

よりグラジエント。

3) データ解析ソフトウェアによるノンラベル定量解析

LTQ·Orbitrap による質量分析データ (RAW 形式) は、基本的に付属のソフトウェアである Xcalibur を用いて解析し、LTQ·Orbitrap の場合には、FT-MS 測定と MS/MS 測定が同時に行うため、基本的にデータ依存的 MS/MS 測定を同時に行った。また、定量比較のための解析ソフトウェアとして “Progenesis LC-MS” (Nonlinear Dynamics) を採用し、比較プロテオーム解析に利用した。

本ソフトウェアは、二次元電気泳動のゲルスポットの定量比較のために開発されたソフトウェアを基本とし、LC-MS 用に開発されたものである。LTQ·Orbitrap からの生データである Raw 形式のファイルを直接読み込むことができ、TPP と同様に 3D グラフ化が可能である。この画像化されたデータを元に、異なるサンプル間のリテンションタイムの補正を行うことにより、ペプチドスポットのマッチングを行い、複数のサンプル間の定量比較および、統計解析を行うことが可能である (図 1)。また、MS/MS データを含む複数の Raw データを統合して MASCOT 検索を行う機能もあり、同定結果を取り込んで、タンパクレベルでの解析を行うこともできる。

4) データベース検索によるタンパク質の同定

MS/MS 測定から得られたフラグメントイオンパターンより、ペプチドマスフィンガープリンティング法によるタンパク質の同定を行うための解析ソフトである MASCOT(Matrix Science)を用いて、SwissProt プロテインデータベースを検索した。MASCOT の検索パラメーターとしては LTQ 用のデフォルト値を用い、固定修飾としてシステインのカルバミドメチル化を、可変修飾として、メチオニンの酸化、およびセリン、スレオニン、チロシンのリン酸化を設定した。同定の信頼性には、MASCOT のデフォルト値である、 $p < 0.05$ を用い、切断ミス許容数 1 にて検索を行った。

5) ラット尿サンプルの採取

メタボローム解析用の採血のためのラットを絶食期間中代謝ゲージにて飼育し、尿サンプルを採取した。基礎的データを得るために設けたラットの群に関しては、以下の通りである。

Group No.	Sex	Age	Fasting duration	Blood collection	Animal code
1	Male	10 w	16 h	Morning	M1 to M10
2	Male	10 w	0 h	Morning	M11 to M20
3	Female	10 w	16 h	Morning	F21 to F30
4*	Male	30 w	16 h	Morning	M31 to M40
5*	Female	30 w	16 h	Morning	F41 to F50
6	Male	10 w	22 h	Morning	M51 to M60
7	Male	10 w	22 h	Afternoon	M61 to M70

* Samples yet to be collected

(倫理面での配慮)

動物実験の実施に際しては、「動物の愛護及び管理に関する法律」「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」等の関連規定に則った、本研究所の「動物実験の適正な実施に関する規定」を遵守し、研究実施の承認を得て行った。その際には、可能な限り、苦痛の軽減等に努めた。

C. 研究結果：

①ラット尿中プロテオーム解析の高感度化に向けた試料前処理方法と LC-MS/MS 測定条件の最適化および定量的解析法の確立

1) 標準的解析法による予備試験

ラット尿プロテオームの概略を把握する上で、まず標準的な解析法であるアセトン 80%、 -20°C 、1 時間処理によるタンパク質の沈殿を行い、通常のトリプシン消化後、LC-MS/MS 測定を行った。その結果検出されたペプチドピークの全体像を可視化するために、得られた質量分析データを Progenesis LC-MS ソフトウェア上にて、3 次元グラフ化した。

その結果、図 2 に示すように、多数のペプチドスポットが検出されたが、幾つかのピークに関しては存在量が多いため、テーリングを起こしていた。

次に、得られた MS/MS データをもとに、MASCOT によるデータベース検索を行い、ペプチドが由来するタンパク質の同定を行った結果、多数のタンパク質が同定された。使用した尿サンプルが雄由来であったことを反映して、最も同定されたペプチド数の多かったのが、雄特異的タンパク質とされる major urinary protein (MUP) であった。この他、上位にランクされたタンパクとして urinary protein 1,2 3 (UP1, UP2, UP3) があり、これらのペプチドが 3 次元グラフ上の濃いスポットに相当することが確認できた。

