

平成 24 年度

高知大学大学院 黒潮圏総合科学準専攻

修士論文要旨集

目次

大角 裕貴

外洋棲ウミアメンボ類の生息密度と環境要因に関する生態学研究

..... 3

佐藤 あゆみ

甲殻類の体表附着性二枚貝類の共生生態—マゴコロガイの初期生活史と幼生形態およびコフジガイとの比較—

..... 7

須貝 一貴

唾液試料を用いる自閉症スペクトラム障がいのメタボローム解析に関する研究

..... 11

外洋棲ウミアメンボ類の生息密度と環境要因に関する生態学研究

大角裕貴

(教育学専攻・授業実践コース・環境生理学)

1. 背景と目的

海洋に生息する動物の生息にとって溶存酸素とクロロフィルは重要な意味を持つ。溶存酸素は海洋動物にとっての呼吸資源であるが、水面に浮き、空気中から気管呼吸によって酸素を得るウミアメンボ類は、海水中の溶存酸素を呼吸資源とはしない。溶存酸素量は、植物プランクトンなどによる、光合成量の絶対量と、生息する生産者（植物）と消費者（動物や好気性細菌など）の生息比に大きく左右される。外洋棲ウミアメンボ類にとってその生息海域のクロロフィル量が高く、しかも溶存酸素量が低ければ、生物量が多くしかも動物などの割合が高く、餌資源が多くことを意味するので、ウミアメンボ類の生息密度が高くなる可能性が考えられる。そこで本研究では、この仮説を世界に先駆けて検証すべく、サンプリング海域の溶存酸素とクロロフィル量と、ウミアメンボ生息密度の関係を分析する。

昆虫などの無脊椎動物は変温動物であり、それらの生息は温度によって影響を受ける。外洋棲ウミアメンボの生息には25℃が生息温度の限界値であるという経験則が存在する¹⁾。しかしながら、コガタに関しては、北緯40度域にまでその生息域を広げていることもあり、25℃よりもっと低い海域での生息や繁殖の可能性も残されている。更に、コガタは高緯度の低温下での生育や生殖を行うことも考えられ、発育温度の違い（季節の違い）によって、その温度耐性を変化させるかも知れない。

本研究では、これらの可能性を検証するために、コガタに注目し、東京～ホノルル間の季節の異なる2回の航海(2-3月、9月)中でのサンプリングにより、同一海域での生息密度と温度の関係を探るとともに、それぞれの季節で採取されたコガタ成虫の高温耐性と低温耐性の指標としての過冷却点を調べ、生育季節によって耐性がどのように変化するかを検証する。

昆虫の低温耐性の指標として過冷却点（Super cooling point: SCP）が頻繁に使用されて来た^{2),3)}。昆虫の耐寒性については、3つのカテゴリーに分けることができる⁴⁾。1つは、“凍る前に死ぬ”タイプ。この場合、過冷却点よりはるかに高い温度域によって氷点付近で死に至る場合である。この場合は、Chill-injuryと呼ばれる何らかの低温障害によって死に至る場合で、アメンボ(*Aquarius paludum*)の場合もこれに含まれ、冷温致死型と言える⁵⁾。ウミアメンボ類の場合、淡水産アメンボ科昆虫のアメンボと同様、凍る前に死ぬタイプと考えられるので、過冷却点が直接低温耐性温度の指標とはならない。しかし、冷温致死型でも、致死温度に相関が見られる例がある⁶⁾。そこで、本研究では、低温耐性の指標候補として、過冷却点の測定を試みた。

2. 研究方法と材料

2-1 中部暖温帯・亜熱帯太平洋域、中東部熱帯インド洋、熱帯インド洋、熱帯太平洋域における海域でニューストーンネットによるサンプリングを行い、各海域で採取されたウミアメンボを種別、成虫・幼虫別、性別に仕分けを行い、1km² 当たりのアメンボ捕獲頭数をウミアメンボ生息密度とした。計算式は 生息密度=(アメンボ捕獲数×1000m×1000m)/(フローメーター値[曳距離 m]×1.3m[ネット幅])とした。

SPSS 統計解析ソフト(Version 11.5)を用いて統計解析が行われた。クロロフィル量と溶存酸素量の相関図を描いた上で、3つの海域グループに分けたがそのグループ間でのウミアメンボ生息密度検定には Bonferonni 法を用いた。東京～ホノルル間の海域における、生息密度と生息海域表面水温との関係については、Pearson の相関分析法を用いた。また、高温麻痺温度、高温麻痺に至る温度変化値、過冷却点などの季節間比較には、Mann-Whitney U-test を用いた。

