

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09727

研究課題名(和文) 早産児における尿メタボローム解析の有用性についての検討

研究課題名(英文) Urinary metabolome analysis in preterm infants

研究代表者

東海林 宏道 (Shoji, Hiromichi)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30365621

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：これまで、メタボローム解析により栄養法の違いが早産児や正期産児の代謝に及ぼす影響について検討した報告は少ない。当院の正期産児および在胎28～31週の早産児を対象に、正期産母乳栄養群(TB)、正期産人工栄養群(TF)、早産母乳栄養群(PB)、早産混合栄養群(PM)の尿メタボローム解析を施行した。1か月時におけるTB群のコリン関連物質排泄はTF群に比べて有意に高値であった。PB群における尿中コリンおよびNN-ジメチルグリシン排泄はPM群に比べ有意に低値であった。PM群ではTF群に比べてコリン関連物質排泄が高値であった。人工乳改良の観点からもCE-MS法による尿メタボローム解析は有用と考えられた。

研究成果の概要(英文)：We performed to examine the nutritional effect on term and preterm infants using urinary metabolome analysis. The infants were separated into four groups: the term-breast group (TB), the term-formula group (TF), the preterm-breast (PB), and the preterm-mixed group (PM). Urinary excretion of choline metabolites at 1mo were significantly higher in TB than in TF. Choline, betaine, and sarcosine excretion was not significantly different between the PB and TB at 1mo. Choline and N,N-dimethylglycine excretion was significantly higher in PM than PB at 1mo. Choline metabolites excretion was also significantly higher in PM than TF. Choline and betaine levels were significantly higher in the preterm than term formula used in this study. The type of feeding in early infancy affects choline metabolism. Metabolome analysis is useful for assessing choline metabolism to modify the contents of infant formulas also in preterm infants.

研究分野：新生児学

キーワード：早産児 母乳栄養 人工乳 メタボローム解析

1. 研究開始当初の背景

ポストゲノム研究の新しい手法として注目されているメタボローム解析は、細胞内代謝産物(メタボローム)を網羅的に探索することによって生命現象を包括的に理解しようとする方法論である。ヒトでは約3,000種類とされ、近年では代謝制御機構、酵素やトランスポーターの機能解明のみならず、代謝異常やがんなどの機序解明などに応用されている。キャピラリー電気泳動-質量分析法 (capillary electrophoresis - mass spectrometry: CE-MS) はイオン性代謝物を網羅的に測定できるという利点があり、解糖系、ペントースリン酸経路、クエン酸回路といったエネルギー代謝経路や核酸代謝、アミノ酸代謝など、主要な代謝経路の代謝中間体の大部分はイオン性であることから、国内でよく用いられているメタボローム分析法である。子宮内(胎児期)発育不全 (intrauterine growth restriction: IUGR) の有無や、新生児期の栄養方法(母乳栄養、人工乳栄養)で栄養素の代謝に相違があることが予測されるが、これまで小児や新生児領域での検討は少ない。

2. 研究の目的

IUGR 動物実験モデル、ヒト正常産児および早産児を対象とし、血液、尿検体を用いて CE-MS 法によるメタボローム解析を行い、その有用性について検討した。また、追加検討として、市販の人工乳サンプルのメタボローム解析を行った。

3. 研究の方法

(1) IUGR ラットにおける血清、尿メタボローム解析についての検討:

妊娠18日目のSDラットに対して両側子宮動静脈結紮術を行い、その後自然分娩で出生したラットをIUGRラットとし、偽手術施行後に出生したラットをコントロール群とした。各群の雄ラット4匹について、生後4週、8週で採血および採尿を行い、CE-MS法によるメタボローム解析を施行した。

(2) 尿メタボローム解析を用いた生後6か月間の母乳栄養の効果についての検討:

当院にて出生した正常新生児を対象とした。母乳栄養群(人工乳使用が540mL/週末満、1か月時:13例、6か月時:9例)、完全人工乳栄養群(1か月時:6例、6か月時:5例)について採尿し、CE-MS法によるメタボローム解析を実施した。解析項目の一つであるクレアチニンによる補正值を用いて評価した。

