

201207003A・B

厚生労働科学研究費補助金  
創薬基盤推進研究事業

大規模生体内分子測定による  
薬物誘発性肝障害バイオマーカーの探索研究

平成 20 年度～平成 24 年度  
総合・総括研究報告書

研究代表者 曾我 朋義

平成 25 年 4 月

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

大規模生体内分子測定による

薬物誘発性肝障害バイオマーカーの探索研究

平成 20 年度～平成 24 年度

総合研究報告書

研究代表者 曾我 朋義

平成 25 年 4 月

## 目 次

I. 総合研究報告書 大規模生体内分子測定による 薬物誘発性肝障害バイオマーカーの探索研究 . . . . .	1
II. 平成20年度総括研究報告書 . . . . .	105
III. 平成21年度総括研究報告書 . . . . .	115
IV. 平成22年度総括研究報告書 . . . . .	137
V. 平成23年度総括研究報告書 . . . . .	155
VI. 平成24年度総括研究報告書 . . . . .	173
VII. 研究成果の刊行に関する一覧表 . . . . .	227
VIII. 研究成果の刊行物・別刷	

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

大規模生体内分子測定による

薬物誘発性肝障害バイオマーカーの探索研究

平成 24 年度

総括研究報告書

研究代表者 曾我 朋義

分担研究者 本間 雅

分担研究者 大畠 武二

分担研究者 奈良岡 準

分担研究者 竹内健一郎

分担研究者 大村 功

分担研究者 鈴木 謙一

平成 25 年 4 月

# 目 次

I. 総括研究報告書	
大規模生体内分子測定による	
薬物誘発性肝障害バイオマーカーの探索研究 . . . . .	173
II. 研究成果の刊行に関する一覧表 . . . . .	231
III. 研究成果の刊行物・別刷	

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）  
総括研究報告書

大規模生体内分子測定による薬物誘発性肝障害バイオマーカーの探索研究

研究代表者：

○曾我 朋義（慶應義塾大学先端生命科学研究所・教授）

研究分担者：

○本間 雅（東京大学医学部附属病院・助教）

○大畠 武二（アステラス製薬（株）安全性研究所・室長）

○奈良岡 準（アステラス製薬（株）安全性研究所・主管研究員）

○竹内健一郎（アステラス製薬（株）安全性研究所・主任研究員）

○大村 功（アステラス製薬（株）安全性研究所・主任研究員）

○鈴木 謙一（アステラス製薬（株）安全性研究所・主管研究員）

研究要旨

一般に薬物誘発性毒性は肝障害として現れる例が多いが、薬物性肝障害に共通する特徴的な所見は必ずしも無く、現状では確定診断は困難である。また、糖尿病治療薬トログリタゾンのように投与中止後も症状が悪化する例も報告されており、薬物性肝障害の確定診断を可能にする所見の発見は急務である。本研究は、最新の測定技術を用いて生体内の内因性分子を大規模に測定し、薬物性肝障害の早期かつ正確な診断マーカーの開発を目指すものである。

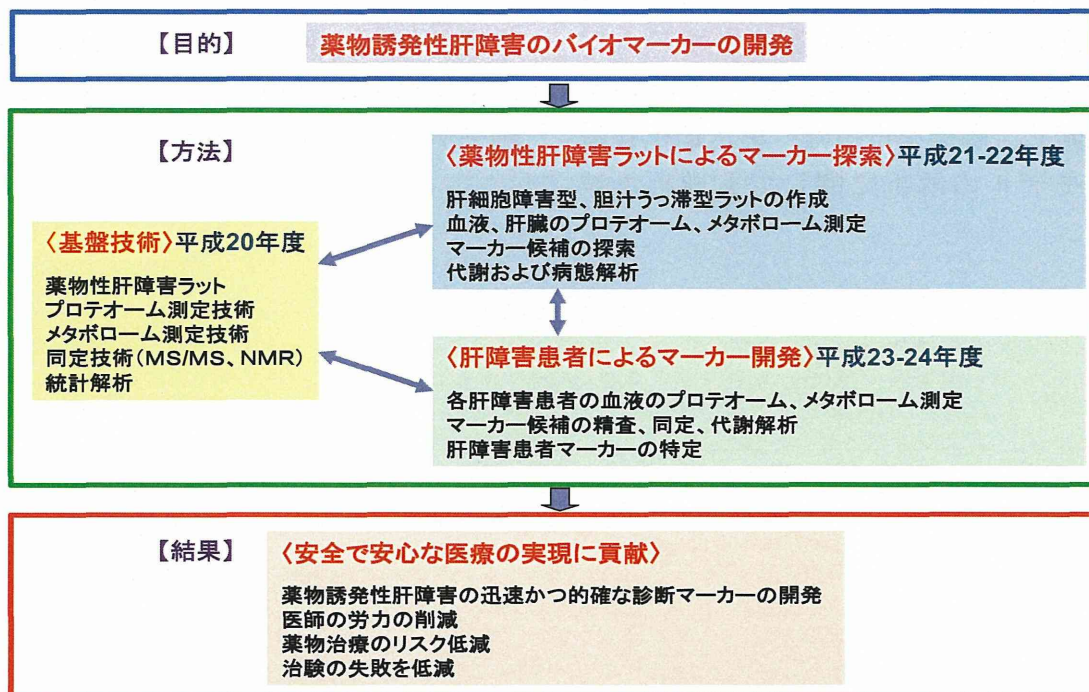
平成 20 年度は、低用量リポポリサッカライドの前感作を行うことで、薬物性肝障害モデル動物を作成する手法を確立した。また、各種肝障害患者の検体集積システムを構築し、大規模メタボローム解析の準備も進めた。平成 21 年度は、モデル動物の解析より見出されたバイオマーカー候補物質に関して、ヒト臨床検体を用いて検証を行い、 $\gamma$ -Glu-X ジペプチドが肝障害患者において高値を示すバイオマーカーとして見出され、肝臓内グルタチオン・レベルの低下が、肝障害発症に関連する重要なメカニズムの一つとなっている可能性が示唆された。平成 22 年度は、薬物性肝障害の発症メカニズムにフォーカスした検討を進め、薬物性肝障害の発症過程には、肝臓への酸化ストレスと血中の炎症性サイトカイン・レベルの上昇が大きく関与していることが明らかとなった。平成 23 年度はさらに大規模なカルテ調査も含めて解析を進めた結果、何らかの理由で酸化ストレスおよび炎症が背景因子としてある患者は、その後薬物性肝障害を発症するリスクが高いことが示唆された。また、 $\gamma$ -Glu-X ジペプチド類は C 型肝炎の治療に伴って低下する傾向がある事も見出され、一部の肝疾患に関しては治療効果を反映するバイオマーカーとしても利用可能である可能性が示唆された。最終年度である平成 24 年度は、薬物性肝障害の発症リスクを評価するための、臨床において適用可能な手法の確立を目指して検討を進め CRP 値を含む複数の臨検値を用いてリスク評価手法を構築した。

