

唾液中代謝物濃度の比較分析に基づく自閉症スペクトラム障害 (ASD)の診断に関する研究

蒲生啓司^{1,2}・日野真綸²・明石拓実²

(¹高知大学教育研究部総合科学系複合領域科学部門・²高知大学教育学部)

An Investigation into the Diagnosis of Autism Spectrum Disorders (ASD) Based on a
Comparative Analysis of the Metabolite Concentrations in Saliva

Keiji Gamoh^{1,2}, Marin Hino² and Takumi Akashi²

¹*Division of Interdisciplinary Science, Kochi University*

²*Faculty of Education, Kochi University*

Abstract : Autism spectrum disorders (ASD) are a behaviorally-defined group of neuro-development disorders characterized by impairments in communication and social interaction, and repetitive, overly-focused behaviors. While the syndrome has been found to be highly heritable, various theories have been investigated suggesting both genetic and environmental factors, such as dietary and chemical exposures. Our basic interest was focused on the investigation of diagnosis markers of ASD based on an analytical chemical approach using a liquid chromatography/high resolution mass spectrometric (LC/MS) method. Salivary samples were used for the exhaustive analysis of biological metabolites. In the present study, we demonstrated the metabolic exhaustive analysis of the salivary samples of both an ASD-diagnosed person and a physically unimpaired person using a reversed-phase separation mode and an electrospray ionization method of the LC/MS, in addition to the investigation of diagnosis markers of ASD based on a comparative analysis using multivariate statistics software, SIEVE. Serine was found as a diagnosis marker of ASD.

キーワード : 自閉症スペクトラム障害, 唾液試料, メタボローム解析, 診断,
液体クロマトグラフィー/質量分析法

Keywords : Autism Spectrum Disorders, Salivary samples, Metabolomic Analysis, Diagnosis,
Liquid chromatography/Mass spectrometry

1 緒言

1943年のカーナーによる自閉症の報告は、初めて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み、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)と呼ばれるに至っている。ASDや自閉症に対する研究は、教育支援と共に早期発見・早期診断・早期療育等の分野でも関心が高まっており、自閉症スペクトラム障害(以下 ASD)の有病率が急増していると言われているが、病因が未解明であるが故に、化学的診断が確立されておらず早期発見が困難である。ASDにおける早期療育は効果性が高いことがわかっているため^{1,2)}、著者らは、ASDの早期診断となり得る生体試料中の化学物質の検索について研究を続けてきた。その際分析に用いる試料として、対象者に対し非侵襲的でありかつ簡便に採取できる唾液を用いてきた。前報³⁾において著者らは、LC/MSによる分析法と共に、唾液試料がASDのバイオマーカー追跡に使える可能性を示し、差異解析の結果、自閉症群と定型発達群の2群間における差異のある化合物としてグルタミン酸を同定した。更に、ASDにおいてグルタミン酸濃度が高いことを立証する代謝メカニズムの解明と、差異解析で検出された他の化合物についての構造解析を進めていかなければならないと考えた。しかしながら一方で、未だASDや自閉症の病因解明や決定的な治療法開発には至っていないことも事実である^{4,7)}。本研究では、LC/MS法により唾液試料中の化学的成分を分析し、差異解析ソフトを用いる自閉症群と定型発達群の比較分析を行うことで、自閉症特有の診断マーカーを見出す、すなわちASDの化学的診断を確立することを目的として、二つの内容を検討した：研究Ⅰとして、先行研究データの再解析を行うことと、研究Ⅱとして、LC/MS法における低分子極性物質に着目した測定条件の検討を行うこととした。

1) 研究Ⅰとして、これまで得られている分析結果を基に、差異解析の設定を変えることで、特定化される物質の再検索を行った。我々の先行研究データ³⁾を用いて、統計解析ソフト SIEVE (ver1.2.0, Thermo Fisher 社製)により、自閉症群 12 検体と定型発達群 24 検体の比較解析を行った。定型発達群は全 50 検体のうちから、ランダムに 24 検体を選び、幾つかのパターンを設定して、2 群間の差異を統計的有意差と相対比によって表し、得られた測定精密質量からデータベース検索を行った。

2) 研究Ⅱとして、新たに検索する対象を低分子極性物質に設定し、自閉症者と定型発達者の唾液サンプルを採取後、これまでと同様の前処理を行い、LC/MS法により網羅的解析を行った。これまでの唾液サンプルとの違いは、被験者間の生活年齢を一致させたことである。低分子極性物質の分析に適した分離カラムとして、SS-C18(3 μ m, 150mm \times 2mm, Imtakt 社製)を用いた。分析により得られたデータは、差異解析ソフト SIEVEにより 2 群間の唾液試料中の全成分の比較解析を行い、差異物質を検出した。低分子極性物質の分離に適したカラムを選択したが、カテコールアミン類やアミノ酸等 15 成分（ノルアドレナリン、アドレナリン、ドーパミン、ドーパ、DOPAC、ホモバニリン酸、バニルルマンデル酸、メラトニン、メチオニン、グリシン、グリシルグリシン、グルタミン酸、フェニルアラニン、アラニン、りんご酸）を分析の対象とし、一斉分析が可能となる移動相条件を検討した。

