化学物質過敏症研究へのメタボロミクスの応用

加藤 貴彦^{*1}, 藤原 悠基^{*1}, 中下 千尋^{*1}, 盧 溪^{*1}, 久田 文^{*1},
宮崎 航^{*1}, 東 賢一^{*2,3}, 谷川 真理^{*3,4}, 内山 巖雄^{*3,4}, 樺田 尚樹^{*5}

^{*1} 熊本大学大学院生命科学研究部公衆衛生学分野

^{*2} 近畿大学医学部環境医学・行動科学教室

^{*3} 財団法人ルイ・パストゥール医学研究センター

^{*4} 医療法人社団医聖会百万遍クリニック

^{*5} 国立保健医療科学院生活環境研究部

Application of Metabolomics to Multiple Chemical Sensitivity Research

Takahiko KATOH^{*1}, Yuki FUJIWARA^{*1}, Chihiro NAKASHITA^{*1}, Xi LU^{*1}, Aya HISADA^{*1},
Wataru MIYAZAKI^{*1}, Kenichi AZUMA^{*2,3}, Mari TANIGAWA^{*3,4}, Iwao UCHIYAMA^{*3,4}
and Naoki KUNUGITA^{*5}

^{*1} Department of Public Health, Faculty of Life Sciences, Kumamoto University

^{*2} Department of Environmental Medicine and Behavioral Science, Kinki University Faculty of Medicine

^{*3} Division of Basic Research, Louis Pasteur Center for Medical Research

^{*4} Hyakumanben Clinic

^{*5} Department of Environmental Health, National Institute of Public Health

Abstract Multiple chemical sensitivity (MCS) is an acquired chronic disorder characterized by non-specific symptoms in multiple organ systems associated with exposure to low-level chemicals. Diagnosis of MCS can be difficult because of the inability to assess the causal relationship between exposure and symptoms. No standardized objective measures for the identification of MCS and no precise definition of this disorder have been established. Recent technological advances in mass spectrometry have significantly improved our capacity to obtain more data from each biological sample. Metabolomics comprises the methods and techniques that are used to determine the small-level molecules in biofluids and tissues. The metabolomic profile—the metabolome—has multiple applications in many biological sciences, including the development of new diagnostic tools for medicine. We performed metabolomics to detect the difference between 9 patients with MCS and 9 controls. We identified 183 substances whose levels were beyond the normal detection limit. The most prominent differences included significant increases in the levels of both hexanoic acid and pelargonic acid, and also a significant decrease in the level of acetylcarnitine in patients with MCS. In conclusion, using metabolomics analysis, we uncovered a hitherto unrecognized alteration in the levels of metabolites in MCS. These changes may have important biological implications and may have a significant potential for use as biomarkers.

Key words: chemical sensitivity (化学物質過敏症), metabolome (メタボローム), fatty acid (脂肪酸), acetylcarnitine (アセチルカルニチン), case control study (症例・対照研究)

1. はじめに

受付 2015 年 4 月 25 日, 受理 2015 年 5 月 7 日
Reprint requests to: Takahiko KATOH
Department of Public Health, Faculty of Life Sciences, Kumamoto
University, 1-1-1 Honjou, Chuo-ku, Kumamoto 860-8556, Japan
TEL: +81(96)373-5112, FAX: +81(96)373-5113
E-mail: katoht@gpo.kumamoto-u.ac.jp

空気質に起因し、シックハウス症候群との関連がいわれる疾患概念として化学物質過敏症がある。化学物質過敏症の概念のスタートは、1987 年、化学物質に曝露される機会の多い労働者を診察していたカレンが、過去に大量の化学物質に一度に曝露された後、または長期間慢