## A. 研究目的

全米の統計では、薬物の有害作用による死亡者は年間 10 万人超と、死因の第 4 位を占めており、医療上のみならず、医療経済学的にも大きな問題となっている。一般に薬物誘発性毒性は肝障害として現れる例が多く、東京大学医学部附属病院においても、薬物性肝障害発症患者は、年間約 100 名程度と見積もられている。厚生労働省が「重篤副作用疾患別対応マニュアル薬物性肝障害」で注意喚起しているように、薬物性肝障害は発症の予測が困難である上に、重篤化して死に至るケースもあり得る重要な薬物有害作用であるため、これを早期に発見し、重症化を予測可能な診断法の開発が強く望まれている。しかしながら、この疾患に対する正確で迅速な診断法は未だ充分には確立されておらず、実臨床で薬物性肝障害が疑われる症例では、従来から用いられている肝機能検査値の他、薬物投与から発症までの期間や、飲酒などの危険因子を考慮したスコアリングにより、薬物性肝障害の診断を行うが、薬物性肝障害に共通する特徴的な所見は必ずしも無く、現状では確定診断は困難である。このため薬物以外の原因を検討した上で消去法的に、「薬物誘発性の肝障害が強く

疑われる」という形で診断されるのが通例である。また、この段階で、疑わしい薬物の投与を中止し経過を観察するのが一般的であり、多くのケースでは症状は軽快に向かうが、中には糖尿病治療薬トログリタゾン（現在は市場撤退）のように投与中止後も症状が悪化する例も報告されており、薬物性肝障害の確定診断を可能にする所見の発見は急務である。また、現在の検査値は肝細胞壊死後に上昇する酵素群であるため、肝細胞壊死前の早期判断は不可能という問題点もある。

本研究では、肝細胞障害型および胆汁うっ滞型の肝障害を誘発するモデル動物をそれぞれ構築するとともに、実臨床で使用される薬物による肝障害を再現する動物モデルの作成を試みる。また、これらの肝障害モデルおよびコントロール動物の肝臓と血清の生体内分子（代謝物、ペプチド、タンパク質）を網羅的に測定し、肝細胞障害型、胆汁うっ滞型の薬物性肝障害のみに検出される薬物性肝障害マーカーを探索する。さらに薬物性肝障害およびウイルス性肝炎の患者および健常人の血液を測定し、肝細胞障害型あるいは胆汁うっ滞型薬物性肝障害を反映し、実臨床において有用な薬物性肝障害マーカーを開発する（図）。



このようなオミクス技術を駆使した大規模なマーカー探索は前例を見ないものであり、薬物性肝障害に特異的なマーカーが発見されれば世界で初めての事例となる。さらに、動物モデルと臨床研究試料の解析結果の比較、および動物モデルでの更なる検討等により、当該バイオマーカーの変動の分子メカニズムの解明も目指しており、これらの研究を通して創薬段階において、肝障害を誘発する薬剤の早期発見への道を拓き、また臨床においても、薬物治療のリスクが把握し、投与量や薬剤の変更など治療上取れるオプションを広げることが可能となり、安全で安心な医療の実現に大きく貢献すると考えている。

研究初年度である平成 20 年度は、

薬物誘発性肝障害モデルの作製を中心に検討を行い、また臨床検体の収集システムの構築も併せて行った。平成 21 年度は、肝障害モデル動物の解析より見出されていたバイオマーカー候補物質に関して、ヒト臨床検体を用いて検証を行い、 $\gamma$ -Glu-X ペプチドがバイオマーカー候補として見出された。平成 22 年度は、より大規模な臨床検体を用いた検証と、薬物性肝障害発症機序の解明を目指した検討を行い、背景疾患としての炎症と酸化ストレスの存在が、薬物性肝障害の発症リスクを高める可能性が示唆された。平成 23 年度は、これまでの研究で見出された肝障害バイオマーカーが、肝疾患の治療に伴ってどのように変動するかを解析した。また、アセトアミノフェンのように反応性代謝物を生じ



