

Application Note

No. 96

ライフサイエンス

羊水に含まれる代謝物・元素・細菌叢の マルチオミクス解析による早期産メカニズム 研究

中川 裕貴¹、守屋 宏一¹、漆山 大知²、宮本 新吾³



Life Science

■ 要旨

ガスクロマトグラフ質量分析計（GCMS-TQ™8040 NX）とエネルギー分散型蛍光X線分析装置（EDX-7200）を用いて妊婦の羊水中に含まれる代謝物（488成分）と含有元素（78元素）を分析しました。それらのデータを小型次世代シーケンサー（MinION Mk1Cシステム、株式会社オックスフォード・ナノポアテクノロジーズ）を用いて測定した羊水中細菌叢（約250種の微生物）と分娩データ16項目（例：新生児体重）と統合し、早期産と正産の出産の差異を解析しました。検出された740項目を基にマルチオミクス解析パッケージによりボルケーノプロット解析や代謝経路解析を実施しました。本稿では、性別や時系列に分けてマルチオミクス解析を実施した事例についてご紹介します。

1. はじめに

早期産は、妊娠期間が22週間以降37週未満での分娩を指し、新生児の健康や発達、その家族の生活に重大な影響を与える可能性があります。この問題は世界中で起こっており、2020年には世界の全出生数の10分の1が早期産でした¹⁾（図1）。未熟児は幼年期死亡原因の一位であるため早期産に関する研究促進が急務となっていますが、2010年から2020年にかけての世界全体の早産減少率はわずか0.14%で、出産周期の改善が進んでいないことが分かります。このひとつの原因として、先進国では出生率が年々低下しており、妊婦ケアに関する市場の縮小に伴い、企業による研究費用等の投資先として忌避されている可能性があります。

しかし、早期産に関する研究を推進しメカニズムを解析することは、予防策を見つけるために不可欠です。

早期産は羊水と密接な関係があることが知られています²⁾。羊水は約500 mLの水で、胎児の尿や脱落した細胞・炎症性物質などを含むため、胎児の成長や健康状態を把握する上で貴重な情報源となります³⁾。羊水中の代謝物の測定は、胎児の代謝活動や栄養状態を評価するのに役立ちます。また、元素の測定によって、胎児の発育や環境への曝露の程度を把握することができます。

また、羊水中の細菌叢の測定も重要です。細菌叢は、妊娠中の母体と胎児の健康に密接に関連しています。特定の細菌の存在やバランスの乱れは、妊婦の炎症反応や早期産のリスクを増加させる可能性があります。早期産の約8割は膣から子宮、子宮から羊水への細菌感染の連鎖を起こした妊婦であることが分かっています⁴⁾。

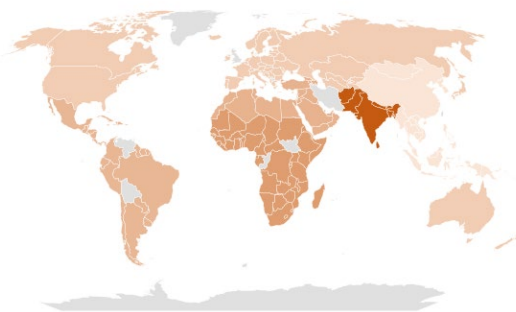


図1 2020年の国・地域別早期産率（赤が濃いほど早期産率が高い）
高い地域では13.2%、低い地域では7.9%

1 株式会社島津製作所

2 福岡大学医学部産科婦人科学講座

3 ナノアーキア合同会社、社会医療法人孝仁会 札幌孝仁会記念病院

本報では、ガスクロマトグラフ質量分析計GCMS-TQ8040 NXとエネルギー分散型蛍光X線分析装置 EDX-7200と小型次世代シーケンサーMinION Mk1Cを用いて、早期産と正期産の妊婦の羊水に含まれる一次代謝物と元素と細菌叢を測定しました(図2)。それらのデータを分娩データ16項目(例：女性の年齢、新生児体重など)と統合し、マルチオミクス解析パッケージにより早期産と正期産の羊水含有物の差異を探索しました。

2. 測定方法

早期産した妊婦の羊水(n=3)と正期産した妊婦の羊水(n=3)を試料としました。羊水を多角的に評価(マルチオミクス解析を実施)するために、以下3つの装置を用いて合計796の化合物、元素、細菌種を測定しました(図3)。