2-2 同一海域での生息密度と温度の関係を探るとともに、それぞれの季節で採取されたコガタ成虫の高温耐性と低温耐性の指標としての過冷却点を調べるために、高温耐性に対しては高温麻痺実験、低温耐性に対しては指標として SCP を使用し、実験を行った。高温麻痺実験は 8 時間以上、採取時の表面海水温に近い温度に順応させた(26-29°C)後、1 時間ごとに、1°C ずつ、海水温を階段状に上昇させ、高温麻痺(胸部・腹部腹面が海水面に接着してしまい、水面から体幹が空中に浮き上がってない状態)に陥るまで、被実験個体を水面上で観察した。過冷却点測定は、被実験個体を-35°Cの冷凍庫に入れ、温度を1分に約1°Cの速度でゆっくりと下げ、ある温度で潜熱の放出による発熱現象が起こる。温度が上昇する直前の最も低い温度を SCP として記録した。

3. 結果

3-1.クロロフィル量と溶存酸素量について

中部暖温帯・亜熱帯太平洋域(2010年9月1日-9月15日、19°-34°N, 140°E-163°W)及び中東部熱帯インド洋域(2010年10月21日-11月19日、4°-15°S, 68°-94°E)(Group 1)でのクロロフィル量は非常に高く、溶存酸素量が低かった(図1)。Group1の海域は、生物生産量(植物プランクトンによる)が多く、しかも消費者(動物プランクトンや魚類など)の生産者に対する存在比が高い状態、すなわち、ウミアメンボ類にとっての餌資源が多く存在すると考えられる。この Group1 海域では高密度でウミアメンボが採取された(図2)。熱帯インド洋(2011年9月23日-2011年12月2日、01°55'S 083°24'E-08°01'S 080°29'E: Group 2)のようにクロロフィル量が低く、溶存酸素量が比較的高い海域は、ウミアメンボが採取されたものの、Group1より有意に低い採集密度であった(Bonferonni-test among Groups 1-2: Group 1 versus Group 2: Gap value: 47460.5, p<0.001)。

3-2.生息域と海水温度の関係について

中部暖温帯・亜熱帯太平洋域：東京～ホノルル間海域では、9月のサンプリングではツヤやセンタは27.5℃を境にこれより低温海域では採取されなかったが、コガタはすべての観測地点で採取することができた(図3左)。2-3月には、ツヤ、センタは採取できず、コガタのみが採取され、コガタは水温22.1℃の低温でも採取することができた。しかし、それより低い水温19℃付近では採取されなかった(図3右)。

3-3. ホノルル-ハワイ航路、2-3月採取と9月採取成虫個体の高温麻痺、過冷却点比較

亜麻痺温度や麻痺温度は、順応温度の違いもあって、9月採集個体が36.60℃、2-3月採集個体が35.09℃となっており、9月採集個体のほうが有意に高かったが、順応温度を起点とした麻痺温度までに要する温度は、逆に2-3月採集個体が9.09℃、9月採集個体が7.78℃となっており、2-3月採集個体が有意に高く、過冷却点も9月個体が-16.25℃、2-3月個体が-17.12℃となっており、2-3月個体の方が有意に低かった。

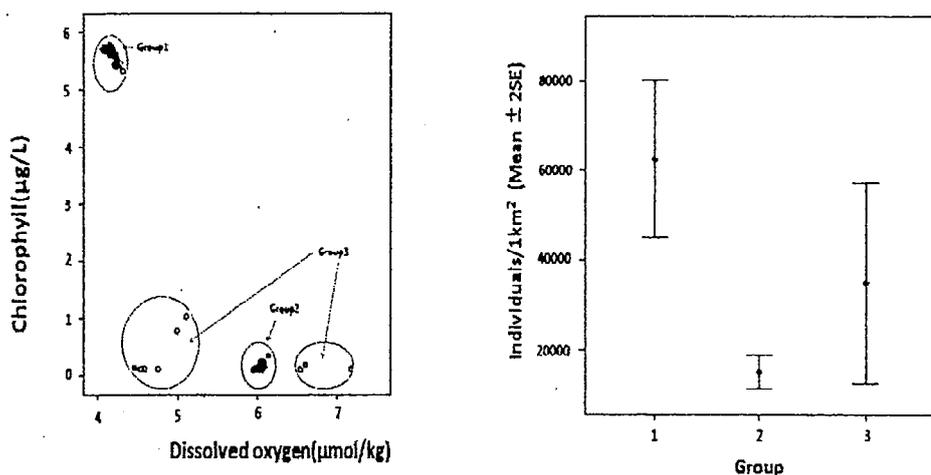


図1: 採集地点でのクロロフィル量と溶存酸素量の相関関係。1プロットは、日没後または、日の出前の3-6回x15分の連続曳航中の測定代表値を示す (Group 1: n=41; Group 2: n=36, Group 3: n=9) (左図)

図2: 図1における各グループの生息密度。1次生産量が多く、溶存酸素量が低いグループ1は高い生息密度を示す。(生息密度: 平均±標準偏差[n], Group 1, 62578.4±56298.8 [41]; Group 2, 15117.8±10898.1 [36]; Group 3, 34925.5±33482.8 [9]) (右図)

