

# 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

蒲生啓司<sup>1,2</sup>・須貝一貴<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>高知大学教育研究部総合科学系複合領域科学部門・  
<sup>2</sup>高知大学大学院総合人間自然科学研究科教育学専攻)

Biomarkers of Autism Spectrum Disorders (ASD) Based on the Comparative Analysis of the Metabolite Concentrations in Saliva

Keiji Gamoh<sup>1,2</sup> and Kazutaka Sugai<sup>2</sup>

*<sup>1</sup>Division of Interdisciplinary Science, Kochi University*

*<sup>2</sup>Graduate School of Integrated Arts and Sciences, Kochi University*

**Abstract** : Autism spectrum disorders (ASD) is a behaviorally-defined group of neurodevelopment disorders characterized by impairments in social interaction and communication, and repetitive, overly focused behaviors. While the syndrome has been shown to be highly heritable, various theories have been presented suggesting both genetic and environmental factors, such as dietary and chemical exposures. Our interest was focused on the biomarker investigation of ASD based on analytical chemical approach using a liquid chromatography/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 ASD and controls using a reversed-phase separation mode and an electrospray ionization method of the LC/MS, in addition to the investigation of biomarkers of ASD based on a comparative analysis using multivariate statistics software, SIEVE.

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

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

## 1 緒言

自閉症は1943年にカナリーによって報告され、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)が明らかにされた。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)と呼ばれている。

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<sup>1)</sup>、分子マーカー<sup>2)</sup>、脳研究<sup>3)</sup>などの様々な分野で行われているが、いまだASDの病因解明がなされているとは言えない。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している疾患である<sup>4)</sup>と推測されている。もうひとつ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り、早期診断が可能になることにより、早期療育への可能性が高まるものと考えられる。

ASD患者に対する早期療育の効果は十分にあり<sup>5)</sup>、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)の向上につながると考えられる。社会サイドの認識が進み、罹患率が急速に伸びているASD患者に対するケア<sup>6)</sup>は、我が国の重要な課題となっている。

上述したASDにおける問題解決にあたって、本研究では、LC/MS法で唾液試料中の化学成分を網羅的に測定し、群間比較を行う統計解析ソフトを用い、自閉症特有のバイオマーカーを見つけることで解決しようと試みた。ASD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に繋がり、更にASDバイオマーカーの制度が高まることにより、新生児や乳幼児の時点でASD発症のリスクが予測可能になるのであれば、新たな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ことが考えられる。

ASDは未解明の疾患であるが、様々な研究報告や知見がある。我々の研究では、①:アミン類のような生体内物質による社会行動変化<sup>7)</sup>、②:オキシトシン投与によるASD症状の改善<sup>8)</sup>、③:社会性マウスの遺伝子ノックアウト研究<sup>9)</sup>、④:ASD特有の症状報告<sup>10)</sup>、などの報告に注目した。これらの論文では、生体内物質濃度変化による特徴的な社会行動変化が報告されており、特に神経ペプチドや神経伝達物質の濃度変化によって社会行動変化が引き起こされることに言及している。したがって、ASDに特徴的な症状も、生体内物質から影響を受けているのではないかと考えることができる。生体内には様々な物質が存在し、生命活動の維持を目的とし、各物質が役割を持ち、連携をとりながら生命活動を維持しているため、生体内における物質によって、我々の精神や行動は支配されていると考えることも可能である。そこで、我々はASD患者の生体内物質を網羅的解析、いわゆるメタボローム解析を試みることにより、ASD体内に特異的に量的に存在または欠損する物質を発見することで、ASDの病因解明にアプローチできるのではないかと考えた。ASD特有の物質がわかることで、そこから代謝経路異常や遺伝子レベルでの病因解明ができることが考えられる。したがって、本研究ではASDの病因解明に向けて、自閉症群と定型発達者の唾液試料を分析試料

として、高分解能 LC/MS を用いて、唾液中の代謝物を網羅的に分析するメタボローム解析を実行し、自閉症分子マーカーとなり得る化合物と早期診断の可能性を追究することとした。

以前の報告<sup>11)</sup>では、唾液サンプルの測定データに基づく自閉症研究の一端として、定型発達者のサンプル供給に時間が必要であったため、ASD と MR（精神遅滞）との差異解析を行った。差異検出ソフト SIEVE によって検出した結果、ASD と MR との間の差異物質として尿酸が検出された。

