

# 唾液試料を用いた自閉症スペクトラム障害のメタボローム解析

蒲生啓司<sup>1</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)

Metabolomic Analysis of Autism Spectrum Disorder Using Saliva

Keiji GAMOH<sup>1</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) are 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 or chemical exposures. Analytical chemical investigation of autism spectrum disorders based on liquid chromatography/mass spectrometric method has been performed. Our interests were targeted to the concentration of biological metabolites in saliva of autism spectrum disorders. In the present study we demonstrated a liquid chromatography/mass spectrometric analysis of the saliva using a reversed-phase separation mode and electro spray ionization mode of the liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS).

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

**Keywords** : Developmental Disorders, Autism Spectrum Disorder, Metabolomic Analysis, Liquid chromatography/Mass spectrometry

## 1 緒言

発達障害の研究は、如何に早期に発見できるかという問題と、どのような教育的支援が適切であるのかという問題に対して応えることではないかと考えられる。そのためには、発達障害を脳内および血中化学物質の変動（欠乏，不足および過剰）として捉え，発達障害の早期発見に関連して，生体試料分析に基づく神経伝達物質およびその代謝物の『脳脊髄液中－血液中－唾液中』の濃度相関を明らかにすることが必要であり，そのためには，脳内物質と脳外物質との対応関係が明らかになることを目標に，脳内の物質変動を，脳外の試料を使った方法で調べることでできる方法を確立する必要がある。脳障害を診断する物質的マーカーとして断言できるものは無いだけに，ある特定の体内物質，例えば，カテコールアミンやセロトニン（神経伝達物質），エストロゲン（ホルモン），アミラーゼ（酵素）およびペプチド等の濃度を追跡することによって，その変動を連続的に観察し，それとは別個に，発達障害者の行動を化学化する，すなわち行動を生体内化学物質的に捉え定量化すること，同一障害者の行動パターン・行動変化を観察することによって，行動上の有意差を見出すことができるのではないかと考えている。脳内神経伝達物質であっても診断マーカーとは言えないが，それらの微小な増減が障害を診断する判断材料になると考えられるし，かつそれらの物質が，長期的に加齢及び成長に伴ってどのように変化していくのかを追跡することで，発達障害に関する重要な知見が得られるのではないかと考える。発達障害者の脳内に散在する神経伝達物質などの生体内物質が増減することによって行動変化が起きることを調査することは，発達障害を化学的・行動学的に考える観点から大きな意味があり，生体内物質としての変動と発達障害における特異な行動を結び付けることにより，新たな教育的対応・医療的対応を見出すことが可能になる。本研究では，代謝物としての生体内物質の測定に基づいて測定データを統計解析することによって，生体内物質の変動パターンと行動変化との関連性を見出すことを目的としている。

研究の流れとして，①附属特別支援学校の生徒から分析試料（唾液）を採取し，これらを測定する。②得られたデータを定型発達者のそれと比較することによって，差異物質を見出す。③差異物質の変動と特別支援学校の生徒の行動を長期的に観察する。これを実施する上では，教育機関やその家族との連携を必要とし，情報交換のできる体制が必要である。④これらの調査結果を詳細に評価・検討することによって，行動と物質変動の相互関係を見出す。⑤その上で，将来的に有益な特別支援教育を考察し，その活動を検証していかなければならない。そのためには，どのような測定系を組立て，どのような測定試料が目的達成にふさわしいのかを考案しなければならない。

本研究では，本学附属特別支援学校の協力を得て自閉症スペクトラム障害（以後 ASD）に関する調査を行うが，分析試料として唾液を用いることに決めた。唾液は血液中の成分を反映していると考えられ，採取に関しても簡便に行うことが可能である。唾液を採取する最大のメリットは，血液採取と異なりストレスが掛からないことにある。唾液に関する有名な研究では，ストレスマーカーとして唾液成分を診断に用いたり<sup>1)</sup>，セロトニンなどは唾液によって測定を行うことができる<sup>2,3)</sup>など，血液を分析対象とすると多くの情報が得ることができる，しかし，血液採取の際の浸襲性や痛みに対するストレスが，血液成分に影響を及ぼすことが懸念されている。その点，唾液採取ではこれらの影響が少なく済むばかりでなく，本研究では全唾液を吐出法と呼ばれる手法で採取しているためにストレスが掛かり難い。

ASD は脳の発達障害の一種であり，複数の遺伝子が関与していると言われており，ASD に関する研究は，家族間研究，遺伝子マーカー研究<sup>4)</sup>，視空間認知研究<sup>5,6)</sup>，脳形成研究<sup>7)</sup>など多岐にわ

たる。現行の診断法では、質問紙や子供の社会性などを評価し、医師によって診断が行われているが、我々の研究では ASD を化学的に診断または新規の治療法を確立することを大きな目的としているため、これまでの研究報告から、自閉症を何らかの遺伝子疾患であると考え、そこから何らかの代謝異常が引き起こされていると仮定している。代謝異常の結果、通常では生産されない化合物が生産されてしまうか或いは生産されるべき化合物が生産されないことで、ASD 特有の行動を引き起こしている可能性が考えられる。