性的に化学物質の曝露を受けた後、非常に微量の化学物質に再接触した際に見られる不快な臨床症状を、MCS (Multiple chemical sensitivity, 多種化学物質過敏状態) と提唱したことによる (1)。わが国では、固有の名称として「化学物質過敏症」と呼ぶことが多いが、カレンの提唱した概念と同一であるとは必ずしも言えず、「シックハウス症候群は化学物質過敏症の一つの病態」、「化学物質過敏症はシックハウス症候群の重症化した病態」などの解説がなされている。しかし、住居という空間を離れても、化学物質過敏症のような健康障害が一定数存在することは事実であり、患者と向き合う臨床現場では、患者からも医師からも、その客観的診断方法の確立、治療法の開発、病態の解明が望まれている。

我々は、化学物質過敏症のような未知の病態が推定される疾患概念に対し、最近の研究技術の一つであるメタボロミクスを用いて、病態解明の糸口をつかもうと研究を実施している。

2. メタボロミクスとは

従来の研究は、生物のある現象に注目し、従来の知見をもとに仮説を設定し、それを証明するという演繹的な方法が標準的であった。一方、近年は仮説を設定せずにデータを収集し、得られたデータから新しい知見を抽出するという帰納的な方法が利用されつつある。この流れに乗って、ゲノミクス、トランスクリプトミクス、プロテオミクスとともに、代謝物質を網羅的に解析するメタボロミクスが注目されている (図 1) (2)。メタボロームは「代謝物総体」という概念である。すなわちメタボロミクスは、他のオミクス技術と同様に、一つの試料から多くの標的物質を一度に測定できる技術である。そのため、測定対象物質の測定間誤差や研究対象の個体間誤差を最小化することが可能である。また高価ではあるが、分析能力の高い測定機器を用いることによって、前処理操作を簡略化できることも、労力の低減とともに誤差要因を低減する効果がある (表 1)。

図1 オミクス解析のなかでのメタボロミクスの位置づけ。(「HMT メタボローム解析技術のご紹介」資料より (2), 一部改編, 2013)

表1 他のオミクスと比較し、メタボロミクスの利点と限界点

特徴	利点
対象物質数が少ない	解析が容易。 ヒトゲノムは約 23,000, プロテオームは約 1,000,000 であるのに対して、メタボロームは約 4,000。
低分子である	従来の知見・経験が活かせる。 種々の代謝物に関する生理学的・病理学的意義が蓄積されている。
表現型に近い	結果に関する直接の原因を探しやすい。
動物種特異性が存在しない	多くの代謝物は、多くの種において共通。 種ごとに異なるゲノム情報や分析法を用意する必要がなく、その分析手法が共通である。
誤差の最小化	多数の物質を一度に測定できる。 実験間誤差や測定間誤差が小さい。
特徴	限界点
因果関係	原因か結果かがわからない コストが下がり、時間的変動が観察できれば解決可能か
臓器特異性	血液は運搬系であり、臓器の代謝異常はみえない。逆に考えれば、血液は全身の反映でもある。
価格	測定機器が高価である。
対象物質の最適測定条件	すべての対象物質に最適な測定条件を設定することは困難である。

表 2 症例群と対照群の属性

変数	症例群	対照群
	Mean±SD	Mean±SD
女性 (割合)	9 (100%)	9 (100%)
年齢 (範囲)	44.2±8.8 47-62	41.1±9.1 46-62
身長 (cm)	158.8±8.0	157.3±4.4
体重 (kg)	51.9±8.3	52.8±4.1
Body Mass Index (体重(kg)/身長(m) ²)	20.5±2.1	21.3±1.0

Value is mean±SD. A *P*-value of 0.05 was considered statistically significant. Statistical analysis was carried out using the Statistical Package SPSS Version 21.