・ガスクロマトグラフ質量分析計

GCMS-TQ8040 NXとSmart Metabolites Database™ Ver.2を用いて有機酸、糖、核酸、脂肪酸、アミノ酸などの一次代謝物488成分を測定しました。各検体で約400成分の一次代謝物が検出されました。各検体で検出された代謝物の面積値は、ブランクである水試料で検出された面積値を減算した後、内部標準物質である2-イソプロピルリンゴ酸により補正しました。



図2 EDX-7200 (左)、MinION (上)、GCMS-TQ8040 NX (右)

・エネルギー分散型蛍光X線分析装置

不活化した各試料から300 μLを試料容器に分注し、Heガス雰囲気下で測定しました。分析対象元素は原子番号11番目のNa(ナトリウム)から92番目のU(ウラン)までの78元素(希ガスを除く)です。検出下限は元素によって異なりますが、数ppm~数百ppmで、羊水に含まれる元素を分析しました。各検体で6つの元素(Cl、K、Ca、S、P、Br)が検出されました。

・次世代シーケンサー

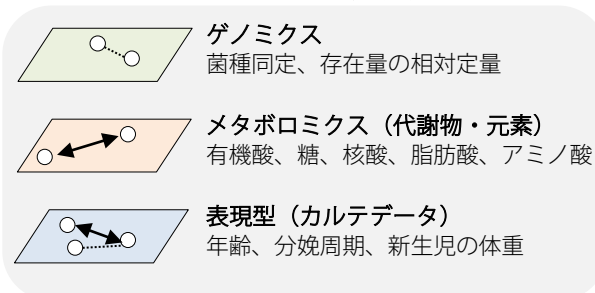
試料をQIAamp DNA Microbiome Kit (QIAGEN)で溶菌した後DNA抽出し、16S rRNA遺伝子の全長をユニバーサルプライマー27F(5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3')および1492R(5'-CGGTTACCTTGTTACGACTT-3')を用いてPCR増幅しました。ナノポア社のプロトコルに従ってライブラリーを作製し、MinION Mk1Cを用いてAmplicon DNAの配列を決定しました。396菌種を測定し、各被験者で約20菌種が同定され相対定量値が算出されました。

検出された約700の説明変数(化合物・元素・菌種)は、マルチオミクス解析パッケージに読み込み、統計解析しました。マルチオミクス解析パッケージは主成分分析、階級クラスタ解析、ボックスプロット解析、ボルケーノプロット解析、代謝経路解析(代謝経路図上での相関解析や時系列解析)を搭載したソフトウェアです(図4)。

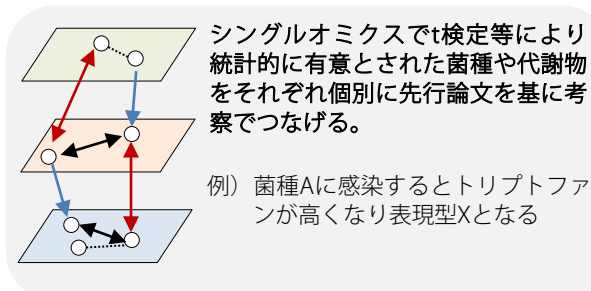


図4 マルチオミクス解析パッケージ (Garuda)

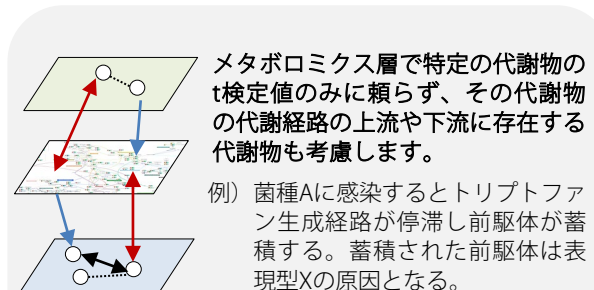
シングルオミクス解析概念



従来のマルチオミクス解析概念



弊社のマルチオミクス解析パッケージ



* ボルケーノプロットを代謝経路上に投影する手法や主成分分析を代謝経路上で解析する手法など弊社独自の解析手法を用います(特許出願中)。詳細はアプリケーションノートNo.94「次世代シーケンサーとGC/MSによる腸内細菌叢と代謝物と香気成分のマルチオミクス解析」をご参照ください。