(3) メタボローム解析を用いた早産児における尿中コリン代謝物についての検討:

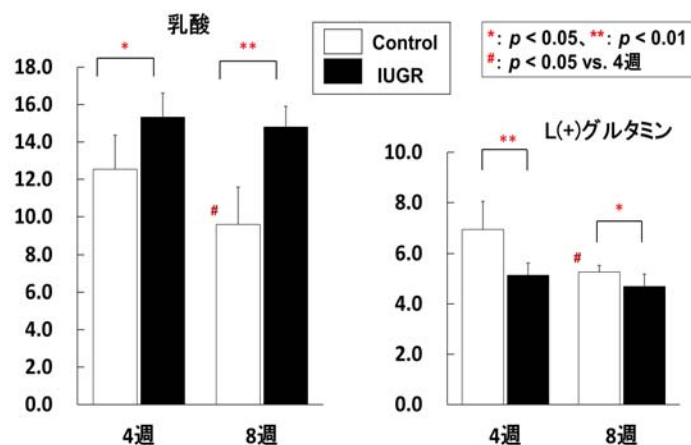
当院にて出生した在胎28~31週の早産児を対象とし、母乳栄養(PB)群11例、混合栄養(PM)群9例について、経静脈栄養が終了し全身状態の安定した生後14~29日の間に採尿し、CE-MS法によるメタボローム解析を施行した。さらに当院で正常産児として出生した生後1か月の母乳栄養(TB)群13例、人工栄養(TF)群6例の尿メタボローム解析結果と比較検討した。

(4) メタボローム解析を用いた人工乳の特徴についての検討

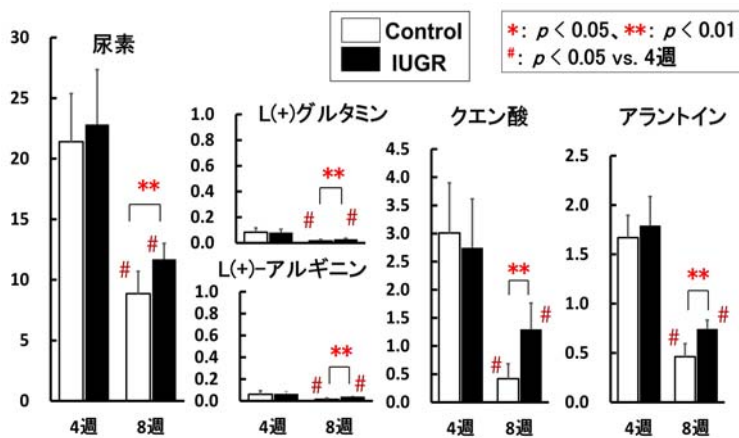
入手できた国内メーカーの人工乳サンプル(正常産児用5種類:A社~E社、早産児用4種類:A社~D社)について、CE-MS法によるメタボローム解析を行った。

4. 研究成果

- (1) 生後4週、生後8週において、両群の体重に有意差は認めなかった。血清メタボローム解析では70種類のメタボライトが検出された。IUGR群ではコントロール群に比べ、生後4週と8週とに共通して有意に乳酸が高値を示し、L(+)-グルタミンが低値を示した。乳酸について、コントロール群では生後8週で4週に比べて有意に低値を示したが、IUGR群では生後4週と8週との間で有意差を認めなかった。



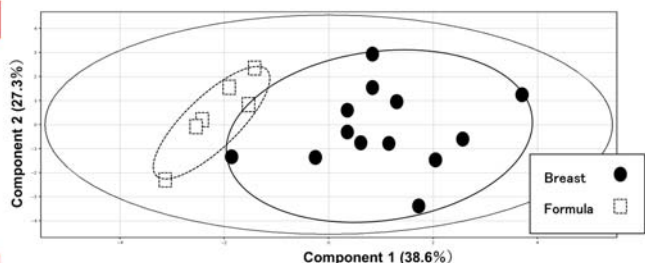
尿メタボローム解析では54種類のメタボライトが検出された。多くの物質で生後4週に尿中メタボライト排泄が最も高く、両群間で有意差は認めなかったが、IUGR群では排泄低下が遅れ、生後8週ではコントロール群に比べ有意に高値であった。



