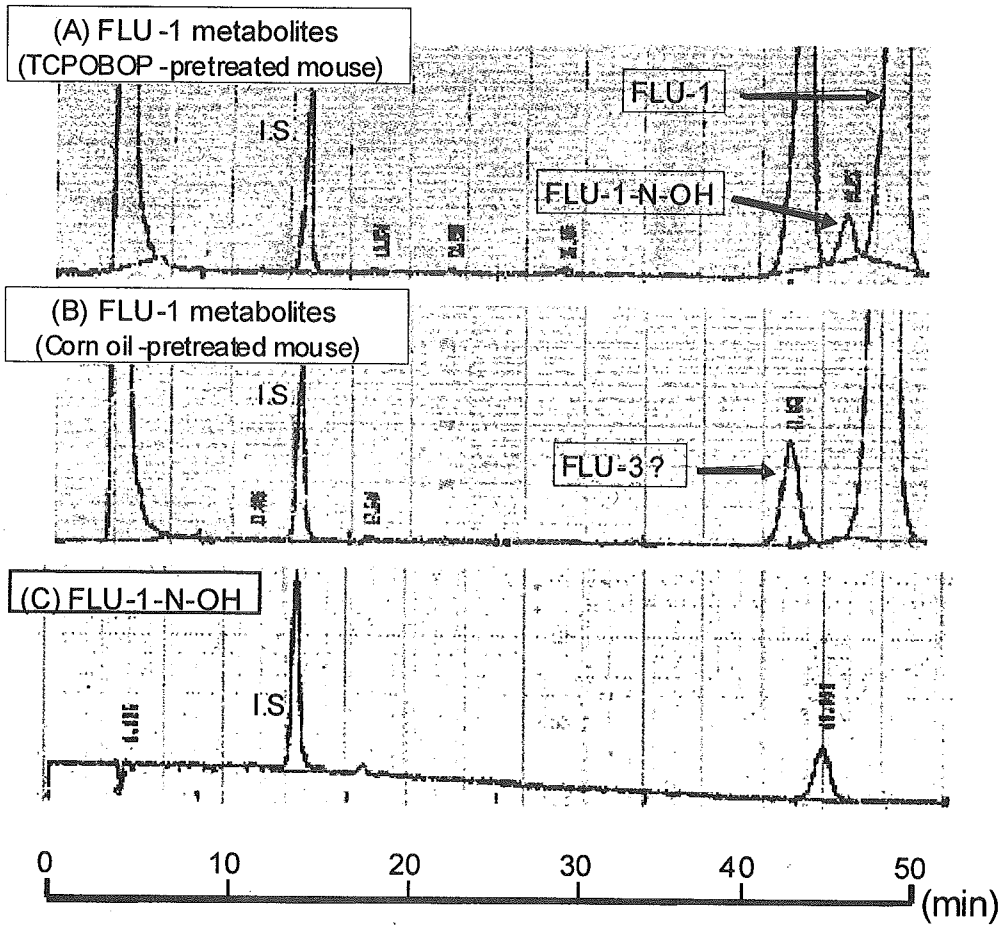


Fig. 4 HPLC chromatograms of flutamide and FLU-1 metabolites produced by TCPOBOP-pretreated mouse liver microsomes



## 5. 肝障害モデルマウスにおける flutamide 代謝の解析

FLU-1-N-OH は培養細胞で細胞毒性が認められ、肝障害誘発に関与している可能性が考えられたため、肝障害が認められた FLU-1/TCPOBOP 併用群と肝障害が認められなかった FLU-1 投与群から肝ミクロゾームを調製し、FLU-1 N-水酸化活性に差が認められるか検討した。Control 群では FLU-1-N-OH 化活性が検出限界以下となり認められなかったのに対し、TCPOBOP 群では FLU-1-N-OH 化活性が認められた。しかし、FLU-1/TCPOBOP 併用群と FLU-1 投与群を比べると、両群共に TCPOBOP 投与群と同程度の FLU-1-N-水酸化活性が認められた (Fig. 6)。TCPOBOP 投与群、FLU-1 投与群、FLU-1/TCPOBOP 併用群から調整したマウス肝ミクロゾームの FLU-1 N-水酸化活性は miconazole (100  $\mu$ M) の存在下で検出限界以下まで低下した。

### D. 考察

ヒト特異的な flutamide 誘発肝障害の機序を解明するために、マウスを用いて flutamide 誘発肝障害モデルを作製することを試みた。Flutamide (200 mg/kg) を 5 日間経口投与し、さらに TCPOBOP を併用しても肝障害は認められなかった。しかし、FLU-1 (200 mg/kg) を 5 日間経口

投与しさらに TCPOBOP を併用すると、肝障害がマウスに認められた。ただし、FLU-1 のみを投与した場合、肝障害は認められなかった。この結果から、flutamide が生体内で加水分解され生成した FLU-1 がさらに代謝活性化されて肝障害を誘発している可能性が示唆された。

FLU-1 と TCPOBOP を併用するとマウスに肝障害が認められたのは、CAR を介した薬物代謝酵素の誘導により FLU-1 から活性代謝物への代謝が促進されたことが原因である可能性が考えられる。特に FLU-1 の N-水酸化体 FLU-1-N-OH には *in vitro* で細胞毒性が認められているため、TCPOBOP 投与により FLU-1-N-OH もしくは FLU-1-N-OH の代謝物の生成量が増加したためにマウスで肝障害が認められた可能性が示唆された。

ヒト肝ミクロゾームでは FLU-1 N-水酸化活性が認められたのに対して、マウス肝ミクロゾームでは FLU-1 N-水酸化活性は検出限界以下となり認められなかった。これらの差異が flutamide 誘発肝障害のヒトとマウスの種差に関与する可能性が考えられた。

