

2025 年度
生命科学院 ソフトマター専攻
修士論文

岩見沢市母子健康調査 (SMILE Iwamizawa) に
おける母乳と乳幼児糞便の統合 NMR メタボ
ロミクス

北海道大学 生命科学院 ソフトマター専攻
蛋白質科学研究室
阿部 潤

2025 年 12 月 31 日 提出

目次

1 概要	2
2 序論	3
3 目的	4
4 材料と方法	5
4.1 実験デザイン	5
4.2 サンプル回収・調製	5
4.2.1 母乳	5
4.2.2 母子糞便	6
4.3 NMR 測定	6
4.4 スペクトル処理・濃度定量	6
4.4.1 母乳	6
4.4.2 母子糞便	7
4.5 統計解析	7
5 結果	8
5.1 母乳中代謝物の同定・定量	8
6 考察	9
7 結論	10
8 参考文献	11
9 図表	12
10 謝辞	27

1 概要

この文書は、著作権の対象となっている文章を、ウィキペディア日本語版において引用する際に守るべき事項を定めたものです。なお、この文書において「引用」とは、参考文献に掲載されている文章等を抜粋し、転載すること (Quotation) をいい、執筆者独自の文章に対し、その文章の作成において参照された文献の書誌情報のみを表示すること (Citation) を指すものではありません。後者に関する詳しい説明は、Wikipedia:出典を明記するを参照してください。

2 序論

この文書は、著作権の対象となっている文章を、ウィキペディア日本語版において引用する際に守るべき事項を定めたものです。なお、この文書において「引用」とは、参考文献に掲載されている文章等を抜粋し、転載すること (Quotation) をいい、執筆者独自の文章に対し、その文章の作成において参照された文献の書誌情報のみを表示すること (Citation) を指すものではありません。後者に関する詳しい説明は、Wikipedia:出典を明記するを参照してください。

この文書は、著作権の対象となっている文章を、ウィキペディア日本語版において引用する際に守るべき事項を定めたものです。なお、この文書において「引用」とは、参考文献に掲載されている文章等を抜粋し、転載すること (Quotation) をいい、執筆者独自の文章に対し、その文章の作成において参照された文献の書誌情報のみを表示すること (Citation) を指すものではありません。後者に関する詳しい説明は、Wikipedia:出典を明記するを参照してください。

3 目的

この文書は、著作権の対象となっている文章を、ウィキペディア日本語版において引用する際に守るべき事項を定めたものです。なお、この文書において「引用」とは、参考文献に掲載されている文章等を抜粋し、転載すること (Quotation) をいい、執筆者独自の文章に対し、その文章の作成において参照された文献の書誌情報のみを表示すること (Citation) を指すものではありません。後者に関する詳しい説明は、Wikipedia:出典を明記するを参照してください。

4 材料と方法

4.1 実験デザイン

本研究は、北海道岩見沢市で実施中の前向きコホート研究である、岩見沢市母子健康調査（SMILE Iwamizawa）¹の一環として実施された。本調査は、健康な妊婦を対象に、妊娠中の環境の把握から始め、出産、乳児期から幼児期、学童期まで子供の生活習慣、健康状態を調査することで、子供の成長発達に影響を与える因子や、近年増加している子どものアレルギーや肥満などの様々な疾患の原因を明らかにすることを目的としている。

本研究はヘルシンキ宣言の精神に則り実施された。ヒトを対象とする全ての実施手順は、北海道大学大学院医学研究院医の倫理委員会（承認番号：16-039）および森永乳業倫理委員会（承認番号：16005-144）の承認を得ている。岩見沢市在住の妊婦が母子健康手帳の交付を受ける際に、本調査に関する説明を行い、書面によるインフォームド・コンセントを得た。なお、乳児の研究参加については、代諾者である母親の同意をもってこれに代えた。同意を得られた参加者（母、子）に対して、調査票などによる調査や母乳・糞便の採取を実施した。採取された試料は速やかに -20°C で保管され、採取から約 1 ヶ月以内に分析時まで -80°C で凍結保存された。参加者の臨床的特性については、表 1 に示す通りである。

4.2 サンプル回収・調製

4.2.1 母乳

解凍した母乳試料 1 mL を、15,000 rpm、4°C で 30 分間遠心分離し、脂質層と水層を分離させた。回収した水層画分 400 μL を、分子量 5 kDa 以上の高分子除去用遠心式限外ろ過フィルターユニット（UFC3LCCNB-HMT; Human Metabolome Technologies, Tsuruoka, Japan）に充填し、9,100 ×g、4°C で完全にろ過されるまで遠心を行った。なお、フィルターユニットの洗浄のため、事前に超純水 300 μL を用いた遠心（9,100 ×g、4°C、30 分間）を 3 回繰り返した。得られたろ液 270 μL に対し、超純水 270 μL および NMR 測定用緩衝液 60 μL (pH 7.4, 50 mM Sodium phosphate, 0.5 mM 3-(trimethylsilyl)propionic acid-d4 sodium salt (TSP), 0.04% NaN₃, 1 mM formate, 10% D₂O；濃度はすべて終濃度) を添加した。この混合液 600 μL のうち 540 μL を外径 5 mm の NMR 試料管 (SJ-5; Shigemi, Hachioji, Japan) に充填した。その後、試料中の溶存酸素を除去するため、試料管を超音波洗浄機に数秒間供し、脱気を行った。

4.2.2 母子糞便

凍結保存された糞便試料を 4°C で解凍し、スパーテルを用いて 2 分間均一に攪拌した後、約 200 mg を分注した。秤量した試料重量に対して 10 倍量の NMR 測定用緩衝液（組成は節 4.2.1 と同一）を添加し、1,800 rpm、4°C で 15 分間振とう抽出を行った。抽出後、13,000 rpm、4°C で 5 分間遠心分離し、上清約 1.5 mL を回収して -80°C で保存した。測定直前に 4°C で再解凍し、15,000 rpm、4°C で 10 分間遠心分離した後の上清 540 μL を、外径 5 mm の NMR 試料管（SJ-5; Shigemi, Hachioji, Japan）に充填した。

4.3 NMR 測定

NMR スペクトルの測定には、CryoProbeTM および SampleJet を装着した Bruker Avance Neo 800 MHz 分光計を用い、すべての測定を 25°C で実施した。パルスシーケンスにはプレサチュレーション付き 1 次元 ¹H NOESY (noesypr1d) を用いた。主な測定パラメータは、観測範囲 12 ppm、データポイント数 65536、ダミースキャン回数 8 回、積算回数 128 回、取り込み時間 3.4 秒、待ち時間 1.6 秒、NOE 混合時間 0.1 秒とした。

4.4 スペクトル処理・濃度定量

スペクトルデータの処理および濃度定量には、Chenomx NMR Suite 12.0 (Chenomx Inc., Edmonton, Canada) を用いた。Chenomx Processor により、0.3 Hz のラインブロードニングを適用した指数関数をウインドウ関数として乗じ、データポイント数が 262,144 となるようにゼロフィリングを行った後、フーリエ変換を実施した。位相およびベースラインを手動で補正し、全スペクトルを TSP の信号強度に基づいて規格化した。

4.4.1 母乳

Chenomx Profiler を用い、内蔵データベースを基に代謝物の同定と濃度定量を行った。データベースに未登録の代謝物については、標準物質を同一条件で測定（節 4.3 参照）したスペクトルをリファレンスとして同定・定量を実施した。

また、濃度定量の解析者による系統誤差を最小限に抑えるため、本作業の解析手順を統一し、文書化した。解析手順の統一性を評価するため、異なる 5 人の解析者が同一試料セット (n=4) を解析し、その定量値について、PCA (後述) および、Bland-Altman 分析を実施した。

4.4.2 母子糞便

Chenomx Profiler を用いてスペクトルのビニングを行い、各ビン領域の信号強度総和を算出した。ビンの幅は 0.02 ppm とし、化学シフト範囲は 0 ppm から 10 ppm までとした。ただし、水信号領域（4.68 ppm ~ 4.88 ppm）は解析から除外した。