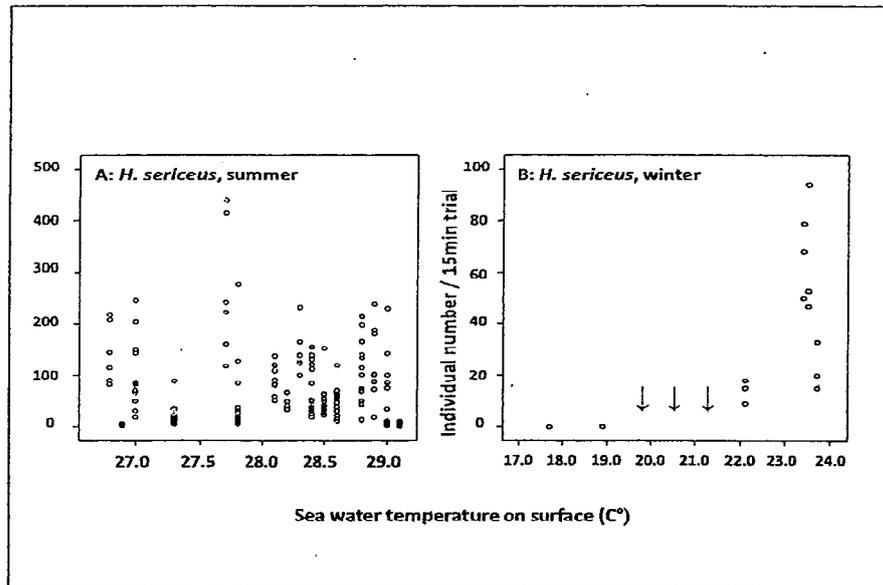


図 3: コガタにおける表面海水温度と生息密度の関係。赤い矢印がコガタの推定生息限界温度を示す。温度と生息密度の間の Pearson correlation test (A: $r=-0.28$, $p=0.709$; B: $r=0.723$, $p=0.001$)。 (左図)

4. 考察

4-1. 様々な海域における外洋棲ウミアメンボ類の生息密度

インド洋の南緯 4-15 度で約 18,000~38,000 頭/km² で比較的高い密度を示した。一方コガタは北緯 19-34 度で 82,000 頭/km², 南緯 26 度で 38,000 頭/km² と、中緯度で高い採取密度を示しており、両種の生息に適した指向温度環境の違いを暗示しているかも知れない。

4-2. クロロフィル量と溶存酸素量からみたウミアメンボの密度の考察

高いクロロフィル量と低い溶存酸素量の組み合わせによって、そこに高い密度で外洋棲ウミアメンボが生息することが高い確率で予測できる可能性を本研究は示唆している。しかし、低いクロロフィル量の海域でも、15mm×6 回のみでのサンプリングとは言え、約 100,000 頭/km² の高い密度でセンタが採取されたことは、この 2 つのパラメータの組み合わせが満たされる場合以外にも、ウミアメンボ高密度で生息する可能性のあることを示している。

4-3. 同海域の 2 季節間の比較による考察

2-3 月に採取されたコガタウミアメンボは、9 月に採取されたものより、高温への変化に耐性が強く、過冷却点 (低温耐性の指標) も低かった。冬季の低温で生育したコガタウミアメンボが高温側と低温側の両方に耐性 (交差耐性) を発達させた可能性がある。コガタは 22°C 程度の低い水温でも生息できる能力を持つが、センタやツヤは 27°C 付近に生息密度が急激に低下する臨界が存在し、このことから、コガタが他の 2 種より遙かに広い低温域での生息能力を備えることが推論できる

5. 引用文献: 1) Andersen NM, Chen L 2004: *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review* 42:119-180.; 2) Bale JS 1993: *Functional Ecology*. 7: 751-753.; 3) Worland MR 2005: *Journal of Insect Physiology* 51 : 881-894.; 4) 田中一裕・積木久明 2010: 昆虫の低温耐性, pp.2-7, 岡山大学出版会、岡山; 5) Harada T 2010: *Formosan Entomologist* 30: 307-316.; 6) Kirchner W 1986: *Ecophysiology of spiders*: pp. 66-77. Springer-verlag

甲殻類の体表付着性二枚貝類の共生生態 —マゴコロガイの初期生活史と幼生形態およびコフジガイとの比較—

佐藤あゆみ

(教育学専攻・黒潮圏総合科学準専攻・理科教育分野)