て肝臓内のグルタチオンを消費するメカニズムとは異なるメカニズムで肝臓に酸化ストレスをかける薬物を探索し、解析を行った。また消化管障害モデルの解析に関しても進めた結

果、複数のバイオマーカー候補物質も見出された。平成 24 年度は臨床において使用可能な DILI 発症リスクの評価モデルの構築を行った。

## B. 研究方法

### 1. 薬物性肝障害の発症予測に繋げるための大規模データベースの構築

薬物性肝障害の発症を事前に予測可能であるかを検証するため、東大病院に入院している患者を対象として、大規模なカルテ調査を行い、データベースの構築を行った。

#### ○調査対象期間

- ・モデル構築セット

DILI の発症リスクを評価するモデルを構築するため、2010年10月の1ヶ月間の東大病院への入院患者を対象にした予検討に基づき、DILI 発症患者数が100名を超えるように、2010年11月～2011年12月までの13か月間の東大病院の入院患者を対象とした。

- ・バリデーションセット

構築したモデルの妥当性を検証するため、2012年4月～2012年7月までの4ヶ月間の東大病院の入院患者を対象として選択した。

#### ○入院日数

検査目的の入院患者や重症疾患による長期入院患者を除外するため、入院日数が14日～100日の全患者を対象とした。

#### ○DILI 発症患者の判定

肝機能を反映する臨床検査値であるALTまたはALP値に関して、CTCAE v4.0に基づくGrade 2（中等症）以上

の検査値異常に該当する患者のうち、以下のいずれかの条件を満たす患者をDILI 発症患者と判定した。

(1) カルテ上の記載中に、肝機能検査値異常を示す原因として、以下に挙げるような他の疾患の可能性が除外でき、薬物服用による影響が疑われると主治医が判断している場合

- ・肝炎ウイルスへの感染
- ・肝臓の器質的病変（肝硬変、肝不全、肝癌、胆道狭窄など）による影響
- ・肝切除や肝動脈塞栓術などの、肝臓に侵襲性のある手術に伴う反応
- ・胆石の落下に伴う一過性の上昇
- ・栄養剤の投与に伴う一過性の上昇
- ・骨病変に伴うALPの上昇

(2) カルテ上に特記されていないが、ALTまたはALP値の時間推移と、服薬履歴を照合した際に、服用開始後に肝機能検査値が上昇し、その薬物の休止に伴って肝機能検査値の回復が認められる場合

また、(1)あるいは(2)の基準に合致するDILI 発症患者に関しては、服用期間と肝機能検査値の上昇および低下のタイミングが一致する薬物をDILI 発症の起因薬と考えて服薬歴より抽出を行った。さらに、DILI 発症の起因となっている薬物が抗がん剤などの明確な細胞毒性を有することが既知の薬物である場合を中毒性のDILI 症例、それら以外の薬剤である場合を特異体質性のDILI 症例と定義

した。本解析には、特異体質性の DILI を発症した症例のみを解析の対象とした。

○解析対象から除外した患者

以下の (1) ~ (3) のいずれかを満たす症例は解析対象から除外した。

(1) DILI 発症の有無を精査した患者の中で、カルテ上の記載だけでは判断がつかず、さらに上述した“DILI 発症患者の判定”の項目における DILI 発症の判断基準 (2) を満たすような薬物が同定できない場合

(2) DILI 発症の有無を精査した結果、DILI を発症した症例であると判定されたが、起因薬の服用開始時点が入院前であり、服用開始時点における臨床検査値の値を収集できず、解析に

用いることができないと判断した場合

(3) プライバシー保護の関係からカルテ情報へのアクセスに制限がかかっており、患者情報が収集できない場合

○臨床検査値

血清検査および血液検査として日常診療において測定される臨床検査値の中で、2010年10月の1ヶ月間の入院患者を対象とした予検討において、患者全体の全測定時点のうち9割以上で測定されていることが確認された以下の15種類を採用した。

略語標記	臨床検査値	反映する病態
Alb	アルブミン	肝機能低下、栄養不良など
BUN	尿素窒素	腎機能低下など
Cl	クロール	電解質異常など
Cre	クレアチニン	腎機能低下など
CRP	C 反応性タンパク質	炎症反応など
Hb	ヘモグロビン	貧血・多血症など
Hct	ヘマトクリット値	貧血・多血症など

K	カリウム	電解質異常など
LDH	乳酸脱水素酵素	組織障害など
Na	ナトリウム	電解質異常など
PCT	血小板クリット値	骨髄疾患、肝硬変など
PDW	血小板分布幅	骨髄疾患など
PLT	血小板数	骨髄疾患、肝硬変など
RBC	赤血球数	貧血・多血症など
WBC	白血球数	炎症反応、白血病など