FLU-1-N-OH が肝障害を誘発している可能性が示唆されたため、肝障害が認められた FLU-1/TCPOBOP 併用群と FLU-1 投与群との間で FLU-1 N-水酸化活性を比較したところ、予想に反して両群の FLU-1 N-水酸化活性に差異は認められなかった。

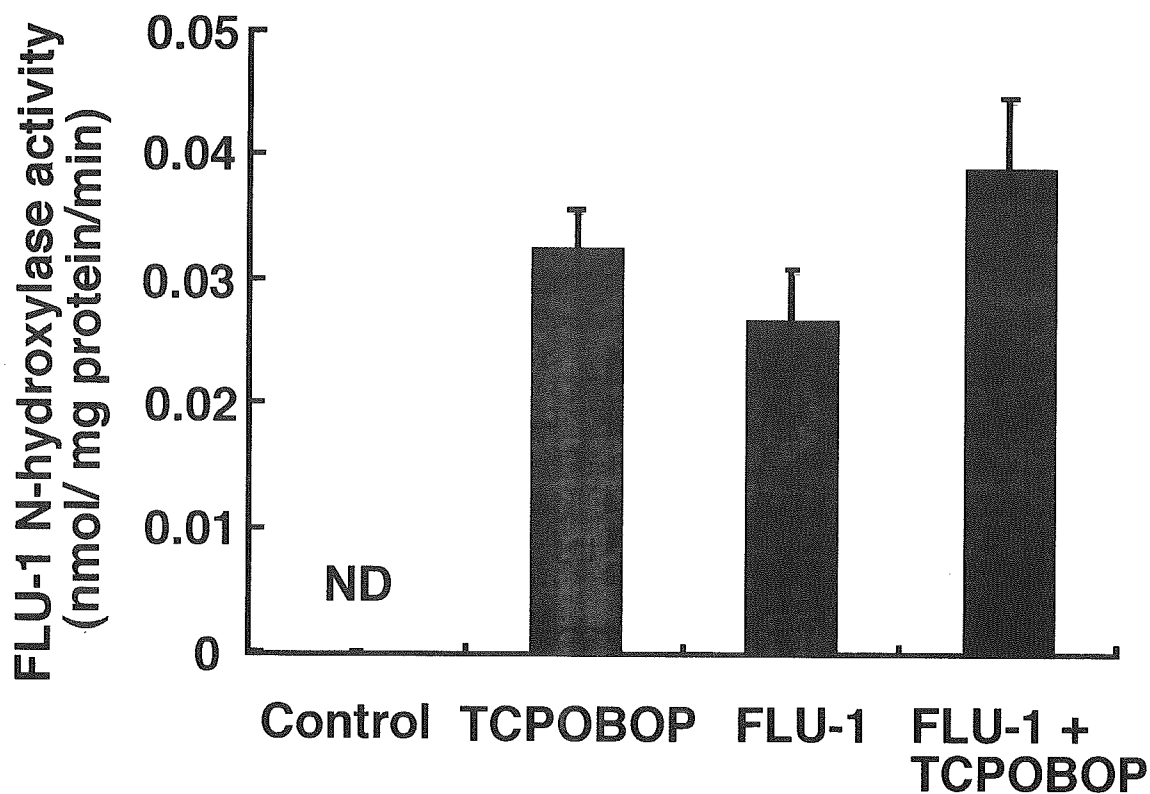


Fig. 6 FLU-1 N-hydroxylase activity in mouse liver microsomes. Values are mean  $\pm$  S.D. (n=4-5). ND, not detected (under 0.0055 nmol/mg protein/min).

この結果から、FLU-1 N-水酸化だけではなく N-水酸化に続く更なる代謝活性化や肝内グルタチオン濃度の枯渇など、予想以上に複雑な機序を介して flutamide は肝障害を誘発している可能性が考えられた。

#### E. 結論

Flutamide と TCPOBOP 併用群、FLU-1 投与群では肝障害は認められなかったが、FLU-1 と TCPOBOP を併用した群では control 群に比べ顕著な ALT 活性の上昇が認められ、FLU-1 を用いたマウスの肝障害モデルの作製に成功した。

Flutamide の代謝実験を行ったところ、ヒト肝ミクロゾームでは認められていた FLU-1 N-水酸化活性がマウス肝ミクロゾーム (コントロール群) では認められなかった。また障害の認められた FLU-1/TCPOBOP 併用群と障害の認められない FLU-1 投与群で FLU-1 N-水酸化活性に有意な差は認められなかった。そのため FLU-1-N-OH は直接肝障害を誘発しているのではなく、FLU-1-N-OH のさらなる代謝活性化や肝内グルタチオンの枯渇等が肝障害誘発に関与し、非常に複雑な機序で肝障害が誘発されていることが示唆された。

本研究で FLU-1 を用い肝障害モデルを作製した。今後はこのモデルマウスを用いヒト特異的な肝障害誘発機序を明らかに

すると共に、尿サンプルのメタボロミクス解析によりヒトに適用出来る毒性マーカーの探索に応用していけると考えている。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

無し

##### 2. 学会発表

○大瀨 雅人、宮田昌明、長井大地、山添康 Flutamide 誘発肝障害における N-水酸化代謝物、N-[4-nitro-3-(trifluoromethyl)phenyl]hydroxylamine の関与 第 126 年会 日本薬学会 2006. 仙台