遺伝子疾患による ASD との関連は、脳内の神経細胞の連携がうまくいっていないことが考えられる。未熟な神経回路では多くの神経細胞が広範な範囲につながっているため、ひとつの入力に対して、必要以上に多くの出力が行われる。これが成熟するに従って神経回路の再編成が行われ、ひとつの入力に対して、必要な出力だけが行われる。また、成熟するに従って使用される神経伝達物質も変化することが報告されている。ASD では、遺伝子疾患のために未熟な脳内の神経回路再編成が通常とは異なる様式をとっている可能性がある。そのために、ASD 特有の行動が引き起こされている可能性が考えられる。この点については、遺伝子操作によってモトプシン欠損マウスを作成し、このマウスの社会行動を調べた三井等の報告<sup>8)</sup>がある。それによると、モトプシン欠損マウスの社会的交流が低下していることが報告されている。その他に、アルギニンバソプレシンの研究もされている。アルギニンバソプレシンは下垂体後葉ホルモンとして恒常性の維持に重要な働きをしている。このアルギニンバソプレシンの受容体はバソプレシン受容体と呼ばれる。精神機能におけるバソプレシン受容体は統合失調症、ASD、うつ病、不安障害など様々な精神疾患との関与を示唆する知見が多数報告されている。江頭等はバソプレシン受容体欠損マウスを作成し、マウスの社会行動が減少したと報告<sup>9)</sup>している。また、シナプス間隙を超えて信号を伝達する働きがある神経伝達物質は社会行動に対して影響を及ぼす。特に神経伝達物質として有名なカテコールアミンとその代謝物は測定方法も数多くある<sup>10)</sup>。覚せい剤で生じる幻覚や妄想と統合失調症の臨床症状は似ており、ドーパミンの過剰作用によるものと考えられる。唾液中セロトニン濃度と心理的衝動性<sup>2)</sup>、攻撃的傾向<sup>11)</sup>、摂食行動<sup>12)</sup>なども関連があると示唆されている。セロトニン濃度は食べ物の消費を増大させ、体重増加を促進するといわれている<sup>13)</sup>。CNS (中枢神経系) セロトニン経路は、気分、衝動抑制と行動抑制、強迫観念に調節に関係し、神経内分泌組織の多様性に影響を与えている<sup>14)</sup>。このように神経伝達物質は社会行動に対して影響を及ぼすことが知られている。

先にも述べたとおり、我々は ASD を遺伝子疾患が引き起こす代謝異常と仮定している。遺伝子疾患にしても代謝異常にしても、これらは物質の相互関係による連絡の取合いである。この物質間の連絡の取合いが ASD では定型発達者とは異なるため、ASD 特有の行動が引き起こされていると考えられる。ASD を持つ児童の関係概念に関する研究などは古くから行われている<sup>15)</sup>。ASD 特有の行動とは、耳ふさぎ行動や瞬間的なパニック<sup>16)</sup>、また視覚に関しては広域優先に強い障害が起きている<sup>17)</sup>、強いこだわりや時間概念が違うなどがある。これらの行動に関しても多くの研究報告がなされているが、やはり脳内の連絡経路が異なっている可能性が示唆されている。これらの研究からも、やはり物質間の連絡が通常とは異なっている可能性或いは物質による影響が考えられる。一部の報告ではオピオイドペプチドが関係しているという説<sup>18)</sup>もある。これらの物質間の比較を行うことによって ASD の物質レベルでの解明を目指している。

本研究では、附属特別支援学校の ASD 生徒の唾液試料を用いて測定を行い、ASD とその対象となるグループの社会行動の違いを生体内物質の差異としてとらえる。また、唾液試料を測定する測定機器に高分解能の液体クロマトグラフィー/質量分析計 (LC/MS) 法を用い、差異物質を明らか

にする．高分解能の LC/MS では小数点第 4 位までの測定精密質量を得ることが可能であるため，差異物質が明らかになった際に同定を行うことができる．同定は測定精密質量から既存のデータベースにアクセスし，そこに記載されている既存物質を用いて行うことができる．このようにして，対象群との比較により ASD を生化学的に解明すると共に早期診断の開発に役立つ．今回行った網羅的解析では，ASD とその対象を 2 群として作成し，年齢，性差などによる影響を極力抑えた．つまり，今回の網羅的解析では純粋に ASD の原因物質を抽出できるように実験系を組立て，この結果によって今後の研究の課題や可能性を見出すことが可能になった．

## 2 実験

### 2-1 分析試料の詳細

試料は高知大学特別支援学校に協力を得て唾液サンプルを用いた．使用したサンプルは ASD として 8 サンプル，精神遅滞（以後 MR）として 5 サンプルを用いた．サンプル提供者の年齢は 12～15 才であり，男女混合になっている．唾液の採取は，口内の唾液を直接容器に採取する吐出法で行った．このようにした理由は，サンプリングの対象者にストレスがかからない方法だからである．採取する際，唾液成分の日内変動を考慮し，複数の日程で同時刻に採取を行った．唾液中の成分の一部は，睡眠に関与するメラトニン<sup>19)</sup> やセロトニンのように日内変動がある．そのため，採取時刻を午前 11 時 30 分と決め，食事や歯磨きによる夾雑物の混入を避け，日内変動を考慮した．また，採取が困難な児童の唾液の採取は，プ

ラスチック製のスポイトによって口内の唾液を採取した．いずれの試料も，測定日まで -20℃ で保存した．上記の表は，サンプル提供者の詳細な情報である．今回の研究では ASD である生徒を ASD 群として扱い，MR をコントロールとして扱った．サンプル数の違いは，症状の程度や体調によって唾液分泌が過度に少ない生徒や欠席した場合があるためである．