2 実験

実験方法としては、唾液試料を採取し、LC/MS法による分析を行い、分析データをSIEVEにより解析する。研究Ⅰでは、先行研究のデータを基に、SIEVEにおける解析方法を検討することとし、研究Ⅱでは、LC/MS法におけるカラムや移動相などの分析条件を検討すること、さらに新たに唾液試料を採取し、分析することとした。

2-1 唾液試料のサンプリング

唾液は、血液や尿と比べて測定に必要な量を簡便に採取出来るばかりでなく、血液採取と異なり患者に対してストレスがかかりにくい利点がある。自閉症群と定型発達群とのメタボローム解析にあたり、前報の試料を用い、定型発達群として高知市立の小学校の児童・生徒から、自閉症群として高知大学特別支援学校の児童・生徒から唾液試料提供の協力を得ている。

2-2 LC/MS分析と統計解析ソフトSIEVEによるメタボローム解析方法

研究Ⅰで焦点を当てたSIEVEは、独自のアルゴリズムにより保持時間のずれを補正する。また、保持時間と測定精密質量で定義されたフレームを作成し、同じフレームのピーク強度を比較し、横軸に統計的有意差、縦軸に存在比で定義された結果を視覚的に表示することができる。マスクロマトグラムでは、横軸が保持時間、縦軸が測定精密質量、高さがピーク強度の3次元により表されており、ここでフレームを作成する。保持時間と測定精密質量のフレーム幅を設定し、ピーク強度の下限値を決めることによって作成され、このフレーム毎に含まれるピーク強度の面積値を測定データ毎に抽出し、その値を用いてt検定を行う。

研究ⅠのSIEVEにおける解析の検討については、先行研究では、自閉症群を12検体、定型発達群を50検体としていたところを、定型発達群を24検体として、数パターンの解析を行うことで解析結果の実証性を高めることとした。解析データから候補物質を抽出する方法として、定型発達24検体は全50検体の分析データからランダムに選択し、その選択方法は同じ組み合わせにならないようにしながら3パターン行った。使用した統計解析ソフトSIEVEは、2群間における差異解析のためのLC/MS専用ソフトであり、LC/MSによって得られる測定データを解析することにより、2群間の差異のある化合物を検索するものである。SIEVEの役割をまとめると以下ようになる：

- ①:LC/MSの測定データを読み取る
- ②:LC/MSによる測定データから2群間で差異のある化合物を見つけ出す
- ③:差異のある化合物が見つかった場合、測定時に得た測定精密質量からデータベース検索を行い、その分子構造を推定する

高分解能LC/MSとSIEVEを組み合わせ、自閉症群と定型発達群の唾液サンプルを測定することで、自閉症群と定型発達者群の差異化合物を発見することができ、その差異化合物を推定することが可能になる。

2-3 高分解能LC/MSによる測定

今回使用したLC/MSは、分解能100,000のフーリエ変換型の高分解能質量分析装置である。イオン化法にはESI(エレクトロスプレーイオン化)を採用し、両極性(positive及びnegative)同時分析を行った。唾液中成分の代謝物は極性物質が多いことから、計測感度を高めるために移動相

に酢酸を用いた．測定における諸条件を以下に記す：

1) LC 条件 (研究 I) :

使用カラム : Xbridge BEH130 C18 (3.5 μ m, 2.0mmi.d. \times 150mmL., Waters 社製)

移動相 : 200 μ l/min, A: 1%酢酸水, B:1%アセトニトリル

グラジエントプログラム : 0min A:98% B:2% \rightarrow 10min A:98% B:2% \rightarrow 12min A:60% B:40% \rightarrow
16min A:60% B:40% \rightarrow 18min A:25% B:75% \rightarrow 20min A:25% B:75% \rightarrow 22min A:5% B:95% \rightarrow
27min A:5% B:95% \rightarrow 29min A:98% B:2% \rightarrow 38min A:98% B:2%.

2) LC 条件 (研究 II) :

使用カラム : SS-C18 (3 μ m, 2.0mmi.d. \times 150mmL., Imtakt 社製)

移動相 : 200 μ l/min, A:10mM ギ酸アンモニウム, B:水/アセトニトリル/ギ酸(=75/25/0.5)

グラジエントプログラム : 0min A:45% B:55% \rightarrow 10min A:35% B:65% \rightarrow 10.1min A:45% B:55% \rightarrow
21min A:45% B:55%

3) MS 条件 :

Scan Range:100-1,000, Maximum Inject Time:250ms, Sheath gas:25, Aux gas:5, Spray voltage(kv):2.50, Capillary temp($^{\circ}$ C):320. Negative mode, Capillary voltage(v):-25.00, Tube lens voltage(v):-95.00, Skimmer voltage(v):-20.00, Positive mode, Capillary voltage(v):42.50, Tube lens voltage(v):95.00, Skimmer voltage(v):18.00.