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

無し

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）  
分担研究報告書

質量分析計を用いたメタボロミクス手法による毒性マーカー検索法の開発

分担研究者：堀 弥 杏林製薬株式会社 創薬研究所

分担研究者：矢本 敬 三共株式会社 安全性研究所

分担研究者：宮田昌明 東北大学大学院薬学研究科

研究要旨 ヒトへの応用が簡便な、尿などの非侵襲試料を用いた新規メタボロミクス高感度安全性予測系の確立を目的として、ヒトで肝障害の発生が報告されているアセトアミノフェンのラット肝障害モデルについて、質量分析計を用いたメタボロミクス手法による尿、血清および組織の解析を行った。簡便な前処理法で得られた質量スペクトルを統計学的手法により網羅的に解析することで、前処置並びに投与条件の異なる肝障害誘発モデル群を分離することが可能となった。続いて、既存の肝障害マーカーと質量スペクトルとの相関性に焦点をあてた新規バイオマーカー探索法について検討し、アセトアミノフェン誘発肝障害時のバイオマーカー候補となる質量数を抽出することができた。また、この質量数はフェノバルビタールを前処置したラットの APAP 誘発肝障害においても既存の肝障害マーカーと良い相関性を示した。以上のように非侵襲試料のメタボロミクス手法による解析から新規肝障害マーカーの探索法を検討し、薬物性肝障害モデルの尿成分からバイオマーカー候補の抽出に至ることが可能となった。

A. 研究目的

ヒトへの応用が簡便な、尿などの非侵襲試料を用いた新規メタボロミクス高感度安全性予測系の確立を目的として、ヒトで肝障害の発現が報告されている薬剤について質量分析(MS)によるメタボロミクス手法の開発ならびに毒性および薬効と細胞環境変化に基づく内因性物質の代謝変動情報との相関に関する知見を得る。具体的には、ヒトで肝障害が報告されているアセトアミ

ノフェン (APAP) のラット肝障害モデルから得られた尿などの試料を用いてメタボロミクス解析法とバイオマーカー探索法について検討する。また、前処置により APAP 肝障害への影響が知られている核内レセプター作動薬 (フェノバルビタール並びにクロフィブレート) を処置した試料についても検討する。

B. 研究方法

## 1. 試験施設および所在地

### 1-1. 動物実験

試験施設：三共株式会社 安全性研究所

所在地：静岡県袋井市堀越 717

### 1-2. MS 測定および解析

試験施設：杏林製薬株式会社 創薬研究所

所在地：栃木県下都賀郡野木町 2399-1

## 2. 試薬

アセトアミノフェン (APAP、シグマ アルドリッチ ジャパン株式会社)

フェノバルビタール (PB、和光純薬工業株式会社)

クロフィブレート (CPIB、シグマ アルドリッチ ジャパン株式会社)

L-ブチオニン-(S, R)-スルホキシイミン (BSO、シグマ アルドリッチ ジャパン株式会社)

メチルセルロース (ナカライテスク株式会社)

カルボキシメチルセルロースナトリウム (和光純薬工業株式会社)

Tween-80 (和光純薬工業株式会社)

アジ化ナトリウム (和光純薬工業株式会社)

アセトニトリル (HPLC 用、関東化学)

ギ酸アンモニウム (特級、関東化学)

## 3. 使用機器

冷却遠心機 CF7D2 (日立工機株式会社)

遠心機 LC06-SP (株式会社トミー精工)

自動分析装置 TBA-2000FR (東芝メディカル株式会社)

遠心機 5415D (ependorf)

LC-MS/MS システム

MS/MS Quattro Ultima (Micromass)

データ処理装置 MassLynx 4.0

Infusion pump Model 100 (NEUROSCIENCE, INC.)

## 4. 実験動物

8 週齢の雄性 F344/DuCrIj ラット (日本チャールス・リバー株式会社) を購入し、1 週間環境に馴化させた後、9 週齢で試験に使用した。動物室の環境は  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 、照明 12 時間/日 (7 時-19 時) に設定した。動物は、馴化期間および前処置投与期間にはラット用ブラケットケージ (有限会社新東洋製作所) で個別飼育し、APAP 投与後にラット用ステンレス製メタボリックケージ (小原医科産業株式会社) に移して個別飼育した。放射線 (30 kGy,  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$ 線) を照射した固形飼料 (Certified Rodent Diet 5002: PMI Nutrition International, Inc.) と 7 ppm クロール水 (自動給水装置) をそれぞれ自由に摂取させた。

## 5. 被験物質、投与用量および投与方法

### 5-1. フェノバルビタール・アセトアミノフェン併用試験

PB の投与用量は 0 および 100 mg/kg とし、投与容量はラットの体重 100 g あたり 0.5 mL とした。APAP の投与用量は 0, 500 および 800 mg/kg とし、投与容量はラットの体重 100 g あたり 1 mL とした。各個体の投与容量は投与日に測定した体重に基づいて算出した。被験物質はガラス製注射筒

(株式会社夏目製作所)と金属製胃ゾンデ(株式会社夏目製作所)を用いて強制経口投与した。投与スケジュールは、前処置としてPBを4日間投与し、PB投与4日目にAPAPを単回投与した。

#### 5-2. クロフィブレート・アセトアミノフェン併用試験

CPIBの投与用量は200 mg/kgとし、投与容量はラットの体重100 gあたり1 mLとした。APAPの投与用量は0, 100, 500および800 mg/kgとし、投与容量はラットの体重100 gあたり1 mLとした。各個体の投与容量は投与日に測定した体重に基づいて算出した。被験物質はガラス製注射筒と金属製胃ゾンデを用いて強制経口投与した。投与スケジュールは、前処置としてCPIBを4日間投与し、CPIB投与4日目にAPAPを単回投与した。

#### 5-3. L-ブチオニン-(S, R)-スルホキシミン・アセトアミノフェン併用試験

BSOの投与用量は0および20 mMとし、給水瓶を用いて飲水投与した。APAPの投与用量は0および500 mg/kgとし、投与容量はラットの体重100 gあたり1 mLとした。各個体へのAPAP投与容量は投与日に測定した体重に基づいて算出し、ガラス製注射筒と金属製胃ゾンデを用いて強制経口投与した。投与スケジュールは、前処置としてBSOを4日間投与し、BSO投与4日目にAPAPを単回投与した。