学年	サンプル No.	性別	症例	サンプル数
中学 1 年	1	女	ASD	5
	2	男	ダウン症	5
	3	男	MR	5
	4	女	MR	4
	5	男	ASD	4
	6	女	ASD	4
中学 2 年	7	女	MR	5
	8	男	ASD	5
	9	男	9P トリソミー	5
	10	男	ASD	5
	11	男	ASD	5
	12	女	ASD	5
中学 3 年	13	男	ASD	5
	14	男	ダウン症	0
	15	男	MR	5
	16	女	MR	5
	17	男	ASD	5
	18	男	ASD	5

第 1 表：分析の対象とした唾液試料情報  
MR：Mental Retardation（精神遅滞）

## 2-2 試料の前処理法

試薬として、ギ酸（和光純薬製特級）、蒸留水、酢酸、アセトニトリル（以上和光純薬製 HPLC 用）を使用した。唾液サンプルの前処理として、複数の日程で採取した唾液サンプルを一つの容器にまとめ、500  $\mu$ l 採取する。これを遠心分離（15,000rpm $\times$ 10min）し、その後上清 200mg を採取する。採取した上澄みに対し 10%ギ酸：アセトニトリル（1：1）100  $\mu$ l を添加する。次にボルテックスによるミキシング 2 分間を行い、再度遠心分離（15,000rpm $\times$ 10min）し、上清 200  $\mu$ l を採取し、これに 10%酢酸水を 100  $\mu$ l 添加して LC/MS 分析の試料とした。

このような前処理を設定した理由は、唾液中に含まれている代謝物を多く残しておくためである。本来の前処理であれば固相抽出カラムなどを用いて夾雑物を除く操作を施すが、固相抽出カラムを用いることによりサンプルに対して希釈がかかったり、或いは成分の一部が固相抽出カラム内に残存してしまう恐れがある。このようなことを避けるため、今回の前処理ではこのような簡便な前処理を設定した。唾液は血液成分を反映しているが、血液成分よりも濃度が低いとされているため、極力希釈がかかることを避けなければならない。また唾液は、血液や尿と異なり粘性が非常に高く、細菌や周りの環境からのコンタミネーションが多い。したがって前処理でこの粘性を落とす必要があり、この点に関しても今回の前処理は適当であると考えられる。

## 2-3 測定機器及び測定条件

### 2-3-1 実験に用いる装置

使用する機器は、Thermo Fisher SCIENTIFIC 社製の Exactive<sup>TM</sup> Bench-Top LC-MS を使用した。LC 側の構成としては 4 液送液ポンプ、オートサンプラー、およびカラム恒温槽からなる。MS はインターフェイス部分に ESI を採用し、ESI によってイオン化された試料は MS の内部に導かれ、C-Trap 内で一旦閉じ込めた後に、Orbitrap 内で各 m/z によって周波数を測定し、それをフーリエ変換によってスペクトルとして情報を得る。

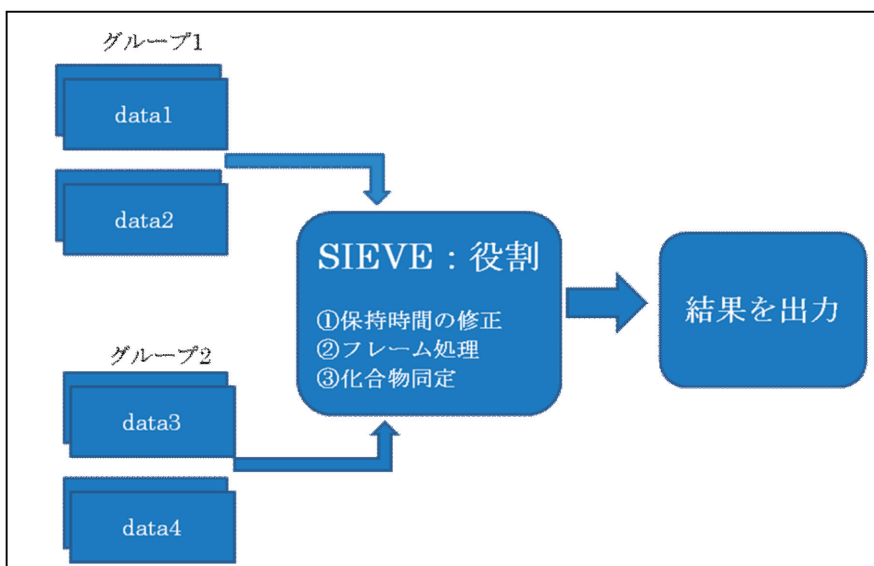
MS に Orbitrap を採用することにより、一定の時間イオンを密閉空間に滞在させておくことができる。この中は電場と磁場が支配しており、電荷をもった物質がこの中で周波数をあてられることによりサイクロトロン運動を行う。このイオンのサイクロトロン運動はイオンの持つ質量電荷比によって運動が異なる。この運動の違いによって質量電荷比毎に分けていく。このイオンの運動毎の周波数をフーリエ変換によってスペクトルに変え、このスペクトルを解析する。このタイプの MS は高い分解能を持っていると言われていたが、Exactive の最大の特徴は、分解能 10 万によって得られる測定精密質量である。

分析カラムとして XBridge BEH130 C18 3.5 $\mu$ m 4.6 $\times$ 150mm Column (Waters 社製) を用いた。このカラムは、充填剤としてオクタデシル基 (C<sub>18</sub>) で修飾されたシリカゲルを使用している。唾液成分は代謝産物を多く含むため、唾液成分の多くは親水性が高い。そのため、シリカゲル等を充填した HILIC カラムを用いて測定することも考えられるが、これまでカテコールアミンやその代謝物を分析試料として HILIC カラムを用いて測定を行った限りでは、カラム内平衡に基づく安定性に乏しかったため、良好な結果を得ることができなかった。したがって本研究では、逆相分配モードに基づく C18 カラムを用いることとした。