図3 シングルオミクス解析とマルチオミクス解析の概念

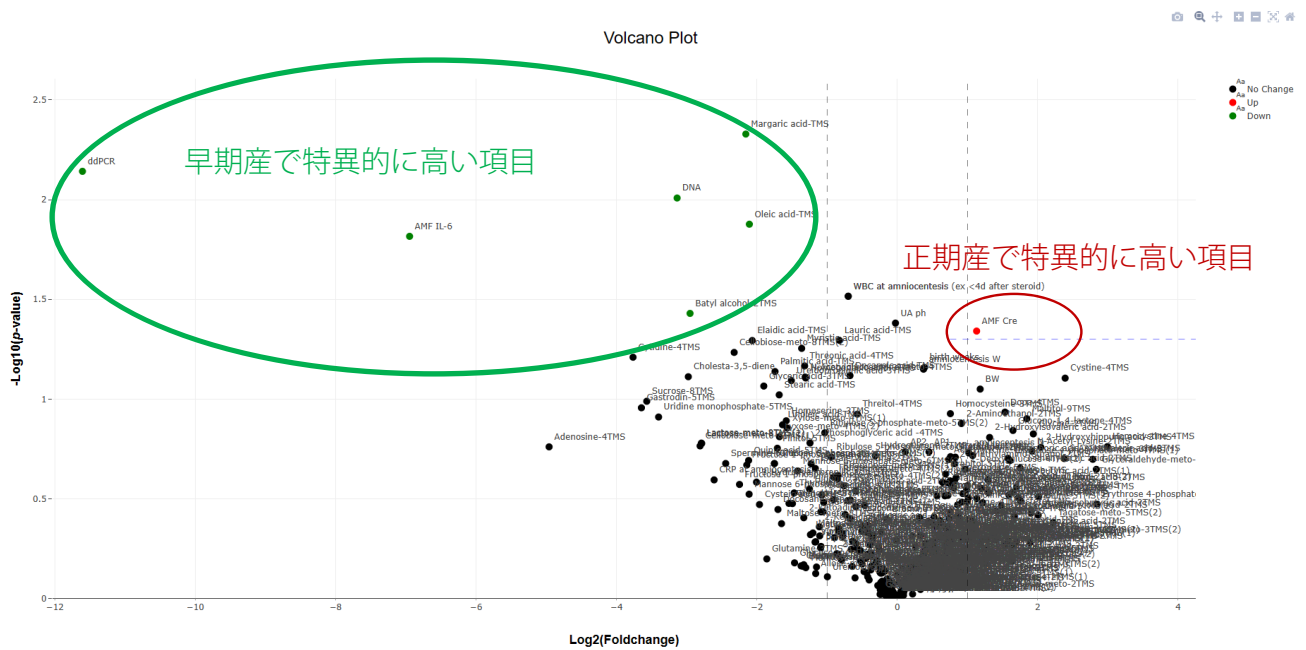


図5 早期産 (n=3) と正期産 (n=3) のボルケーノプロット解析 (代謝物、元素、菌種、分娩データの約700変数)