#### 6. 群構成

投与1~3日前に体重の平均値および分散に大きな差が出ないように群分けを行っ

た。各群は雄5例で構成した。

#### 7. 検体調製

APAPの溶媒には注射用水(大塚製薬株式会社)にメチルセルロースあるいはカルボキシメチルセルロースナトリウムを0.5%の割合で添加したものを使用し、APAPの1,5および8%懸濁液を調製した。PBは注射用水に5%となるように溶解した。CPIBの溶媒には2%のTween-80を用い、CPIBの2%溶液を調製した。BSOは水道水に20 mMとなるように溶解した。

#### 8. 尿サンプル採取

アジ化ナトリウムを1%になるように注射用水に溶解した。この溶液1 mLを防腐剤として50 mL遠心分離用コニカルチューブ(ベクトンディッキンソン)に入れ、メタボリックケージの尿回収ポート部の下端にチューブを固定した。チューブの周囲をドライアイスで冷却した状態で、APAP投与後24時間で排泄される尿を採取した。尿採取後、尿を室温で融解し、遠心分離(3000 rpm, 5 min)した。この上清の容量をメスピペットで測定し、尿量とした。尿は分注し分析に用いるまで-80°Cで保存した。

#### 9. 採血および組織サンプル採取

APAP投与24時間後に各個体の体重を測定した。次いで、エーテル麻酔下で、テルモ注射針(18G:テルモ株式会社)を取り付けたテルモシリンジ(10 mL:テルモ株式会社)を用いて腹大動脈から全採血することにより安楽死させた。解剖して肉眼的観察を行った後、肝臓および腎臓を採取し、重量を測定した。得られた血液は凝固促進



型分離剤入りスピッツ管(コアラ・チューブ S:株式会社シノテスト)に注入し、室温で約30分間放置した。その後、冷却遠心機で遠心分離(4°C, 3000 rpm, 10 min)して血清を得た。血清は0.5 mLを血液化学的検査に使用した。残りは分注し分析に用いるまで-80°Cで保存した。

#### 10. 血液化学的検査

得られた血清を用いて自動分析装置で検査を実施した。以下に検査項目を示す。

アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST), アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT), アルカリホソファターゼ (ALP), 総ビリルビン (T.BIL), 総コレステロール(T.CHO), トリグリセライド(TG), グルコース (GLU), 総タンパク (T.PRO), アルブミン (ALB), A/G 比 (A/G), 尿素窒素 (UN), クレアチニン (CRE), カルシウム (Ca), 無機リン (IP), ナトリウム (Na), カリウム (K), クロール (Cl)

#### 11. 病理組織学的検査

採材した肝臓および腎臓は10%中性緩衝ホルマリン液で固定し、常法に従って病理組織標本を作製した。病理組織標本はヘマトキシリン・エオジン染色を施し、光学顕微鏡で観察した。

#### 12. MS用試料の調製

PBの前処置の有無を含むAPAP誘発肝障害モデル(6群各5例)のラット尿、血清および肝臓について、以下の方法でMS用試料を調製した。

得られた尿10 µLにアセトニトリル20 µLとアセトニトリル/0.2%ギ酸アンモニウ

ム水溶液(1/1, v/v)200 µLを添加し、攪拌後MS測定試料とした。

血清については、血清50 µLにアセトニトリル100 µLを添加して混合後、遠心分離し、上清30 µLにアセトニトリル/0.2%ギ酸アンモニウム水溶液(1/1, v/v)200 µLを添加し、攪拌後MS測定試料とした。

肝臓については、肝臓約500 mgにミリQ水1 mLを添加し、ステンレスビーズでホモジネートを作成した。ホモジネート50 µLにアセトニトリル100 µLを添加して混合後、遠心分離し、上清30 µLにアセトニトリル/0.2%ギ酸アンモニウム水溶液(1/1, v/v)200 µLを添加し、攪拌後MS測定試料とした。

#### 13. MS測定条件

MS測定試料をシリンジに150 µL採取し、以下の条件でMSスペクトルを採取した。

Infusion rate 10 µL / min

Ion source Electrospray ionization (ESI)

Ion mode Positive (PIM) and negative ion mode (NIM)

Resolution power Unit mass

Scan mode Full scan mode (Q1)

Scan range m/z 100 ~ 1,000

Scan speed 900 amu / 1sec

Scan time 30 sec

Data points 14,303

Data mode MCA

Capillary voltage 3.0 (-) / 3.5 (+) kV

Cone voltage 50 V

Source temp. 90 °C

Desolvation temp. 120 °C

Cone gas flow 72 L/hr

Desolvation gas flow 650 L/hr

#### 1.4. 統計学的方法

##### 1.4-1. 動物実験

体重、器官重量、臓器/体重比、尿量および血液化学的検査値は、統計解析パッケージ SAS® System Release 8.2 (SAS Institute Inc.) を用いて処理し、平均値と標準偏差を算出した。対照群 (APAP 非投与群) と APAP 投与群との平均値の有意差検定は、PB・APAP 併用試験および CPIB・APAP 併用試験については Dunnett 検定を用いて、BSO・APAP 併用試験については t 検定を用いて行い、いずれも有意水準を 1% および 5% とした。

##### 1.4-2. 主成分分析および相関係数

得られた MS スペクトルは質量数を小数点以下 2 桁で表記し、Microsoft EXCEL 2000 に取り込んだピーク強度を 1000 分の 1 にして、統計解析パッケージ SAS® System Release 8.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC) を用いて主成分分析 (PCA, principal component analysis) を行った。

PB 処置あるいは未処置の群について、肝障害マーカー (ALT 活性の対数値) と得られた MS スペクトルの相関係数を Microsoft EXCEL2000 で算出し、スピアマンの順位相関係数に基づいて有意差検定 (有意水準: 0.1%、1% および 5%) を実施した。