### 2-3-2 統計解析ソフト SIEVE



SIEVE による唾液サンプルの網羅的解析の統計処理法を以下に示す。唾液サンプルの網羅的解析には SIEVE ver1.2.0 (Thermo Fisher 社製) を使用した。SIEVE はサンプル間の差異解析のために用いるソフトである。今回の網羅的解析には、2 群間比較による差異解析を行った。SIEVE では全ての測定データのマスクロマトグラムに対し t-検定を行い、有意な差を pValue (統計的有意差) として検出できる。マスクロマトグラムの保持時間の誤差もソ



第 1 図 : SIEVE の解析の流れ

フト内に組込まれている独自のアルゴリズムによって補正する。その結果、有意な差異のみを抽出することができる。更に測定時に得られた測定精密質量から抽出したマスクロマトグラムの  $m/z$  から、データベース検索を行うことができる。第 1 図に SIEVE による解析の流れを示す。

**Alignment** : 溶出時間のずれを補正。Alignment の際の評価基準は Alignment score として表示され、リファレンスとの相違性を確認することができる。**Frame** : 得たデータを保持時間、 $m/z$ 、ピーク強度の 3 次元の空間に展開し、ピーク強度の高い順に保持時間、 $m/z$  フレームを定義し、2 群間の差異を t-検定によって評価する。この作業時に留意する点として、自らがそれぞれのスコアを見て判断しなければならない。まず SIEVE による保持時間のずれの補正について、これは完璧には補正できない。補正時に基準となるデータを設定するが、そこからの修正度合いに関してはスコアを見て判断しなければならない。このときのスコアが悪い場合は後の解析結果に影響が出る恐れがあるため、解析から除外しなければならない。今回の解析ではスコアの低いものは観察できなかった。

次にフレーム処理について、これは設定値を適正にしなければ解析が難しくなる。特に下に記してある **Frame  $m/z$  width** というパラメーターが重要になる。その理由として、上記で記したが **Exactive** は高分解能を持ち、 $m/z$  小数点第 4 位まで測定できる。しかしながら、この小数点第 4 位は±約-4~4 の範囲で誤差が乗じる。**Frame  $m/z$  width 0.01** に設定した場合、測定時に得た  $m/z$  が 10.0008 ならば繰返し測定や、他のサンプルを測定したときに桁が上がる可能性がある。**Frame  $m/z$  width 0.01** に設定してしまうと、この桁が上がる現象のため解析結果に影響が出る。そのため、今回の設定値は **Frame  $m/z$  width 0.02** に設定した。**Frame** 設定条件パラメーターは  $m/z$  min 120,  $m/z$  max 500, Retention time start 2min, Retention time stop 15min, Frame time width 2min, Frame  $m/z$  width 0.02, Maximum number of frame 20000, Peak intensity threshold 100000 とした。