NGSリード数

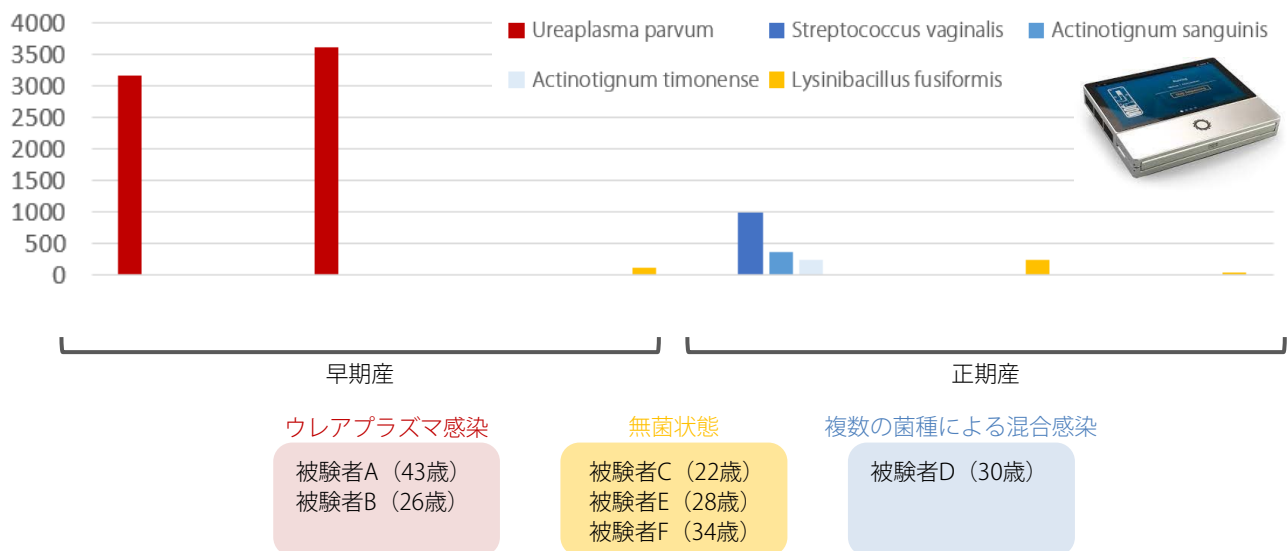


図6 小型次世代シーケンサーを用いて、16S rRNA遺伝子 (16S rDNA) の配列を基に菌種の推定を実施した結果 (試料: 羊水、主要な菌のみを抜粋)

3. 結果

早期産した妊婦の羊水 (n=3) と正期産した妊婦の羊水 (n=3) で検出された約700の説明変数をボルケーノプロットで解析しました (図5)。その結果、正期産した妊婦の羊水では特異的に高い変数は少なく、早期産した妊婦の羊水で特異的に高い検査項目が多いことが分かりました。早期産した妊婦の羊水ではオレイン酸 (p値 0.001)、マルガリン酸 (p値 0.04)、バチルアルコール (p値 0.04)、ミスチリン酸 (p値 0.005)、ラウリン酸 (p値 0.03) など脂質・脂肪酸が特異的に高濃度で含まれることが分かりました。

また、早期産した妊婦の羊水で特異的に高く検出された検査項目のなかに16SリボソームRNA遺伝子のコピー数 (コピー数/μL) があり、細菌数と分娩周期に関連がある可能性が示唆されましたので、次世代シーケンサーの結果を主要な細菌に絞り確認しました (図6)。その結果、早期産した被験者AとBの羊水にはウレアプラズマ細菌が高く検出されていたことが分かりました。しかし、同じく早期産した被験者Cは同細菌に感染しておらず、6名の被験者は「ウレアプラズマ感染」「無菌」「混合感染」の3群に分類できることが分かりました。

混合感染を起こしてしながら正期産した被験者Dはリンが他被験者よりも高く検出されました (図7)。羊水中のリン (P) は微量に存在する亜鉛の抗菌作用を決定する役割がありますが、被験者Dでは亜鉛が検出されておらず、抗菌作用が低いと予測されます⁹⁾。また同様に臭素 (Br) 濃度とウレアプラズマ細菌数にも、弱い正の相関関係も確認されました。