## 2 実験

### 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者とのメタボローム解析にあたり、定型発達者群として高知市立の小学校の児童と、自閉症群として高知大学特別支援学校の生徒から唾液試料提供の協力を得た。表 1 に学年ごとの協力者の人数を示す。

表 1: 高知市立小学校(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		

以上の人数に協力していただき、唾液採取を行った。採取時の留意点として、

- ① 口腔内の全唾液を直接チューブに吐出する
- 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、ギ酸とアセトニトリルを用いる除タンパクと固相抽出法によって前処理を行った。また、唾液中成分の変化や前処理による流出を極力抑えるため、前処理は出来る限り簡便な手法をとった。

### 2-2 LC/MS と統計解析ソフト SIEVE によるメタボローム解析方法

LC/MS は医療・食品・環境など多くの分野において使用されている分析装置である。LC/MS は混合物を分離し、分離した化合物の質量電荷比(以下  $m/z$ )を得ることのできる分析機器である。LC/MS で得られる情報として、分離度の違いによる化合物特有の保持時間とイオン強度および  $m/z$  を得ることが可能である。本研究では唾液試料のメタボローム解析を行うにあたり、高分解能 LC/MS を用い、測定を行った。高分解能 LC/MS を用いることで、測定精密質量と呼ばれる高精度

の測定データを得ることが可能になり、ここからデータベース検索を行うことで化合物の持つ組成を推定できる。

ま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専用ソフトである。SIEVE は LC/MS 専用のソフトであり、LC/MS の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者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。また、今回の SIEVE による解析は自閉症群から 12 検体、定型発達者群からランダムに 12 検体を抽出し、SIEVE によって 2 群間の差異解析を行った。

### 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、感度を得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：

使用カラム：Xbridge BEH130 C18 (3.5 $\mu$ m, 2.0mm i.d.×150mm L.)

移動相：200  $\mu$ 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%→10min A:98% B:2%→12min A:60% B:40%→16min A:60% B:40%→18min A:25% B:75%→20min A:25% B:75%→22min A:5% B:95%→27min A:5% B:95%→29min A:98% B:2%→38min A:98% B:2%.

#### 2)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(高須小学校児童データ)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このような 2 段階の作業を行った。

#### 1)保持時間の修正

ここでは、繰り返し測定における保持時間の誤差を補正している。繰り返し測定によって保持時

間が微妙にずれるが、これを自動的に補正することができる。

## 2) フレーム処理

LC/MS は保持時間、 $m/z$  およびピーク強度の三次元情報が得られる。SIEVE はこれらの三次元空間を細分化し、細分化されたピーク強度の面積値を用いて検定を行うことができる。今回設定したフレーム処理のパラメーターとして、M/Z Min, M/X Max, Retention Time Start(min), Retention

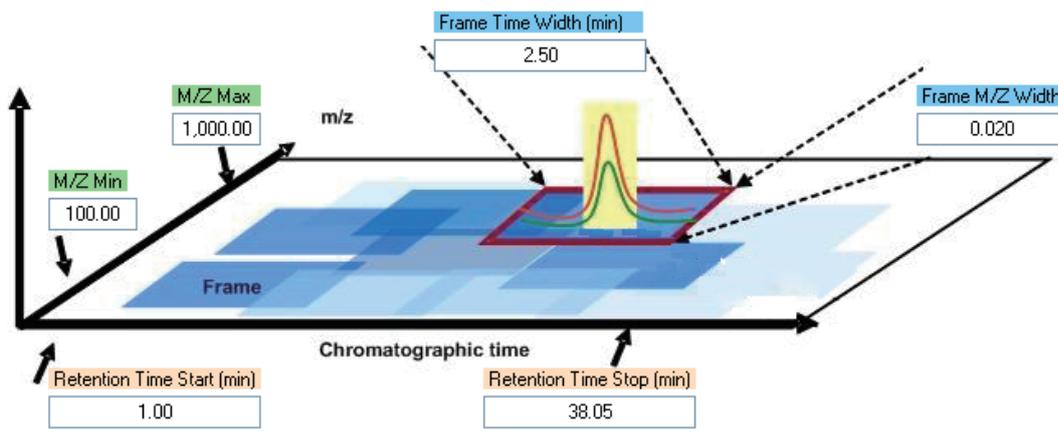


図 1 . 設定したフレーム処理のパラメーター

Time Stop(min), Frame Time Width(min), Frame M/Z Widthがある。これらの説明として M/Z Min, M/X Max は統計解析を行う対象となる  $m/z$  の範囲であり、Retention Time Start(min), Retention Time Stop(min) は統計解析を行う対象となる測定時間の範囲である。Frame Time Width(min) は 1 フレームの保持時間の幅であり、Frame M/Z Width は 1 フレームの  $m/z$  の幅となっている。今回の解析に用いたパラメーターは、図 1 中の数値を用いた。

