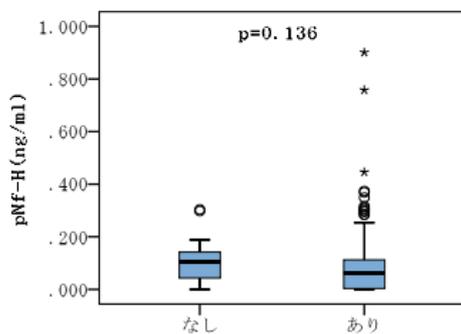


図 9 1歳半健診時の有意語の有無と臍帯血清pNf-H値

1歳半健診時に有意語なしの群では0.111 ± 0.094 ng/ml、ありの群では0.085 ± 0.112 ng/mlであり両群間に有意差はみられなかった(図9)。

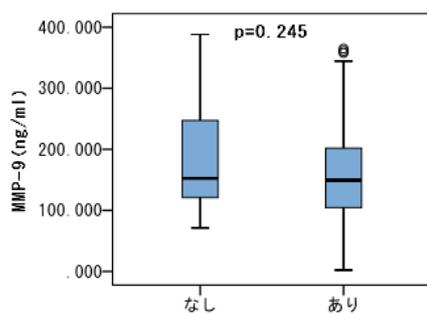


図10 1歳半健診時の有意語の有無と臍帯血清MMP-9値

1歳半健診時に有意語のなしの群では190.7 ± 95.0 ng/ml、ありの群では154.5 ± 75.8 ng/mlであり両群間に有意差はみられなかった(図10)。

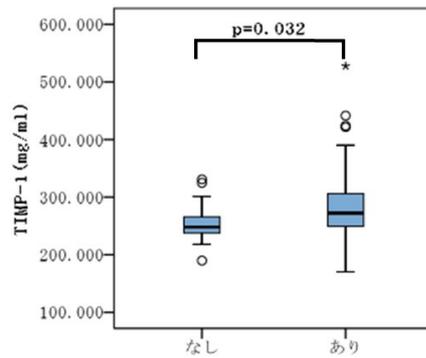


図11 1歳半健診時の有意語の有無と臍帯血清TIMP-1値

1歳半健診時に有意語なしの群では255.7 ± 38.1 ng/ml、ありの群では279.1 ± 47.6 ng/mlであり有意な差がみられた(p=0.032)(図11)。

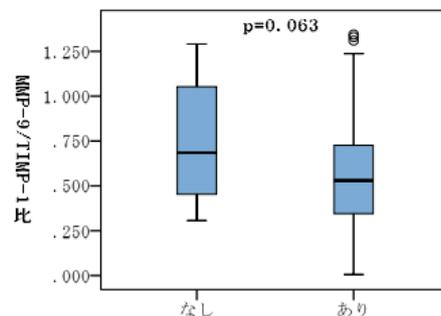


図12 1歳半健診時の有意語の有無と臍帯血清MMP-9/TIMP-1比

1歳半健診時に有意語なしの群では0.74 ± 0.32、ありの群では0.56 ± 0.28であり両群間に有意差はみられなかった(図12)。

表 9 1歳半健診時の有意語の有無と臍帯血清サイトカイン濃度

	なし	あり	p値
IL-2	2.46 ± 2.68	2.91 ± 2.54	0.414
IL-4	2.78 ± 2.48	3.47 ± 2.02	0.391
IL-6	55.5 ± 108.2	47.6 ± 198.3	0.890
IL-10	5.07 ± 2.73	6.33 ± 11.16	0.447
TNF-	3.59 ± 1.49	4.08 ± 1.86	0.153
IFN-	3.49 ± 2.39	4.32 ± 2.17	0.336
IL-17	18.25 ± 23.67	8.46 ± 19.41	0.021 *

平均 ± 標準偏差  
いずれも単位はpg/ml

有意語なしの群でIL-17が有意に上昇していた。そのほかのサイトカインでは両群間に有意差を認めなかった(表9)。

考察

以上をまとめると、1歳半健診時のM-CHAT重要6項目中不通過項目の有無と神経バイオマーカー(pNf-H、MMP-9、TIMP-1、MMP-9/TIMP-1

比)には有意差がなかった。また、同様の不通過項目の有無とサイトカイン(IL-2、IL-4、IL-6、IL-8、IL-10、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-17A)では、IL-2、IFN- $\gamma$ がなしの群で有意に上昇、IL-17 $\alpha$ が有りの群で有意に上昇していた。IL-2とIFN- $\gamma$ は細胞性免疫と関連しており、なしの群では細胞性免疫が活性化していた可能性が示された。IL-17Aは炎症性サイトカインやケモカインの誘導、好中球の遊走を強力に行うことによって炎症を誘導する。有りの群でIL-17Aが上昇していたことから、出生時の何等かの炎症がM-CHATの不通過項目の有無に関連している可能性が考えられた。独歩開始時期が18か月未満か18か月時点で未獲得かについてと神経バイオマーカーには有意差がなかった。また、独歩開始時期とサイトカインについての検討では、独歩開始が18か月未満群のTNF- $\alpha$ が有意に上昇していた。

1歳半健診時の有意語出現の有無と神経バイオマーカーについては、有意語出現有りの群でTIMP-1が有意に上昇していた。TIMP-1は、血液脳関門の障害因子とされるMMP-9の内因性阻害因子である。有意語出現有りの群はTIMP-1の上昇により血液脳関門の障害が阻害された可能性、あるいは有意語出現なしの群でTIMP-1の低下により微細な血液脳関門の障害がみられた可能性が示唆された。有意語出現の有無とサイトカインについては、有意語なし群でIL-17 $\alpha$ が有意に上昇していた。出生時の何等かの炎症が、1歳半健診時に有意語の出現がみられないことに関連している可能性が示唆された。

また、有意差を認めなかったものの、少数ながらpNf-Hの高値例を認めた。これは周産期における神経軸索障害を示すバイオマーカーで、今回検討した18か月時点での神経学的異常は明らかではなかったが、今後の発達過程の中で何らかの異常が出現する可能性があり、注意深く発達をフォローする必要がある。

以上、18か月の発達評価をアウトカムとした今回の検討のみでは、確定的な言及はできないもののいくつかの項目で、当初掲げた作業仮説に合致する所見を認めた。神経発達障害では幼児期以降にその特性が明らかになることも少なくないため、今後、これらの小児が発達していく過程でも注意深く観察し、キーエイジでの発達評価とバイオマーカーおよびサイトカインのデータとの検証を継続する。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

三澤 由佳(MISAWA, Yuka)

信州大学・医学部・助教(受託研究)

研究者番号: 10738644

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者

### (4) 研究協力者

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

稲葉 雄二(INABA, Yuji)

信州大学・学術研究院医学系・准教授

研究者番号: 30334890

塚原 照臣(TSUKAHARA, Teruomi)

信州大学・学術研究院医学系・講師

研究者番号: 50377652

日高 義彦(HIDAKA, Yoshihiko)

信州大学・学術研究院医学系(医学部附属病院)・助教

研究者番号: 40624713