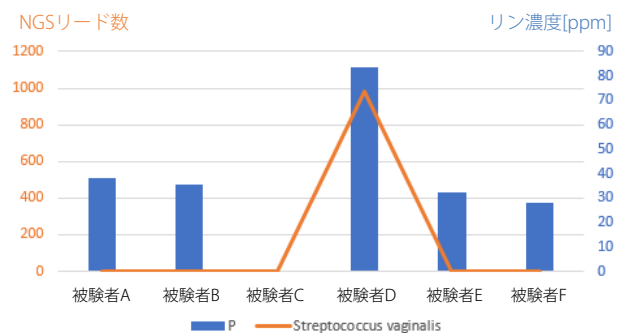
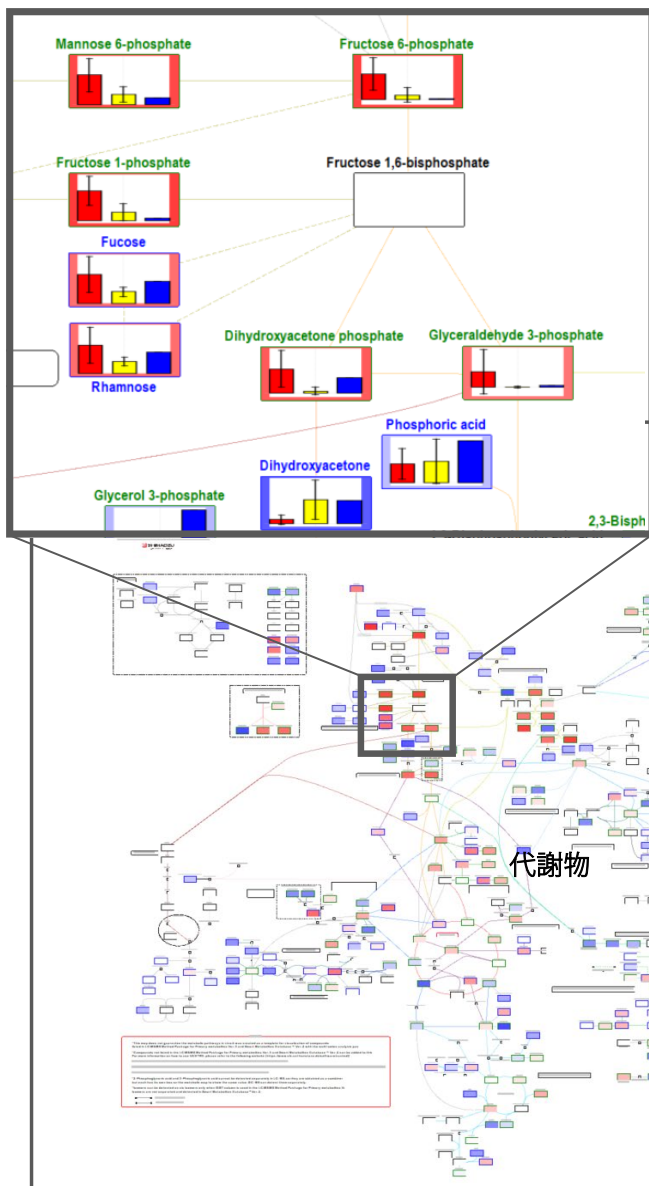


図7 羊水中リン濃度 (青色) とストレプトコッカス バジナリス菌のリード数

次世代シーケンサーの結果より、6名の被験者を「ウレアプラズマ感染」「無菌」「混合感染」の3群に分類し、代謝経路上解析を実施しました。網羅的に相関解析を行うために、代謝経路に加え、EDXにより検出された元素、次世代シーケンサーにより検出された主要な菌種、新生児の体重などの分娩データをひとつの代謝経路図に追加しました（図8）。棒グラフの赤色がウレアプラズマ感染者、黄色が無感染者、青色が混合感染で、各項目ボックスの色はウレアプラズマ感染者のみに多い項目が赤色、逆にウレアプラズマ感染者のみで低い項目が青色、中間色は相関が無いことを示します。

ウレアプラズマ細菌感染者では解糖系代謝経路（エネルギー源生成経路）が活性化され生成物が他被験者よりも高く検出されることが分かりました。この代謝経路が胎児の細胞由来と仮定すると、細胞内で起こる高エネルギー化合物のATPを産生する基質が増加していることを意味します。また、ピリミジン塩基代謝経路の中間代謝物も同様に蓄積が見られました。ピリミジン塩基は異化されて糖・脂質代謝経路に入るため、中間体の増加は生成物の増加を示唆し、代謝経路が活性化されていることが考えられます。

ウレアプラズマ細菌感染者の羊水では解糖系代謝経路が活性化



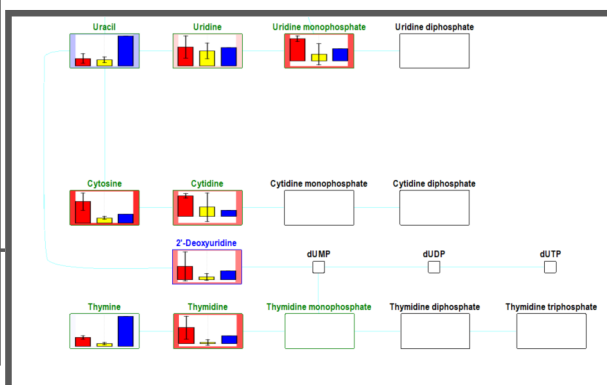
またマルチオミクス解析パッケージでは、代謝物の蓄積量だけではなく、生成物と基質の比や、その逆数の基質と生成物の比をグラフで一覧表示し、相関解析を実施することが可能です（次項 図9）。それらの比を新たな変数として階級クラスタ解析に投影することでクラスター形成過程を確認し、未知の代謝経路を解明していくツールとなります（次項 図10）。