## 2. 薬物性肝障害の劇症化頻度に関する調査

日米欧それぞれの地域における DILI および薬物性の劇症肝炎の報告を収集した。なお、抗がん剤に関しては、中毒性機序の肝毒性発現を示す薬物が多いと考えたため、解析対象から除外した。参照した各医薬品規制当局の副作用報告データベースおよび期間は以下の通り。

日本：医薬品医療機器総合機構 (PMDA, 2000年1月～2010年8月)

米国：アメリカ食品医薬品局 (FDA, 2004年1月～2011年6月)

欧州：欧州医薬品庁 (EMA, 2001年12月～2012年5月)

「DILIは起因薬に依らず一定の頻度で劇症化する」という仮説を検証する

ためには、すべての薬物に関して DILI が劇症化する頻度を推定する必要がある。そのため、薬物ごとの劇症化頻度の推定法として、多変量の推定に優れたギブスサンプリングを用いたベイズ推定を試みた。なお、統計解析ソフトは R 2.14.1 および WinBUGS 1.4 を用いた。

### ○統計モデル

薬物ごとに、報告された DILI 症例数を  $x_i$ 、劇症肝炎症例数を  $y_i$  ( $i = 1, 2, \dots, n$ ; 薬物番号) と表記したとき、以下の統計モデルに従って解析を行った。

$$y_i = x_i \times r_i \times \beta$$

このとき、 $\beta$ は全薬物の劇症化頻度の平均値、 $r_i$ は薬物ごとの劇症化頻度を

全体の平均値 $\beta$ で規格化した値として表される。 $r_i$ が平均1の対数正規分布に従うものと仮定して推定を行った結果、 $r_i$ の99%ベイズ信頼区間(以下、99% CI)が1を含む場合に、その薬物は検証したい仮説に従うものとみなした。

この解析をPMDA、FDA、EMAの各副作用症例報告データベースに対して行い、それぞれの薬物が仮説に従うか否かを調査した。

#### ○構築した統計モデルの理論

本解析は、各医薬品規制当局に対して報告された副作用症例数に基づいて行っている。しかしながら、基本的に副作用報告は自発報告に従うため、一定の確率で報告漏れが生じてしまう点、また服薬を継続すれば劇症化してしまったはずの症例でも、起因薬剤の休薬等の治療介入を行ったために、発症までには至らなかった症例も存在する可能性が想定される点を考えると、報告された症例数は実際に発症すると想定される症例数よりも少ないものと思われる。

ここで、実際に発症すると想定されるDILIおよび劇症肝炎症例数をそれぞれ $X_i, Y_i$ としたとき、 $X_i$ と $Y_i$ の間には、薬物に依らず一定の劇症化頻度 $B$ を仮定するとき、検証したい仮説が正しければ、

$$Y_i = X_i \times B$$

という関係式が成立する。このとき、

治療介入の影響を考慮しない場合に対する、影響を考慮した場合に報告されるDILIおよび劇症肝炎症例数の変化率を $a_{X_i}, a_{Y_i}$ とし、さらに実際に発症したDILIおよび劇症肝炎症例のうち、当局に報告される頻度を $b_{X_i}, b_{Y_i}$ としたとき、

$$Y_i \times a_{Y_i} \times b_{Y_i} = X_i \times a_{X_i} \times b_{X_i} \times \frac{a_{Y_i} \times b_{Y_i}}{a_{X_i} \times b_{X_i}} \times B$$

という関係式で表される。ここで、当局に報告されたDILIおよび劇症肝炎症例数である $x_i, y_i$ はそれぞれ $x_i = X_i \times a_{X_i} \times b_{X_i}$ 、 $y_i = Y_i \times a_{Y_i} \times b_{Y_i}$ として表すことができるため、上記の式は、

$$y_i = x_i \times \frac{a_{Y_i} \times b_{Y_i}}{a_{X_i} \times b_{X_i}} \times B$$

となる。薬物ごとに異なる変数である $a_{X_i}, a_{Y_i}, b_{X_i}, b_{Y_i}$ をそれぞれ分離して推定することは不可能であるため、これらの変数を

$$R_i = (a_{Y_i} \times b_{Y_i}) / (a_{X_i} \times b_{X_i})$$

なるパラメーター $R_i$ を用いてまとめると、

$$y_i = x_i \times R_i \times B$$

となる。さらに、薬物ごとの変数である $R_i$ の平均値 $\bar{R}$ を用いて変形すると、

$$y_i = x_i \times \frac{R_i \times B}{\bar{R} \times B} \times (\bar{R} \times B)$$

このとき、 $\bar{R} \times B$ はそれぞれの薬物に関して報告された症例数に基づき算出した、見かけの劇症化頻度の平均と

して表され、これが $\beta$ にあたる。また、 $R_i \times B$  は、薬物ごとに算出された劇症化頻度であり、これを全体の平均値 $\beta$ で規格化した値が $r_i$ にあたる。これらを考慮して、

$$y_i = x_i \times r_i \times \beta$$

という統計モデルを構築した。

#### ○ギブスサンプリングの解析手順

以下に、ギブスサンプリングの手順を示す。なお、本解析で用いた DILI および劇症肝炎報告数のデータを、観測データ  $\mathbf{Y}$  として表すこととする。