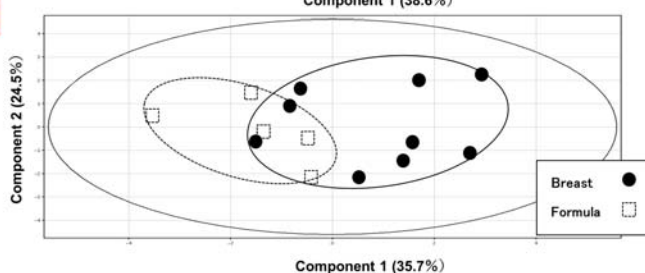
血清メタボローム解析から、IUGRにより乳酸高値、1-グルタミン低値といった影響が長期に残る可能性が示唆された。尿メタボローム解析から、IUGRによりメタボライト排泄増多が長期に持続し、代謝機能よりも近位尿細管機能の発達に影響する可能性が示唆された。

- (2) 在胎週数、出生体重、健診時の体重に両群間で有意差を認めなかった。メタボローム解析で測定した全110のメタボライトのうち、29項目がすべての尿サンプルで検出された。主成分解析では、生後1か月時において両群はほぼ分離しており、尿の含有成分が異なる傾向がみられたが、6か月時では分離が不明瞭となった。

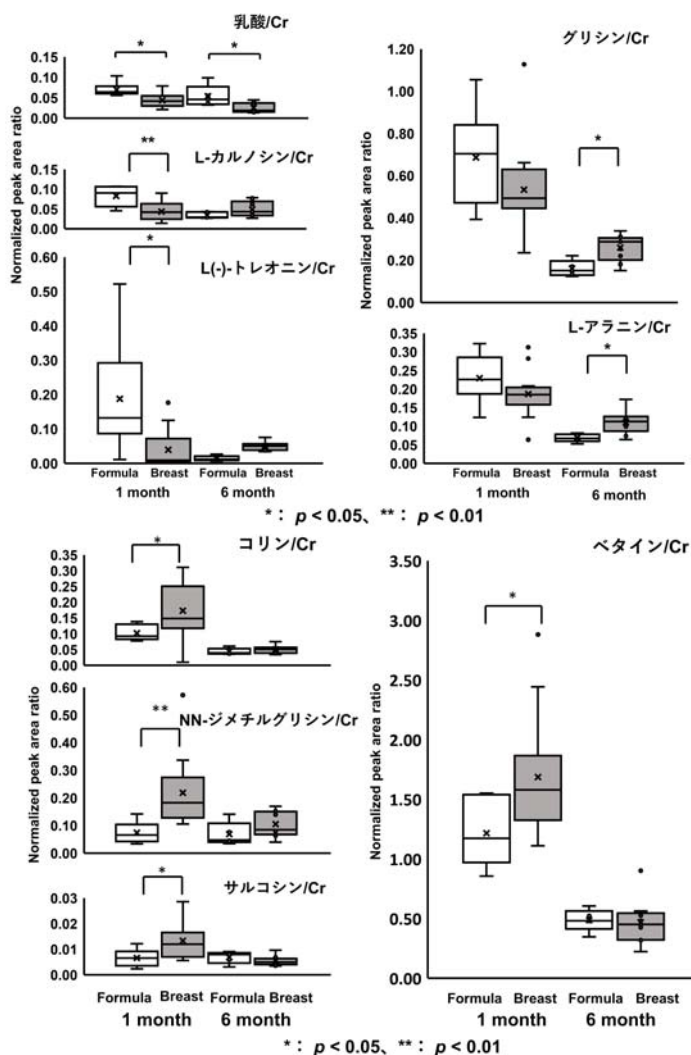
1か月



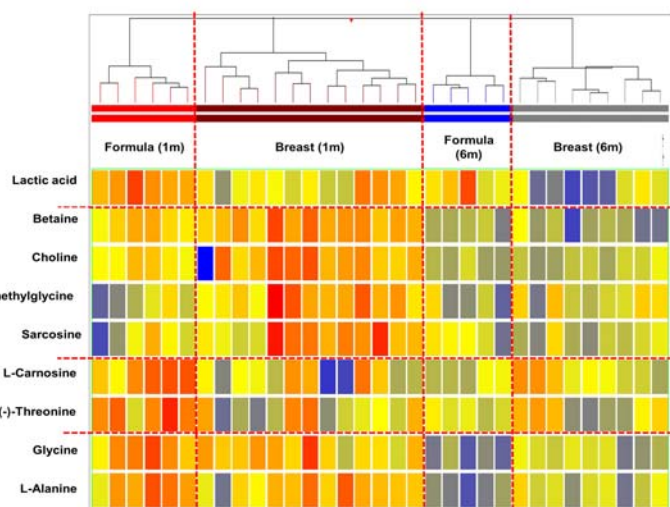
6か月



母乳栄養群では人工乳栄養群に比べ、両ポイントで乳酸排泄が有意に低値を示した。カルノシンおよびトレオニン排泄は生後1か月において母乳栄養群で有意に低値を示し、グリシンおよびアラニン排泄は生後6か月において母乳栄養群で有意に高値を示した。コリン及びコリン代謝物であるベタイン、N,N-ジメチルグリシンなどが母乳栄養群の生後1か月時で有意に高値を示したが、6か月時には有意差を認めなかった。