#### C. 研究結果

##### 1. フェノバルビタール・アセトアミノフェン併用試験

Table 1 に解剖時の病理学的検査および尿量の結果を、Table 2 に血液化学的検査の結果を示す。PB 投与群は PB 非投与群に比べて肝重量および肝重量/体重比が増加し、PB による肝肥大が確認された。APAP 800 mg/kg 投与群では、PB 投与および非投与でばらつきは大きいものの AST, ALT および T,BIL が増加し、APAP による肝障害が認められた。また、尿量の増加も認められた。しかし、PB を投与した APAP 800 mg/kg 群では、PB 非投与に比べて AST および ALT が同程度であり、PB を前処置することによる APAP 肝障害の増強効果は確認できなかった。

##### 2. クロフィブレート・アセトアミノフェン併用試験

Table 3 に解剖時の病理学的検査および尿量の結果を、Table 4 に血液化学的検査の結果を示す。APAP 500 mg/kg および 800 mg/kg 投与群では、APAP 非投与および 100 mg/kg 投与群に比べて、体重、肝重量および肝重量/体重比が減少し、800 mg/kg 投与群では尿量が増加した。CPIB を併用投与した APAP 800 mg/kg 投与群では T.BIL の増加が認められたが、AST および ALT の増加は認められず、CPIB の前処置により APAP 肝障害の発症が抑制された結果となった。

##### 3. L-ブチオニン-(S, R)-スルホキシイミン・アセトアミノフェン併用試験

Table 5 に解剖時の病理学的検査および尿量の結果を、Table 6 に血液化学的検査の結果を示す。BSO 非投与においては、APAP 500 mg/kg 投与群で APAP 非投与群に比べ

て体重減少が認められたが、肝重量や AST、ALT に大きな変化は認められなかった。一方、BSO を投与した場合、APAP 500 mg/kg 投与群では AST、ALT および T.BIL の顕著な増加が認められ、BSO による肝臓のグルタチオン枯渇が APAP の肝障害を増悪させることが確認された。特に AST、ALT および T.BIL が高値を示した 3 個体 (04M01, 04M02 および 04M03) では赤色尿が認められた (Appendix 6 参照)。病理組織学的には腎臓の尿細管腔内に Hyaline cast が軽度に見られたのみで、腎障害を示唆する変化は認められなかった。

#### 4. 主成分分析を用いた分類

フェノバルビタール・アセトアミノフェン併用試験で得られた尿、血清および肝臓について MS スペクトルデータを測定し、主成分分析 (PCA) による試料間および群間の分類の可能性について検討した。

##### 4-1. 由来の異なる成分の分類

コントロール試料 (5 例) の尿、血清および肝臓から得られた MS スペクトルについて、PCA を実施した。得られた上位 3 つの固有ベクトル (PCA1~3) について 2 次元プロットした。NIM (Fig.1a, 1b) および PIM (Fig.2a, 2b) のいずれのモードにおいても、PCA2 vs. PCA3 でこれら 3 群を明確に分離することが可能であった。NIM の PCA1 では血清と肝臓が近く、尿とは異なった位置に分布し、PIM の PCA1 では 3 群が密集したことから、MS データの PCA1 は移動相などのマトリックスに由来する影響が大きいものと推察された。

##### 4-2. APAP 誘発肝障害モデルにおける

分類

6 群 (Control 群、APAP 500mg/kg 群、800mg/kg 群、PB + Control 処置群、PB+APAP 500mg/kg 群、PB+APAP 800mg/kg 群) 各 5 例の尿、血清および肝臓から得られた MS データを用いて、PCA を実施した。得られた固有値をヒートマップ (Fig.3~8) で示し、上位 4 つの固有ベクトル (PCA1~4) について 3D プロットを行った (Fig.9~20)。各群は尿の NIM および PIM において明確に分離することが可能であった。特に NIM の PCA1 と PCA2 では APAP 投与群と非投与群の明確な分離が可能であり、PCA3 では PB の処置・未処置の分離が可能であり、PCA4 は APAP と PB の両方の影響を受けたパラメータであった。ヒートマップ (Fig.3~8) で確認できるように、MS データの主成分分析から得られる PCA1 には群間の分離への寄与は少ないことから、PCA2 から PCA4 のデータを用いることが多群の分類には有効であることが明らかとなった。また、MS データの PCA による分離は、障害部位である肝臓よりも尿や血清で良好であることが明らかとなった。

##### 4-3. 尿の MS スペクトルと代謝物

最も明瞭な分離が可能であった尿の NIM の代表的な MS スペクトル (Fig.21) を示す。APAP 非投与群と比較して、APAP 投与群では質量数 (m/z) 230, 311, 326 に顕著なピーク強度の増加が認められ、それぞれ APAP の尿中代謝物として知られている APAP の硫酸抱合体、N-アセチルシステイン抱合体およびグルクロン酸抱合体の擬分子イオン [M-H]<sup>-</sup> に相当した。これらのピー

ク強度は PB の前処置により顕著な増加 (Table 7) が認められた。また、PB の未処置群と比較し、前処置群に認められた m/z 423 は、4-Hydroxy PB のグルクロン酸抱合体と推定した。

## 5. 新規バイオマーカーの探索

血清 ALT 活性は AST 活性と同様に肝障害の病理所見を良く反映したこと、個体毎の血清 ALT 活性と AST 活性には相関係数が 0.94 以上の良好な相関が認められたことから、血清 ALT 活性を基準として、新規バイオマーカー探索法の検討を試みた。すなわち、個体毎の血清 ALT 活性と尿の MS スペクトル毎のピーク強度との相関性を利用して、バイオマーカー候補を抽出する。(Table 7, Fig.22~24)。

### 5-1. APAP 誘発肝障害モデルにおける相関性

ALT 活性と質量数毎のピーク強度の相関性を検討した結果、ALT 活性値の対数値を指標に用いることにより相関性の向上が認められた。特に尿の NIM では m/z 196, 409 および 424 にそれぞれ 0.8723, 0.8684 および 0.8663 の相関性が、PIM では m/z 313, 345 および 388 にそれぞれ 0.8374, 0.7781 および 0.8197 の有意な正の相関性が認められた。また、APAP-NAC は APAP の毒性発現に寄与する活性体 N-acetyl benzoquinoneimine の代謝物であり、APAP-NAC を含む APAP の他の代謝物にも良好な相関性が認められた。