2-4 統計解析

統計解析には SIEVE を用いた．SIEVE は 2 群間の差異解析ソフトである．今回の解析ははじめに定型群 8 サンプル(公立小学校児童データ)と自閉症群 8 サンプル(特別支援学校生徒データ)で比較を行った．ここで有意差のある成分を見つけ、その後に定型群 12 サンプル、自閉症群 12 サンプル間の有意差をエクセルにて処理を行った．このような 2 段階の作業をした理由としては、サンプル数が多いと解析に多くの時間を要することから解析の時間短縮のためである．SIEVE によるデータ上の保持時間の修正やフレーム処理等の統計解析の詳細については、前報³⁾を参照されたい．更に SIEVE では、有意差のある化合物が見つかった際、測定時に得た測定精密質量から化合物を推定することができるので、測定時に得た測定精密質量からデータベースにアクセスし、測定精密質量から化合物の推定をすることができる．今回用いた LC/MS は化合物の質量電荷比を小数点第 3 位までを確実に測定できるため、ここから化合物の組成を推測することができる．

3 結果および考察

3-1 研究 I における統計解析

パターン毎の解析結果を以下の図(図 1.~図 3.)に示した．パターン I ~ III まで、t-検定を行った結果、横軸を統計的有意差、縦軸を存在比で表しており、A を自閉症群、B を定型発達群として示した．図中の小さい点は 1 つ 1 つが比較された測定精密質量を示している．存在比は、中心線に近いほど差異

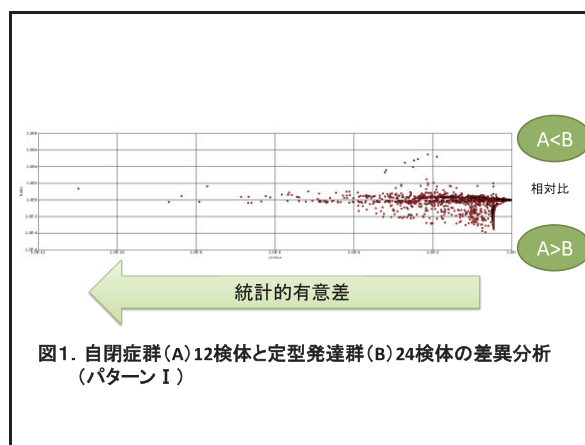
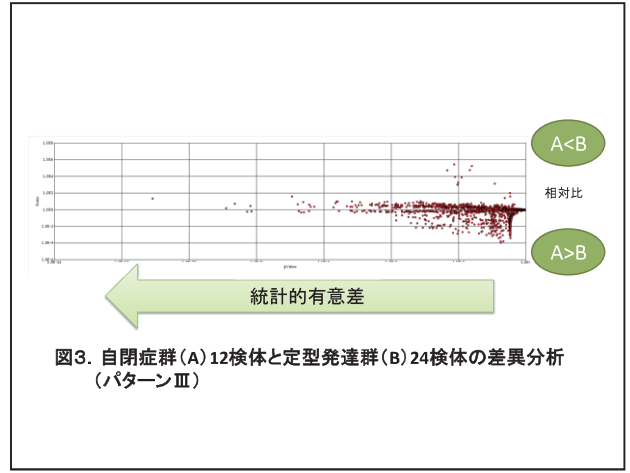
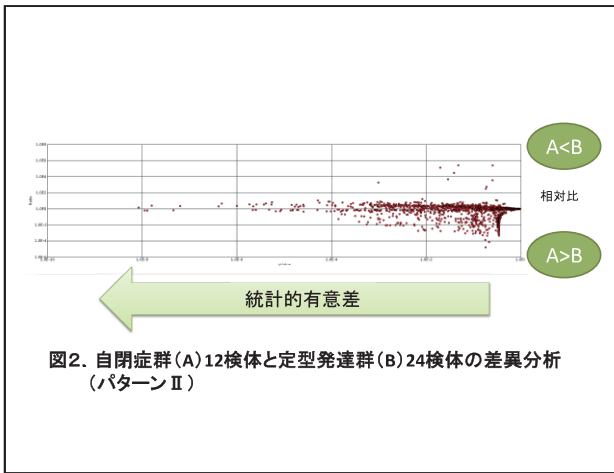


図1. 自閉症群(A)12検体と定型発達群(B)24検体の差異分析 (パターン I)