(1) 最初に何らかの $\{\beta, r_1, r_2, \dots, r_N\}$ の初期値を設定しておく。

(2)  $r_1, r_2, \dots, r_N$ を固定したとき、 $\beta$ を動かす、確率分布 $p(\beta|\mathbf{Y}, r_1, r_2, \dots, r_N)$ に従う乱数を一つ発生させて、それを新しい $\beta$ とする。

(3)  $\beta$ および $r_2, \dots, r_N$ を固定したとき、 $r_1$ を動かす、確率分布 $p(r_1|\mathbf{Y}, \beta, r_2, \dots, r_N)$ に従う乱数を一つ発生させて、それを新しい $r_1$ とする。次に、 $r_2$ 以外のパラメーターを固定したとき、 $p(r_2|\mathbf{Y}, \beta, r_1, r_3, \dots, r_N)$ に従う乱数を一つ発生させて、それを新しい $r_2$ とする。この操作を $r_N$ まで繰り返す。

(4) (2) ~ (3) の過程を 1 ステップとし、得られた $\{\beta, r_1, r_2, \dots, r_N\}$ の値を記録する。

(5) 十分な個数の $\{\beta, r_1, r_2, \dots, r_N\}$ のサンプルが得られるまで、(2) ~ (4)

を繰り返す。

#### ○解析条件

ギブスサンプリングの試行回数を 51,000 ステップとし、また初期値の影響を取り除くために、はじめの 1,000 ステップの結果を排除した。さらに、データ処理の効率を向上させるために、1,001 から 51,000 ステップまでの 50,000 ステップのうち、50 ステップおきにサンプリング結果を記録して、1,000 個のサンプルを得た。ここまでの試行を 3 回反復した。反復ごとのサンプルをサンプル列と呼ぶとき、1,000 個 $\times$ 3 本のサンプル列をもとにして解析を行った。

#### ○パラメーターの収束診断

各パラメーターの収束診断は、 $\hat{R}$  指数を使用した。 $\hat{R}$  指数は、3 本のサンプル列を比較して評価される指標であり、

$$\hat{R} = \sqrt{\left(\frac{n-1}{n}W + \frac{1}{n}B\right)/W}$$

と定義される。 $n$ はサンプル列の長さ、 $W$ はサンプル列内の分散、 $B$ はサンプル列間の分散である。この $\hat{R}$ 指数が 1.0 に近ければ、サンプル列間よりもサンプル列内のバラつきが大きくなると推測され、パラメーターは収束しているとみなす。本検証では $\hat{R} \leq 1.1$ となる時に、パラメーターは収束しているとみなした。

### 3. 消化管障害バイオマーカーの検討

#### 実験—1

代表的な NSAIDs であるアスピリン及びイブプロフェンをラットに単回経口投与して、胃潰瘍を惹起させ、その程度を経時的に調べるとともに、その動物から採取した胃の抽出物及び血中の内因性代謝物がどの様に変化するかを調べた。胃潰瘍が惹起された動物と胃潰瘍が惹起されなかった動物との間で内因性代謝物の臓器内濃度が異なるか否かを検討し、胃潰瘍が惹起された動物で特異的に変化した代謝物を胃潰瘍のバイオマーカー候補とした。さらに抽出されたバイオマーカー候補が血中でも同様に変化するか否かを確認して、臓器内での変化が血中においても確認できるような代謝物をバイオマーカー候補とした。

#### ○動物実験

アスピリンはナカライテスク株式会社からイブプロフェンは和光純薬工業株式会社から購入した。

日本チャールスリバー株式会社から CD(SD)系のラットを 110 匹購入した。馴化期間に異常を示さなかった 100 匹を選択し、アスピリンの 3 及び 300 mg/kg、イブプロフェンの 8 及び 800 mg/kg を 0.5 w/v% メチルセルロース (MC) 溶液に懸濁して各群雄 20 匹のラットに単回経口投与した。投与後 1、2、5、8、24 時間に各 4 匹ずつ体重を測定後、ペントバルビタールナトリウム水溶液 (6.48 mg/mL、5 mL/kg) の腹腔内投与により麻酔を行い、血液

を採取した後、放血安楽死させ、胃を摘出した。胃を大弯に沿って切開後、肉眼的に観察し、胃内部の写真撮影を行った。胃及び血液はその後 CE-MS を用いた内因性代謝物の濃度測定に供した。また、剖検時に撮影した写真から画像解析ソフトを用いて胃潰瘍面積を測定した。これと同時に、対照群として媒体として利用した 0.5 w/v% MC 溶液を被験物質群と同様の方法で雄 20 匹に投与し、投与群と同時に処理して投与による変化を調べた。

○サンプルの前処理及び CE-MS の測定剖検及び胃潰瘍面積の結果、代表的なデータとなりうると判断した 1 時間、5 時間及び 24 時間の胃及び血液について CE-MS を用いて臓器内及び血中の低分子代謝物の濃度を測定した。サンプルの前処理及び測定は以下の通りに行った。

#### サンプルの前処理、測定 (胃)

Methionine sulfone、MES (2-(n-morpholino)-ethanesulfonic acid) および CSA (D-Camphol-10-sulfonic acid) を各 20  $\mu$ M となるように調製した MeOH 溶液 1mL に採取した胃を加えホモジネートした。さらに  $\text{CHCl}_3$  500  $\mu$ L、MilliQ 水 200  $\mu$ L を加えて攪拌し、4  $^\circ\text{C}$ 、4600  $\times$ g で 20 分間遠心分離した。上層の水-MeOH 層より取れる限りの量を限外ろ過フィルター (分画分子量 5000 Da) にとり 4  $^\circ\text{C}$ 、9100  $\times$ g で 12 時間遠心分離し、ろ液を遠心濃縮したものをサ