通常 LC-MS 測定におけるエレクトロナノスプレーによるイオン化では、イオン化できるペプチドの量に制限があるため、こうした高発現量のタ

タンパク質由来のペプチドと同時に溶出する他のペプチドのイオン化が抑制される。また、LC 分離が難しくなるためインジェクションできるペプチドの量が制限され、その大部分を特定のペプチドが占めることになるため、微量ペプチドの検出が難しくなる。一般に、バイオマーカーとされるタンパク質は、その発現量が微量であることが多く、こうしたプロテオーム解析によるバイオマーカーの検出においては、高感度化のためのキープポイントとして、高発現量のタンパク質の前処理による除去が重要な課題となっている。特に血清プロテオーム解析においては、アルブミンやイムノグロブリンなどの高発現量のタンパク質数種のみで全体の 9 割以上を占めるため、抗体カラム等による前処理による除去が必須となっている。我々は以前にマウスを用いた尿中プロテオーム解析の検討において、ラットと同様に MUP および UP が高発現しており、これらの除去のため交代を作成して、イムノプレシピテーションによる除去を試みたが、効率的に除去できなかった経験から、別のアプローチをとることにした。より安価で簡便に特定のタンパク質を除去できる手法としてタンパク質の沈殿法に着目し、高発現量のタンパク質の除去のための条件検討を行った。

2) 尿タンパク質の沈殿法に関する検討

通常のプロテオーム解析においては、なるべく多くのタンパク質を沈殿として回収したいため、比較的濃い有機溶媒濃度 (アセトン終濃度 80%) を用いて沈殿操作を行うが、異なる有機溶媒、および異なる終濃度を用いることにより、一部のタンパク質のみを沈殿させ、MUP 等の高発現タンパクが除去できるかを検討した。また、沈殿時のインキュベーション温度、時間、振とう有無、および沈殿操作前のタンパク質の変性処理の影響について検討を行った。

図 3 に有機溶媒としてエタノールを用いた際の、濃度変化による沈殿タンパク質の変化を BioAnalyzer (Agilent) にて調べた結果を示したが、終濃度として 70% 以下になると、21KD の MUP を含めて、80% にて見られた濃いバンドが消失していくことがわかった。これは、有機溶媒濃度が低くなると、比較的分子量の小さいタンパク質が沈殿しづらくなるためであると考えられる。

アセトニトリル、アセトンに関しても同様の検討を行い、最終的なパフォーマンスの評価を、Progenesis LC-MS を用いて検出できる総ペプチド数をもとに判断した。異なる終濃度のアセトン (A) およびエタノール (E) を用いた際に、LC-MS 解析で得られた総ペプチド数および同定タンパ

ク数の結果を図 4 に示した。両者を総合して最も良い結果が得られたのが E50% を用いた場合であり、ペプチド数として約 25,000、同定タンパク数として 455 が検出、同定された。

一方、この際のタンパク質の回収率に関して検討を行ったところ、図 5 に示すように、有機溶媒濃度が下がるにしたがって回収率は減少し、E50% においては、回収率は 14.1% であった。回収率は低いものの、高発現量のタンパクの除去効果により、検出できるペプチドの総数が増えたと考えられる。新たに検出できたペプチドに関して、Progenesis を用いてその位置を確認したところ、リテンションタイムが MUP 等由来の濃いスポットの近傍であることがわかった。この結果は、前述のイオンサプレッションの効果を反映するもので、高発現量のタンパク (ペプチド) の除去により、本来は存在していた同時に溶出する微量ペプチドのシグナルが観察できるようになったことを物語っている。以上の結果より、今後の検討には、エタノール 50% (終濃度) にて沈殿させることにより、尿タンパク (一部) を回収することとした。

沈殿生成時のインキュベーション温度 (-20°C、4°C、室温)、振とうの有無、事前のタンパク質変性操作 (尿素または還元アルキル化による) に関しても検討を行ったが、有機溶媒濃度ほど大きな変化は見られなかった。そこで、操作の簡便性からも、インキュベーションは、室温にて 1 時間、振とうなし、事前変性処理なしの条件を標準プロトコールとして採用することにした。