### 5-2. PB 前処置した APAP 誘発肝障害モデルにおける相関性

PB 処置したラットの APAP 誘発肝障害

モデルを用いて、肝障害マーカーと先に抽出されたバイオマーカー候補の相関性について検討した。ALT 活性値の対数値に対して、NIM の m/z 196, 409 および 424 でそれぞれ 0.7402, 0.8773 および 0.8985、PIM の m/z 313, 345 および 388 でそれぞれ 0.8445, 0.8472 および 0.8478 の良好な正の相関性が認められた。一方、APAP-NAC ではピーク強度は増加したが有意な相関性は認められなかった。

## D. 考察

医薬品の開発ならびに安全性研究において、現在トキシコゲノミクス手法を導入した研究が進められており、毒性発現時の遺伝子発現情報と既存毒性試験情報の組み合わせにより、毒性発現に関して多くの情報が得られてきた。しかし実際には種差のあるヒトの毒性を詳細に予測することは難しく、その予測にはトキシコゲノミクス研究で得られた遺伝子の発現情報に加えて、毒性によって生じた細胞環境の変化を高感度に検出する手法の組み合わせによる、細胞維持・エネルギー代謝系に関わる内因性物質の代謝変動の経時的な情報が必須である。そこで本研究では、ヒトへの応用が簡便な、尿などの非侵襲試料を中心として用いた新規メタボロミクス高感度安全性予測系の確立を目的として、肝障害モデル動物の試料を用いて手法の開発と解析を実施した。

APAP 投与後 24 時間の蓄尿と 24 時間後の血清および肝臓について、簡便な前処理後、質量分析計に導入し、negative および positive ion mode でそれぞれ低分子量域の m/z100~1,000 の質量スペクトルを得た。

フェノバルビタール前処置の有無を含む APAP 誘発肝障害モデル 6 群の試料から得られた MS スペクトルを主成分分析により分類することが可能となった。一方、PCA 後の固有ベクトルは、尿から血清、肝臓と障害部位に近づくほど収束せず、重なり合う傾向が認められた。この原因は不明であるが、障害部位の不均一性や肝臓の複雑な代謝機能の影響が考えられるので、今後もデータの収集を進める。血清には障害部位から漏出された逸脱酵素などがその障害の程度に応じて存在する。同様に血液に漏出した低分子は通常速やかに腎臓から消失されるため、障害発生からの時間が重要な因子となる。この点で、尿は障害部位から血液を介して腎臓で濃縮された成分であること、蓄尿により障害発生から採取時までの積算した結果ととらえられることから、肝障害の程度を良好に反映できたものと考えられた。このように尿は非侵襲試料であるばかりでなく、内因性低分子代謝物の濃縮効果と経時変化の積算効果から肝障害マーカーの検索に適した生体成分と考えることができる。

今回の MS スペクトルの PCA において、いずれの PCA 1 もその寄与率が約 90% と極めて高かった。このことは尿および組織などに由来する固有の MS スペクトルと共に移動相に由来する MS スペクトルが反映されているものと考えられた。よって、各群の特異性を検出するためには主成分 2 ～ 4 に着目し、分類することが有用と考えられた。

PCA により最も明確に分類できたのは尿の NIM データであったが、MS スペクトルを解析した結果、APAP 投与群には APAP

に由来する代謝物（APAP 硫酸抱合体、APAP N-アセチルシステイン抱合体、APAP グルクロン酸抱合体など）の質量数の顕著な増加が認められ、PB 処置群は PB の水酸化体のグルクロン酸抱合体に相当する質量数の増加が認められた。このことから薬物性肝障害モデルでは、内因性代謝物の変化以外に薬物に由来する成分の変化も解析に影響を与えることを考慮する必要がある。

そこで、既存の肝障害マーカーに着目し、MS スペクトルの質量数毎に相関性を算出し、良好な相関性から質量数を探索する方法を検討した。個体毎の ALT 活性値をそのまま用いるのではなく、ALT 活性の対数値を指標として用いることで MS スペクトルとの相関性が向上した。このことから、基準となる指標に ALT 活性の実測値のみならず、その対数値を用いることもバイオマーカー探索の有用な方法と考えられた。この方法から、尿の NIM および PIM からそれぞれ 3 つの質量数を抽出することが出来た。また、これら質量数は、PB 前処置により代謝能の亢進したラットの APAP 誘発肝障害モデルにおいても、ALT 活性の対数値と良好な相関性を示した。このように既存の肝障害マーカーとの相関性から絞り込むことで、バイオマーカー候補を探し出すことが可能であった。各成分の構造解析は検討中であり、今後、BSO 処置による APAP 誘発肝障害モデルや他の薬物性肝障害モデルにおいてもバイオマーカー候補としての可能性を検証したい。

## E. 結論

ヒトへの応用が簡便な、尿などの非侵襲試料を用いた新規メタボミクス高感度安全性予測系の確立を目的として、薬物性肝障害モデルにおける尿および生体成分の質量分析計による解析を実施した。その結果、尿の質量スペクトルから統計学的手法により解析することで、前処理並びに投与条件の異なる肝障害誘発モデル群を尿などの非侵襲試料を用いて分離することが可能となった。さらに、既存の肝障害マーカーと質量スペクトルの相関性を利用して、薬物性代謝物の影響を除き、バイオマーカーを探索する手法を開発した。今後は、BSO 処置による APAP 誘発肝障害モデルや他の薬物性肝障害モデルにおいてもバイオマーカー候補としての可能性を検証する。また、同様の方法を用いて、異なる肝障害発症機序に特異性の高いバイオマーカーの探索を引き続き実施する。さらに、その構造を解析し、障害部位における代謝変化と結びつけることで、ゲノミクス並びにプロテオミクスの情報を含めて、メタボミクス研究の有用性を検証していきたい。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