4.5 統計解析

母乳の濃度データおよび母子糞便のビニングデータを用い、多変量解析ソフト SIMCA 18 (Sartorius, Umeå, Sweden) にて多変量解析を実施した。各変数は平均 0、分散 1 となるように標準化 (Unit Variance scaling) を行い、主成分分析 (PCA) および直交部分的最小二乗回帰分析 (OPLS-DA/R) を実施した。群間の統計学的比較には、Welch の t 検定または Tukey-Kramer 法を用いた。

5 結果

5.1 母乳中代謝物の同定・定量

実際に得られた NMR スペクトルの一例を図に示す。

6 考察

この文書は、著作権の対象となっている文章を、ウィキペディア日本語版において引用する際に守るべき事項を定めたものです。なお、この文書において「引用」とは、参考文献に掲載されている文章等を抜粋し、転載すること (Quotation) をいい、執筆者独自の文章に対し、その文章の作成において参照された文献の書誌情報のみを表示すること (Citation) を指すものではありません。後者に関する詳しい説明は、Wikipedia:出典を明記するを参照してください。

この文書は、著作権の対象となっている文章を、ウィキペディア日本語版において引用する際に守るべき事項を定めたものです。なお、この文書において「引用」とは、参考文献に掲載されている文章等を抜粋し、転載すること (Quotation) をいい、執筆者独自の文章に対し、その文章の作成において参照された文献の書誌情報のみを表示すること (Citation) を指すものではありません。後者に関する詳しい説明は、Wikipedia:出典を明記するを参照してください。

7 結論

この文書は、著作権の対象となっている文章を、ウィキペディア日本語版において引用する際に守るべき事項を定めたものです。なお、この文書において「引用」とは、参考文献に掲載されている文章等を抜粋し、転載すること (Quotation) をいい、執筆者独自の文章に対し、その文章の作成において参照された文献の書誌情報のみを表示すること (Citation) を指すものではありません。後者に関する詳しい説明は、Wikipedia:出典を明記するを参照してください。

8 参考文献

1. Komatsu, Y. *et al.* Associations between Maternal Diet, Human Milk Macronutrients, and Breast-Fed Infant Growth during the First Month of Life in the SMILE Iwamizawa in Japan. *Nutrients* **15**, 654 (2023).

9 図表

表 1 研究参加者の母子特性

母親の特徴量	値 (n=121)
年齢 (歳) ^{*1}	31.4 ± 4.7
身長 (cm) ^{*1}	158.9 ± 5.5
妊娠初期の体重 (kg) ^{*1}	55.0 ± 10.1
妊娠初期の BMI ^{*2} (kg/m ²) ^{*1}	21.6 ± 3.3
妊娠中の体重増加量 ^{*3} (kg) ^{*1}	9.7 ± 4.1
妊娠期間 (週) ^{*1}	39.0 ± 1.2
妊娠回数 [n (%)]	2.21 ± 1.4
初産婦 [n (%)]	25 (20.7)
帝王切開 [n (%)]	16 (13.2)
新生児の特徴量	値 (n=119)
性別 (男の子) [n (%)]	66 (55.4)
出生体重 ^{*1} (g)	3149.6 ± 412.8
出生身長 ^{*1} (cm)	49.0 ± 2.1
低出生体重児分娩 ^{*4} [n (%)]	6 (5.04)
早産分娩 ^{*5} [n (%)]	1 (0.84)

*1 平均値 ± 標準偏差。

*2 body mass index、初回臨床受診時に得られた情報に基づき算出。

*3 初回臨床受診時と分娩直前の体重の差。

*4 2500 g 未満。

*5 37 週未満。

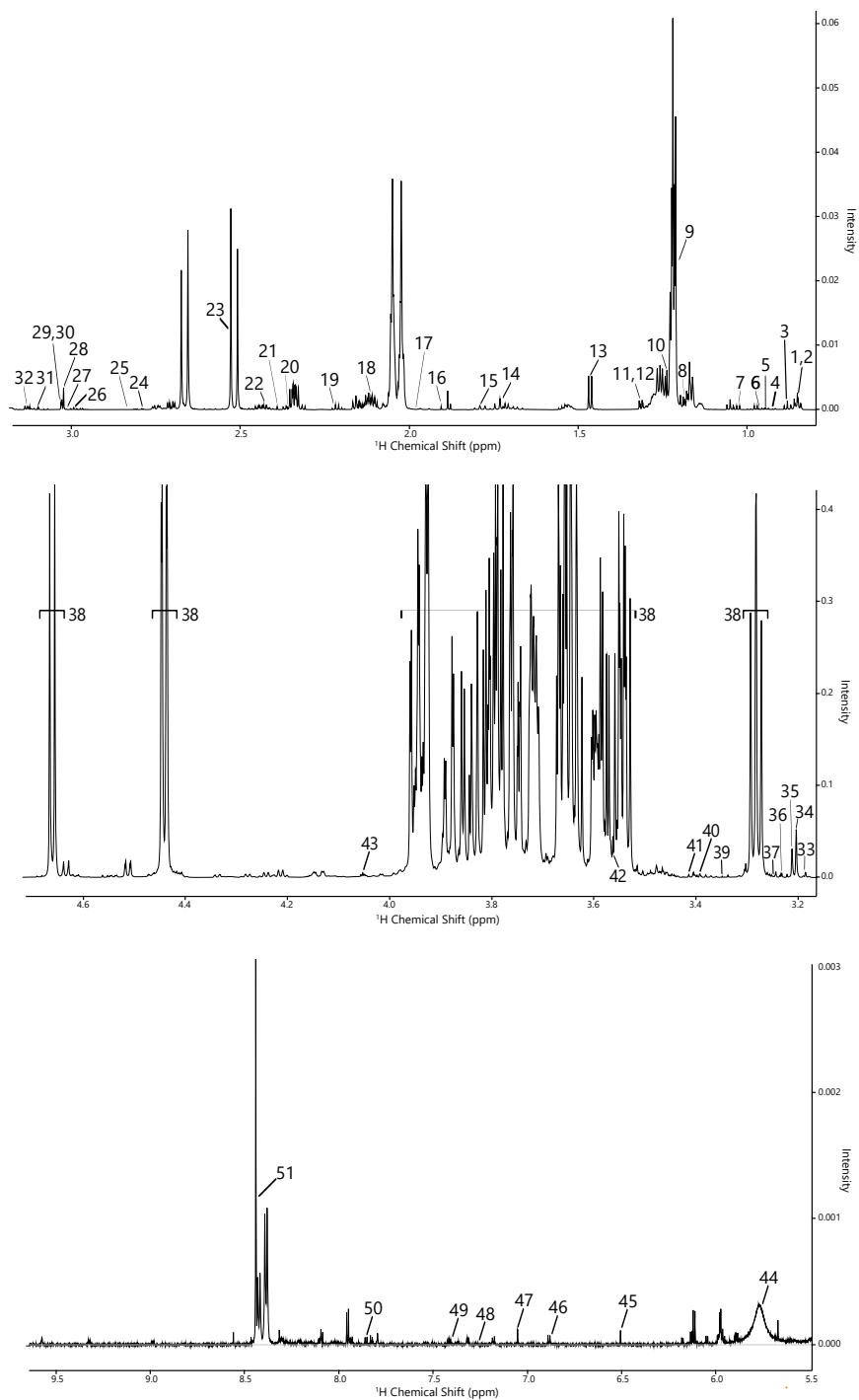


図1 母乳のNMRスペクトル。図中の番号は同定された代謝物を示す。

1, Caprate; 2, Caprylate; 3, Butyrate; 4, Isoleucine; 5, Leucine; 6, 2-Aminobutyrate; 7, Valine; 8, 3-fucosyllactose; 9, 2'-fucosyllactose; 10, fucose; 11, Threonine; 12, Lactate; 13, alanine; 14, 6'-sialyllactose; 15, 3'-sialyllactose; 16, acetate; 17, proline; 18, Glutamate; 19, acetate; 20, pyruvate; 21, succinate; 22, glutamine; 23, citrate; 24, aspartate; 25, asparagine; 26, 2-oxoglutarate; 27, lysine; 28, creatine; 29, Creatine phosphate; 30, Creatinine; 31, cis-aconitate; 32, ethanolamine; 33, choline; 34, O-phosphocholine; 35, sn-Glycero-3-phosphocholine; 36, glucose; 37, betaine; 38, lactose; 39, methanol; 40, taurine; 41, fucose; 42, glycine; 43, myo-Inositol; 44, Urea; 45, fumarate; 46, tyrosine; 47, histidine; 48, tryptophan; 49, phenylalanine; 50, uridine; 51, formate.