が少ないことを示しており、中心線から離れるほど存在比が大きいことを示している。本研究では、有意差が 0.001 以下で、相対的に定型発達群よりも自閉症群が大きい質量に焦点を当てている。ここに示されている測定精密質量について 1 つ 1 つ調べた。質量を調べていく中で、さらに保持時間の短い低分子極性物質に的を絞りを、ピーク形状から ASD のバイオマーカーとなる候補物質を検出した。検出したものを表 (表 1. ~ 表 3.) に示した。表には、測定精密質量とその質量を示す組成式を記した。また、表の中の緑色で示されている測定精密質量は、3 パターンの解析で同じ質量を示したもので、全部で 12 種類ヒットした。これらを ASD のバイオマーカーとなる候補物質とし、12 種類の測定精密質量からデータベース検索を行い、物質の選定を行った。

表 1. SIEVE による解析結果 (パターンⅠ)

測定精密質量	構造式
101.0231	C4H4O3
221.0658	C8H12O7
216.0353	C8H10ClN3S
179.0551	C6H10O6
132.0773	C4H9N3O2
148.0593	C5H9NO4
156.0417	C3H10NO4P
163.0601	C6H10O5
144.1015	C7H13NO2
155.0099	C3H7O5P
207.0499	C8H14O2S2
175.0236	C6H6O6
191.0181	C6H6O7
135.0284	C4H6O5
133.0490	C5H8O4

表 2. SIEVE による解析結果 (パターンⅡ)

測定精密質量	構造式
101.0231	C4H4O3
221.0658	C8H12O7
216.0353	C8H10ClN3S
179.0551	C6H10O6
156.0417	C3H10NO4P
132.0773	C4H9N3O2
239.0766	C8H14O8
163.0601	C6H10O5
155.0099	C3H7O5P
144.1015	C7H13NO2
124.9995	C2H5O4P
191.0181	C6H6O7
133.0490	C5H8O4
175.0236	C6H6O6
135.0284	C4H6O5

表 3. SIEVE による解析結果 (パターンⅢ)

測定精密質量	構造式
101.0231	C4H4O3
221.0658	C8H12O7
341.1086	C12H20O11
179.0551	C6H10O6
239.0766	C8H14O8
132.0773	C4H9N3O2
215.0318	C5H11O7P
216.0352	C8H10ClN3S
155.0099	C3H7O5P
163.0601	C6H10O5
144.1015	C7H13NO2
175.0236	C6H6O6
191.0181	C6H6O7
135.0284	C4H6O5
133.0490	C5H8O4

表 4. ASDのバイオマーカーとしての候補化合物

ASDのバイオマーカーとしての候補化合物 (保持時間順) 自閉症群12検体: 定型発達群24検体		
	測定精密質量	物質名
A	101.0231	Succinic anhydride
B	221.0658	(2R)-2-Hydroxy-1,2,4-pentanetricarboxylic acid
C	216.0353	N-(2-Chloro-4-methyl-3-thienyl)-4,5-dihydro-1H-imidazol-2-amine
D	179.0551	3-Deoxyhex-2-ulosonic acid
		2-Deoxyhex-5-ulosonic acid
		2-Deoxyhex-3-ulosonic acid
		D-Glucono-delta-lactone
		D-glucono-1,4-lactone
		2-keto-3-deoxy-D-gluconic acid
		D-Gulonic g-lactone
		3-Deoxy-D-threo-hex-2-ulosonic acid
		L-Gulonic g-lactone
		D-galacto-Hexodialdo-1,5-pyranose
		3-keto-beta-D-galactopyranose
		2-Deoxy-D-threo-hex-5-ulosonic acid
		2-Deoxy-D-erythro-hex-3-ulosonic acid
		3-Deoxy-L-threo-hex-2-ulosonic acid
E	132.0773	Creatine b-Guanidinopropionate
F	163.0601	1,4-Anhydro-D-fructose
		a-Hydroxyadipic acid
		2-Hydroxy-2,3-dimethylsuccinic acid
		(3R)-3-Hydroxy-2,2-dimethylsuccinic acid
		2-Ethyl-2-hydroxysuccinic acid
		2-Ethyl-3-hydroxysuccinic acid
		(3S)-2-Hydroxy-2,3-dimethylsuccinic acid
		3,6-Dideoxyhex-2-ulosonic acid
		3,6-Anhydro-D-talose
		3,6-Anhydro-D-mannose
		(2R,3S)-2,3-dimethylmalate
		3,6-Dideoxy-D-threo-hex-2-ulosonic acid
		3,6-Dideoxy-L-threo-hex-2-ulosonic acid
		3,6-Anhydro-D-glucose
3,6-anhydrogalactose		
G	155.0099	Propionyl dihydrogen phosphate 2-Oxopropyl dihydrogen phosphate
H	144.1015	methyl hydrate betaine
I	175.0236	L-threo-2,2-Hexodiulosonic Acid g-Lactone
		(E)-Aconitic Acid
		(Z)-Aconitic Acid
J	191.0181	Oxalosuccinic acid
K	133.0490	acetyllactic acid
		Glutaric acid
L	135.0284	(±)-Malic acid
		(+)-D-malic acid
		L-(-)-Malic acid