海洋で最も種の多様性が高いグループは軟体動物であり、その高い多様性の一部は他の生物との共生(密接な関係を持って共に住むこと)によりもたらされたと考えられる。二枚貝類は軟体動物のなかで、巻貝類に次ぐ主要なグループであり、やはり共生性の種を多数含んでいる。表に日本産の共生性二枚貝類の例を挙げた。共生性二枚貝はウロコガイ科に属する種が多く、星口動物やユムシ動物、棘皮動物とともに、甲殻類を宿主としている。甲殻類は一般的に運動性が高く、その体表は付着基質としては適さない。さらに、甲殻類は脱皮によって成長するため、付着生物は基質をたびたび失うこととなる。それにもかかわらず、マゴコロガイやコフジガイ、オサガニヤドリガイなど数種の二枚貝が甲殻類への体表共生に適応している。一方、これらの共生二枚貝は、宿主も付着部位も異なり、種間で生態学的特性や形態が多様化していることが分かる。二枚貝類にどのような適応があって甲殻類の体表共生が可能となり、その結果、生態や形態がどのように多様化したかを論じるにあたり、本論文では以下の問題を対象とする。

まず、マゴコロガイの初期生活史を明らかにする。マゴコロガイはアナジャコ科の甲殻類の胸部に付着する二枚貝である。一般的に、二枚貝類の生態学的諸問題の解明のためには、浮遊幼生の加入プロセスが重要であることが強調されている(関口・木村, 1999)。共生性二枚貝類についても、宿主との付着共生を開始するプロセスを理解するにあたり、初期生活史の解明が必要である。次に、マゴコロガイの系統的位置を検討するため、幼生形態の比較を行う。すでに、Goto *et al.*, (2012)により、分子系統解析を用いて、マゴコロガイがウロコガイ科に属することが明らかにされたが、本研究では、幼生形態を用いてその仮説を検証する。さらに、マゴコロガイと宿主との利害関係を明らかにする。コフジガイやオサガニヤドリガイなど他の体表共生二枚貝類では、宿主を付着基質として利用しているが、マゴコロガイでは付着基質であるとともに、餌の横取りも行っている。マゴコロガイでのみ発達した寄生的な生態に関して、成長試験により成長量を直接比較することにより、その寄生的影響の有無を明らかにする。最後に、マゴコロガイとの比較を行うため、コフジガイを対象として、甲殻類への体表共生への適応、特に、宿主の脱皮時における行動を明らかにする。

・マゴコロガイの初期生活史—幼生の人工飼育から

高知県浦ノ内湾から採集されたマゴコロガイに刺激を与えて、幼生を放出させた。幼生はピーカーにて人工飼育を行った。マゴコロガイは卵胎性であり、放卵・放精は確認されず刺激により直接、幼生が放出された。マゴコロガイ幼生は母貝から放出された直後ベリジャー幼生であり、また、放出直後から採餌行動を行うプランクトン栄養型の二枚貝であった。プランクトン栄養型の二枚貝は大体においておよそ 85 μm で放卵されるが (関口・木村, 1999)、マゴコロガイ幼生は殻長 200 μm 前後と大型であった。人工飼育下において浮遊幼生期は 3~4 週間であることが明らかになった。マゴコロガイ幼生は 11 日目までは、1 日におよそ 10 μm 成長したが殻長 330 μm を超えるとほとんど成長しなかった。これは、幼生が宿主を探すステージへ入ったためと考えられる。本種ではペディベリジャー幼生の期間が短いこと、着底期幼生が砂泥にもぐることが観察されたため、宿主への着底は、ペディベリジャー幼生期に水柱中で行われるのではなく、泥中もしくは巣穴の中であることが示唆された。マゴコロガイの着底期幼生は大型であることは、マゴコロガイの幼生が宿主を堆積物中で探索し、また、宿主の体表に付着するために、サイズの大型化が必要であったためであると考えられる。

・マゴコロガイの系統的位置—幼生形態の比較から

マゴコロガイの適応的生態を論ずるにあたり、マゴコロガイの系統学的位置を明らかにする必要がある。マゴコロガイは、これまで、外部形態の類似性からイガイ科に含められたこともあったが、内部形態からはウロコガイ上科に含めることが適当であると提唱された (Kato and Itani, 1995)。一方、日本で最も影響力のある図鑑 (奥谷編, 2000) では、本種をカワホトトギス科に含めた。カワホトトギス科はマルスダレガイ目である点でウロコガイ科と共通であるが、外部形態がイガイ類に類似している。

マゴコロガイが幼生形態からみて、ウロコガイ科とカワホトトギス科のどちらに属するかを比較するため、ウロコガイ科のマメアゲマキ属 sp. とカワホトトギス科のイガイダマシの幼生を人工飼育し、形態を詳述した。また、ウロコガイ科のコフジガイについても、小型個体を用いて原殻の形態を記述した。その結果、イガイダマシの幼生がウロコガイ科の典型的な形態から外れて、最も形態が異なっていた。マメアゲマキ属 sp. の幼生が、ヒンジが長くアンボ低いという点でウロコガイ科の典型的な形態を有するものの、ヒンジに交歯の小歯列が並ぶ点で、マゴコロガイやコフジガイと異なっていた。さらに、マゴコロガイとコフジガイは、ヒンジが長くアンボ低い、かつ、ヒンジに交歯の小歯列が並ばない、という点で、幼生のヒンジの形状の記述が得られている *Montacuta* 属や *Mysella* 属の幼生形態と共通であった。この幼生形態から見たグループは、