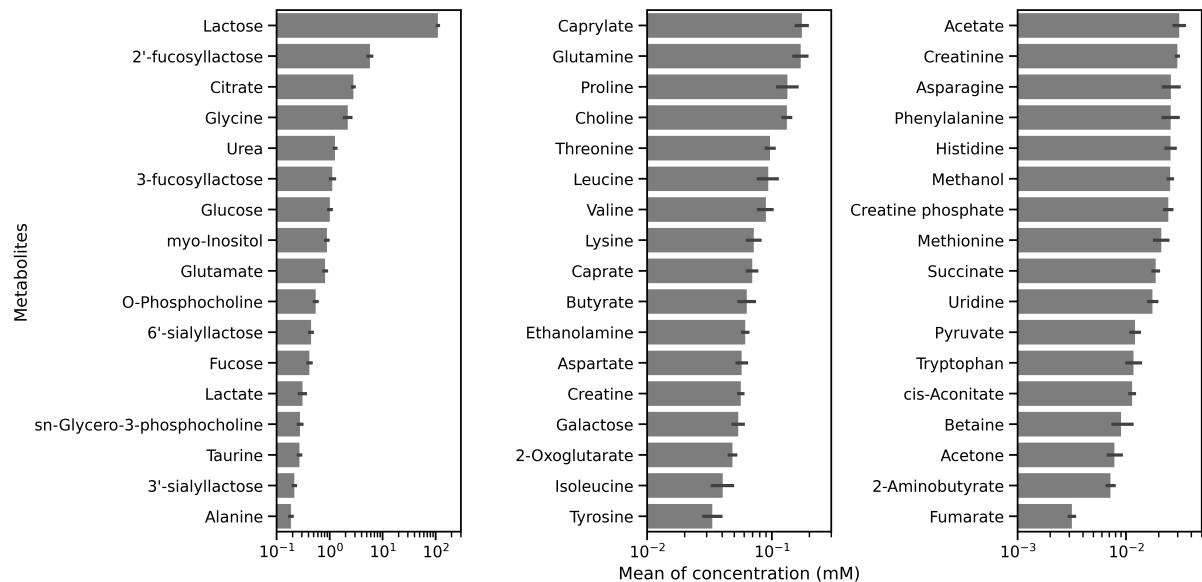
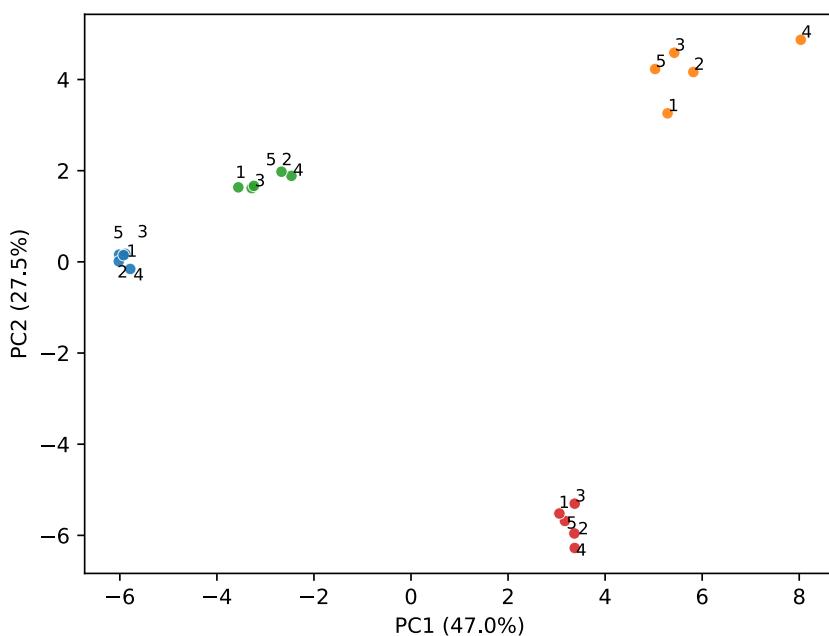


図2 同定できた化合物の平均濃度。エラーバーは標準偏差を示す。

A



B

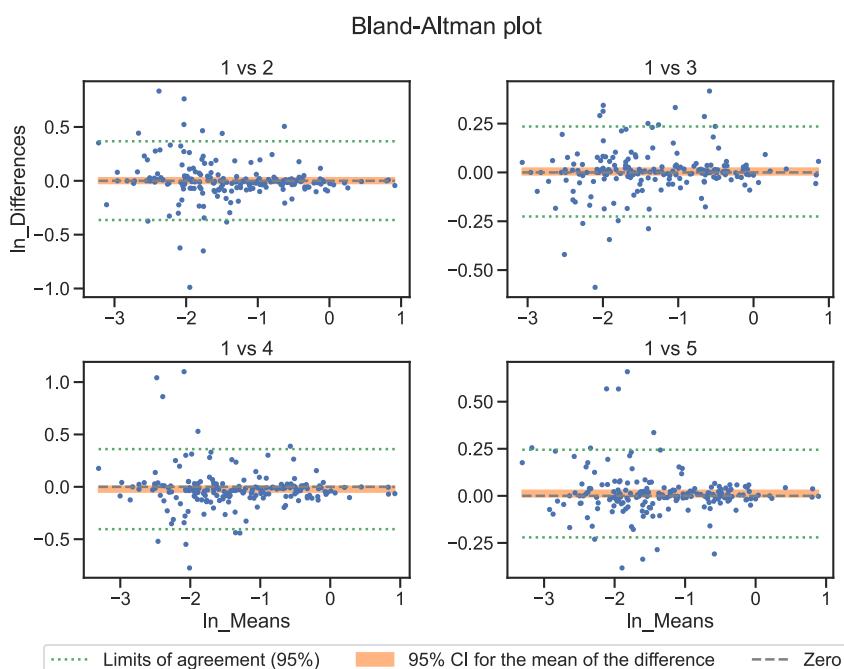
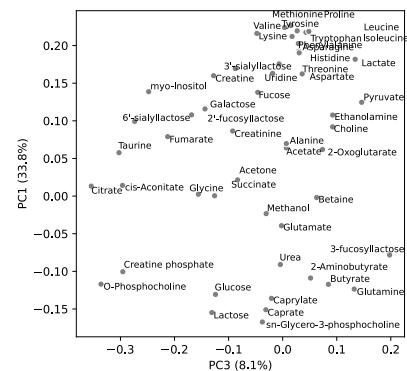
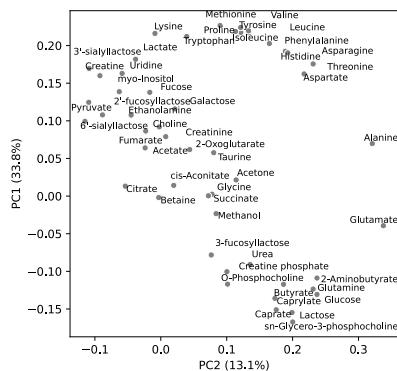


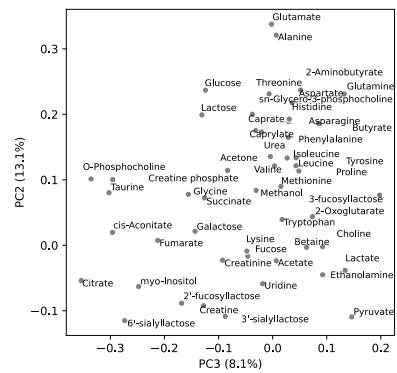
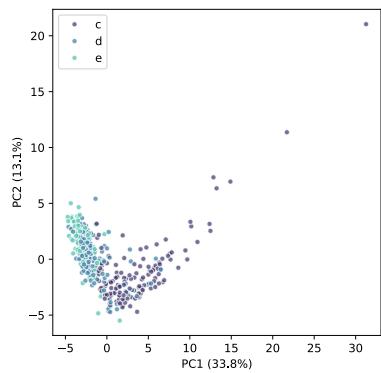
図 3 母乳中代謝物の濃度定量における解析者間の系統誤差の評価