登録および登録予定共になし

Table 1 Pathological and urinary data of combined administration of PB and APAP in the rat

PB mg/kg	APAP mg/kg	N	Body		Liver		Kidney (left)		Kidney (right)		Urine mL
			g	g	g	g%	g	g%	g	g%	
0	0	5	Mean	193.9	6.409	3.301	0.730	0.376	0.722	0.372	10.838
			S.D.	6.4	0.655	0.240	0.048	0.021	0.051	0.015	1.569
			Mean	183.9	6.067	3.296	0.735	0.400	0.728	0.396 *	11.828
500	500	5	S.D.	10.0	0.489	0.088	0.053	0.014	0.054	0.011	1.823
			Mean	171.4 **	6.140	3.582	0.711	0.415 **	0.705	0.411 **	14.136 *
			S.D.	6.3	0.506	0.258	0.038	0.009	0.045	0.016	1.916
100	0	5	Mean	209.4	10.018	4.781	0.803	0.383	0.783	0.374	9.000
			S.D.	5.5	0.494	0.113	0.038	0.013	0.022	0.004	0.596
			Mean	200.9	9.525	4.743	0.794	0.395	0.767	0.382	11.580
500	500	5	S.D.	6.5	0.181	0.097	0.021	0.011	0.039	0.016	2.871
			Mean	198.1 *	9.566	4.835	0.821	0.415 *	0.799	0.404 **	20.830 *
			S.D.	8.8	0.701	0.399	0.036	0.027	0.019	0.016	12.550

Significantly different from APAP 0 mg/kg group \* p < 0.05, \*\* p < 0.01 (Dunnett's test)

Table 2 Serum chemistry data of combined administration of PB and APAP in the rat

PB mg/kg	APAP mg/kg	N	AST U/L	ALT U/L	ALP U/L	T.BIL mg/dL	T.CHO mg/dL	TG mg/dL	GLU mg/dL	T.PRO g/dL	ALB g/dL
0	0	5	Mean 93.6 S.D. 6.58	Mean 34.0 S.D. 3.46	Mean 1261.2 S.D. 74.13	Mean 0.010 S.D. 0.0000	Mean 54.4 S.D. 1.67	Mean 46.2 S.D. 11.56	Mean 150.8 S.D. 8.58	Mean 5.62 S.D. 0.084	Mean 2.54 S.D. 0.089
	500	5	Mean 91.6 S.D. 6.35	Mean 42.2 S.D. 3.70	Mean 1176.2 S.D. 59.03	Mean 0.024 S.D. 0.0089	Mean 59.2 S.D. 5.12	Mean 58.0 S.D. 29.73	Mean 141.8 S.D. 11.67	Mean 5.74 S.D. 0.089	Mean 2.62 S.D. 0.045
	800	5	Mean 5084.2 S.D. 6083.03	Mean 2006.4 S.D. 2193.04	Mean 1260.2 S.D. 143.09	Mean 0.070 * S.D. 0.0604	Mean 61.8 S.D. 17.74	Mean 39.8 S.D. 23.08	Mean 132.6 * S.D. 13.05	Mean 5.80 S.D. 0.187	Mean 2.72 ** S.D. 0.084
100	0	5	Mean 106.2 S.D. 8.32	Mean 56.8 S.D. 5.02	Mean 1318.6 S.D. 63.58	Mean 0.028 S.D. 0.0084	Mean 77.4 S.D. 5.03	Mean 62.2 S.D. 4.15	Mean 140.6 S.D. 4.04	Mean 5.90 S.D. 0.100	Mean 2.58 S.D. 0.045
	500	5	Mean 221.2 S.D. 186.18	Mean 182.4 S.D. 185.80	Mean 1203.0 * S.D. 34.01	Mean 0.044 S.D. 0.0114	Mean 74.2 S.D. 7.36	Mean 73.0 S.D. 17.78	Mean 134.4 S.D. 5.13	Mean 5.86 S.D. 0.089	Mean 2.68 S.D. 0.045
	800	5	Mean 3839.4 S.D. 6697.47	Mean 2944.6 S.D. 4480.87	Mean 1194.8 * S.D. 83.43	Mean 0.102 * S.D. 0.0782	Mean 71.2 S.D. 5.85	Mean 76.2 S.D. 41.95	Mean 131.0 S.D. 13.27	Mean 5.78 S.D. 0.130	Mean 2.62 S.D. 0.110

Significantly deferent from APAP 0 mg/kg group \* p < 0.05, \*\* p < 0.01 (Dunnnett's test)



Table 2 (Continued)

PB mg/kg	APAP mg/kg	N	GLB g/dL	A/G	UN mg/dL	CRE mg/dL	Ca mg/dL	IP mg/dL	Na mEq/L	K mEq/L	Cl mEq/L
0	0	5	Mean 3.10 S.D. 0.071	0.826 0.0134	16.56 1.374	0.292 0.0179	10.62 0.084	7.772 0.2111	145.2 0.45	4.32 0.217	105.0 0.71
	500	5	Mean 3.12 S.D. 0.045	0.838 0.0084	17.80 0.897	0.282 0.0130	10.56 0.219	8.182 0.4844	144.8 0.45	4.36 0.134	105.2 1.10
	800	5	Mean 3.10 S.D. 0.100	0.872 ** 0.0130	22.94 ** 2.809	0.296 0.0351	10.20 * 0.255	8.106 0.5273	143.2 * 1.64	4.62 0.342	103.8 1.30
100	0	5	Mean 3.32 S.D. 0.084	0.788 0.0164	18.72 0.661	0.290 0.0071	10.98 0.130	7.302 0.2281	144.0 1.00	4.50 0.187	104.2 0.45
	500	5	Mean 3.20 * S.D. 0.071	0.838 * 0.0217	17.70 1.463	0.306 0.0152	11.02 0.084	7.354 0.2077	143.8 0.84	4.30 0.158	103.2 0.84
	800	5	Mean 3.16 ** S.D. 0.055	0.838 * 0.0303	20.14 2.903	0.314 * 0.0152	10.70 ** 0.122	7.770 0.7895	142.6 1.82	4.34 0.270	102.8 2.68