ンプルとした。測定前に CE-MS の移動時間補正用の 3-Aminopyrrolidine、Trimesate 各 200  $\mu\text{M}$  水溶液 50  $\mu\text{L}$  で溶解し、CE-TOFMS で測定した。

#### サンプルの前処理、測定（血清）

Methionine sulfone、MES および CSA (D-Camphol-10-sulfonic acid) を各 20  $\mu\text{M}$  となるように調製した MeOH 溶液 450  $\mu\text{L}$  に血清 50  $\mu\text{L}$  を加え攪拌した。さらに  $\text{CHCl}_3$  500  $\mu\text{L}$ 、MilliQ 水 200  $\mu\text{L}$  を加えて攪拌し、4  $^\circ\text{C}$ 、4600  $\times g$  で 8 分間遠心分離した。上層の水-MeOH 層より取れる限りの量を限外ろ過フィルター（分画分子量 5000 Da）にとり 4  $^\circ\text{C}$ 、9100  $\times g$  で 3 時間遠心分離し、ろ液を遠心濃縮したものをサンプルとした。測定前に、3-Aminopyrrolidine、Trimesate 各 200  $\mu\text{M}$  水溶液 25  $\mu\text{L}$  で溶解し、CE-TOFMS で測定した。

#### サンプルの同定

代謝物質標準液 (STD) は表 1 の濃度に調整し、各測定条件の最初に対応する STD を測定した後、サンプルを測定した。

CE-TOFMS で検出されたピークは、自動積分ソフトウェアの MasterHands（慶應義塾大学開発）を用いて自動抽出し、ピーク情報として質量電荷比 ( $m/z$ )、泳動時間 (Migration time: MT) とピーク面積値を得た。

検出されたピークに対して  $m/z$  と MT の値をもとに代謝物質ライブラリに登録された全物質との照合、検索を行

った。検索のための許容誤差は MT で  $\pm 0.5$  min、 $m/z$  では  $\pm 10$  ppm とした。血清中及び臓器中の濃度は内部標準検量法に従い算出した。

#### データの解析

胃潰瘍で特異的に変化する内因性低分子代謝物を見つけるため、胃抽出物から得られたデータについて Principal components analysis (PCA) を用いて外れ値となる動物を除去した後、Orthogonal PLS (OPLS) を用いて胃潰瘍が確認された動物で特異的に変化する内因性代謝物を抽出した。PCA 及び OPLS は SIMCA-P+ (Umetrics) を用いて行った。抽出された代謝物は群間比較を行うため、GraphPad Prism を用いて Dunnett の多重比較検定を行い、胃潰瘍が確認された動物群で有意に変化している代謝物をバイオマーカー候補とした。さらに同一代謝物の臓器内濃度と血中濃度が有意性を持って相関している事を確認するため、それぞれのマーカー候補についての各動物における臓器内濃度と血中濃度の Pearson の積率相関係数を算出し、その有意性を確認した。これらの算出及び検定は GraphPad Prism を用いて実施した。さらにマーカー候補の血中濃度は GraphPad Prism を用いて Dunnett の多重比較検定を行い、胃潰瘍が確認された動物群で有意に変化している事を確認した。

#### 実験—2

実験-1 において 2 つの NSAIDs に共



通して変動する複数のバイオマーカー候補を見出した。しかしながらこれらのバイオマーカー候補の変動機序は不明である。そこでその変動機序を見出すため胃酸の放出を抑制する事で NSAIDs による胃潰瘍の惹起を抑制する作用がある事が知られている (Takeda et al., 1982) ヒスタミン H2 受容体拮抗薬 (ファモチジン) 及びプロトンポンプインヒビター (オメプラゾール) をアスピリンの投与 30 分前に投与した場合の低分子代謝物の変化を調べた。

#### ○動物実験

アスピリンはナカライテスク株式会社からファモチジン及びオメプラゾールは和光純薬工業株式会社から購入した。

日本チャールスリバー株式会社から CD (SD) 系のラットを 20 匹購入した。馴化期間に異常を示さなかった 16 匹を選択し、4 匹にはファモチジンの 5mg/kg を、他の 4 匹にはオメプラゾールの 60mg/kg を 0.5 w/v% MC 溶液に懸濁して経口投与した。残りの 8 匹には媒体である 0.5 w/v% MC 溶液を経口投与した。これらの薬物を投与した 30 分後にファモチジンの 5mg/kg、オメプラゾールの 60mg/kg、及び 0.5 w/v% MC 溶液を投与した各 4 匹についてアスピリンの 100 mg/k を 0.5 w/v% MC 溶液に懸濁して経口投与した。0.5 w/v% MC 溶液を経口投与した動物のうち残りの 4 匹には再度 0.5 w/v% MC 溶液を経口投与し、Control 群とした。アスピ

リンの投与後 5 時間にイソフルランを吸引させて麻酔を行い、血液を採取した後、放血安楽死させ、胃を摘出した。胃を大弯に沿って切開後、肉眼的に観察し、胃内部の写真撮影を行った。胃及び血液はその後 CE-MS を用いた内因性代謝物の濃度測定に供した。