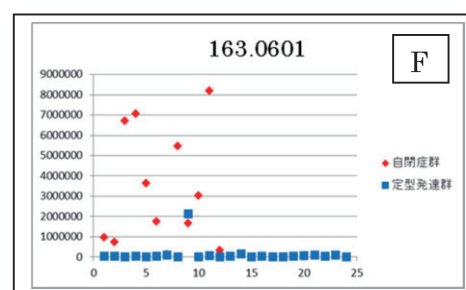
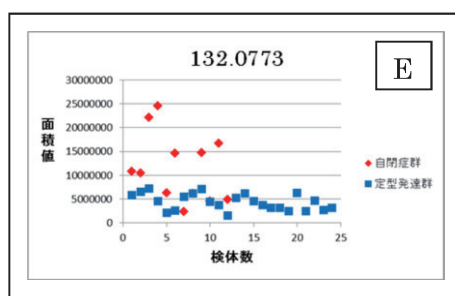


図 4. 測定精密質量 132.0773 の面積値に基づく分散図

図 5. 測定精密質量 163.0601 の面積値に基づく分散図

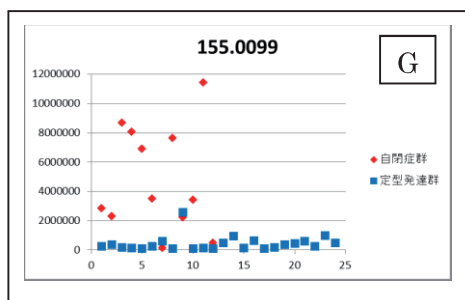


図 6. 測定精密質量 155.0099 の面積値に基づく分散図

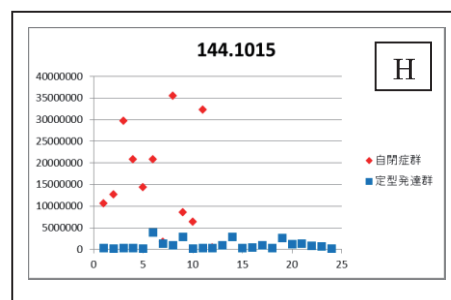


図 7. 測定精密質量 144.1015 の面積値に基づく分散図

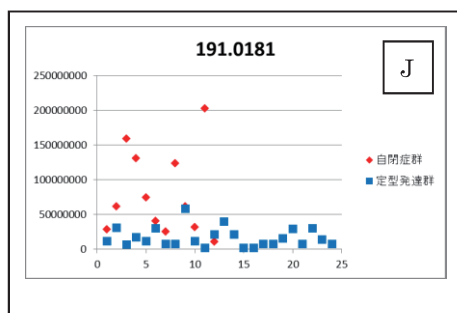


図 8. 測定精密質量 191.0181 の面積値に基づく分散図

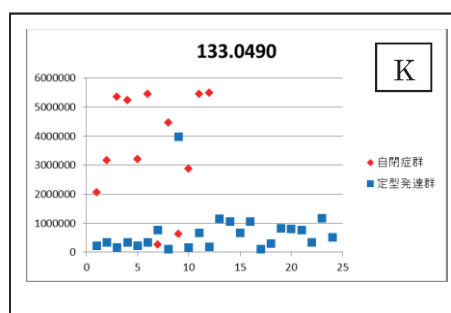


図 9. 測定精密質量 133.0490 の面積値に基づく分散図

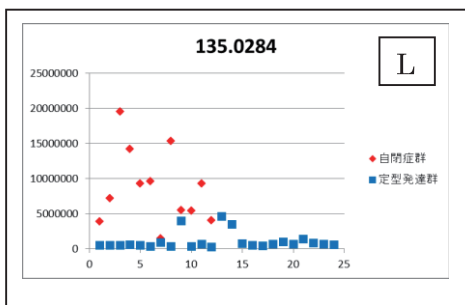


図 10. 測定精密質量 135.0284 の面積値に基づく分散図

更にそれらの物質から、明らかに生体内物質ではないものを排除し、測定精密質量とその質量を示す物質名をまとめて表(表 4.)に記した。3パターンでの解析結果から示された 12 種類の質量を示す物質 (A~L 群に分類) は、有力な ASD 診断マーカー候補物質であると考えられる。この中で、E, F, G, H, J, K 及び L 群について、それらの測定精密質量とその面積値に基づく自閉症群と定型発達群の分布図を以下に示した(図 4. ~ 図 10.)。これらの候補物質を特定するためには、それらの標準品を入手し、その保持時間の挙動から検討していく必要がある。候補物質の中には、F 群に見られるようにウロソン酸由来の物質が多く含まれており、ウロソン酸はウイルスや毒素などに作用することが知られているため、それについても定性的な分析を基に検討していきたい。今

回, 自閉症が 12 検体と少なかったため, 更にサンプル数を確保し分析することで, ASD 診断マーカー候補物質としてより現実性が実証されるのではないかと考えられる.