3. 化学物質過敏症に関する症例・対照研究

3-1 対象と方法

対象者は、京都市内の病院にて化学物質過敏症と診断された症例群 (女性) 9 名と年齢と性がマッチング (±2 歳) された対照群 (女性) 9 名であり、年齢は 46 歳～62 歳の範囲である (表 2)。化学物質過敏症の診断は、化学物質過敏症を専門とする医師が、診察と質問票のスコアを参考に診断し、一般的検査で明らかな合併症を有したり、精神疾患が疑われる人は除外している。対照群は、一般的健康診断で異常値の認められなかった健康者 9 名である。今回の症例群はすべて食後採血であり、対照群は 5 名が食前採血、4 名が食後採血であった。薬剤の服用歴については、症例群のうち 1 名が抗うつ薬と精神安定剤を常用し、対照群では 1 名が精神安定剤を常用していた。

対象者から、EDTA-2K が入った採血管にて採血後、すぐに遠心分離し、得られた血漿は測定まで -80°C に保存した。採取された検体は、一部は株式会社エスアールエルに依頼し臨床検査を実施した。メタボロミクス解析については、ヒューマン・メタボローム・テクノロジー株式会社 (以下、HMT) に分析を依頼した。分析は、同時解析で症例と対照はランダムに測定した。

本研究は、財団法人ルイ・パストゥール医学研究センターと百万遍クリニックに設置されている倫理委員会の承認 (それぞれ、2010 年 10 月 5 日, LPC.11, 2010 年 9 月 28 日, 倫 HB22-1) を得ており、熊本大学では匿名可された分析結果の検討のみを行った。調査対象者には、文書と口頭で研究概要を説明するとともに、調査協力が任意であることを説明し、文書によって研究参加への同意を得た。

3-2 結果

3-2-1 血液・生化学的検査

末梢血液一般検査値、一般生化学検査値に関し、症例群と対照群のあいだに統計学的に有意な差は認められなかった (表 3)。

表 3 症例群と対照群の血液・生化学検査の結果

変数	症例群	対照群
	Mean±SD	Mean±SD
白血球数 ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	51.1±20.0	49.0±11.3
赤血球数 ($\times 10^4/\mu\text{l}$)	441.7±22.6	451.9±35.7
ヘモグロビン量 (g/dl)	13.1±0.6	13.5±1.4
血小板数 ($\times 10^4/\mu\text{l}$)	24.6±6.3	28.2±6.0
総蛋白 (g/dL)	7.5±0.3	7.5±0.4
アルブミン (g/dL)	4.5±0.3	4.6±0.3
LDL コレステロール (g/dL) ^a	123.8±19.1	125.6±32.6
HDL コレステロール (g/dL) ^a	79.0±24.3	78.4±16.4
中性脂肪 (g/dL) ^a	92.2±44.3	122.6±81.9
AST (GOT) (U/L) ^b	18.6±6.5	19.2±4.5
ALT (GPT) (U/L) ^b	14.2±6.6	17.7±7.0
γ -GT (γ -GTP) (U/L) ^b	20.6±13.8	22.2±7.5
クレアチニン (mg/dL)	0.5±0.1	0.6±0.1

Value is mean±SD. A *P*-value of 0.05 was considered statistically significant. Statistical analysis was carried out using the Statistical Package SPSS Version 21.

If variables were not normally distributed, the statistical analyses were performed after variables transformed ^aSquare root and ^blog-transformed.

3-2-2 メタボローム解析

18 検体の血漿検体について、“キャピラリー電気泳動装置 (capillary electrophoresis: CE) を飛行時間型質量分析装置 (time-of-flight mass spectrometry: TOFMS) に接続した分析装置 (CE-TOFMS)” を用いてメタボローム解析を行った。HMT 代謝物質ライブラリー及び Known-Unknown ピークライブラリーに登録された物質から 904 のアノテーション (機能について注釈がある) がある物質が得られ、そのなかで 183 物質が検出限界以上であった。得られた代謝産物に関し、HMT によって開発された Sample Stat ver3.14 を用いて解析を行った。

本研究では、対象者の食事摂取状況をマッチングすることができなかったため、①対照群 9 名のなかで食前採血群 (5 名 control 1) と食後採血群 (4 名 control 2) ②症例群 9 名 (食後採血) と対照群 9 名 (control 1+2) と比較解析し、次に食事摂取を考慮し、③症例群 9 名 (食後採血) と対照群 4 名 (control 2) で比較解析を行った。