4. まとめ

6名の妊婦（早期産3名、正期産3名）の羊水を次世代シーケンサー（MiniIONシステム、オックスフォード・ナノポアテクノロジー株式会社）とガスクロマトグラフ質量分析計（GCMS-TQ8040 NX）とエネルギー分散型蛍光X線分析装置（EDX-7200）を用いて測定し、腸内細菌叢（約250種の微生物）と代謝物（約500成分）と元素（約80元素）を評価しました。検出された約700の項目を基にマルチオミクス解析パッケージにより代謝経路解析を実施しました。

代謝経路解析は代謝物の蓄積量だけでなく、生成物/基質、あるいはその逆数となる基質/生成物の比をマルチオミクス解析パッケージ内で自動作成し、階級クラスタ解析などに読み込ませる新たな変数として利用することで、蓄積量とは異なる観点からの統計解析が実施できました。

ウレアプラズマ細菌感染者の羊水ではピリミジン塩基代謝経路の中間代謝物が蓄積



検出された元素

主要な菌種

分娩データ

代謝物

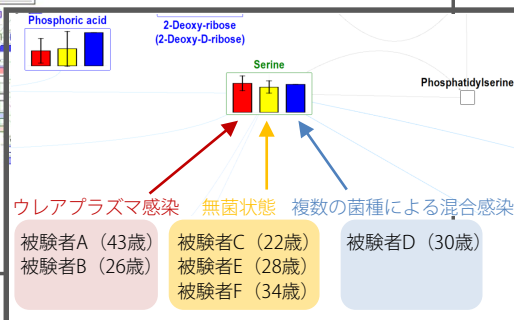


図8 NGSにより6名の被験者を3群に分けた代謝経路解析

棒グラフの赤色がウレアプラズマ感染者、黄色が無感染者、青色が混合感染

各代謝物ボックスの色はウレアプラズマ感染者のみに多い項目が赤色、逆にウレアプラズマ感染者のみで低い項目が青色、パステルが相関なし

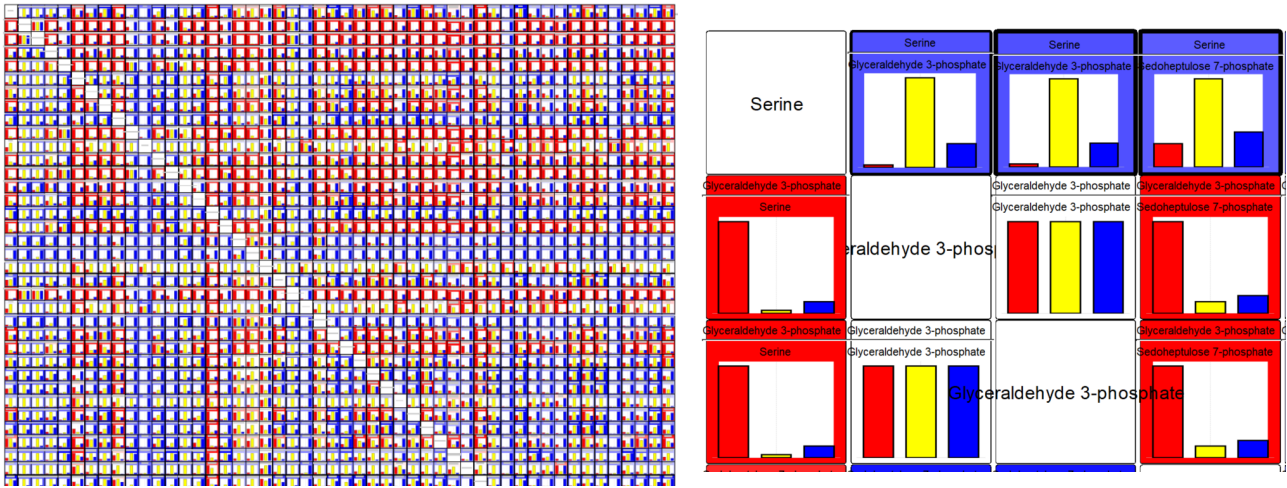


図9 NGSにより6名の被験者を3群に分けた代謝経路解析（生成物/基質やその逆数である基質/生成物の比を変数として相関関係を可視化）
3本の棒グラフは左がウレアプラズマ感染者、中央が無感染者、右が混合感染
*各比率ボックスの色はウレアプラズマ感染者のみで高い比率が赤色、逆にウレアプラズマ感染者のみで低い比率が青色、パステルが相関なし
（基質や生成物のように類似した化学構造を持つ代謝物のイオン化効率は類似すると仮定）

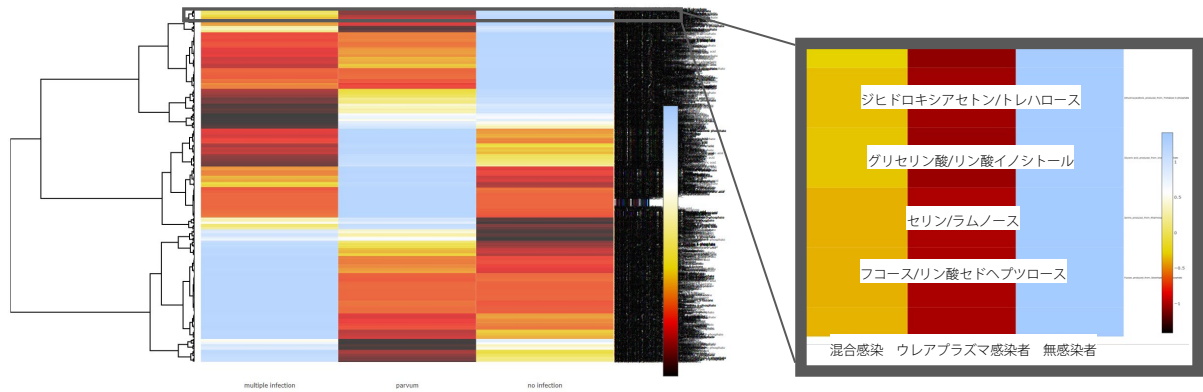


図10 生成物/基質やその逆数である基質/生成物を変数として階級クラスタ解析を実施し、類似した挙動を示す代謝物ペアのクラスターを探索