A: 主成分分析 (PCA) スコアプロット。5人の解析者が同一試料セット ($n=4$) を解析した結果を示す。B: Bland-Altman 分析。各代謝物について、5人の解析者が得た濃度定量値の平均値と、各解析者の定量値と平均値との差をプロットした。橙線は平均差の95%信頼区間を、緑線は2つの測定方法の誤差の許容範囲 (limits of agreement; LOA) を示し、「差の平均値 $\pm 1.96 \times$ 差の標準偏差」で表される。

PC1 (33.8%)



PC2 (13.1%)



PC3 (8.1%)

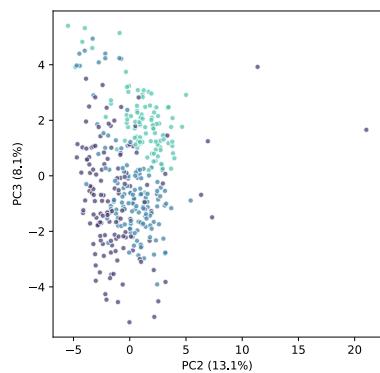
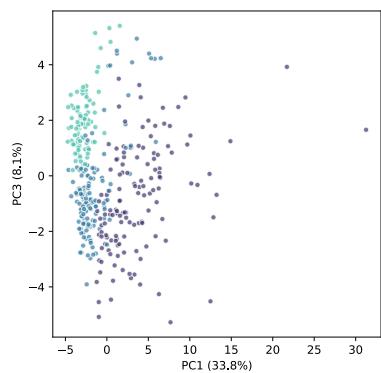


図4 母乳中代謝物のPCA結果。

左下：スコアプロット。右上：ローディングプロット。

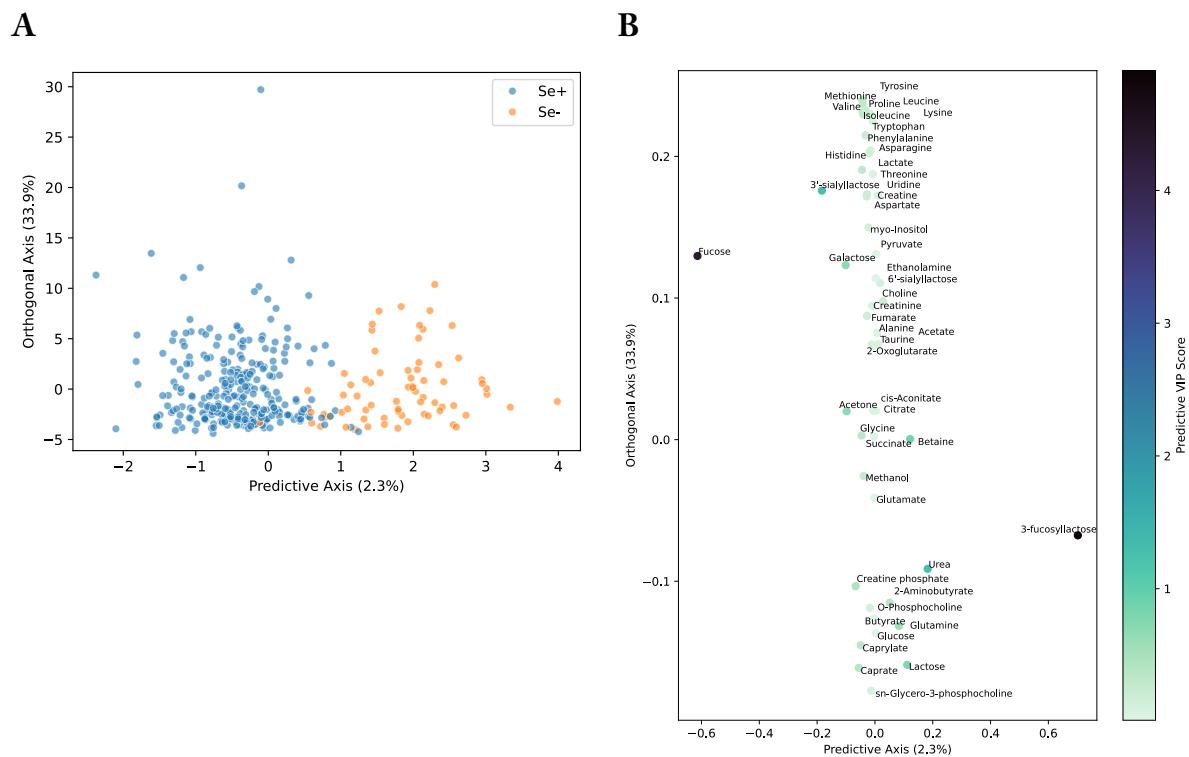


図 5 母乳中代謝物の OPLS-DA 結果。

A: スコアプロット。Se+ (青色) は 2'-FL 分泌型個体、Se- (橙色) は 2'-FL 非分泌型個体を示す。B: ローディングプロット。図中点の色は、VIP の値により色分けされている。