フレーム処理では、Frame Time Width(min) と Frame M/Z Width によって保持時間と  $m/z$  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三次元のフレームができる。このフレームの中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-検定を行い、差異物質を見つけることが出来る。なお Frame M/Z Width の値を 0.02 と設定した理由は、使用した高分解能 LC/MS は小数点第 4 位までの  $m/z$  を測定できるが、この小数点第 4 位の数値は  $\pm 3\sim 5$  の範囲で誤差が生じる。そのため、Frame M/Z Width の値を 0.01 に設定すると小数点第 4 位の誤差による繰り上がりが起こり、統計解析が正確に出来ない可能性が考えられるからである。今回の解析において Frame M/Z Width の値を 0.02 と設定した。

## 3) SIEVE による化合物推定

SIEVE 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。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。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・考察

自閉症群 12 検体と定型発達者 12 検体の各唾液サンプルを LC/MS で測定し、SIEVE によって解析した結果、約 700 成分が検出された(図 2). 図 2 から、唾液中成分の大部分が高極性物質であり、 $m/z$  400 以下の低分子化合物であることがわかる. このような分布をする約 700 成分が自閉症群と定型発達者群の唾液中に含まれており、これらすべての成分を SIEVE によって解析を行い、差異物質を求めた.

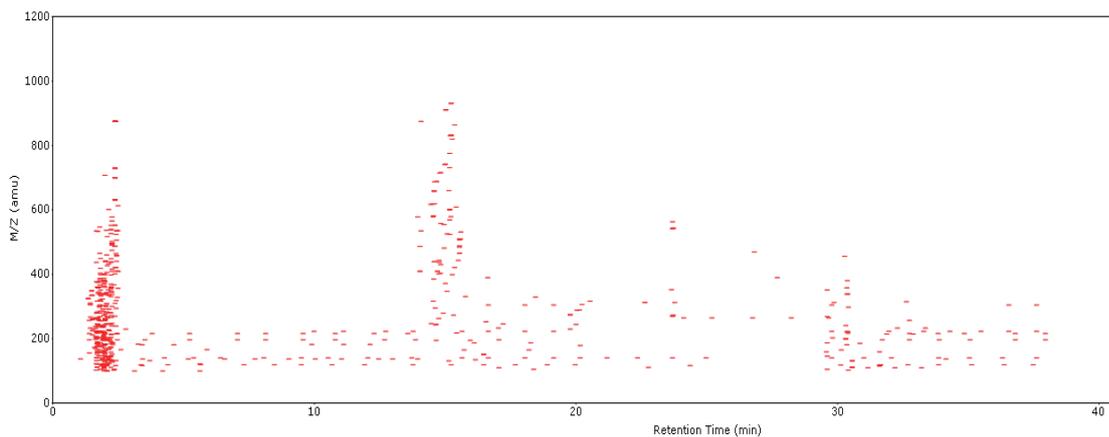


図 2. 唾液成分の分布 (縦軸:  $m/z$ , 横軸: 保持時間)

図 3 は、この約 700 成分全てを解析し、縦軸に 2 群間の存在比を、横軸に統計的有意差を  $p$  値として表した図であり、有意差のある物質と 2 群間における存在比を視覚的に表したものであり、左に行くほど 2 群間における有意差が強く、また縦軸の中心から距離が離れているものほど存在比が大きいことを示す.