3-2 研究Ⅱにおける唾液試料の分析と統計解析

ここでは, 分析の対象である低分子極性物質の分離能を高めるため, 分離カラムの選択をし, 標準試料 (スタンダード) 15 種類を用意し, 分離のための最適移動相条件を検討した. その後, 唾液試料への適用と, 得られたマスキロマトグラムの解析を行った. 先行研究では, Xbridge C18 の逆相カラムを使用していたが, 今回の研究は, 唾液試料中の保持のし難い低分子極性物質をターゲットにしているため, 低分子極性物質の分離に適した Scherzo SS-C18 カラムを選択した. このカラムは, アニオン系化合物もカチオン系化合物も同時に分析することができ, また分離の機能も高いとされている. 分離カラムの変更に伴い, 移動相条件の検討を行った. 低分子極性物質として, カテコールアミン類やアミノ酸, またその代謝物などを含めて標準試料 15 成分を分析対象とした. これらの一斉分析が可能となる移動相条件として検討した結果, 移動相は, A が 10mM ギ酸アンモニウム, B が水/アセトニトリル/ギ酸 = 75/25/0.5 として, グラジエント溶離法により分析を行った.

表 5. SIEVE 解析による自閉症と定型発達 の 2 群間の差異物質

	保留時間	分子量	構造	物質名
1	106.0492	1.47E-05	C ₃ H ₇ NO ₃	DL-Serine
				L-(+)-Serine
				D-(-)-Serine
2	131.0815	3.87E-05	C ₁₁ H ₁₉ NO ₂	L-Acetamid-N-methylacetamide
				(+)-Discurbitine
				2S-2'-Piperazinecarboxylic acid
				2R-2'-Piperazinecarboxylic acid
3	132.0291	1.30E-03	C ₆ H ₁₁ NO ₄	2(E)-2'-aminosuccinic acid
				L-Amino-2,4-dioxobutanoic acid
				minosuccinic acid
4	174.0574	1.88E-03	C ₁₁ H ₁₇ N ₃ O ₂	L-Carbanimidamide-2-oxopentanoic acid
5	146.0447	2.83E-03	C ₇ H ₉ NO ₂	L-Ketoglutaramic acid
6	144.5822	4.90E-03	C ₁₂ H ₁₅ N ₃ O ₂	L-Amino-4,5-dioxopentanoic acid
7	448.2077	2.65E-03	C ₁₇ H ₂₁ N ₃ O ₂	N-Benzyl-N'-N'-dimethyl-N-(2-pyridyl)-1,2-ethanediamine 2-Hydrochloride (Fumarate)
8	119.0933	4.80E-03	C ₁₁ H ₁₆ N ₂	Carboxy-1,1,1-trimethylmethanaminium
9	105.1140	4.81E-03	C ₄ H ₉ NO	choline
10	144.5822	4.90E-03	C ₁₂ H ₁₅ N ₃ O ₂	Ethephon
11	145.0606	5.78E-03	C ₇ H ₁₁ N ₃ O ₂	L-Proline nitrosom
12	132.0613	6.23E-03	C ₆ H ₉ N	Stratole
				O-Methylbenzylcyanide
				DL-Glutamic acid
				N-Methyl-L-glutamic acid
				D-(+)-Glutamic acid
				D-(-)-Glutamic acid
				L-Glutamic acid
				O-Acetyl-L-serine
				L-threo-3-Methylaspartate
				4R-4-Hydroxy-5-oxo-L-norvaline
				4R-5-Amino-4-hydroxy-2-oxopentanoic acid
				N-Carboxymethyl-L-alanine
13	182.0511	6.78E-03	C ₁₁ H ₁₃ NO ₃	L-hydroxy-L-3-pyridylbutanoic acid
				DL-Tyrosine
				L-(+)-Tyrosine
				tyramate
				adrenalone
				D-Tyrosine
				2S,3S)-2-Amino-3-hydroxy-3-phenylpropanoate
				threo-4-Hydroxy-L-phenylalanine
				L-Amino-3,4-hydroxyphenylpropanoic acid
				N-Hydroxy-L-phenylalanine
				2(E)-2,5-Dichloro-4-oxo-2-hexenedioic acid
14	226.9509	8.27E-03	C ₁₄ H ₁₁ Cl ₂ O ₄	
15	290.8463	9.00E-03	H ₂ CaO ₇ S ₂	Calcium sulfate hemihydrate