症例群と対照群の群間の相対面積比を算出し、Welch の *t*-検定を実施し、個別に検討を重ねた。その結果、中鎖脂肪酸であるヘキサノ酸 (hexanoic acid (C6:0)) とペラゴン酸 (Pelargonic acid (C9:0)) は、食事の影響が認められないにもかかわらず (図 2, 3, それぞれの上図)、症例群 9 名 (食後採血) と対照群 9 名 (食後+食前採血) 比較で、症例群において統計学的に有意な高値が認められ (図 2, 3, それぞれの中図) (それぞれ *P*=0.001, *P*=0.002), 症例群 9 名 (食後採血) と対照群 5 名 (食後採血) 比較でも、症例群は対照群と比較し、統計学的に有意な高値が認められた (図 2, 3, それぞれの下図) (それぞれ *P*=0.001, *P*=0.004)。

図2 ヘキサン酸の比較分析結果。上：対照群内の食事影響比較, control 1 群 (食前)・(n=5) control 2 群 (食後) (n=4)。中：症例群 (n=9)・対照群 (n=9, control 1+2 群) の比較。下：症例群 (n=9)・対照群 (食後) (n=4, control 2 群) の比較。 $*$ 2 群間の相対面積比を算出し, Welch の t -検定を実施。P<0.05

図3 ペラルゴン酸の比較分析結果。上：対照群内の食事影響比較, control 1 群 (食前)・(n=5) control 2 群 (食後) (n=4)。中：症例群 (n=9)・対照群 (n=9, control 1+2 群) の比較。下：症例群 (n=9)・対照群 (食後) (n=4, control 2 群) の比較。 $*$ 2 群間の相対面積比を算出し, Welch の t -検定を実施。P<0.05

一方, アセチルカルニチンは, 食事や採血時刻の影響によって高値傾向が認められるにもかかわらず (図 4, 上図), 症例群 9 名 (食後採血) と対照群 9 名 (食後+食前採血) 比較では, 症例群において統計学的に有意な

低値が認められ (図 4, 中図) (P=0.016), 症例群 9 名 (食後採血) と対照群 5 名 (食後採血) においても, 症例群は対照群と比較し統計学的に有意な低値が認められた (図 4, 下図) (P=0.011)。

図 4 アセチルカルニチンの比較分析結果。上：対照群内の食事影響比較，control 1 群・（食前）（n=5）control 2 群（食後）（n=4）。中：症例群（n=9）・対照群（n=9，control 1+2 群）の比較。下：症例群（n=9）・対照群（食後）（n=4，control 2 群）の比較。＊2 群間の相対面積比を算出し，Welch の *t*-検定を実施。P<0.05

3-3 考察

今回の研究結果では，症例群において中鎖脂肪酸の統計学的に有意な高値とアセチルカルニチンの統計学的に有意な低値が認められた。

脂肪酸は油脂を構成する成分のひとつで，数個から数 10 個の炭素が鎖のように繋がった構造をしている。その炭素の数から，短鎖脂肪酸，中鎖脂肪酸，長鎖脂肪酸の 3 群に分けられ，長鎖脂肪酸はさらに，ミリスチン酸 (C14:0)，パルミチン酸 (C16:0)，ステアリン酸 (C18:0) のような飽和脂肪酸とオレイン酸 (C18:1) リノール酸 (C18:2)， α -リノレン酸 (C18:3)，アラキドン酸 (C20:4)，エイコサペンタエン酸 (EPA: C20:5)，ドコサヘキサエン酸 (DHA: C22:6) のような不飽和脂肪酸に分類される。一般的な油は，分子の鎖が長い長鎖脂肪酸によって構成されているが，中鎖脂肪酸は鎖の長さがその 6 個から 12 個の脂肪酸である。代表的な中鎖脂肪酸にはカプリル酸 (C8:0)，カプリン酸 (C10:0)，ラウリン酸 (C12:0) があり，飽和脂肪酸は炭素の数が多いほど融点が高くなるという性質をもっている。