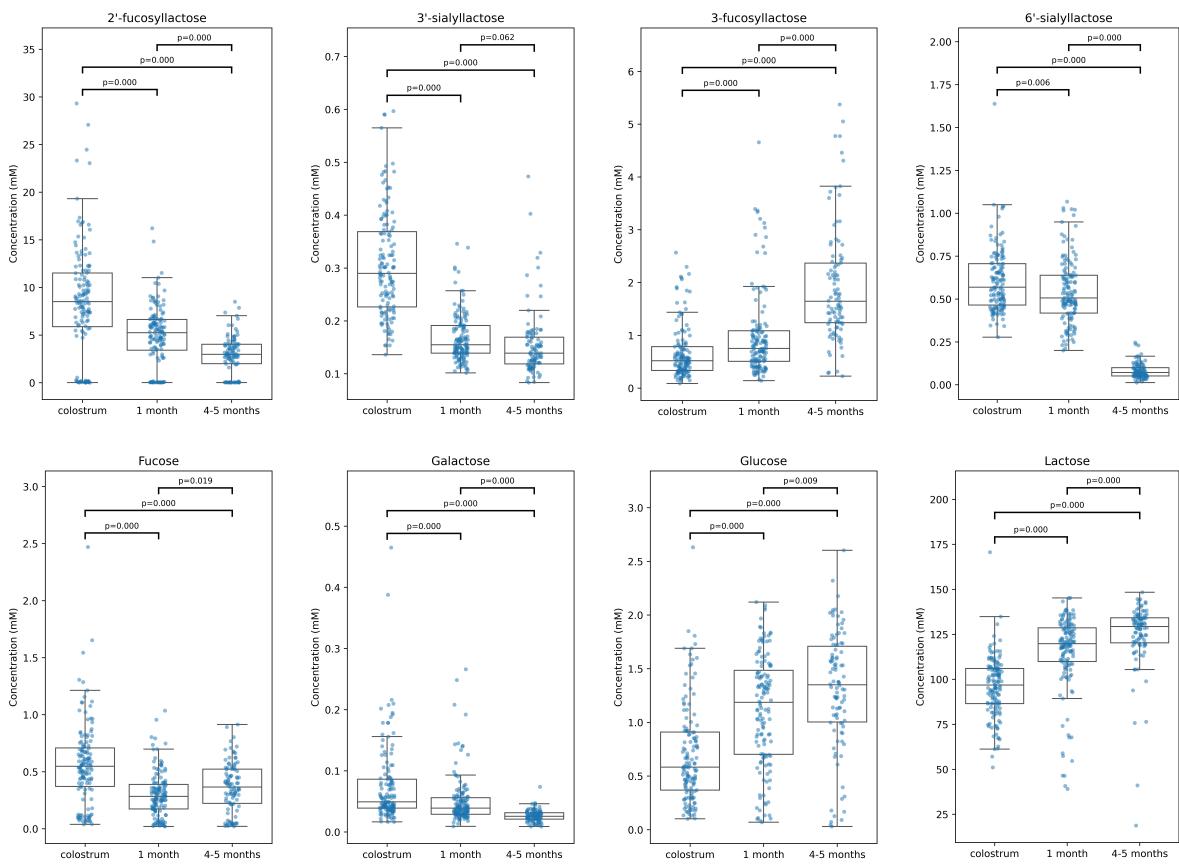


図6 糖類の経時変化による母乳中代謝物濃度の比較。

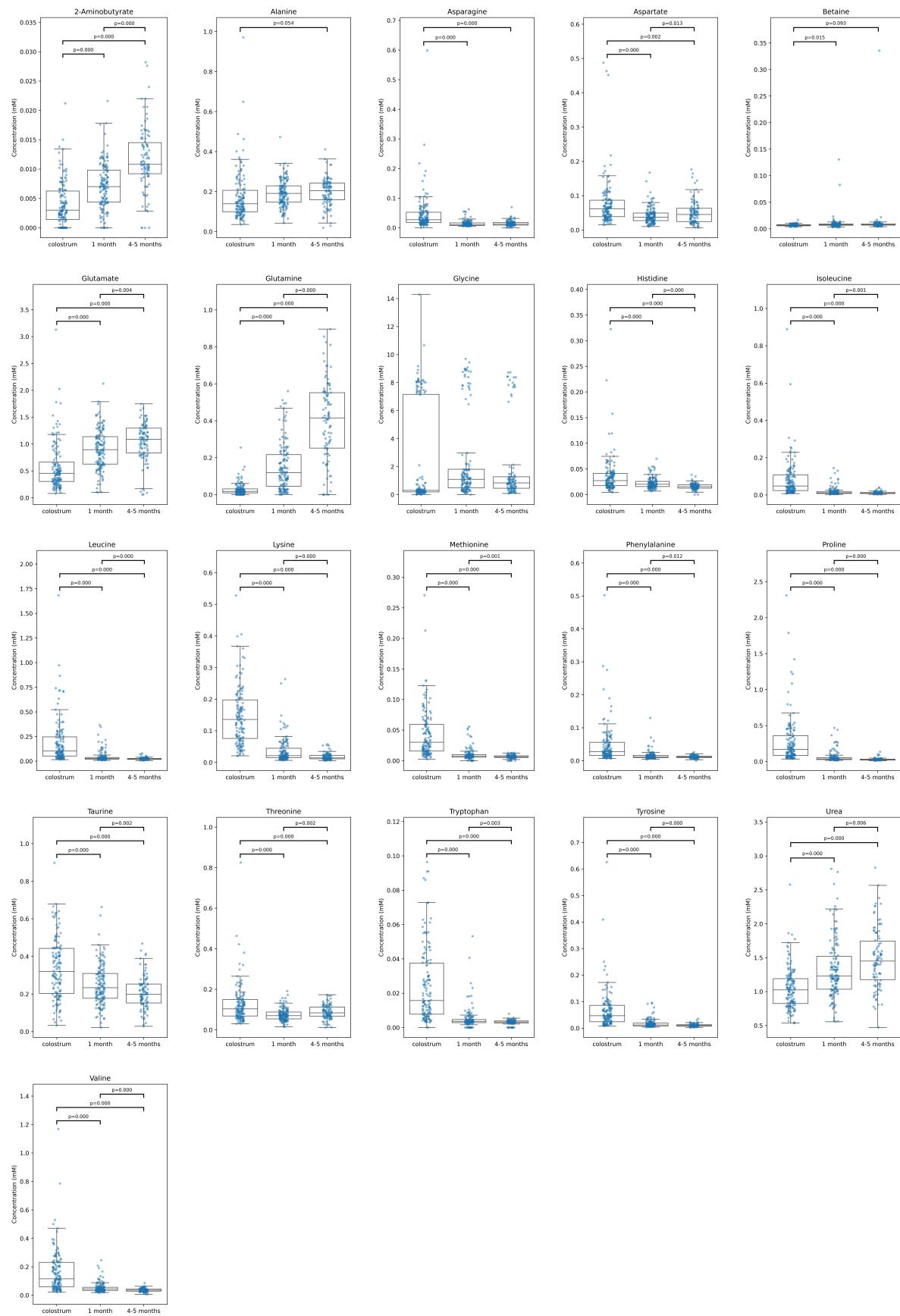


図7 アミノ酸及びその関連代謝物の経時変化による母乳中代謝物濃度の比較。

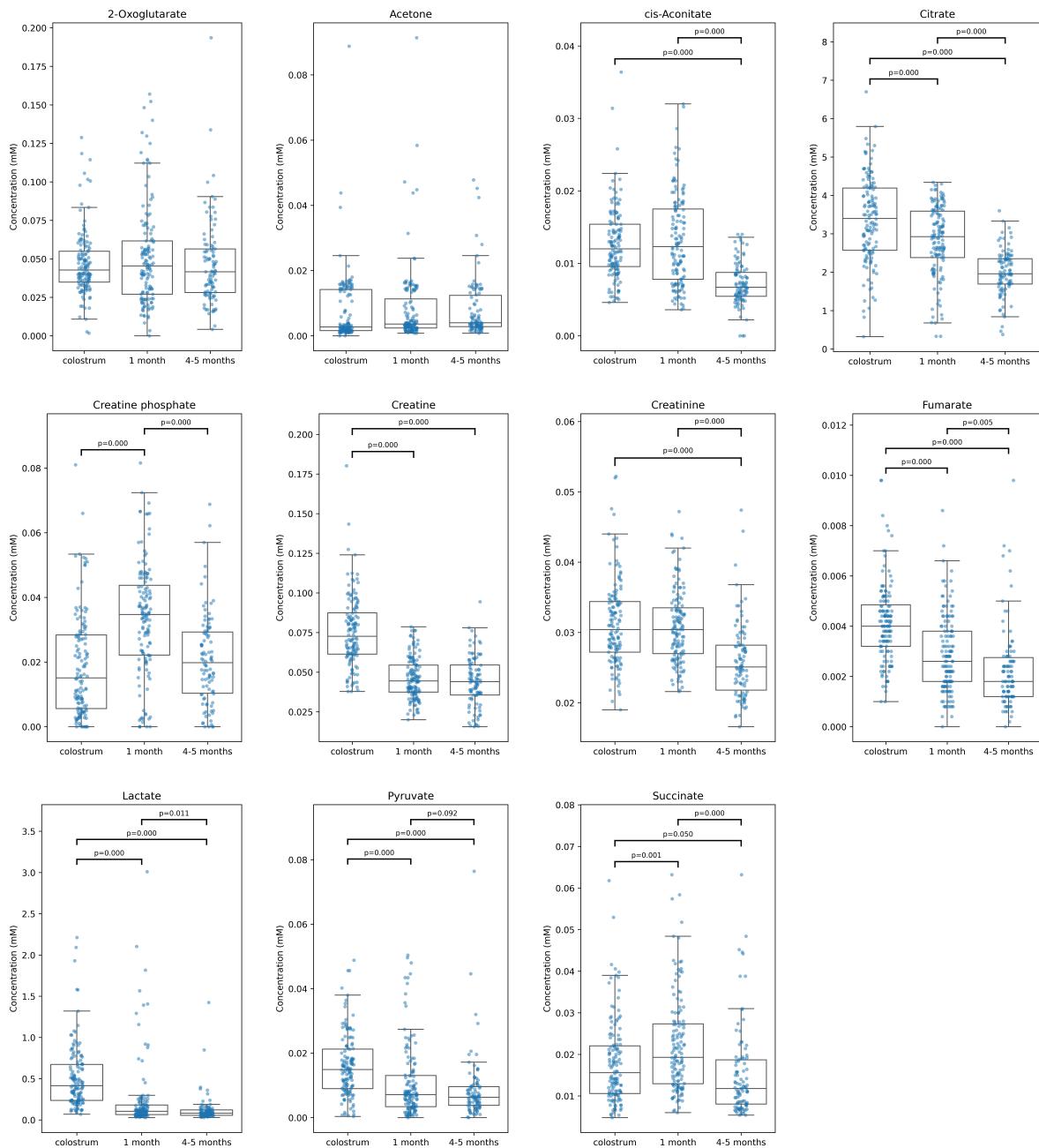


図 8 エネルギー関連代謝物の経時変化による母乳中代謝物濃度の比較。