○サンプルの前処理及び CE-MS の測定  
全ての動物の胃及び血液について CE-MS を用いて臓器内及び血中の低分子代謝物の濃度を測定した。サンプルの前処理及び測定は以下の通りに行った。

#### サンプルの前処理、測定 (胃)

Methionine sulfone、MES および CSA (D-Camphol-10-sulfonic acid) を各 20  $\mu$ M となるように調製した MeOH 溶液 1mL に採取した胃を加えホモジネートした。さらに  $\text{CHCl}_3$  500  $\mu$ L、MilliQ 水 200  $\mu$ L を加えて攪拌し、4  $^{\circ}\text{C}$ 、4600  $\times g$  で 20 分間遠心分離した。上層の水-MeOH 層より取れる限りの量を限外ろ過フィルター (分画分子量 5000 Da) にとり 4  $^{\circ}\text{C}$ 、9100  $\times g$  で 12 時間遠心分離し、ろ液を遠心濃縮したものをサンプルとした。測定前に CE-MS の移動時間補正用の 3-Aminopyrrolidine、Trimesate 各 200  $\mu$ M 水溶液 50  $\mu$ L で溶解し、CE-TOFMS で測定した。

#### サンプルの前処理、測定 (血清)

Methionine sulfone、MES および CSA (D-Camphol-10-sulfonic acid) を各 20  $\mu$ M となるように調製した MeOH

溶液 450  $\mu\text{L}$  に血清 50  $\mu\text{L}$  を加え攪拌した。さらに  $\text{CHCl}_3$  500  $\mu\text{L}$ 、MilliQ 水 200  $\mu\text{L}$  を加えて攪拌し、4  $^\circ\text{C}$ 、4600  $\times g$  で 8 分間遠心分離した。上層の水-MeOH 層より取れる限りの量を限外ろ過フィルター（分画分子量 5000 Da）にとり 4  $^\circ\text{C}$ 、9100  $\times g$  で 3 時間遠心分離し、ろ液を遠心濃縮したものをサンプルとした。測定前に、3-Aminopyrrolidine、Trimesate 各 200  $\mu\text{M}$  水溶液 25  $\mu\text{L}$  で溶解し、CE-TOFMS で測定した。

#### サンプルの同定

代謝物質標準液 (STD) は表 1 の濃度に調整し、各測定条件の最初に対応する STD を測定した後、サンプルを測定した。

CE-TOFMS で検出されたピークは、自動積分ソフトウェアの MasterHands（慶應義塾大学開発）を用いて自動抽出し、ピーク情報として質量電荷比 ( $m/z$ )、泳動時間 (Migration time: MT) とピーク面積値を得た。

検出されたピークに対して  $m/z$  と MT の値をもとに代謝物質ライブラリに登録された全物質との照合、検索を行った。検索のための許容誤差は MT で  $\pm 0.5$  min、 $m/z$  では  $\pm 10$  ppm とした。血清中及び臓器中の濃度は内部標準検量法に従い、式(1)を用いて算出した。

#### データの解析

胃抽出物から得られたデータについて Principal components analysis

(PCA) を用いて外れ値となる動物を除去するとともに、全体の代謝物パターンの傾向を確認した。PCA は SIMCA-P+ (Umetrics) を用いて行った。さらに、実験-1 抽出されたマーカー候補について群間比較を行うため、GraphPad Prism を用いて Dunnett の多重比較検定を行い、ファモチジン及びオメプラゾールがアスピリンによるこれらの代謝物の変化に与える影響について検討した。さらにマーカー候補の血中濃度は GraphPad Prism を用いて Dunnett の多重比較検定を行い、ファモチジン及びオメプラゾールがアスピリンによるこれらの代謝物の血中濃度変化に与える影響についても検討した。

#### 実験—3

実験-1 において 2 つの NSAIDs に共通して変動する複数のバイオマーカー候補を見出した。また実験-2 においてヒスタミン H2 受容体拮抗薬 (ファモチジン) 及びプロトンポンプインヒビター (オメプラゾール) をアスピリンと共投与して、バイオマーカー候補の変動パターンを見る事で、それらの変動する原因をおおよそ確認する事が出来た。実験-3 では NSAIDs 以外のモデルで胃潰瘍を誘発させたモデルについてもバイオマーカー候補の変動パターンを見る事で、バイオマーカー候補の変動する原因を再確認するとともに、バイオマーカー候補がどのような目的に使えるかを明らかにする。

## ○動物実験

アスピリンはナカライテスク株式会社から購入した。

日本チャールスリバー株式会社から CD(SD)系のラットを 24 匹購入し、馴化期間に異常を示さなかった 20 匹を選択して試験に供した。これら 20 匹のうち 4 匹にアスピリンの 300 mg/kg を 0.5 w/v% MC 溶液に懸濁して単回経口投与した。また他の 4 匹にはエタノールの 5mL/kg を単回経口投与した。残りの 12 匹には媒体である 0.5 w/v% MC 溶液を経口投与した。0.5 w/v% MC 溶液を経口投与した動物のうち 4 匹は低温室(室温 4-6°C)で飼育し、ストレス負荷による胃潰瘍を惹起した。残りの 8 匹は 0.5 w/v% MC 溶液を経口投与した後室温で飼育し、この試験の Control 群とした。残りのそれぞれの投与後 5 時間にイソフルランを吸引させて麻酔を行い、血液を採取した後、放血安楽死させ、胃を摘出した。胃を大弯に沿って切開後、肉眼的に観察し、胃内部の写真撮影を行った。胃及び血液はその後 CE-MS を用いた内因性代謝物の濃度測定に供した。