次に解析に必要な尿サンプルの必要量の検討を行った。これまでの検討により、通常 LC-MS へのインジェクションに適切なペプチドサンプル量 4 μ g を得るために、トリプシン消化時の必要タンパク量として 12 μ g を設定した。この 12 μ g のタンパク質を沈殿として得るための初期タンパク量として、オスの場合の回収から余裕を見て 300 μ g を設定した。この量のタンパク質を得るために必要な尿サンプルの容量は、平均約 250 μ l であった。一方、メスの場合にはオス特異的 MUP タンパク質の発現が低いため、オスに比べて少なめの量として 200 μ g を設定した。この際の、平均必要尿量は、430 μ l であった。

3) 各種実験条件下における尿中プロテオームの変化

30 週令の群を除く 5 群のラットから得られた LC-MS データを Progenesis に取り込み、ペプチドピークの検出およびアラインメント、定量比較を行った。

その結果、全 47 サンプルを統合して得られた

ペプチドピークの総数は347622であり、MS/MSデータを統合してMASCOT検索を行った結果、同定されたタンパク質の総数は、1954であった。類縁タンパクが重複してヒットする場合もあるので、実数はもう少し減ると考えられるが、2000近い同定数が得られたことは、満足が行く結果であるといえる。さらに、図6に示すように、得られたペプチドピークのうち、タンパク質として同定されProgenesisのフィルターをクリアした(信頼度の高いもの)総数は2861であり、この割合はわずか0.8%であった。また、MS/MSデータが得られたピークは全体の13.2%であり、大部分のペプチドはMS/MS測定がされなかった。これは、サンプルの複雑性を象徴するものであり、繰り返し測定を行うことによってさらに同定数を増やせることが期待できる。ただし、効率的なアプローチとしては、Progenesisによる定量解析の結果、発現量の差が見られたバイオマーカー候補に絞って、再びMS/MS測定を行うことにより、狙い撃ちによる同定をかけることが望ましい。

得られたデータを統合して、群ごとのばらつきおよび類似性を評価するため、主成分分析による統計解析を行った結果を図7に示す。主成分分析(PCA)においては、類似した特徴をもつデータが近傍にプロットされるため、同一群内の個体からのデータは、比較的まとまりを持ってプロットされた。なかでも類似性が高く平均的な位置にプロットされたのが第7群の雄、22時間絶食、午後採血のグループであった。この群だけ、午後の採血であるが、尿の採取は22時間行っているため、他群に比べてデータのばらつきが少なかった原因は不明である。

比較的ばらつきが大きかったのが第2群の非絶食群であるが、この群においてはサンプルの品質が悪かった。ばらつきの要因となっているのは1個体のみであるが、10匹中7匹のマウスで解析可能な分析データが得られず、食餌の混入などの原因が考えられる。今後原因に関しては明らかにしていかなければならないが、現時点では絶食を行った方が良いデータが得られるという結論になる。ただし、絶食と非絶食群の間にはPCA上大きな差異は見られず、メタボローム解析のように食事の影響は受けにくいことがわかった。

雌雄間の比較においては、予想されたように比較的差が見られ、第3群のメスデータは他の雄データから離れた位置にプロットされたが、これは主に第2主成分による寄与が大きい。第1主成分による変化は、主に各群内での個体間のばらつきを与える要因となっていることがわかる。今後、どのようなタンパクがばらつきを与える要因になっているかについても、検討を加えたい。

雌雄差に関してもう少し詳しく検討を行った結果、図8に示すように、雌雄共通して発現するタンパク909に対し、雄のみで発現するタンパクは544、雌のみで発現するタンパクは533とどちらも約1/3程度を占めた。これらのうちで、発現量の高いものを(表1)にリストした。雄特異的タンパク質としては、前立腺や精巣など雄特異的臓器にて発現するタンパク質が含まれており、妥当な結果といえる。雌特異的タンパク質には、BRCA1,2, IP₃受容体、PIP₂など機能的に注目されるタンパク質も含まれており、性特異性との関連が注目される。

当初雄特異的なタンパク質であると考えられたMUPに関しては、雌での詳細な検討により、個体によっては比較的発現の高いラットもあることが判明した(図9)。雄も含めて、MUPの発現量には個体間差が大きく、ばらつきの原因となっていることが示唆された。

絶食時間の差に関しては、大きな影響を受けなかったが、絶食期間の延長によって発現の上昇したタンパク質を表2に示した。アルブミンが比較的大きな変化を示したが、尿中アルブミンは腎障害のマーカーとしても使われるため、絶食の影響を受けやすい点には注意が必要だといえる。