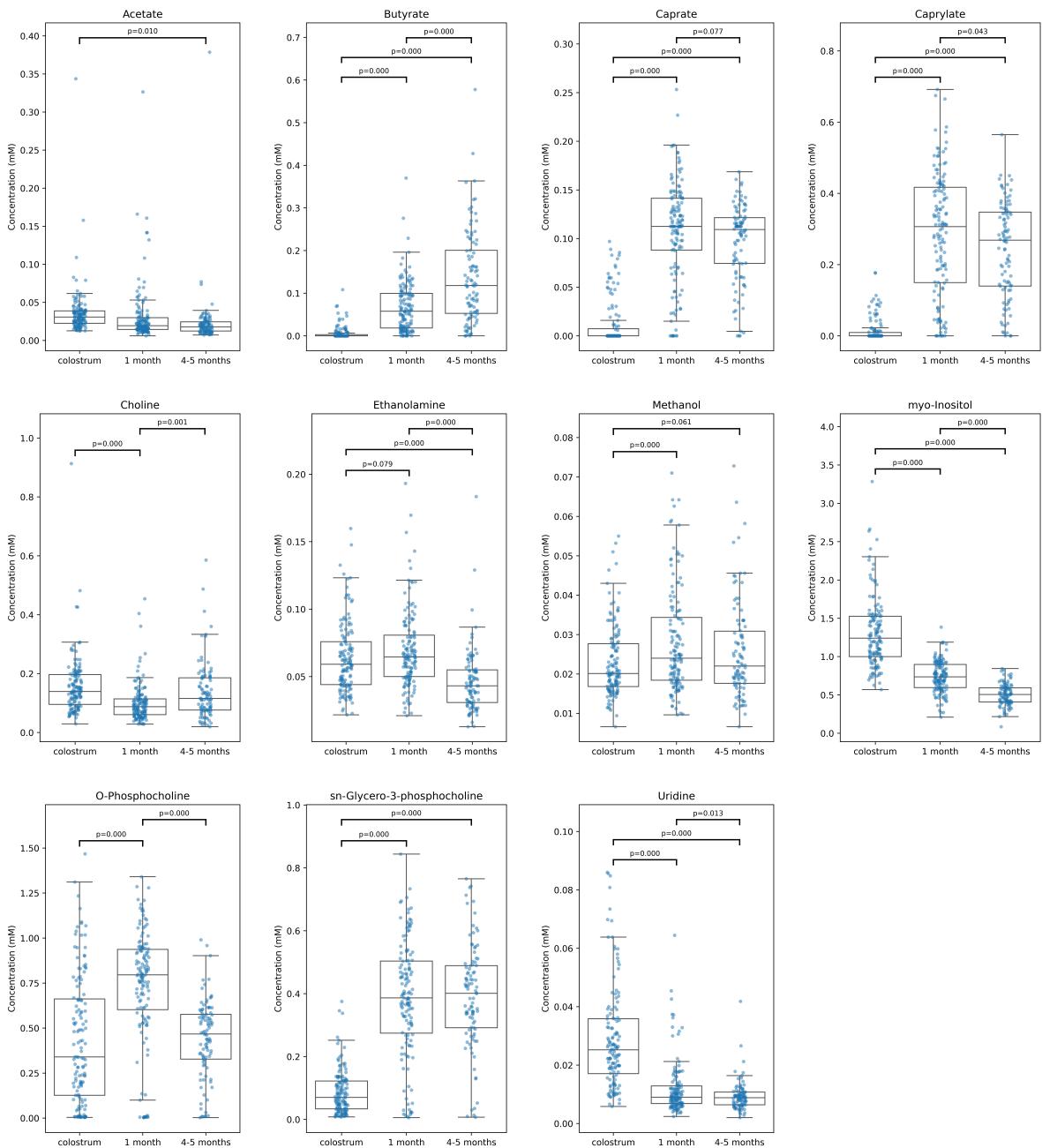


図9 脂肪酸及びその他代謝物の経時変化による母乳中代謝物濃度の比較。

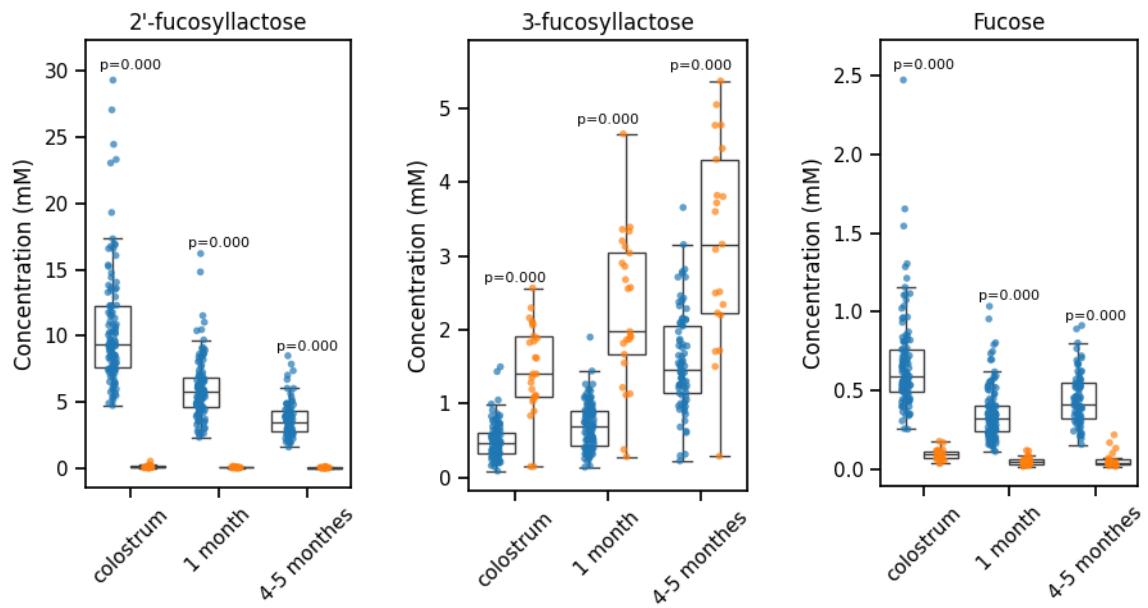


図 10 2'-FL 分泌型個体・非分泌型個体間で、優位な濃度差が見られた代謝物。
青色は Se+ (2'-FL 分泌型個体)、橙色は Se- (2'-FL 非分泌型個体) を示す。