○サンプルの前処理及び CE-MS の測定  
全ての動物の胃及び血液について CE-MS を用いて臓器内及び血中の低分子代謝物の濃度を測定した。サンプルの前処理及び測定は以下の通りに行った。

サンプルの前処理、測定 (胃)

Methionine sulfone、MES および

CSA(D-Camphol-10-sulfonic acid) を各 20  $\mu$ M となるように調製した MeOH 溶液 1mL に採取した胃を加えホモジネートした。さらに  $\text{CHCl}_3$  500  $\mu$ L、MilliQ 水 200  $\mu$ L を加えて攪拌し、4  $^{\circ}\text{C}$ 、4600  $\times$ g で 20 分間遠心分離した。上層の水-MeOH 層より取れる限りの量を限外ろ過フィルター (分画分子量 5000 Da) にとり 4  $^{\circ}\text{C}$ 、9100  $\times$ g で 12 時間遠心分離し、ろ液を遠心濃縮したものをサンプルとした。測定前に CE-MS の移動時間補正用の 3-Aminopyrrolidine、Trimesate 各 200  $\mu$ M 水溶液 50  $\mu$ L で溶解し、CE-TOFMS で測定した。

サンプルの前処理、測定 (血清)

Methionine sulfone、MES および CSA(D-Camphol-10-sulfonic acid) を各 20  $\mu$ M となるように調製した MeOH 溶液 450  $\mu$ L に血清 50  $\mu$ L を加え攪拌した。さらに  $\text{CHCl}_3$  500  $\mu$ L、MilliQ 水 200  $\mu$ L を加えて攪拌し、4  $^{\circ}\text{C}$ 、4600  $\times$ g で 8 分間遠心分離した。上層の水-MeOH 層より取れる限りの量を限外ろ過フィルター (分画分子量 5000 Da) にとり 4  $^{\circ}\text{C}$ 、9100  $\times$ g で 3 時間遠心分離し、ろ液を遠心濃縮したものをサンプルとした。測定前に、3-Aminopyrrolidine、Trimesate 各 200  $\mu$ M 水溶液 25  $\mu$ L で溶解し、CE-TOFMS で測定した。

サンプルの同定

代謝物質標準液(STD)は表 1 の濃度に調整し、各測定条件の最初に対応する STD を測定した後、サンプルを測定し

た。

CE-TOFMS で検出されたピークは、自動積分ソフトウェアの MasterHands (慶應義塾大学開発) を用いて自動抽出し、ピーク情報として質量電荷比 ( $m/z$ )、泳動時間 (Migration time: MT) とピーク面積値を得た。

検出されたピークに対して  $m/z$  と MT の値をもとに代謝物質ライブラリに登録された全物質との照合、検索を行った。検索のための許容誤差は MT で  $\pm 0.5$  min、 $m/z$  では  $\pm 10$  ppm とした。血清中及び臓器中の濃度は内部標準検量法に従い、式(1)を用いて算出した。

#### データの解析

胃抽出物から得られたデータについて Principal components analysis (PCA) を用いて外れ値となる動物を除去するとともに、全体の代謝物パターンの傾向を確認した。PCA は SIMCA-P+ (Umetrics) を用いて行った。さらに、実験-1 抽出されたマーカー候補について群間比較を行うため、GraphPad Prism を用いて Dunnett の多重比較検定を行い、各モデルにおけるこれらの代謝物の変化を検討した。さらにマーカー候補の血中濃度は GraphPad Prism を用いて Dunnett の他群比較検定を行い、各モデルにおけるバイオマーカー候補の変化を検討した。

#### (研究の倫理的側面への配慮)

本研究には、ラットあるいはマウスを用いた動物実験が含まれる。動物実

験に関しては、東京大学においては、研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針(平成18年6月1日 文部科学省告示第71号)を遵守した上で、東京大学医学部動物実験委員会によりプロトコルの承認を受けたのち、東京大学医学部動物実験指針に従い、実験を行っている。また、アステラス製薬(株)安全性研究所においては、厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針(平成18年6月厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知)を遵守した上で、当該施設の規程に従い、実験を行っている。

また本研究には、ヒト臨床研究も含まれる。ヒトにおける臨床研究については、疫学研究に関する倫理指針(平成16年文部科学省・厚生労働省告示第2号)、臨床研究に関する倫理指針(平成16年厚生労働省告示第459号)を遵守した上で、東京大学医学部倫理委員会およびアステラス製薬ヒト組織研究倫理審査委員会による承認を得た後、下記の倫理的配慮(a, b)を適切に行い、研究を進めている。

a) 試料は匿名化し、個人情報個人が特定できる形で研究機関の外部に持ち出すことを禁止する。

b) 文書にて研究の目的および方法を十分に説明して了解を得た後、提供者の自由意思に基づき書面によるインフォームド・コンセントを得て試料の提供を受ける。