唾液試料の分析については、中学生以下の子どもから、自閉症群として 15 検体、定型発達群として 30 検体を採取した。先行研究では、知能年齢に基づいて自閉症と定型発達の唾液試料を採取したが、今回は生活年齢を同一にするために、自閉症群として 8 検体、定型発達群として 15 検体を分析の対象とした。唾液試料は、前報と同様に夾雑物やタンパク質などを取除く処理を施した上で LC/MS により分析を行った。分析の結果から SIEVE による解析を行い、自閉症と定型発達の 2 群間に得られた測定精密質量に基づく差異物質 (15 群に分類) を以下の表 (表 5.) にまとめた。更に、SIEVE 検索の結果からヒットしたアミノ酸 3 種 (グルタミン酸 Glu, セリン Ser, チロシン Tyr) と X (: 2-ケトグルタラミン酸) に加えて、存在量の多いフェニルアラニン Phe を選び、それらの個々の面積値 (表 6.) に基づいて、各検体毎の存在量の割合として、自閉症の 8 人と定型発達の 15 人に分けてグラフ化した (図 1 1. および図 1 2.)。

表 6. 自閉症と定型発達の 2 群間の唾液試料中の低分子極性物質のピーク面積

ASD	リンゴ酸	グルタミン酸	パニルマンデル酸	グリシン	DOPAC	アラニンドーパ	ホモパニル酸	グリシルグリシン	メチオニン	ノルアドレナリン	アドレナリン	フェニルアラニン	メトニド	ドーパミン	セリン	チロシン	X	
m15		44228										368421			44258	12920	5419	
m16		384216										300072			136853	47458	22771	
m17		26510										74171			77276	47458	8716	
w18		149693										642737			263920	21438	12160	
m19		123406										1576571			219478	10210	8851	
m20		49471										364300			138511	230982	5805	
w21		3232										8245			35176	3690	785	
m22		96091										446397			54461	159823	-	
TD	リンゴ酸	グルタミン酸	パニルマンデル酸	グリシン	DOPAC	アラニンドーパ	ホモパニル酸	グリシルグリシン	メチオニン	ノルアドレナリン	アドレナリン	フェニルアラニン	メトニド	ドーパミン	セリン	チロシン	X	
m1		702909										3195051			222006	652399	28286	
m10		10070										457397					845	
m12		28246										312869				21038	-	
m14	239	52919										1804289				79235	2759	
m17		5240										138496				12109	584	
w1		58889										3693387				951488	6814	
w2		1214767										4357322				1727890	43660	
w3		188111										4105830				68858	1373690	9892
w4	2477	4129099										14468767				53973	760030	338833
w5		7269630										6379427				140142	1196575	298469
w6		1104021										7854590				162763	1765067	59138
w8		371033										5244154				85031	1863309	-
w9		864161										1904192				177232	652649	38465
w15	9260	6376897									326	8112515				557012	166922	-
w16		2625										100726				6735	418	-

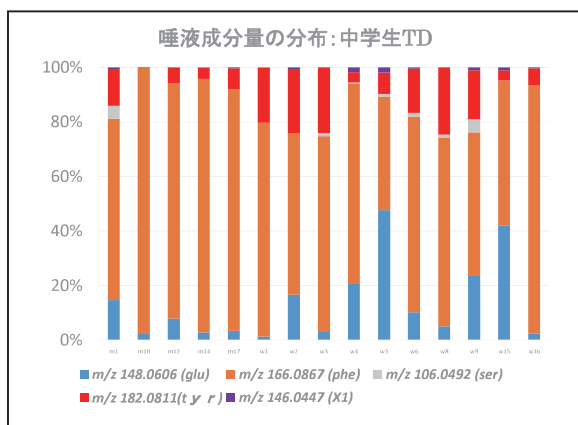


図 11. 唾液成分量の分布 (中学生定型発達)

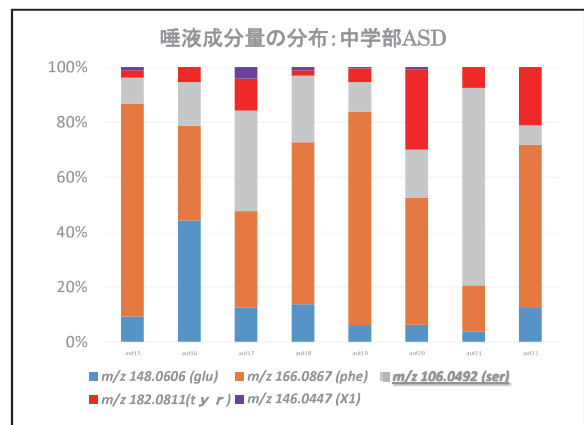


図 12. 唾液成分量の分布 (中学生自閉症)

この結果を見ると、自閉症と定型発達の2群間の比較において、アミノ酸レベルでは、グルタミン酸、フェニルアラニンおよびチロシンで2群間の差は見られないが、自閉症においてセリンの存在量が多いことは注目に値する。アミノ酸の中でもグルタミン酸は、カテコールアミン類と同じく中枢神経系において重要な役割を果たしている神経伝達物質の一つである。またD-セリン(遊離型)は、西川らの統合失調症の研究の過程で、高濃度でラット脳に存在することを発見している^{8,9)}。統合失調症にはグルタミン酸仮説が報告されており、Kimらは、統合失調症患者の脳脊髄液中のグルタミン酸濃度が低下していることを見出した¹⁰⁾。一方、双極性障害の病態におけるD-セリンの関わりが示されている¹¹⁾。これらの研究の背景を基に、上里らは、グルタミン酸/D-セリン系の異常と精神神経疾患の病態との関連を追究している¹²⁾。本研究における著者らの研究結果は、セリンの存在量と自閉症の関係を考え得る上で、有用な知見を与えるものと思われる。