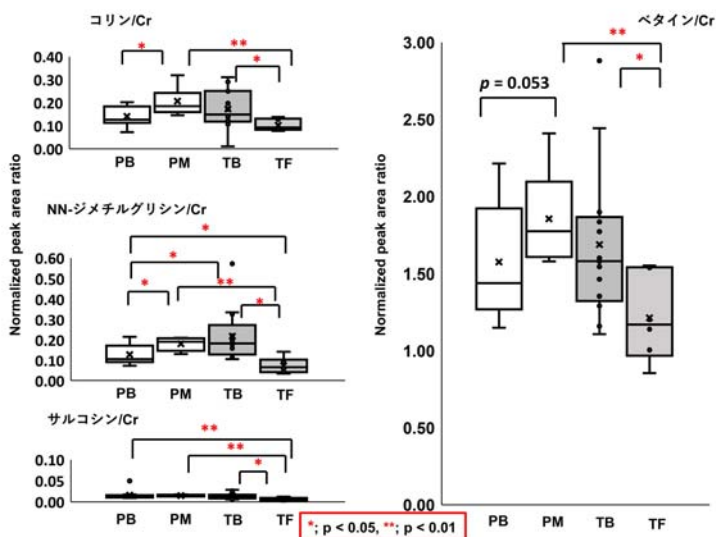
尿中排泄量の有意差のあった7項目について、階層的クラスター分析を行ったところ、母乳栄養群と人工乳栄養群ではヒートマップの傾向が明らかに異なっていた。



正期産児における尿メタボローム解析により、母乳栄養児では生後6か月の間、

生体の乳酸産生低下に影響する可能性が示唆された。母乳栄養と人工乳栄養では生後1か月の時点で尿コリン及びコリン代謝物排泄が異なり、摂取量に差があると考えられた。人工乳改良の観点からも尿メタボローム解析は有用と考えられた。

- (3) PB群とPM群、TB群とTF群との間に在胎週数、出生体重、採尿時の体重に有意差を認めなかった。コリンおよびコリン代謝産物について、PB群における尿中コリンおよびNN-ジメチルグリシン排泄はPM群に比べ有意に低値であり ($p < 0.05$)、最も排泄量の多いベタインも低い傾向が認められたが ($p < 0.053$)、最も排泄の少ない尿中サルコシンは両群間で有意差を認めなかった。PB群ではTB群に比べ、NN-ジメチルグリシン排泄が有意に低値であったが、コリン、ベタイン、サルコシン排泄は両群間に有意差を認めなかった。PM群ではTF群に比べ、4項目いずれの排泄も高値であった。