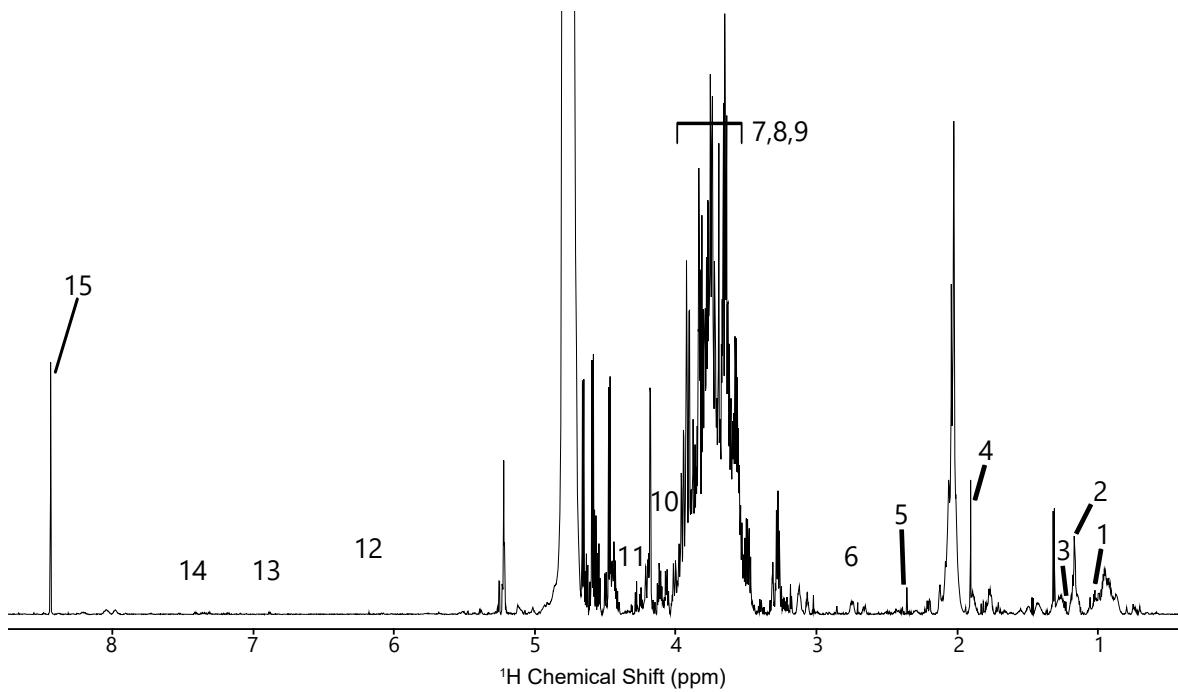
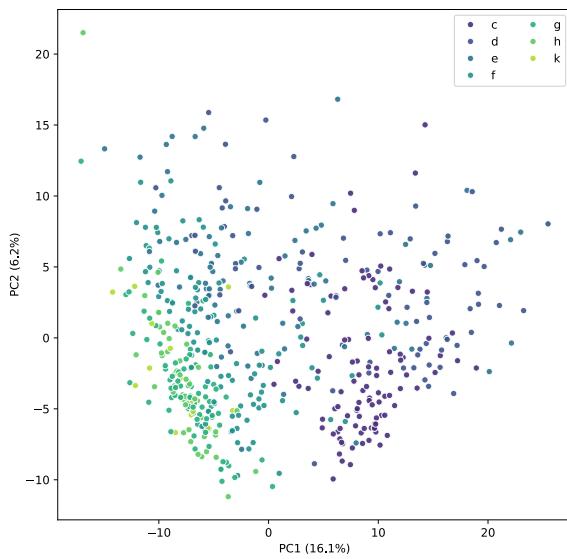


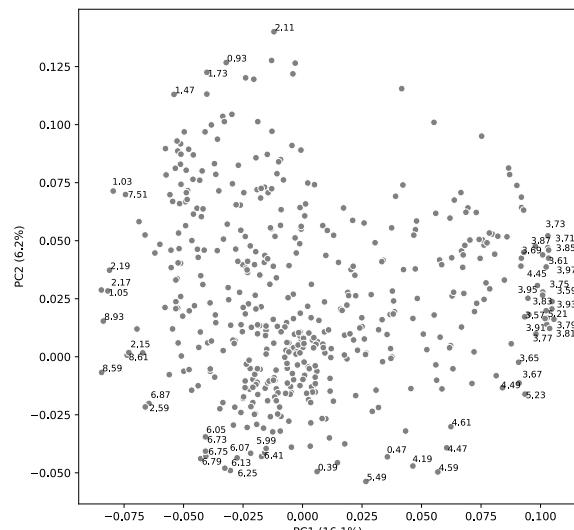
図 11 母子糞便の NMR スペクトルの一例。

図中の番号は同定された一部の代謝物を示す。1, lactate; 2, 3-fucosyllactose; 3, 2'-fucosyllactose; 4, acetate; 5, succinate; 6, 3'-sialyllactose; 7, galactose; 8, glucose; 9, lactose; 10, myo-inositol; 11, lactulose; 12, fumarate; 13, tyrosine; 14, phenylalanine; 15, formate

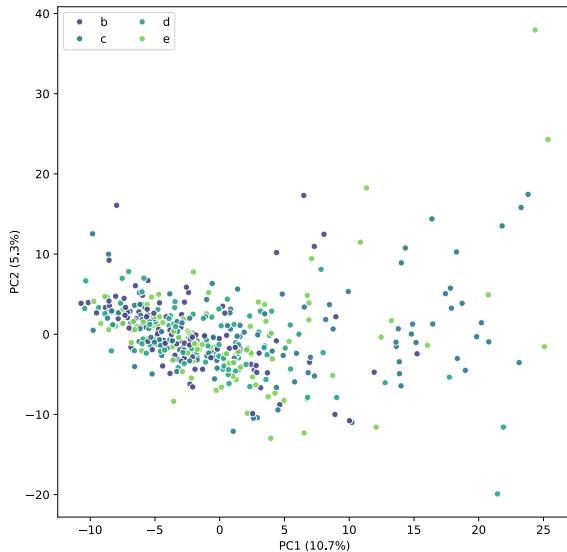
A



B



C



D

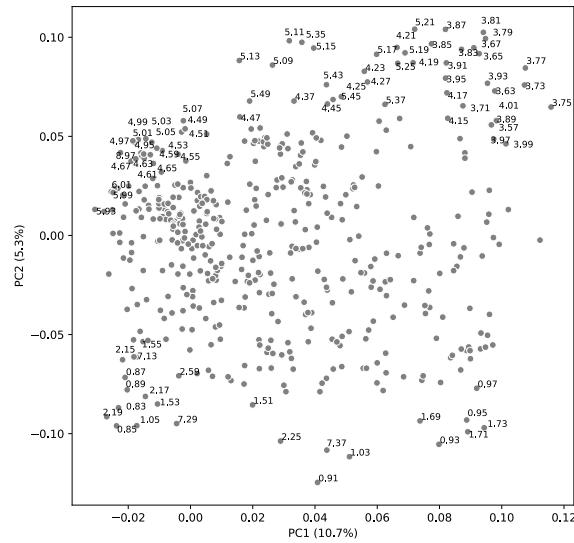


図 12 母子糞便の PCA 結果。

A: 子糞便の PCA スコアプロット。B: ローディングプロット。C: 親糞便の PCA スコアプロット。D: ローディングプロット。スコアプロットは時期により色分けされている。b, 出産前 24 週; c, 出産直後; d, 生後 1 ヶ月; e, 生後 4-5 ヶ月; f, 生後 8 ヶ月; g, 生後 1 年半; h, 生後 3 年; k, 生後 5 年。

