

広汎性発達障害の早期診断のための診断システム開発

金沢大学 子どものこころの発達研究センター
菊知 充

1. はじめに

広汎性発達障害(自閉症スペクトラム障害:ASD)は、主に社会性、コミュニケーションにおける障害および反復的な行動様式によって特徴づけられる神経発達障害である。その有病率が高いこと(1.16%)、社会的認知度が高まっていることから、病態生理の解明と客観的診断指標の確立が急務となっている。この神経発達障害は幼少期からその特徴が認められ、生涯にわたりその特徴が持続する。したがって、言語の遅れや知的障害を伴わないケースであっても、環境がミスマッチであれば、生涯にわたり長期間、様々な社会的不適応状態に陥ることがある。残念なことに、現時点で、これらの発達障害の早期診断・介入のための医療機器開発は遅れており、治療法に関しても極めて選択肢の少ない状況にある。

自閉症者の脳内で起きている、病態生理学の起点をたどっていくと、幼児期以前にまでさかのぼる必要がある。何が起きているかを調べるためには、胎児期から幼児期までの脳研究が必要になる。しかし、従来の脳機能記録方法(例:functional MRI)では、幼少期は協力的ではないため、安全に研究することは困難であった。幼児において、覚醒状態で、不安を伴わない、やさしい環境で脳研究を可能したい。その思いから、金沢大学では2008年から国内唯一の幼児専用の装置を開発し、幼児脳機能測定に挑戦してきた。当初我々は、「自閉症の脳の特徴を可視化する」ことを目指し、早期の診断の補助となることを目指してきた。

この自閉症スペクトラム障害は、遺伝子の寄与率が高い(90%との報告もある)こともあり、関連遺伝子が見つかる事が期待され、研究されてきた。遺伝子研究により、自閉症スペクトラム障害の原因と治療方法の解明が進むことが期待されている。一方で、ゲノムワイドスクランが可能になった現在においても、「自閉症スペクトラム障害」全体を説明するために十分な効果量をもった関連遺伝子がなかなか見つからない現実もある。原因として、この疾患がもつ表現型の多様性が、遺伝子研究を効果的に行う上での障壁になっていると考えられる。すなわち、多様な臨床症状の一つ一つに、異なる遺伝子が弱く関連しているとするならば、多様な症状を示す自閉症スペクトラム障害を全体として説明しきれていない可能性がある。あるいは、疾患に強く関連する遺伝子があっても、疾患のごく少数例にしか関連していないため、自閉症スペクトラム障害を一まとめにして大規模な調査をすると、高い効果量のある遺伝子として見つけ出すのが困難になってしまうのかもしれない。

多様な症状をもつ、自閉症スペクトラム障害を、行動観察のみならず、何か客観的生理学的手法で、特徴づけていくことが必要であると我々は感じていた。そして、そのような取り組みが、将来的には早期診断補助のみならず、遺伝子研究と臨床症状の橋渡しを担う要素になると信じて研究を開始した。

2. 方法

被験者は50人のASD児童、月齢は38-92か月、知的能力検査であるKaufman Assessment Battery for Children(K-ABC)の認知処理過程尺度の標準化得点は96.8 ± 22.5(平均±標準偏差)。一方で定型発達のコントロール群50名は、概ね知的水準と月齢をマッチングさせた。ASD群の診断は国際的に標準的な

方法であるAutism Diagnostic Observational Schedule, Genericおよび the Diagnostic Interview for Social and Communication Disordersを当施設でのライセンス保持者が試行している。幼児用MEGは、横河電機株式会社と金沢工業大学が世界一号としてオーストラリアに納入した幼児用MEGを、さらに最適化したものを使用した。すなわち東洋人の幼児の頭に合うように最適化したデュアー（ヘルメットの部分）を装備した幼児用MEGの第2号機(PQ 1151R model; Yokogawa/KIT Corp, Kanazawa, Japan)(参考文献1, 2)を用いた。従来の成人用MEGによる測定では、幼児の頭が小さいことから、脳とセンサーの距離が遠くなり、その結果信号が大きく減損してしまうことが問題であった。今回開発された、幼児用に最適化されたMEGにおいては、幼児の左右半球ともにセンサーの距離を近いことから、左右半球から、同時に良好な信号を得ることが可能になっている。MEGの記録中は、幼児はリラックスできるように、インストラクターの女性または母親と記録室（アニメの人気キャラクターの乗り物を模した部屋）に入室し、絶えず、アニメーションを鑑賞してリラックスした状態で記録を行っている。この条件での記録時間は3～4分である。

(MEG解析方法)最近我々が発表した独自のMEGのセンサー配列(参考文献3)を利用し、長距離のセンサー間のパワー値の変動の類似性をもちいて、脳内長距離間の機能的結合について評価した。具体的には、脳を水平断方向で取り囲む28個のMEG超伝導センサーで観測された脳活動を分析対象とした。近年の我々のコヒーレンス解析をもちいた分析(参考文献3)では、Theta帯域の振動を介した長距離の機能的結合が、自閉症スペクトラム幼児において低下していることを報告している。その一方で、周波数をまたいだ脳内の長距離の機能的結合(すなわちCross frequency coupling)が近年注目されるようになっている。しかし、幼児用MEGをもちいて、幼児の自閉症スペクトラム障害についての検討はなされていない。そこで、本研究では、Theta(6-7Hz)とGamma(31-59Hz)帯域の周波数のパワー値の1秒ごとの変化を計80秒間解析し、脳を水平断方向で取り囲む28のMEG超伝導センサーの、最も長距離となる28ペアについて、ThetaとGamma bandのパワー値の相関関係を調べた。それぞれ28ペアの電極間の相関係数を、自閉症スペクトラム障害児と定型発達児に有意な違いがあるかun-paired t-testにより検定した。有意差はボンフェローニの補正を行い、 $P < 0.05/28 = 0.0018$ を有意の閾値とした。