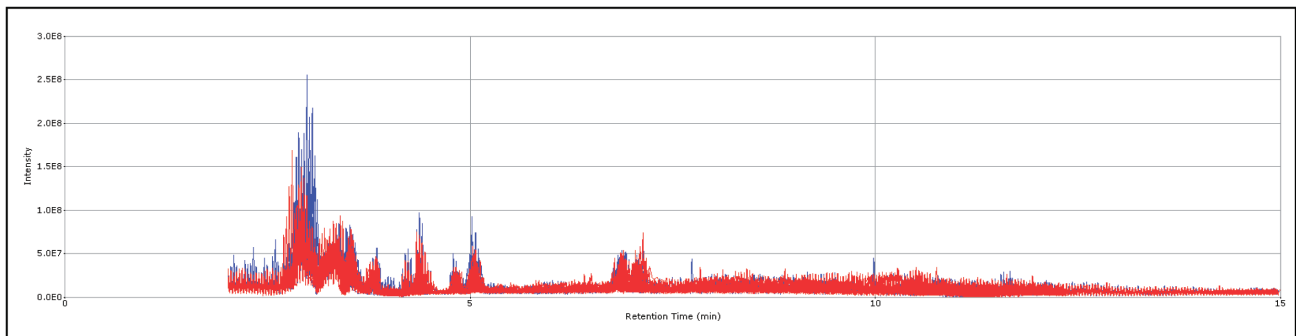
### 2-3-3 LC/MS の分析条件

LC用分離カラムは XBridge BEH130 C18 3.5 $\mu$ m 4.6 $\times$ 150mm Column (Waters 社製) を用い、カラム温度を 30 $^{\circ}$ C とした。移動相は、1%酢酸水を A 液とし、アセトニトリルを B 液とするとグラジエント溶出法を用い、(A 液 : B 液), 0~5 分=92 : 8, 5~9 分=92 : 8 $\rightarrow$ 60 : 40, 9~14 分=60 : 40, 14.01 分=92 : 8, 14.01~21 分=92 : 8 に設定した。流速は 0.5 ml/min とした。本来であれば今回用いたカラムの最適流量は 1.0~1.2 ml/min である。しかし今回の測定では、流量を 0.5 ml/min に設定した。この理由は MS 側にある。今回の MS 側のインターフェイスには ESI を使用した。ESI はキャピラリー内に移動相を流し、その出口に高電圧と窒素ガスをかけることによって移動相内の物質を気化し、イオン化する。このとき流速が高過ぎると全ての移動相を気化できなくなる。すべての移動相を気化できなくなるとインターフェイス内に多くの水滴が付着し、定量結果に影響が出る。定量にはマスクロマト그램の面積値を用いるが、SIEVE もこのマスクロマト그램の面積値を用いる。面積値の変動が大きいことは、平均値には見た目では影響は出ないが、分散値に影響が出る。イオン化が不完全であれば、面積値の分散が大きくなる。マスクロマト그램の面積値を利用する SIEVE は、この数値を使用して t-検定を行う。t-検定による統計的有意差を算出する数式内には、平均値と分散値がある。特に分散値が増加することにより、統計的有意差は分散値と逆に減少する。そうなることにより、本来であれば統計的有意差がある物質を逃してしまう可能性がある。そのため、今回は流速を 0.5ml/min に設定したが、一方で流速を落とすことによってピーク形状に影響が出ることが予測される。カラムに対して最適流量でないと、ピークがブロード状になる。SIEVE は、一定のピーク形状を認識するので、SIEVE によってピーク形状を認識されなければ解析が行われないことになる。しかし今回の測定には、流速を上げることによって面積値が不安定になるよりも、流速を落としてピーク形状が最適にならない方が良い。その理由としては、唾液サンプルは全体的に極性が高く、今回使用しているカラムの充填剤は C18 である。この組み合わせは高極性物質に対し、保持が難しい。そのため、前半部分に集中的にピークが集まる。前半部分はピークが後半部分と比較し、ブロードになり難いためである。今回の流速の設定値で測定を行った。MS 条件は、Positive モード [Sheath gas 32] [Aux gas 14], [Sweep gas 0], [Spray voltage 5.0(kV)], [Capillary temp. 345 $^{\circ}$ C], [Capillary voltage 52.50(v)], [Tube lens voltage (105.00)], [Skimmer voltage 16.00(v)] および Negative モード [Sheath gas flow rate 32], [Aux gas flow rate 14], [Sweep gas flow rate 0], [Spray voltage 5.00(kv)], [Capillary temp. 345 $^{\circ}$ C], [capillary voltage-25.00(v)], [Tube lens voltage-50.00(v)], [Skimmer voltage-22.00(v)] とした。

### 3 結果及び考察

#### 3-1 ASD と MR の TIC による比較

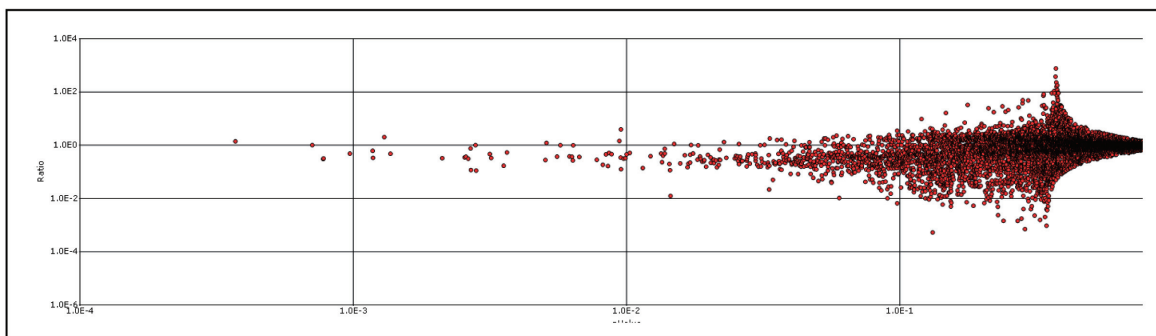
第 2 図は ASD の 8 サンプル、MR の 5 サンプルの TIC (Total Ion Chromatograms) の重書きである。この時点で 2 群間の若干の違いが観察される。全体的にみると青色の MR 由来の成分が多く、赤色の ASD 由来の成分が少なく見えるが、この図のみからでは統計的有意差が表れているものを判断できない。また、前半部分に多くの成分が溶出しているが、これは唾液中の化学成分が極性の大きい代謝物由来であることに起因している。唾液中に含まれる代謝総産物は、体内に取り込まれた物質に対して親水性を付与するために、総じて高極性物質が多く含まれているためである。



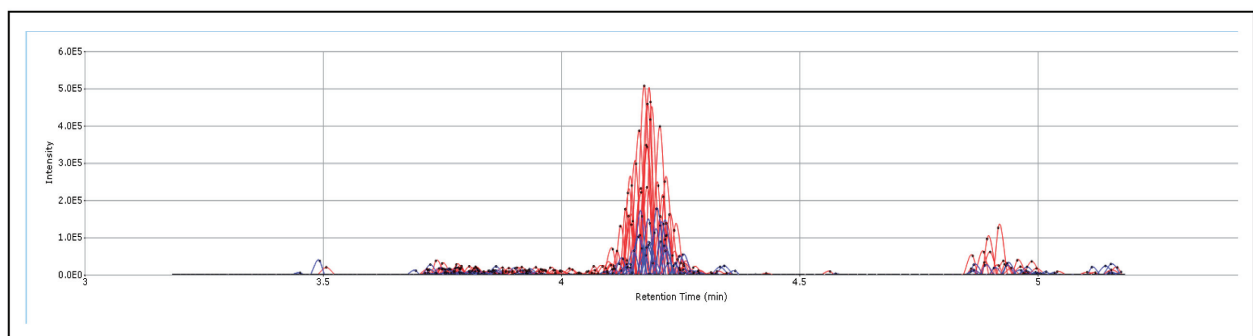
第 2 図 : ASD, MR の TIC (total ion current) 重ね書き (青 : MR, 赤 : ASD)

### 3-2 SIEVE による統計解析

SIEVE を用いた統計解析では, ASD の 8 サンプルおよび MR の 5 サンプルの分析結果から得られる全てのデータを入力する. それに基づいて出力した結果が下第 3 図である. 第 3 図は, 縦軸が 2 群間に含まれる成分の相対比を表わしている. 真ん中を中心とし, 上下に広がるほどその相対比が大きくなる. 横軸は統計的有意差を表している. 統計的有意差は右端を 0 とし, 左に行くほど統計的有意差が大きいことを意味する. この図のプロットはフレーム処理を行い, t-検定を行った数と等しい. この SIEVE によって統計的有意差があると解析されたものを見ていく必要がある.