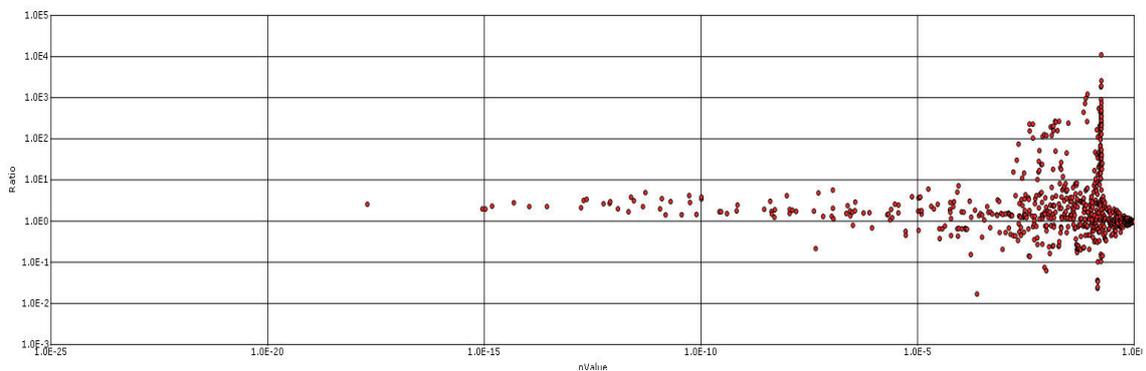


図 3. 2 群間の差異解析の結果から得られた有意差のある物質の存在比

この図を用いて、2 群間における有意差のある物質を網羅的に調べ、全ての物質を調べて行った結果、約 10 種類の差異のある物質を見つけることが出来た. これら約 10 種類の物質は全て 2 群間

における有意差が 0.01 以下のものであった。

しかしながら、10 種類すべての物質を推定することは出来ていない。その理由として考えられることは、測定時に得た測定精密質量がデータベース上に記載されておらず、測定精密質量から化合物の推定ができなかったことである。しかし、今回の SIEVE による解析では約 10 種類中の差異物質から 2 種類の物質を推定することができた。その中の 1 種類が興味深い物質であったため、その 1 種類について詳細を記載する。それは、測定時にプロトン付加体として  $m/z$  148.06050 を与え、LC/MS の両極性分析のうち positive mode で測定可能であり、測定時の精密質量から SIEVE によってグルタミン酸と推定された。

生体内においてグルタミン酸は中枢神経系、神経細胞発達に重要な物質である。自閉症を神経発達障害ととらえる考え方は多く、その例としては自閉症児の平均頭囲拡大<sup>12)</sup>、神経細胞誘導に重要な働きを持つカドヘリンに関する遺伝子異常<sup>13)</sup>、などがある。グルタミン酸も中枢神経系に重要な働きを持つため、SIEVE によって推定されたグルタミン酸が自閉症と関連する可能性は十分にある。鈴木らの研究<sup>14)</sup>では、ASD 患者と定型発達者群の血清サンプルを測定した結果、ASD 群で有意にグルタミン酸濃度が高かったと報告しており、加えて社会性相互作用の障害との関連を見出している。また、グルタミン酸は自閉症の病態への関与も示唆されている<sup>15,16)</sup>。

図 4 にグルタミン酸と推定された化合物のマスクロマトグラムを示す。マスクロマトグラムから明らかにわかることは、用いた移動相条件下では高極性を示し、保持時間が短く、両極性分析において negative mode よりも positive mode での感度が高いことがわかる。また、用いた固定相との疎水性相互作用を考慮すると、この物質は疎水性のアルキル基等は少ないことが推測される。今回行った測定条件によってグルタミン酸を測定したと仮定すると、図 4 のようなマスクロマトグラムになることが十分に考えられる。即ち、SIEVE によってグルタミン酸と推定された化合物はグルタミン酸である可能性が極めて高いことがわかる。