Goto *et al.*, (2012)の系統樹と矛盾せず、幼生形態の情報を用いても、マゴコロガイがウロコガイ科に含まれることが明らかとなった。

・マゴコロガイが宿主のヨコヤアナジャコの成長に与える影響

共生関係の分類方法としては、宿主との位置関係をもとにした分類、つまり、体表共生や巣穴共生等の区別が便宜上有効である（伊谷，2008）。しかし、その進化を考えるうえで最も重要であるのは、利害関係の有無、つまり相利共生であるのか、片利共生であるのか、それとも寄生であるのかを区別することである。

高知県浦ノ内湾の堂ノ浦に位置する干潟より着底直後の小型のヨコヤアナジャコを採集し、甲長とマゴコロガイの有無を記録後、1 個体ずつ、現地の砂泥を満たした飼育容器（直径 85mm、高さ 120mm）に入れ、約 1mm のメッシュの網で蓋をした。干潟付近に設置された高知大学の筏に飼育容器の上面が水深 50cm となるようにつるし、およそ 2 ヶ月後に回収し、成長量を記録した。秋期と冬期の 2 度の着底期に実験を行ったところ、いずれの季節でも、マゴコロガイの影響によってヨコヤアナジャコの成長量が 2 割程度少した。マゴコロガイは宿主の口部付近に水管を伸ばすことが知られていたが、この行動が明らかに寄生的な影響を与えることが明らかになった。

・シャコに付着するコフジガイの共生生態

マゴコロガイで得られた知見を体系づけるため、コフジガイの共生生態を明らかにした。コフジガイはマゴコロガイと同じウロコガイ科に属するが、マゴコロガイが背腹に扁平な特異な形態であるのに対し、本種は通常の二枚貝の殻形態を有している。サンプルは山口県水産試験場の資源調査として、山口県の瀬戸内海周防灘で底引き網または桁網（目あい約 25 mm）で漁獲された個体より得た。コフジガイの付着位置や殻長の計測を行い、また、一部の個体は水槽観察に供した。

周防灘では、6378 個体のシャコが採集され、コフジガイの共生率はおよそ 4 %であった。シャコの成熟雌の割合は、コフジガイの付着しない個体で 17%、コフジガイの付着個体では 14%であり、付着の有無によって成熟個体の出現頻度には有意な差が認められなかった。コフジガイの付着位置は、第 8 胸節と第 1 腹節の間が多かった（定位置）。コフジガイは単独で付着する例が 73%と多かったが、複数個体での付着例もあり、ペア個体の付着する例も 18%あった。

コフジガイと宿主のサイズには、相関は見られなかった。しかし、定位置に付着する単独個体だけを用いると、有意な相関がみられた。また、ペア個体の雌だけ用いると、より高い相関が認められた。脱皮直後である甲の柔らかい個体は 91 個体得られたが、

これらの個体からも4個体ではコフジガイの付着が確認された。これらの結果は、コフジガイが宿主の脱皮後にも引き続き、同じ宿主を利用することを示唆している。実際に宿主の脱皮行動の観察に成功し、宿主の脱皮中にコフジガイが移動することが確かめられた。この行動は、マゴコロガイで観察されたものと同様であり (Itani *et al.*, 2002)、宿主の脱皮への適応行動は、甲殻類の体表付着する大型共生二枚貝では必須であると考えられる。

表. 日本産共生性二枚貝類の宿主動物門別リストと共生様式. *はウロコガイ科.