第 3 図 : SIEVE による ASD8 サンプルと MR5 サンプルの出力結果



第 4 図 : 視覚的差異を表したマスクロマトグラム の例



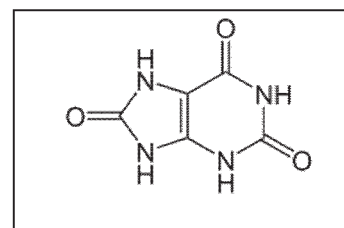
第3図のプロットを選択することにより、第4図のようなマスクロマトグラムが表示される。第4図はマスクロマトグラムによる視覚的差異を表しているものである。青：MR および赤：ASD に対応している。このマスクロマトグラムからは、強い統計的有意差が観測されているように感じられるが、これは測定データを抽出し、抽出したデータのみで解析を行っているため、サンプル全ての情報を集め、t-検定を行うと統計的有意差はほとんどなくなる。しかし、このようなマスクロマトグラムの情報や統計的有意差を表す数値化から、よりよい情報を選択していく必要がある。

### 3-3 SIEVE による解析結果

SIEVE によって数種類の差異のある化合物が推測された。しかし、全ての差異のある化合物がデータベース検索によって見つかるわけではなく、SIEVE 内に導入される Chem Spider に登録されている化合物しか同定を行うことができない。そのため、統計的有意差が見つかった数よりも同定数は減少する。また SIEVE による検索では、測定データの合計情報量が多いほど莫大な時間が必要となる。従って、ASD の 8 サンプルおよび MR の 5 サンプルを各 4 回ずつ測定を繰り返しているが、これらすべての測定データを SIEVE に導入することは出来ない。この問題を解決するために、それぞれの測定データから 1 つの測定データをランダムに抽出し、この 1 つの測定データを集めて SIEVE で統計解析を行う。この手法では、各サンプルデータをランダムに 1 つ測定データを選択しているため、t-検定で使用される各測定データの平均・分散などはほとんど影響を受けない利点がある。この手法によって出てきた統計的有意差の高い  $m/z$  を全てのデータに対して適応し、ここではじめて繰り返し測定 of 平均値や分散を計算する。その後、この全データの t-検定を自ら行うことにした。いくつかのサンプルデータを用い、試験を繰り返したが、SIEVE によって計算された統計的有意差と自ら行った t-検定での差はほとんどなかった。以下 SIEVE によって推測された化合物を示したが、これらの統計的有意差などの計算は上記の方法によって計算したものである。

### 3-4 SIEVE によって推測された化合物

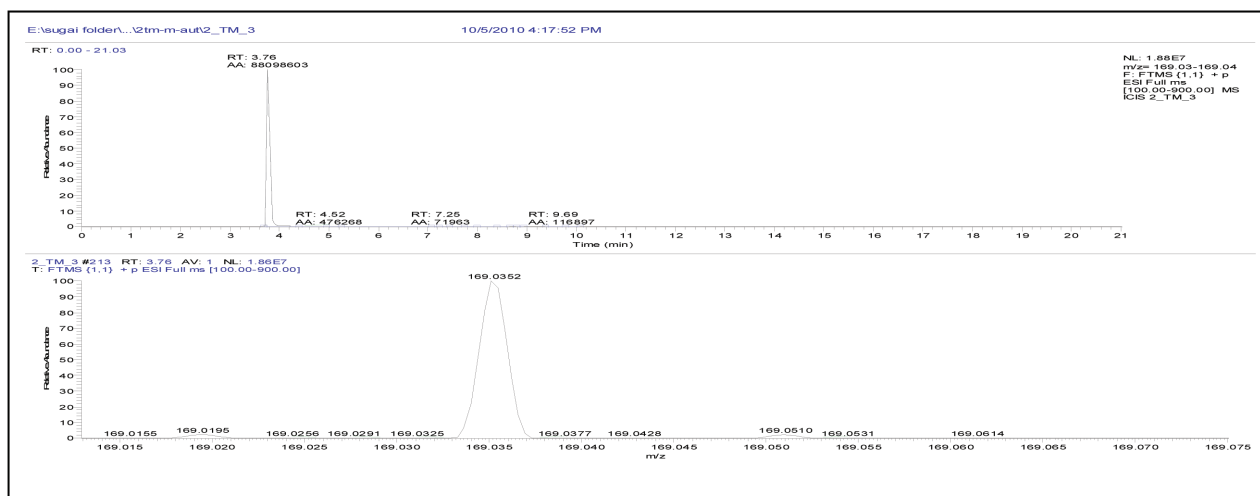
SIEVE によって統計的有意差があるとされ、なおデータベース検索によっても一致した化合物を第5図に示した。尿酸は  $C_5H_4N_4O_3$ 、分子量 168.0283Da である。SIEVE による統計的有意差は  $p < 0.01$ 、保持時間 3.7 分、positive モードにて観測された。尿酸は、唾液中にも含まれていることは知られている。