今後の課題として、まず採取した唾液試料をすべて分析し、SIEVEによる解析を行うこと。さらに、その解析結果と研究Iとの結果を比較し、ASDのバイオマーカーとなる候補物質の検討を行っていくこと。また、候補物質の中には、生体内試料だけでなく、様々な物質が含まれている可能性もあるため、生活環境物質との関連を調べていく必要もある。

4 結 言

定型発達群と自閉症群の唾液成分の2群間比較について、統計解析ソフト SIEVE による解析を行ったところ、有意差が 0.001 以下で自閉症群で存在量の多い低分子極性物質を見つけ、その中から、セリンを特定することができた。ASD において特定のアミノ酸が高値であることの代謝的意味を考え、その信憑性を検証する必要がある。ASD 診断マーカーの考え方として、特定の物質だけに注目するのではなく、複数の物質の分布を観察していく方法を考えていくことも必要であろう。ASD の診断マーカーが見つかることで、ASD の原因解明や早期診断を化学的に立証することができる。診断マーカーに関する医学薬学分野における最新研究の進展は著しいものがあり、ASD や自閉症の早期発見・早期診断に対する社会的認識も大きく変化してきている。緒言でも述べた通り、ASD や自閉症に対する研究は、教育支援と共に早期発見・早期診断等の分野でも関心が高まっており、本研究で行われた唾液試料を用いる LC/MS による分析法と共に、唾液試料中の体内物質が診断マーカー追跡に使える可能性が示されたと考えられる。更に、ASD においてグルタミン酸或いはセリンの濃度が高いことを立証する代謝メカニズムの解明と、本研究の差異解析で検出された他の化合物についての構造解析を同時に進めていかなければならない。一方で、いまだ ASD や自閉症の病因解明や決定的な治療法開発には至っていないことも事実であり、個々の研究と共に、今後 ASD 病因解明および早期発見に向けて、医療と教育現場、更に行政や企業の研究機関との連携を図りながら、基礎的な研究が遂行されることを期待したい。

本研究を進めるにあたって、唾液試料の提供をいただいた高知大学教育学部附属特別支援学校および高知市立小学校および中学校に深く感謝申し上げます。

本研究の一部は、科学研究費補助金(平成 26-28 年, 課題番号 26590259, 研究代表)によった。

文 献

- 1) 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).
- 2) 神尾陽子: 自閉症スペクトル障害の早期発見をめぐって, *教育と医学*, 49-57 (2011).
- 3) 蒲生啓司, 須貝一貴: 唾液中の代謝物濃度の比較分析に基づく自閉症スペクトラム障害のバイオマーカー, *高知大学学術研究報告*, **63**:241-252 (2014).
- 4) 熊谷俊幸: 全身疾患としての自閉症, *小児の精神と神経*, **50**(2):147-154 (2010).
- 5) 東田陽博, 堀家慎一, 小泉恵太: 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).
- 6) 藤田貴子, 山崎貴男, 飛松省三: 自閉症スペクトラムにおける視空間認知障害, *Japanese Psychological Review*, **50**(1):46-53 (2007).
- 7) 音羽健司, 佐々木司: 自閉症スペクトラム障害の遺伝子研究, *分子精神医学*, **11**(4):282-288 (2011).
- 8) A.Hashimoto, T.Nishikawa, T.Hayashi, N.Fujii, K.Harada, The presence of free D-serine in rat brain, *FEBS Lett.*, **296**:33-6 (1992).
- 9) T.Nishikawa, Analysis of free D-serine in mammals and its biological relevance, *J. Chromatogr. B, Analyt Technol Biomed Life Sci.*, **879**:3169-83 (2011).
- 10) J.S.Kim, H.H.Kornhuber, W.Schmid-Burgk, B.Holzmuller, Low cerebrospinal fluid glutamate in schizophrenic patients and a new hypothesis on schizophrenia, *Neurosci. Lett.*, **20**:379-82 (1980).
- 11) D.J.Muller, C.C.Zai, T.Shinkai, J.Strauss, J.L.Kennedy, Association between the DAOA/G72 gene and bipolar disorder and meta-analyses in bipolar disorder and schizophrenia, *Bipolar Disord.*, **13**:198-207 (2011).
- 12) 上里彰仁, グルタミン酸/D-セリン系と精神疾患, *D-アミノ酸研究会誌*, **1**(No.1), 1-6 (2013).

平成28年 (2016) 10月12日受理

平成28年 (2016) 12月31日発行