種	宿主の動物門	宿主の種	共生の様式
ホウオウガイ	海綿動物	海綿動物(とくに、 <i>Spongia</i> sp.)	埋もれてすむ
ヤブサメガイ	海綿動物	海綿動物	埋もれてすむ
ウグイスガイ	刺胞動物	ヤギ類	付着
ワニガイ	刺胞動物	ヤギ類	付着
イソギンチャクヤドリガイ	刺胞動物	ナスビイソギンチャク	体表共生
ムツワンヤドリガイ	刺胞動物	ムラサキハナギンチャク	体表共生
* チリハギガイ	軟体動物	ムラサキイソガイなど	足糸に付着
* ホシムシアケボノガイ	星口動物	スジホシムシモドキ	巢穴共生、体表共生
* ハナビラガイ	星口動物	スジホシムシ	体表共生
* ユンタクシジミ	星口動物	スジホシムシ	体表共生
* スジホシムシモドキヤドリガイ	星口動物	スジホシムシモドキ	体表共生
* フィリピンハナビラガイ	星口動物	スジホシムシ	体表共生
* ナタマメケボリ	ユムシ動物	タテジマユムシ、スジユムシ	巢穴共生
* セウケガイ	ユムシ動物	スジユムシ	巢穴共生
ハイスミカゼガイ	ユムシ動物	スジユムシ	巢穴共生
イソカゼ	ユムシ動物	ミドリユムシ	巢穴共生、体表共生
* ミドリユムシヤドリガイ	ユムシ動物	ミドリユムシ	体表共生
クシケマスオガイ	甲殻類	アナジャコ類	巢穴共生
* オオツヤウロコガイ	甲殻類	ミナミアナジャコ	巢穴共生
* アケボノガイ	甲殻類	アナエビ類	巢穴共生
* ニッポンヨーヨーシジミ	甲殻類	シマトラフヒメシヤコ	巢穴共生
* コフジガイ	甲殻類	シヤコ	体表共生
* マゴコロガイ	甲殻類	アナジャコ	体表共生
* シマノハテマゴコロガイ	甲殻類	ミナミアナジャコ	体表共生
* ガンヅキ	甲殻類	メナシピンノ	体表共生
* オサガニヤドリガイ	甲殻類	フタバオサガニ、ノコハオサガニ	体表共生
ハリナデシコ	甲殻類	タカアシガニ	体表共生
* ヘノジガイ	甲殻類	トゲツノヤドカリ、ゼンマイヤドカリ	ヤドカリ共生(殻)
* アリアケケボリ	棘皮動物	トゲイカリナマコ	巢穴共生、体表共生
* ツルマルケボリ	棘皮動物	トゲイカリナマコ	巢穴共生、体表共生
* ヒナノズキン	棘皮動物	トゲイカリナマコ	体表共生
* ヒノマルズキン	棘皮動物	ヒモイカリナマコ	体表共生
* コノワタズキン	棘皮動物	イソナマコ	体内共生
* マルヘノジガイ	棘皮動物	クモヒトデ	体表共生
* オカメブンブクヤドリガイ	棘皮動物	オカメブンブク	体表共生
* オオブンブクヤドリガイ	棘皮動物	オオブンブク	体表共生

須貝一貴

(教育学専攻・授業実践コース・理科分野)

1. 研究背景と目的

自閉症は1943年にカナーによって世界で初めて報告された。カナーは自閉症特有の臨床症状(社会性相互作用の障害、コミュニケーション障害、興味・関心の局限)を明らかにした。その後、自閉症に関する研究が進むことにより、自閉症に特徴的な症状を持ちながらも、知的障害および言語の遅れのない高機能自閉症やアスペルガー症候群を代表とした疾患が多数存在することが明らかとなった。そのため、自閉症は連続性を持つ広範な範囲にわたるものとして捉えられるようになり、自閉症スペクトラム障害(以下、ASD)と呼ばれるようになる。

本研究では、自閉症のメタボローム解析を行っている。メタボローム解析とは、特定のターゲット物質を決めて測定を行うのではなく、代謝物を網羅的に解析することによって知見を得る手法のことである。本研究では、自閉症児と定型発達者の唾液を採取し、測定を行うことにより、自閉症のバイオマーカーを発見することを目的とした。

現行におけるASDに関する問題点は大きくふたつあり、ひとつ目はASDの病因が未解明であることがあげられる。ASDの病因解明に関する研究は遺伝子¹⁾、分子マーカー²⁾、脳研究³⁾などの様々な分野で行われているが、いまだASDの病因は未解明である。現時点でASDの病因として考えられていることは、複数の遺伝子が関与⁴⁾している疾患であることが推測されている。また、ASDは連続性を持つ複雑な疾患であることもASD病因未解明の原因となっている。もうひとつのASDの問題点は早期診断が困難であることがあげられる。早期診断が困難である理由としては様々な要因があるが、いまだ化学的診断が行えないことに大きな原因があるとされている。したがって、早期診断を可能にすることが重要である。早期診断が可能になることにより、早期療育が可能になる。ASD患者に対する早期療育の効果⁵⁾は十分にあり、加えて見過ごされやすいアスペルガー症候群などの患者に対してもケアを行うことができる。アスペルガー症候群などの比較的軽度の患者に対するケアは重要な課題であり、不安や鬱などの二次的被害を抑えて行くことは患者のQOL(クオリティー オブ ライフ)の向上につながる。社会サイドの認識が進み、罹患率が急速に伸びているASD患者⁶⁾に対するケアは我が国の重要な課題となっている。

本研究では、上記で述べたASDにおける問題について、「LC/MS法で唾液試料を測定し、群間比較を行う統計解析ソフトSIEVEを用い、自閉症バイオマーカーを見つける」ことで解決しようと試みた。唾液を分析試料とした理由は、血液や尿と比べて測定に必要な量を簡便に採取出来ることに加えて、血液採取と異なり被験者に対してストレスがかかりにくいからである。自閉症バイオマーカーが見つかることにより、ASDの病因解明や早期診断が可能になり、加えて、自閉症バイオマーカーにより、新生児の時点でASD発症のリスクが予測可能になり、新規早期療育プログラムが作成でき、その結果としてASD患者の社会適応能力向上につながる事が考えられる。