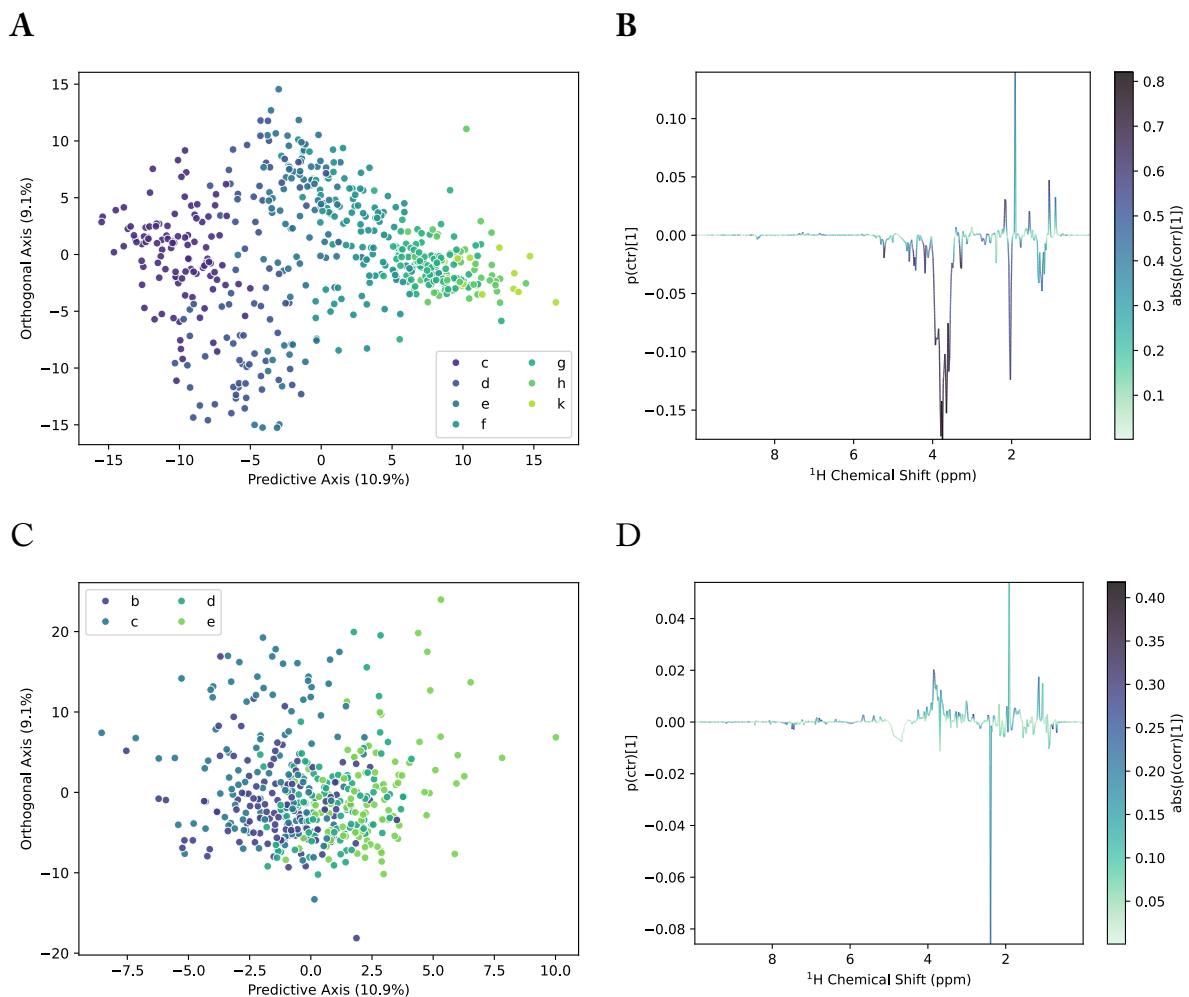


図 13 母子糞便の OPLS 結果。

A: 子糞便のスコアプロット。B: S-line プロット。C: 親糞便のスコアプロット。D: S-line プロット。スコアプロットは時期により色分けされている。b, 出産前 24 週; c, 出産直後; d, 生後 1 ヶ月; e, 生後 4-5 ヶ月; f, 生後 8 ヶ月; g, 生後 1 年半; h, 生後 3 年; k, 生後 5 年。

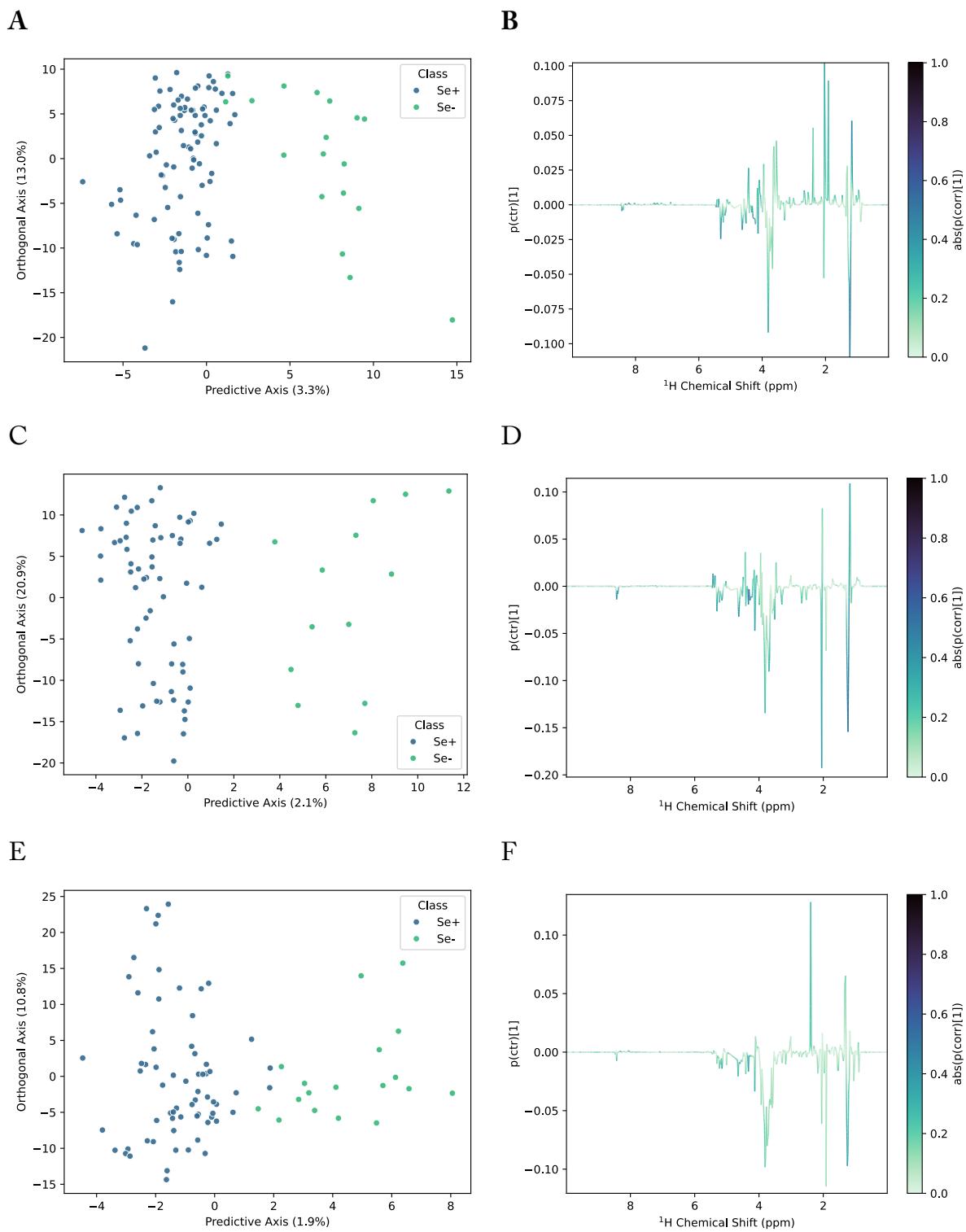


図 14 母子糞便の OPLS-DA 結果（子糞便）。

A: スコアプロット (Se+ vs Se-)。B: S-line プロット (Se+ vs Se-)。C: スコアプロット (母乳中 2'-FL 高濃度群 vs 低濃度群)。D: S-line プロット (母乳中 2'-FL 高濃度群 vs 低濃度群)。E: スコアプロット (母乳中 3'-SL 高濃度群 vs 低濃度群)。F: S-line プロット (母乳中 3'-SL 高濃度群 vs 低濃度群)。スコアプロットは時期により色分けされている。b, 出産前 24 週; c, 出産直後; d, 生後 1 ヶ月; e, 生後 4-5 ヶ月; f, 生後 8 ヶ月; g, 生後 1 年半; h, 生後 3 年; i, 生後 5 年。

10 謝辞

本研究を進めるにあたり熱心にご指導くださった、北海道大学 大学院先端生命科学研究院 蛋白質科学研究室の相沢智康教授、新井達也助教、並びに副査として貴重なご意見を頂きました自然免疫研究室の中村公則教授、生物情報解析科学研究室の菊川峰志准教授に心より御礼申し上げます。

NMR 実験に関して多くのサポートをしていただきました久米田博之様、熊木康裕様、大西裕季様、また実験手法や考察において多くのお力添えをいただきました森永乳業株式会社の和泉裕久様、田畠風華様に深く感謝申し上げます。

本研究を進めるにあたり、研究デザインや試料提供の調整などでご尽力いただきました、北海道大学医学研究院社会医学分野公衆衛生学教室の玉越暁子教授をはじめとした、岩見沢市母子健康調査研究グループの皆さんに厚く御礼申し上げます。並びに、本研究にご協力いただきました岩見沢市の皆様に心より感謝申し上げます。

様々な助言をいただいた蛋白質科学研究室の皆さん、研究室での生活において数々のご支援をいただきました技術補佐員の大貫しのぶ様に感謝の意を表します。