また採尿のタイミングに関しては多少の差が見られたが、昼夜の排尿のタイミングによる個体差をなくす意味では、今回は検討しなかったが24時間尿を採取することが望ましいと考えられる。

週令の影響については、現在30週令のサンプル解析を行っているところで、まだ結果が得られていないため、来年度に報告を行う。サンプリングの段階では、10週令に比べて得られる尿量が少なく、尿タンパク濃度が高い傾向が得られた。(プロテオーム解析においては、最終的にタンパク質濃度で補正されるため、尿量およびクレアチニン量での補正は行わない予定である。)

②国内外における血液・尿中バイオマーカーの開発動向調査

平成24年8月21日から23日まで米国ワシントンDCにて開催された、第5回次世代診断薬サミットに参加し、コンパニオン診断薬を中心とする次世代診断薬の開発と規制に関する最新動向を調査するとともに、関連バイオマーカーに関する情報を入手した。

近年の新薬開発においては、分子標的薬に代表されるように、治療ターゲットがそのまま薬の感受性を予測する診断ターゲットとなるケースが多く、臨床試験の初期の段階から製品版としてのコンパニオン診断薬の開発と利用が必要となっている。新薬とコンパニオン診断薬の同時承認を

前提とした FDA の規制に合致するためには、バイオマーカーの信頼性とその検出法の確立に対する重要性が高まっており、個別化医療の実現に向けた各種バイオマーカーの利用が今後さらに加速されることが予測される。現在は主に制癌剤を中心として、標的組織でのバイオマーカー検出が主に免疫組織学的検出法を用いて行われているが、より侵襲性の低い血液や尿中のバイオマーカーの利用も期待されている。今後は国内においてもこうしたコンパニオン診断薬の開発が盛んになると考えられるが、診断薬メーカーと製薬企業との連携、承認申請に関するガイドライン整備など課題は大きい。バイオマーカーの品質評価に関するアウトプットとして、今後本研究の成果を応用できるよう努力したい。

本研究においては、プロテオミクスを用いた尿中バイオマーカーの開発に注目しているが、Web 上での情報収集も含め、すでに多くの新規バイオマーカー（タンパク）が得られ、臨床応用が進んでいることがわかる。特に腎臓毒性マーカーに関しては研究が進んでおり、KIM-1, NGAL, Cystatin, L-FABP などの有望なマーカーが得られている。こうした腎障害マーカーは、安全性試験やヒト臨床試験への利用が検討されている。また、実験動物からヒトへの外挿の例として、両者のデータの相関性が今後注目される。

我々も、別の検討により独自の腎毒性マーカー候補タンパク質を同定しており、今後本研究の中でもその有用性に関して検討を加えてゆきたい。

D. 考察：

プロテオーム解析によるバイオマーカー開発の成否を決める最も重要な要素としては、検出系の感度を高めることがあげられる。これまで、2次元電気泳動を中心にして多くのバイオマーカー候補が見つけれられてきたが、その大部分は高発現量のタンパク質であり、真に有用なバイオマーカーとなるものは少なかった。各種サイトカインや腫瘍マーカー等のバイオマーカーは、その発現量が少ないことが多く、これらの発現量まで解析系の検出感度を高めることが必要とされる。特に血液の場合には、アルブミン、IgG 等の数種の高発現量のタンパク質が 9 割以上を占めており、これらの除去が必要であることから、解析が難しい。これに対して、尿中のたんぱく質に関しては、高発現量のタンパク質が血液中ほど顕著ではないため、解析がしやすいという利点がある。また、安定性、採取のしやすさという観点からも、バイオマーカー探索のための生体試料として好都合であるため、我々は以前より尿中プロテオーム解

析に注目して検討を行ってきた。

その過程で、血液中ほどではないもののやはり尿中にも比較的発現量の高いタンパク質があり、さらに検出感度を高めるためには、これらを除く前処理が必要であるという結論に達した。そして、本研究においては、ラット尿中において高発現する MUP および UP を適当な有機溶媒による選択的沈殿という比較的簡便な方法で取り除く方法を開発した。この方法を用いて、今年度はラットの性差、絶食の影響などについて検討し、基本的なデータを得た。特に性差に関しては予想されたように変化が見られ、尿において性特異的に発現するタンパク質を同定した。一般に、バイオマーカーとしては性差の影響を受けにくいものが望まれ、これらのタンパクは適切ではないと考えられるが、性特異的なレスポンスを反映するマーカーとしては、むしろ有望である可能性がある。いずれにしても、バイオマーカー候補を同定した場合には、性差に関する情報を得ておくことも重要であると考えられる。