Significantly deferent from APAP 0 mg/kg group \* p &lt; 0.05, \*\* p &lt; 0.01 (Dunnnett's test)

Table 3 Pathological and urinary data of combined administration of CPIB and APAP in the rat

CPIB mg/kg	APAP mg/kg	N	Body		Liver		Kidney (left)		Kidney (right)		Urine mL
			g	g	g	g%	g	g%	g	g%	
200	0	5	Mean	221.0	10.915	4.936	0.931	0.421	0.906	0.410	10.456
			S.D.	7.1	0.694	0.197	0.060	0.018	0.060	0.028	1.172
	100	5	Mean	226.8	11.533	5.083	0.916	0.404	0.923	0.407	12.272
			S.D.	7.3	0.477	0.072	0.043	0.016	0.048	0.022	1.622
	500	5	Mean	203.5 **	9.257 **	4.550 *	0.886	0.435	0.862	0.423	12.504
			S.D.	8.5	0.700	0.290	0.053	0.014	0.039	0.011	0.939
	800	5	Mean	205.6 *	9.442 **	4.592 *	0.898	0.437	0.911	0.443	14.584 **
			S.D.	9.4	0.475	0.053	0.065	0.019	0.060	0.021	1.562

Significantly deferent from APAP 0 mg/kg group \* p < 0.05, \*\* p < 0.01 (Dunnnett's test)

Table 4 Serum chemistry data of combined administration of CPIB and APAP in the rat

CPIB mg/kg	APAP mg/kg	N	AST U/L	ALT U/L	ALP U/L	T.BIL mg/dL	T.CHO mg/dL	TG mg/dL	GLU mg/dL	T.PRO g/dL	ALB g/dL
200	0	5	Mean 129.2	50.4	1407.4	0.000	32.4	16.8	165.8	5.66	2.96
			S.D. 30.14	6.07	103.36	0.0000	2.41	4.38	7.46	0.055	0.055
	100	5	Mean 101.8	45.2	1446.8	0.000	36.2	18.0	167.6	5.66	2.94
			S.D. 6.53	8.23	123.96	0.0000	3.49	6.28	3.21	0.114	0.055
	500	5	Mean 128.8	57.8	1153.6 **	0.008	39.2 *	33.8 **	165.8	5.56	2.9
			S.D. 42.89	15.74	73.29	0.0084	3.03	6.98	9.20	0.195	0.071
	800	5	Mean 111.0	50.4	1112.4 **	0.024 **	45.8 **	27.2 *	171.4	5.60	2.9
			S.D. 7.52	8.68	95.87	0.0055	4.09	2.86	4.98	0.187	0.100

Significantly deferent from APAP 0 mg/kg group \* p < 0.05, \*\* p < 0.01 (Dunnnett's test)

Table 4 (Continued)

CPIB mg/kg	APAP mg/kg	N	GLB g/dL	A/G	UN mg/dL	CRE mg/dL	Ca mg/dL	IP mg/dL	Na mEq/L	K mEq/L	Cl mEq/L
200	0	5	Mean 2.700	1.098	16.56	0.288	10.3	6.754	145.2	4.82	105.2
			S.D. 0.0000	0.0192	1.060	0.0045	0.148	0.4039	0.45	0.148	0.84
	100	5	Mean 2.720	1.084	17.80	0.292	10.4	7.102	144.2	4.70	104.8
			S.D. 0.0837	0.0251	1.755	0.0110	0.182	0.2553	1.48	0.122	1.30
	500	5	Mean 2.660	1.082	18.94	0.258 **	10.0	7.524 *	144.4	4.60	104.0
			S.D. 0.1949	0.0804	1.841	0.0084	0.130	0.6137	0.89	0.255	1.58
	800	5	Mean 2.680	1.088	20.52 **	0.252 **	10.1	7.800 **	144.0	4.78	103.8
			S.D. 0.1095	0.0286	1.813	0.0110	0.217	0.4664	1.22	0.327	1.30

Significantly deferent from APAP 0 mg/kg group \* p < 0.05, \*\* p < 0.01 (Dunnnett's test)

Table 5 Pathological and urinary data of combined administration of BSO and APAP in the rat

BSO mM	APAP mg/kg	N	Body g	Liver		Kidney (left)		Kidney (right)		Urine mL	
				g	g%	g	g%	g	g%		
0	0	5	Mean	202.9	6.499	3.202	0.778	0.384	0.760	0.375	12.648
			S.D.	5.1	0.333	0.126	0.018	0.012	0.022	0.012	0.012
20	500	5	Mean	191.4 *	6.032	3.149	0.753	0.394	0.711 *	0.372	14.906
			S.D.	6.5	0.449	0.170	0.071	0.038	0.039	0.022	0.022
500	0	5	Mean	190.1	5.907	3.107	0.725	0.381	0.694	0.365	9.632
			S.D.	3.4	0.190	0.081	0.027	0.010	0.008	0.005	0.005
500	500	5	Mean	173.9 ##	6.834 **	3.936 ##	0.760	0.437 **	0.737 #	0.425 ##	14.236 ##
			S.D.	8.0	0.229	0.204	0.027	0.015	0.029	0.027	0.027

Significantly different from APAP 0 mg/kg group \*P<0.05, \*\* P<0.01 (Student's t test)

Significantly different from APAP 0 mg/kg group #P<0.05, ##P<0.01 (Welch's test)