<参考文献>

- 1) [Born too soon: decade of action on preterm birth](#), WHO, 2024年4月9日参照
- 2) [羊水の問題](#), MSD, 2024年4月9日参照
- 3) [羊水とは？赤ちゃんを守る重要な役割](#), Moony, 2024年4月9日参照
- 4) [早産になる原因となりやすい人の特長](#), NIPT Japan, 2024年4月9日参照
- 5) [Phosphate-to-zinc ratio as a predictor of bacterial growth-inhibitory activity](#), PubMed, 2024年4月9日参照

<関連アプリケーションノート>

1. No.94 「次世代シーケンサーとGC/MSによる腸内細菌叢と代謝物と香気成分のマルチオミクス解析」、島津製作所、2024年4月9日参照

GCMS-TQとSmart Metabolites Databaseは、株式会社島津製作所またはその関係会社の日本およびその他の国における商標です。

株式会社 島津製作所 分析計測事業部
<https://www.an.shimadzu.co.jp/>

初版発行：2024年9月

本文書に記載されている製品は、医薬品医療機器法に基づく医療機器、体外診断用医薬品として承認・認証を受けておりません。本文書に記載されている分析手法を治療診断目的およびその手続き上で使用することはできません。

本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。本文中に記載されている会社名、製品名、サービスマークおよびロゴは、各社の商標および登録商標です。本文中では「TM」、「®」を明記していない場合があります。

本資料の掲載情報に関する著作権は当社または原著者に帰属しており、権利者の事前の書面による許可なく、本資料を複製、転用、改ざん、販売等することはできません。掲載情報については十分検討を行っていますが、当社はその正確性や完全性を保証するものではありません。また、本資料の使用により生じたいかなる損害に対しても当社は一切責任を負いません。