今回の我々の分析結果では，化学物質過敏症の症例群において，中鎖脂肪酸の増加が認められた。最近，中鎖脂肪酸はココナッツやパームフルーツなどヤシ科植物の種子の核の部分に含まれる天然成分として注目されており，長鎖脂肪酸よりも消化吸収が早く，肝臓で分解されやすく，エネルギーとなりやすい特徴がある。従って脂肪酸のなかで最も脂肪になりにくく，健康に望ましい脂肪酸だといわれている (3)。また中鎖脂肪酸は，長鎖脂肪酸と異なりカルニチンと結合しなくてもミトコンドリア内に輸送される。その後，脂肪酸は β 酸化によってアセチル CoA となり，クエン酸回路を通じて ATP (エネルギー) が生成される。

症例群において，中鎖脂肪酸値，特にヘキサン酸値とペラゴン酸値が高い結果が得られたメカニズムは現時点では明らかではない。一つの仮説としては，ミトコンドリア脂肪酸酸化酵素の一つである中鎖アシル-CoA 脱水素酵素 (medium-chain acyl-CoA dehydrogenase: MCAD) の異常が考えられる。脂肪酸が分解されないと，各臓器に脂肪が蓄積し脂肪変性が生じ，心筋障害や筋力低下などを来すことが報告されており (4)，これらは化学物質過敏症の臨床症状と類似している。これまでに中鎖脂肪酸と化学物質過敏症との関連についての報告はなく，今後，検討を重ねていきたいと考えている。

カルニチンは生体の脂質代謝に関与する物質であり，アミノ酸から生合成される誘導体である。生体内では，カルニチンの約 10% がアセチルカルニチンとして存在している。立体異性体のうち脂質代謝に利用されるのは L-カルニチンのみである。カルニチンはエネルギーを産生するために，アシル脂肪酸を燃焼の場であるミトコンドリア内部に運搬する。その後，カルニチンはカルニチンアセチルトランスフェラーゼによってアセチルカルニチンとなり，ミトコンドリア外の細胞質へ輸送される。アセチルカルニチンは，細胞質でカルニチンとアセチル-CoA に分解され，アセチル-CoA は，アセチル-CoA カルボキシラーゼにより脂肪酸に合成される。またアセチルカルニチンは，血液脳関門を通過し脳内に到達し，アセ

チルコリンの合成, シナプスからの放出という一連のプロセスを促進することが報告されている (5)。アセチルコリンは副交感神経や運動神経の末端から放出される神経伝達物質である。アセチルコリンの減少は, 集中力や記憶力の低下やアルツハイマー病との関連が指摘されており, アセチルカルニチンがアルツハイマー病初期症状に対する改善効果を有することが報告されている (6)。以上のような報告から, アセチルカルニチンの減少は, 化学物質過敏症患者における疲労感, 不安, うつ状態などの精神症状を引き起こしている可能性が示唆される。

今回の研究結果では, 有意差は認められなかったものの, アセチルカルニチンと同様にカルニチンの低値も観察された。化学物質過敏症の類似疾患の一つとして慢性疲労症候群があるが, これまで, 慢性疲労症候群の患者でカルニチンが欠乏していることや (7), アシルカルニチンが疲労の程度と相関しているということが報告されている (8)。さらにカルニチン欠乏マウスを用いた実験研究から, 脂肪酸代謝障害によって血中脂肪酸が増加し, その結果, 自発活動量が低下することが報告されている (9)。カルニチン欠乏マウスでは心肥大が認められ, その原因はエネルギー欠乏によって生じたのではなく, 脂肪酸そのものの毒性に起因することを証明する実験結果も報告されている (10)。

今回の研究結果は, サンプル数も少なく, 断面調査のため因果関係には踏み込むことはできない。しかしあえて推察すれば, 化学物質過敏症ではカルニチン, アセチルカルニチンの減少が生じ, それらの直接的影響や, 脂肪酸の利用障害による影響, そして脂肪酸そのものの毒性による自発活動量の低下や臓器障害が引き起こされている可能性が示唆される。アセチルカルニチンはまだわが国では販売されていないが, カルニチンはサプリメントとして販売されており, その補給によって化学物質過敏症の症状が軽減される可能性が期待される。