今年度はこうした基本的実験条件による尿中プロテオーム発現の変化に関して検討したが、PCA 解析の結果得られた情報として、同一群内の個体間のばらつきが PC1 方向に認められる傾向があった。PC1 として寄与の大きいタンパク質に関して今後検討が必要であるが、こうした分子はバイオマーカーとしては望ましくない。群内のバラツキという観点においては、午後に採血を行った群が最も小さかったが、採尿を午後に終えるという行為がどのように影響するかについては今後の検討が必要である。今回は、採血との関係で 16 および 22 時間という時間を設定したが、採尿だけを考えた場合には、24 時間尿を採取するのが良いと考えられる。尿サンプルとしては、起床後最初の尿が最適であると考えられるため、この尿を確実に採取できるよう、日中の就寝時に採尿を開始、終了することが望ましいと考えられる。

来年度は、薬物処理を行った際の尿中プロテオームの変化およびヒトへの外挿へ向けた種間での比較プロテオーム解析に関して検討を行っていききたい。

E. 結論

ナノ LC-MS/MS 装置を用いたラット尿プロテオーム解析により、約 35 万のペプチドを検出できたことから、バイオマーカー探索に十分なレベルの感度を持った試験系を確立できた。

プロテオーム解析に関しては、食事の影響を受けにくいことがわかった。最も変化を与える要因は雌雄差であり、性ホルモンなどの性特異的タン

パク質の発現差の影響であると考えられる。バイオマーカーの探索においても、性差を十分考慮に入れる必要があることが示唆された。

バイオマーカーの開発状況に関しては、特に個別化医療をめざしたコンパニオン診断薬としての利用が今後重要性を増すと予想される。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Watanabe T, Suzuki T, Natsume M, Nakajima M, Narumi K, Hamada S, Sakuma T, Koeda A, Oshida K, Miyamoto Y, Maeda A, Hirayama M, Sanada H, Honda H, Ohyama W, Okada E, Fujiishi Y, Sutou S, Tadakuma A, Ishikawa Y, Kido M, Minamiguchi R, Hanahara I, Furihata C. Discrimination of genotoxic and non-genotoxic hepatocarcinogens by statistical analysis based on gene expression profiling in the mouse liver as determined by quantitative real-time PCR. *Mutat Res.*, 747, 164-175. 2012

2) Suenaga K, Takasawa H, Watanabe T, Wako Y, Suzuki T, Hamada S, Furihata C. Differential gene expression profiling between genotoxic and non-genotoxic hepatocarcinogens in young rat liver determined by quantitative real-time PCR and principal component analysis *Mutat Res.*, 751, 73-83. 2013.

2. 学会発表

1) 鈴木孝昌：Omics approach for the biomarker of genotoxicity by aristolochic acid. 韓国毒性学会、公衆衛生学会合同国際シンポジウム (2012.6、ソウル)

2) 鈴木孝昌、田邊思帆里、山口鉄生、鈴木和博：MYBPC2 はヒト骨格筋芽細胞の筋分化マーカーとなる。第11回日本再生医療学会総会 (2012.6、横浜)

3) 鈴木孝昌、小原有弘、松本真理子、広瀬明彦、林 真、本間正充：ジメチルアニリン異性体のマウスでの変異原性。日本環境変異原学会 第41回

大会 (2012.11、静岡)

H. 知的財産権の出願・登録状況：

1. 特許出願

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

(参考文献)

1) Towards the application of proteomics in renal disease diagnosis.

Vidal BC, Bonventre JV, I-Hong Hsu S. *Clin Sci.* 109, 421-30. (2005)

2) Clinical application of urinary proteomics/peptidomics.

Albalat A, Mischak H, Mullen W. *Expert Rev Proteomics.* 8, 615-29 (2011)

3) High resolution proteome/peptidome analysis of body fluids by capillary electrophoresis coupled with MS.