安定期の早産児において、尿中コリン代謝物排泄は正産児と比べて大きな相違はないが、正産児とは異なり母乳栄養児で低くなる傾向が示された。早産児用と正産児用とで人工乳のコリン代謝物組成が異なることが影響した可能性があると考えられた。

- (4) メタボローム解析で測定した全110のメタボライトのうち、40項目がすべての人工乳サンプルで検出された。主成分分析では各人工乳サンプルはほぼ分離しており、成分含量の傾向が異なっていた。バリン、イソロイシン、ロイシン、リジン、アルギニン、フェニルアラニンなどのアミノ酸含量はA社早産児用人工乳で突出して高値であった。A、B社人工乳の

コリン含量は正産児用、早産児用で同等であったが、C、D社では早産児用人工乳で有意に高値であった。A社～D社のベタイン含量は早産児人工乳で正産児用人工乳に比べ有意に高値であった。メタボローム解析により、人工乳の成分含量は正産児用、早産児用で異なり、各メーカーに特徴があることが示された。今後、母乳サンプルの解析結果と比較し、人工乳改良に向けた基礎データとなるか検討していく。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

- ① Shoji H, Taka H, Kaga N, Ikeda N, Kitamura T, Miura Y, Shimizu T. A pilot study of the effect of human breast milk on urinary metabolome analysis in infants. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 査読有. 28;30:939-946,2017. doi: 10.1515/jpem-2017-0179.
- ② Shoji H, Shimizu T. The role of breast-feeding on biological metabolisms in infants. *Pediatr Int.* 査読有. 投稿中.
- ③ Shoji H, Taka H, Kaga N, Ikeda N, Hisata K, Miura Y, Shimizu T. Choline-related metabolites influenced by feeding patterns in preterm and term infants. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 査読有. 投稿中.

[学会発表] (計6件)

- ① 東海林宏道, 村野弥生, 池田奈帆, 遠藤周, 西崎直人, 清水俊明. 子宮内発育不全ラットの尿メタボローム解析についての検討. 日本小児科学会学術集会, 2016.
- ② 東海林宏道, 北村知宏, 清水俊明, 三浦芳樹, 高ひかり, 加賀直子. 生後1ヵ月児における栄養法別の尿中コリン代謝物に関する検討. 日本小児栄養消化器肝臓学会学術集会, 2016.
- ③ 村野弥生, 東海林宏道, 池田奈帆, 西崎直人, 清水俊明. 子宮内発育不全ラットの血清メタボローム解析についての検討. 日本周産期新生児医学会学術集会, 2017.
- ④ 東海林宏道, 池田奈帆, 北村知宏, 清水俊明. 尿メタボローム解析を用いた生後1ヵ月児における母乳栄養の効果についての検討. 日本小児科学会学術集会, 2017.
- ⑤ 東海林宏道, 池田奈帆, 北村知宏, 清水俊明. 尿メタボローム解析を用いた生後6ヵ月間の母乳栄養の効果についての検

討. 日本周産期新生児医学会学術集会, 2017.

- ⑥ 東海林宏道, 大川夏紀, 森真理, 菅沼広樹, 北村知宏, 鈴木光幸, 大塚宜一, 清水俊明. 早産児における尿中コリン代謝物に関する検討. 日本小児栄養消化器肝臓学会学術集会, 2017.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

東海林 宏道 (SHOJI, Hiromichi)
順天堂大学・医学研究科・准教授
研究者番号：30365621

(2) 研究分担者

清水 俊明 (SHIMIZU, Toshiaki)
順天堂大学・医学部・教授
研究者番号：30260889

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

池田 奈帆 (IKEDA, Naho)
順天堂大学・医学部・助手
研究者番号：20773881