2. 研究方法

本研究では 2011 年と 2012 年に自閉症患者と定型発達者の唾液サンプルを採取した。2011 年のサンプリングは高知市立の高須小学校の児童と、高知大学特別支援学校の生徒を対象に行った。2011 年の協力者をまとめた表を下に示す。

表 1. 2011 年の高須小学校(定型発達者)と特別支援学校(自閉症群)の協力者数

	高知市立小学校		特別支援学校(中学)
3 年	16 人	1 年	4 人
4 年	14 人	2 年	4 人
5 年	10 人	3 年	4 人
6 年	11 人		

唾液の採取方法としては

- ①口腔内の全唾液を直接チューブに吐出
- ②唾液成分の日内変動を考え採取時の時間を合わせる(昼前)
- ③採取後は酵素や細菌の影響を防ぐため、瞬時に冷凍保存を行う(-20℃以下)を徹底した。

唾液試料を直接 LC/MS で測定することは困難であるため、LC/MS によって測定を行えるよう、唾液試料をギ酸とアセトニトリルによって除タンパクを行い、除タンパクを行った溶液を ODS 系の固相抽出カラムを用いて前処理を行った。また、前処理による唾液中成分量の変化、流出を極力抑えるために前処理は出来る限り簡便な手法をとった。前処理を行った後の抽出液を LC/MS によって測定を行い、この測定データを用いて自閉症児群と定型発達者群との群間比較を SIEVE によって行った。また鈴木⁷⁾の報告では、ASD 群の生体内物質質量と社会行動得点との相関関係を調査していたため、本研究でも、2011 年に特別支援学校の生徒の領域別社会生活年齢、新版 K 式発達検査 2002 と呼ばれる診断テスト結果を提出して頂いた。SIEVE による解析結果から差異物質を見つけた後、その差異物質と診断テストの得点との間に相関関係が表れるのかを調べるためである。

また、2011 年の唾液サンプル採取時に、高須小学校児童の両親に対してアンケート調査を行い、環境省が行っている「エコチル調査」の研究も行った。エコチル調査は子どもの健康と環境に関する全国調査であり、健やかに育つ環境を子どもたちへ贈るための国家プロジェクトであり、環境省が中心に行っている。本研究では、高須小学校児童の両親に協力を依頼し、アンケート調査によって子どもの生活環境を調べた。アンケートに協力して頂いた児童の唾液を同時に採取しているため、アンケート結果と唾液試料の測定結果を SIEVE を使い、子どもの生活環境と唾液中成分の比較検討も自閉症バイオマーカー研究とは別に行っている。

この 2011 年の解析結果をもとに 2012 年にも唾液サンプルの採取を行っている。2011 年の自閉症児と定型発達群の解析結果を受け、この結果の信頼性を調べるために 2012 年の唾液サンプルの採取を行った。唾液サンプルの採取法は 2011 年と同じ方法で行った。2012 年特別支援学校の協力者人数の表を表 2 に示す。

表 2. 2012 年の唾液試料提供者(特別支援学校)

	特別支援学校(中学)
1 年	2 人
2 年	3 人
3 年	4 人

以上の協力者から唾液サンプルを採取し、2011 年に行った測定法と同じように測定を行った。2011 年の結果が 2012 年にも表れているか確認を行った。

3. 結果と考察

今回行った研究についての結果と考察を述べる。

3-1. 2011 年の高須小学校の児童に対して唾液サンプリングを行った際にアンケートを提出して頂き、唾液試料とアンケート調査結果との間の統計解析。

アンケートを集計し、アンケート結果による子どもの生活環境と唾液試料中成分を比較した結果、特に結果は得られなかった。対象となったアンケート項目は好きな食べ物、メラミン樹脂の使用、家族内における喫煙者の有無で解析を行った。結果が得られなかったことを考察すると、アンケート項目の質問内容に欠点があることが考えられる。アンケート項目の詳細を聞き出す内容に変更することによって何らかの結果が得られる可能性はある。

3-2. 2011 年に行った高須小学校(定型発達群)と特別支援学校(自閉症児群)を対象とした、唾液試料の差異解析。

2011 年に行った差異解析では 8 種類の差異物質が見つかった。しかし、これらすべてを同定することは出来なかった。SIEVE による同定は LC/MS によって得られる測定精密質量から物質を同定するが、同定出来なかった物質はデータベース上に測定精密質量が登録されていなかった可能性が考えられる。だが、2 種類は SIEVE によって同定を行うことができた。そのうち 1 種類が同定された物質の構造と LC/MS による測定結果との間に関連が見られたため、この物質を調べた。SIEVE による解析で差異物質として表れたものはグルタミン酸であった。この時の有意差は 0.0045 であり、自閉症児群で有意に高かった。図 1 に自閉症児群と定型群のグルタミン酸と推測された物質の面積値をプロットしたものを示す。