4. おわりに

メタボロミクスは, ハイスループットの魅力的な分析方法であるが, 食事摂取や日内変動など個人的な生活状況によって大きな影響を受けやすい課題を抱えている。実際, 実験条件をそろえやすい培養細胞や動物実験を除くと, 人の研究では個人間のばらつきが大きく, 同一人をつかった介入研究以外, 十分な成果が得られているとはいえない。また人の代謝物とライフスタイルとの関連などの基本的な情報も少ない。従って, 個人間変動を包括した症例・対照研究への利用には, 少なくとも, 年齢, 性別, 食事や採血時間を可能な限りマッチングする必要がある。今後, 我々もこれらの条件をできる限りそろえ, 化学物質過敏患者の症例・対照研究デザインやケース・クロスオーバーデザインによってメタボローム解析を実施していく予定である。あわせて, 今後のメタボロミク

スの普及を考え, 継続的にその有効性と課題も検討していきたいと考えている。

本稿が今後の化学物質過敏症患者の予防や治療の礎となることを願っている。

謝 辞

本研究の一部は, 厚生労働科学研究費補助金 健康安全・危機管理総合研究事業 (代表者 樺田尚樹), JSPS 科研費 22590568 (代表者 内山巖雄) の助成で実施された。

利益相反なし

文 献

- (1) Cullen MR. The worker with multiple chemical sensitivities: An overview. *Occup Med* 1987;2:655-661.
- (2) HMT メタボローム解析技術のご紹介の資料, ヒューマン・メタボローム・テクノロジー株式会社 (HMT), 2013.
- (3) Kasai M, Nosaka N, Maki H, Negishi S, Aoyama T, Nakamura M, et al. Effect of dietary medium- and long-chain triacylglycerols (MLCT) on accumulation of body fat in healthy humans. *Asia Pac J Clin Nutr* 2003;12:151-160.
- (4) Purevsuren J, Hasegawa Y, Fukuda S, Kobayashi H, Mushimoto Y, Yamada K, et al. Clinical and molecular aspects of Japanese children with medium chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Mol Genet Metab* 2012;107:237-240.
- (5) Ando S, Tadenuma T, Tanaka Y, Fukui F, Kobayashi S, Ohashi Y, et al. Enhancement of learning capacity and cholinergic synaptic function by carnitine in aging rats. *Neurosci Res* 2001;66:266-271.
- (6) Hudson S, Tabet N; Cochrane Dementia and Cognitive Improvement Group. Acetyl-L-carnitine for dementia. *Cochrane Database Syst Rev* 2003;(2):CD003158. doi: 10.1002/14651858.CD003158
- (7) Lavergne MR, Cole DC, Kerr K, Marshall LM. Functional impairment in chronic fatigue syndrome, fibromyalgia, and multiple chemical sensitivity. *Can Fam Physician* 2010;56:e57-e65.
- (8) Kuratsune H, Yamaguti K, Takahashi M, Misaki H, Tagawa S, Kitani T. Acylcarnitine deficiency in chronic fatigue syndrome. *Clin Infect Dis* 1994;Suppl 1:S62-S67.
- (9) Yoshida G, Li MX, Horiuchi M, Nakagawa S, Sakata M, Kuchiiwa S, et al. Fasting-induced reduction in locomotor activity and reduced response of orexin neurons in carnitine-deficient mice. *Neurosci Res* 2006;55:78-86.
- (10) Jalil MA, Horiuchi M, Wakamatsu M, Li MX, Begum L, Suzuki K, et al. Attenuation of cardiac hypertrophy in carnitine-deficient juvenile visceral steatosis (JVS) mice achieved by lowering dietary lipid. *J Biochem* 2006;139:263-270.