(SNP解析)我々は、ASDの重症度関連し、脳内のネットワーク形成に深く関与している遺伝子であるMET(Met Receptor Tyrosine Kinase)遺伝子に焦点をあてて解析した。具体的な方法としては、幼児からストレスなく遺伝子サンプルを抽出するために、頬粘膜を擦過して得た細胞から染色体DNAを抽出し、特異的なプライマーを用いたポリメラーゼ連鎖反応(polymerase chain reaction; PCR)法によって、特定の遺伝子を増幅した。MET遺伝子のプロモーター領域のDNA 652 bpを増幅し、さらにダイレクトシーケンシングを行い、塩基配列を決定した。

本研究は金沢大学医学倫理審査委員会の承認を受け、ヘルシンキ宣言に従って本研究を実施している。すべての被験者に関して、親権者へ書面による明確な説明をおこない、書面による同意を得た後に試行した。また児童本人が研究参加に同意しない意思が認められる場合、試行は中止している。

3. 結果 研究成果

(結果)自閉症スペクトラム児では、28通りの電極ペア中4ペアにおいて定型発達児に比して有意に高値を示していた($P < 0.0018$)。そのうち多数を占める3ペアについては、左前頭部(Theta band)と右後頭部(Gamma band)の前後方向における相関関係(機能的結合)が有意に高値であった。

SNP解析については、自閉症スペクトラム障害児22名、定型発達児7名について分析が終了しており、GG,CGそしてCCのMET遺伝子のプロモーター領域の遺伝子多型について残りのデータについても、現在解析は進行中である。今後も分析を継続していく。

4. 考察 まとめ

ASD児において幼児の段階から、脳機能の長距離間の機能的結合に異常が認められることを、覚醒状態の児において捉える事ができた。Theta bandとGamma bandの振動は、脳の長距離間の情報ネットワークの

形成に深く関与し、神経間の連絡に重要な役割を果たしていると考えられている。脳血流を評価する Functional MRIをもちいたASDの幼児期における脳内ネットワーク研究については、成人期とは異なり、機能的結合が上昇しているとの報告もなされている。我々も最近、Near Infrared Spectroscopy (NIRS)を用いた研究で、ASD幼児の脳血流動態からみた脳機能結合が上昇していることを報告している(参考文献4)。一方、我々の幼児用MEGによるコヒーレンス解析をもちいた解析によれば、幼児期にもTheta bandを介した脳機能結合の低下を報告している(参考文献3)。我々の先行研究以外の様々な研究報告においても、ASD患者の幼児期の脳内機能結合については、一致していない。我々の報告に限ってみても、ミリ秒単位の解析(例:MEGの波形に対するコヒーレンス解析)と秒単位(例:NIRSやMEGの周波数の変動)では、相反する結果がでてくる。すなわち、ミリ秒単位ではASD児の長距離間の脳機能結合の低値が認められ、秒単位では逆に高値が認められることが判明しつつある。推測的な考察を許していただけるのであれば、筆者は以下のように考えている。ミリ秒単位の機能的結合については、より解剖学的にミクロの現象(すなわち、神経線維の髄鞘化など)を反映している可能性がある。一方で、秒単位の機能的結合には、よりマクロな現象(すなわち、脳の領域間でのタスク等に対する協調的な活動)を反映している可能性がある。そのような観点から考えると、今回、ASD児に認められた秒単位の機能的結合の上昇は、脳のマクロ的視点からみた領域的役割が未分化であることを示している可能性がある。このように解釈すれば、ミリ秒単位での結果と、秒単位での結果に一旦矛盾する結果が見出されていても、実は矛盾していないと筆者は考えている。

本技術では、幼児に恐怖感を与えず、わずか5分以内に、脳の機能的発達について生理学的指標が得られることから、幼児の脳機能研究において現実的な検査方法であると考えられる。今後は、脳内機能結合に関与すると考えられる遺伝子型(例:MET遺伝子)との関連性を分析し、表現型と遺伝型の上に位置する中間表現型としての意義を検討していく必要があると考えられる。

5. 発表論文、参考文献

- (1)Yoshimura Y, Kikuchi M, Ueno S, Shitamichi K, Remijn GB, Hiraishi H, Hasegawa C, Furutani N, Oi M, Munesue T, Tsubokawa T, Higashida H, Minabe Y. A longitudinal study of auditory evoked field and language development in young children. *Neuroimage*. 2014 Nov 1;101:440-7.
- (2)Remijn GB, Kikuchi M, Shitamichi K, Ueno S, Yoshimura Y, Nagao K, Tsubokawa T, Kojima H, Higashida H, Minabe Y. Somatosensory evoked field in response to visuotactile stimulation in 3- to 4-year-old children. *Front Hum Neurosci*. 2014 Mar 24;8:170.
- (3)Kikuchi M, Yoshimura Y, Hiraishi H, Munesue T, Hashimoto T, Tsubokawa T, Takahashi T, Suzuki M, Higashida H, Minabe Y. Reduced long-range functional connectivity in young children with autism spectrum disorder. *Soc Cogn Affect Neurosci*. 2014 Apr 9.
- (4)Kikuchi M, Yoshimura Y, Shitamichi K, Ueno S, Hiraishi H, Munesue T, Hirose T, Ono Y, Tsubokawa T, Inoue Y, Oi M, Niida Y, Remijn GB, Takahashi T, Suzuki M, Higashida H, Minabe Y. Anterior prefrontal hemodynamic connectivity in conscious 3- to 7-year-old children with typical development and autism spectrum disorder. *PLoS One*. 2013;8(2):e56087.