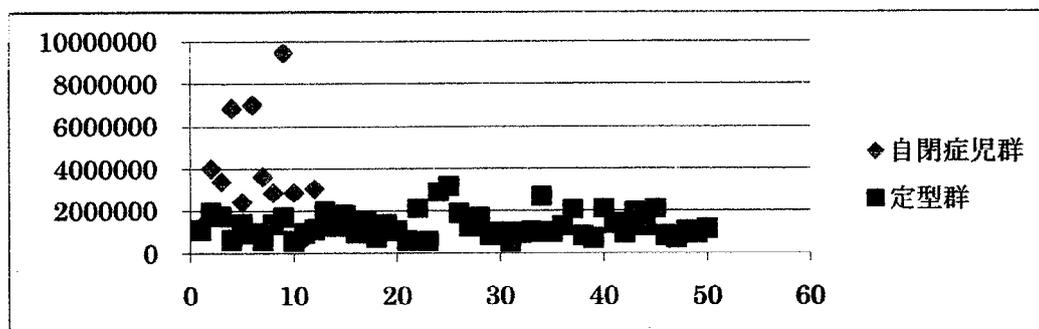


図 1. グルタミン酸と推測された物質の面積値

グルタミン酸は中枢神経系において主要な興奮性神経伝達物質であり、なおかつ神経細胞の増殖や分化に関係し、軸索発生や生存に関しても働きかける物質である。このような結果を得て、初めにグルタミン酸の標準品を手に入れ、標準品を用いた測定を行った。その結果、唾液試料から SIEVE によってグルタミン酸と推測された物質と同じ保持時間とマススペクトルを得ることができた。

次に、グルタミン酸と推測された物質と領域別社会生活年齢と新版 K 式発達検査の診断結果との相関関係を調べた結果、新版 K 式発達検査の認知・適応で相関関係が得られた。

3-3. 2011 年の差異解析結果をもとに、2012 年に再度特別支援学校の自閉症児を対象とした解析。

2011 年の研究において、SIEVE によって自閉症児群と定型群の間でグルタミン酸が差異物質として推測された。その後、グルタミン酸標準試料を用いて保持時間とマススペクトルの確認を行った。最後に、グルタミン酸と新版 K 式発達検査における認知・適応間において相関関係が得られた。

この結果を受け、2012 年に特別支援学校から再度唾液サンプルを採取して測定を行い、2011 年の結果と比較した。

初めに 2012 年の自閉症児群のグルタミン酸濃度と 2011 年の定型群のグルタミン酸濃度の有意差を求めた。その結果、有意差 0.021 という結果を得られた。2011 年の結果では 0.0045 であったため、有意差が減少しているが、それでも十分の有意差を得ることができた。有意差が減少した理由を考えると、唾液中のグルタミン酸の変動が大きいことが考えられる。また、図 1 からわかることとして定型群のグルタミン酸の面積値の変動は小さく、自閉症児群のばらつきは大きい。2011 年の自閉症児群のグルタミン酸の平均値と 2012 年のグルタミン酸の平均値を比較した結果、2012 年のグルタミン酸濃度の方が平均値が低かった。そのため、有意差が減少したことが考えられる。この結果から、グルタミン酸がバイオマーカーとして使用できる可能性が示唆されるが、より正確な調査を行うために検体数を増し、また長期的な調査を行う必要があることがわかった。また、新版 K 式発達検査の認知・適応との相関関係を求めたが、2011 年時の相関関係とほぼ同じような相関関係が得られた。

参考文献

- 1)熊谷俊幸: 全身疾患としての自閉症, 小児の精神と医学, 50(2), 147-154(2010).
- 2)東田陽博, 堀家慎一, 小泉恵太 等: 自閉症分子マーカー探索・自閉症の遺伝子・分子生物・実験動物学的研究, 医学のあゆみ, 231(10), 1072-1078(2009).
- 3) Milne, E., Swettenham, J., Hansen, P., et al.: High motion coherence thresholds in children with autism, *Journal of Child Psychology and Psychiatry* 43, 255-263(2002).
- 4) Ronald A, Happe F, Bolton P et al: Genetic heterogeneity between the three components of the autism spectrum: a twin study, *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 45, 691-699(2006).
- 5)西田充潔:自閉症児に対する早期介入・早期療育の有効性について一幼児期からの親による介入の効果とその課題一, 北星学園大学社会福祉学部北星論集, 48, 119-127(2011).
- 6)宮尾益知:自閉症スペクトル障害(ASD)のバイオマーカー、臨床の現場から、小児の精神と神経 51(1), 28-31(2011).
- 7)鈴木勝昭:バイオマーカーからみた自閉症スペクトラム障害, 小児の精神と神経 51(2), 133-142(2011).