第5図：尿酸の構造式

第6図は、SIEVE によって尿酸と推測された化合物のマスクロマトグラムである。この推測された化合物は、positive モードによって推測され、 $[M+H]^+169.035 m/z$  として観測された。尿酸の構造式上、今回の移動相の条件では保持時間もおよそこの位になると考えられる。この化合物は ASD の 8 サンプル、MR の 5 サンプル全てのサンプルで観測された。第6図のマスクロマトグラムの面積値は約 88,000,000 である。標準試料による確認作業を行っていないが、この面積値はかなり大きい。面積値が大きいことによって鮮明なマススペクトルを得ることができる。標準品を測定し、そのスペクトルを得ることにより、SIEVE が推測した尿酸と考えられる物質とスペクトルの比較が行い易い。また、Exactive による組成解析の結果を第7図に示した。第7図の組成式の一項目には、尿酸のプロトン付加した組成式が位置していることがわかる。このときの誤差は  $-0.397 mmu$  であり、信頼性は高いと考えられる。次に、SIEVE によって尿酸と推測された

化合物の各面積値を，ASD の 8 サンプルおよび MR の 5 サンプルについてプロットした図が第 8 図である．この図より，面積値約 40,000,000 付近に，ASD と MR の境界線を見ることができるといえる．即ち，尿酸値から判断して，ASD 群は MR 群よりも高値であることが観察された．



第 6 図：尿酸と推測された化合物のマスキロマトグラムとマススペクトル

Single mass

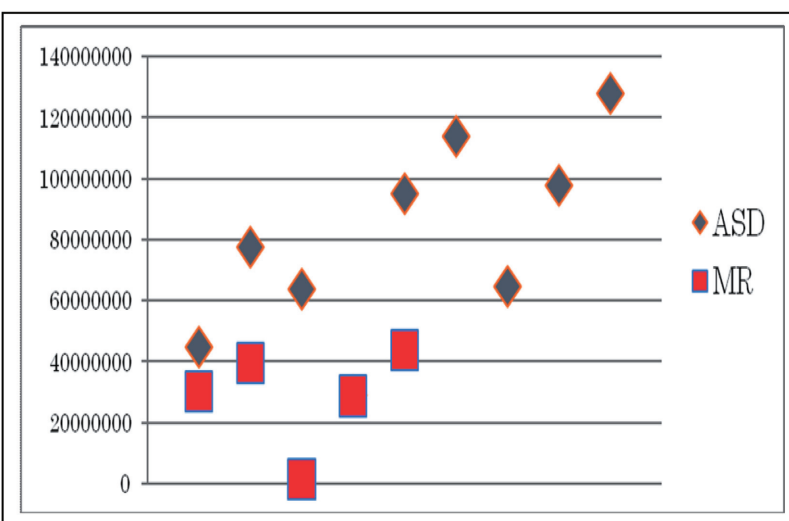
Mass: 169.03522

Mag. results 10 Calculate

Idx	Formula	RDB	Delta mmu
1	C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> O <sub>3</sub> N <sub>4</sub>	5.5	-0.397
2	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> O <sub>7</sub>	0.5	0.941
3	C <sub>3</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> N <sub>7</sub>	6.0	0.946
4	C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> O <sub>4</sub> N	5.0	-1.739
5	C <sub>2</sub> H <sub>7</sub> O <sub>6</sub> N <sub>3</sub>	1.0	2.284
6	CHON <sub>10</sub>	6.5	2.289
7	C <sub>8</sub> H <sub>3</sub> N <sub>5</sub>	10.0	-3.077
8	H <sub>5</sub> O <sub>5</sub> N <sub>6</sub>	1.5	3.626

File... List Simulate

第 7 図：精密質量から検索された組成式



第 8 図：ASD8 サンプル及び MR5 サンプルの面積値のプロット

### 3-5 考 察

本研究では自閉症研究の一端として，唾液サンプルの測定データに基づく ASD と MR との差異解析を行った．ASD を代謝異常疾患としてとらえ，その影響が化学物質として生体内に表れている可能性は十分考えられる．その影響を与えている化合物を，差異検出ソフト SIEVE によって検出した．結果，尿酸がヒットした．今回の研究で，これらの結果を基に新たな可能性と問題点について考察した．まず可能性として ASD と定型発達者の差異を検出できる可能性がある．本来であれば ASD と定型発達者との比較を行う予定であったが，定型発達者のサンプル提供に時間が必要で

あったため、今回は ASD と MR の比較を行った。ASD と MR による比較は今後の研究の試験的研究でもあったが、今回の結果から ASD と定型発達者との差異物質を見つけることが出来る可能性が示唆された。また、今回の研究の成果である尿酸と考えられる化合物を追跡調査することによって新たな知見が得られる可能性もある。加えて、SIEVE を用いることによって他の診断マーカーを検索することも可能であると考えられる。

問題点としては、はじめに、LC/MS 分析を設定する諸条件に対して、SIEVE がどのような変動を示すかである。これは、分析カラム（充填剤）移動相、が変化することによってピーク強度、形状が変化することに起因する。ピーク強度または形状が変化することによって SIEVE の検出結果が変化する。移動相、カラムサイズ、カラム充填剤によってピーク形状が変化する理由は、移動相が変化することによってカラム内の充填剤と物質間の中で働く相互作用に変化が起き、溶出順序が変化する、またはピーク形状が崩れることに起因する。また、同じメーカーのカラムでも充填剤の性質がわずかに異なる。そのため、ピークに何らかの影響が出ることは十分に示唆される。前述したとおり、SIEVE はピークの形状を認識する。そのため、統計的有意差がある化合物が見逃されてしまう可能性がある。なので、SIEVE による解析では何種類かの諸条件によって測定を繰り返す必要性があると考えられる。しかし、このやり方はスループットに欠ける。そのため、前もって試料を測定し、ブランクとの比較を SIEVE で行い、もっともデータ量が多い条件を設定する必要がある。このような方法を取ることによって、確率的に統計的有意差がある物質を検出しやすくする必要がある。