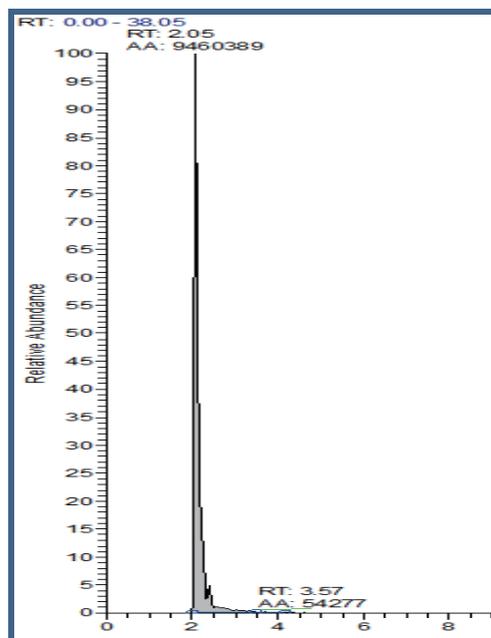


図 4. グルタミン酸と推定された化合物のマスクロマトグラム

また、図 5 にグルタミン酸と仮定された化合物の濃度差を自閉症群 (autism)、定型発達者群

(control) それぞれプロットしたものを示す。横軸は被測定者、縦軸はマスキロマトグラムより得られた濃度を表している。濃度の平均値は、自閉症群で約 3 倍定型発達者群より高く、統計的有意差は  $p < 0.005$  であった。また、定型発達者群では濃度の分布が狭く、自閉症群では広がっている。このような分布が見られたことを考察するのであるならば、自閉症群のサンプリングの際に新版 K 式発達検査 2002, 領域別社会生活年齢の結果を提出してもらったが、軽度から重度の生徒が混在しており、その結果が濃度分布の幅となって表れたと考えられる。しかし、重度の自閉症のためグルタミン酸濃度が増加しているといった結果はなかった。また、統計解析を行った際の年齢差や性差を考え、これらとグルタミン酸の濃度に関連性があるのかを確認したが、関連性は見受けられなかった。特に年齢の増加とグルタミン酸濃度の増減の間を詳しく調べたが、年齢の増加とグルタミン酸濃度の関連性は全くなかった。

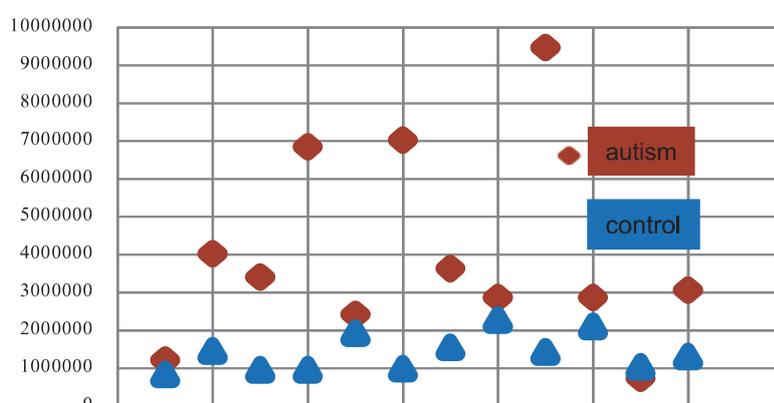


図 5. 自閉症群と定型発達者群のグルタミン酸濃度の分布

#### 4 結 言

バイオ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。冒頭で述べたとおり、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 LC/MS による分析法と共に、唾液試料がバイオ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る。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が連携を図りながら、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附属特別支援学校および高知市立高須小学校に深く感謝申上げる。

本研究の一部は、JSPS 科研費 (平成 26 年 課題番号 26590259) の助成を受けたものである。

## 文 献

- 1) 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).
- 2) 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).
- 3) 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).
- 4) 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).
- 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) 神尾陽子:自閉症スペクトル障害の早期発見をめぐる, *教育と医学*, 49-57 (2011).
- 7) N. Takahashi, N. Hamaue, N. Kuromura: Salivary concentration of 5-hydroxytryptamine in patients with bulimia nervosa, *Biogenic Amines*, **18**(3-6):361-368 (2004).
- 8) 棟居俊夫:自閉症スペクトラム障害における oxytocin の有効性, *日本生物学的精神医学会誌*, **22**(1):35-38 (2011).
- 9) S. Mitsui, Y. Osako, F. Yokoi: A mental retardation gene, *motopsin/neurotrypsin/prss12*, modulates hippocampal function and social interaction, *Europ. J. Neurosci.*, **30**:2368-2378 (2009).
- 10) Y. Kita, T. Hosokawa: History of Autism Spectrum Disorders, Historical Controversy over the Diagnosis, *東北大学大学院教育学研究科研究年報*, **59**(2):147-165 (2011).
- 11) 蒲生啓司, 須貝一貴: 唾液試料を用いた自閉症スペクトル障害のメタボローム解析, *高知大学学術研究報告*, **60**:241-252 (2011).
- 12) 宮尾益知: 自閉症スペクトル障害(ASD)のバイオマーカー ー臨床の現場からー, *小児の精神と神経*, **51**(1):28-31 (2011).
- 13) Wang K., Zhang H., Ma D., et al.: Common genetic variants on 5p14.1 associate with autism spectrum disorders, *Nature*, **459**:528-533 (2009).
- 14) 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).
- 15) Fatemi S.H., Halt A.R., Stary J.M.: Glutamic acid decarboxylase 65 and 67 kDa proteins are reduced in autistic parietal and cerebellar cortices, *Biol. Psychiatry*, **52**:805-810 (2002).
- 16) McDougle C.J., Erickson C.A., Stigler K.A.: Neurochemistry in the path physiology of autism, *J. Clin. Psychiatry*, **66**:9-18 (2005).

平成26年 (2014) 10月9日受理

平成26年 (2014) 12月31日発行