次に、唾液中の差異物質が見つかった際の差異物質の日内変動を追跡調査する必要性があることである。もともと唾液は日内変動などの影響を受けやすいため、差異物質を長期的にわたって観察していく必要があり、今回の研究結果をもとに慎重かつ、長期的に観測していくことが重要である。そのためには教育機関やその家族との連携を必要とする。この協力体制も築いていく必要がある。

また、SIEVE によって同定を行ったが、次の段階として標準試料を準備し標準品のマススペクトルの取得、保持時間の取得を行う必要がある。SIEVE や Exactive による組成解析では、測定時に得た測定精密質量しか用いていない。これだけでもある程度の信頼性は得られるが、より信頼性を得るためには、より高精度の同定作業を築く必要がある。そのため現在考えている方法として、上述したように標準品の入手がある。標準品と唾液中に含まれている尿酸と推測されている化合物を同系統の実験系で測定することにより、物質固有のマススペクトルと保持時間を得ることが出来る。この二つが一致すればより信頼性は向上する。さらに MS/MS 測定を行うことにより、フラグメンテーションのパターン解析や、可能であれば IR などを用いた同定作業も行うつもりである。今後の研究として、さらなる確証を得ることのできる実験系をくみ上げて行きたい。

## 文 献

- 1) 山口昌樹, 高井規安: ドライケミストリーによるストレス評価, *ぶんせき*, **10**, 526-529 (2007).
- 2) 橋本久美: 思春期における心理的衝動性と唾液中セロトニンとの関連, *心理学部研究紀要*, No.1, 93-98 (2005).
- 3) N.Takahashi, N.Hamaue, N.Kuronuma, T.Yoshihara, S.Ando, M.Hirafuji, T.Endo, M.Senjo, S.H.Parvez and M.Minami: Salivary concentration of 5-hydroxytryptamine in patients with bulimia nervosa, *Biogenic Amines*, **18**(No.3), 361-368 (2004).

- 4) 東田陽博：自閉症分子マーカー探索，*医学の歩み*，**231**(No.10), 1072-1077 (2009).
- 5) 片桐正敏：健常成人における自閉症尺度得点による視覚処理特性の違い，*信学技法, IEICE Technical Report HIP*, **6**, 39-43 (2007).
- 6) 藤田貴子：自閉症スペクトラムにおける視空間認知障害，*Japanese Psychological Review*, **50**(No.1), 46-53 (2007).
- 7) 中根 晃：脳科学と自閉症スペクトラムの精神生物学，*The Japanese Journal of Autistic Spectrum*, **7**, 81-88 (2008).
- 8) S. Mitsui, Y.Osako, F.Yokoi, M.T.Dang, K.Yuri, Y.Li and N.Yamaguchi：A mental retardation gene, motopsin/neurotrypsin/prss12, modulates hippocampal function and social interaction, *European Journal of Neuroscience*, **30**, 2368-2378 (2009).
- 9) 江頭伸昭：精神機能におけるパンプレシン受容体の役割，*日薬理誌*，**134**, 3-7 (2009).
- 10) T. Hasegawa, K.Wada, E.Hiyama, T.Masujima：Pretreatment and one-shot separating analysis of whole catecholamine metabolites in plasma by using LC/MS, *Anal. Bioanal. Chem.*, **385**, 814-820 (2006).
- 11) D.J.Stein, E.Hollander, M.R.Liebowitz：Neurobiology of impulsivity and the impulse control disorders, *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.*, **5**, 9-17 (1993).
- 12) G.K.Frank, W.H.Kaye, T.E.Weltzin：Reduced 5-HT<sub>2A</sub> receptor binding after recovery from *anorexia nervosa*, *Biol.Psychiatry*, **52**, 896-906 (2002).
- 13) S.F. Leibowitz and G. Shor-Posner：Brain serotonin and eating behavior, *Appetite*, **7**, 1-14 (1986).
- 14) シャッツバーグ・ネメフロ編：*精神神経薬理学大辞典*，西村書店，698 (2009).
- 15) 近藤明子，太田千鶴子，小林重雄：自閉症児の関係概念に関する研究（1）空間概念について，*心身障害学研究*，**2**, 33-38 (1979).
- 16) 十一元三，神尾洋子：自律神経反応からみた自閉症の覚醒状態，*児童精神医学とその近接領域*，**40**, 319-327 (1999).
- 17) S. Dakin and U. Frith：Vagaries of visual perception in autism, *Neuron*, **48**, 497-507 (2005).
- 18) K. Dettmer, D. Hanna, P. Whetstone, R. Hansen, B.D. Hammock：Autism and urinary exogenous neuropeptides: development of an on-line SPE-HPLC-tandem mass spectrometry method to test the opioid excess theory, *Anal Bioanal Chem.*, **388**, 1643-1652 (2007).
- 19) 駒形美穂，高木司，板橋光春，久保野勝男，三島和夫：メラトニン測定キットの基礎的検討および日内変動のパターンについて，*生物試料分析*，**21**(No4), 293-297 (1998).

平成23年（2011）11月15日受理

平成23年（2011）12月31日発行