Schiffer E, Mischak H, Novak J. *Proteomics.* 6, 5615-27. (2006)

4) Earlier recognition of nephrotoxicity using novel biomarkers of acute kidney injury.

Waring WS, Moonie A. *Clin Toxicol.* 49, 720-8. (2011)

5) Comprehensive human urine standards for comparability and standardization in clinical proteome analysis.

Mischak H, Kolch W, Aivaliotis M, Bouyssié D, Court M, Dihazi H, Dihazi GH, Franke J, Garin J, Gonzalez de Peredo A, Iphöfer A, Jänsch L, Lacroix C, Makridakis M, Masselon C, Metzger J, Monsarrat B, Mrug M, Norling M, Novak J, Pich A, Pitt A, Bongcam-Rudloff E, Siwy J, Suzuki H, Thongboonkerd V, Wang LS, Zoidakis J, Zürlbig P, Schanstra JP, Vlahou A. *Proteomics Clin Appl.* 4, 464-78. (2010)

6) 最新の疾患バイオマーカー研究—より適切な診療を目指して—
日本臨牀 70巻5号 (2012)

図1 Progenesis-LC/MS ソフトウェアを用いた定量的プロテオーム解析



図2 ラット尿プロテオーム解析データの3次元可視化

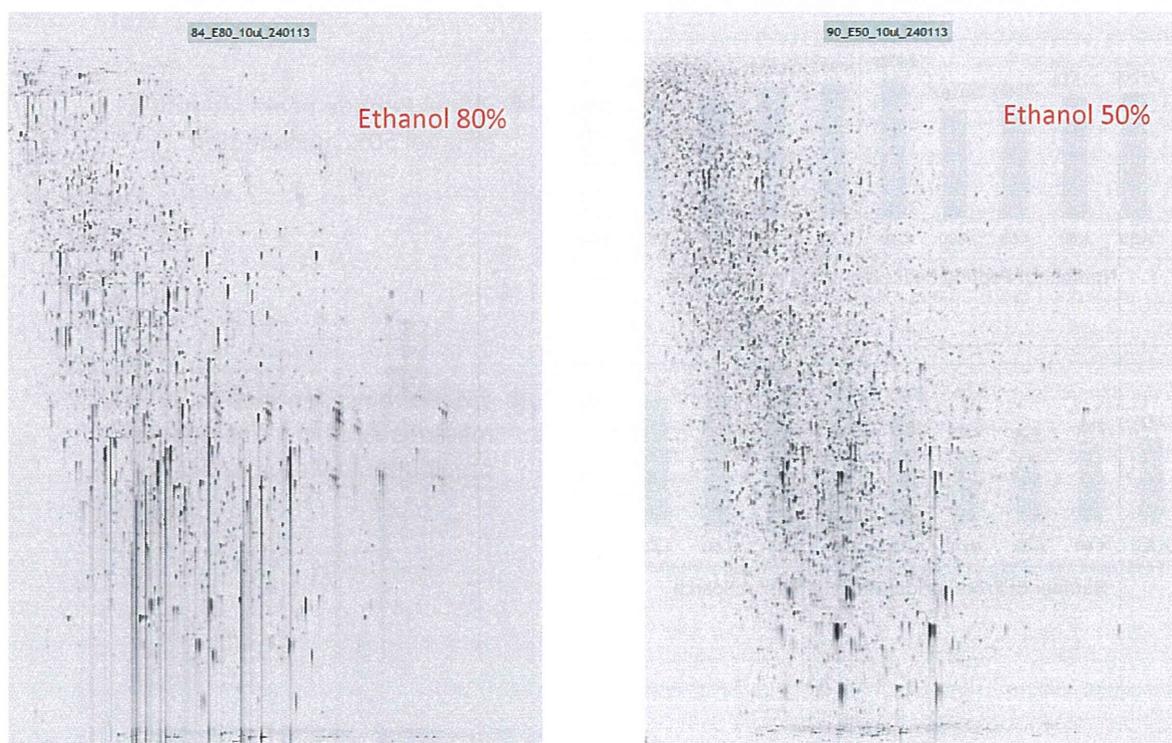


図3 エタノールの濃度変化に伴う回収タンパク質の変化

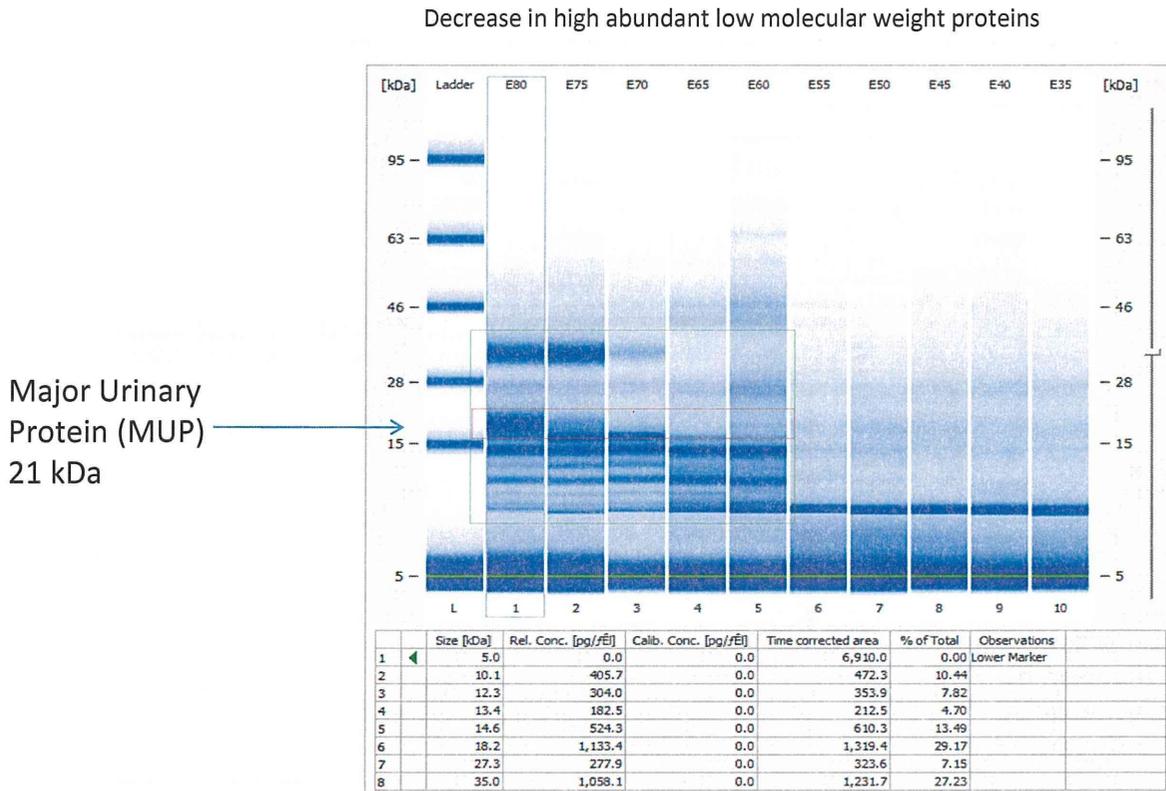
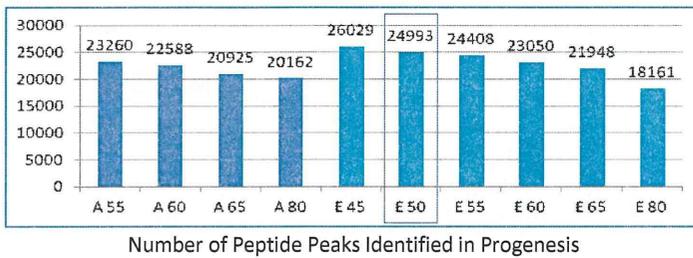
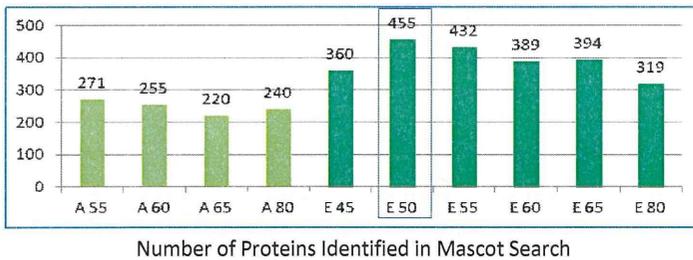


図4 有機溶媒濃度を変化させたときの同定ペプチド数の変化

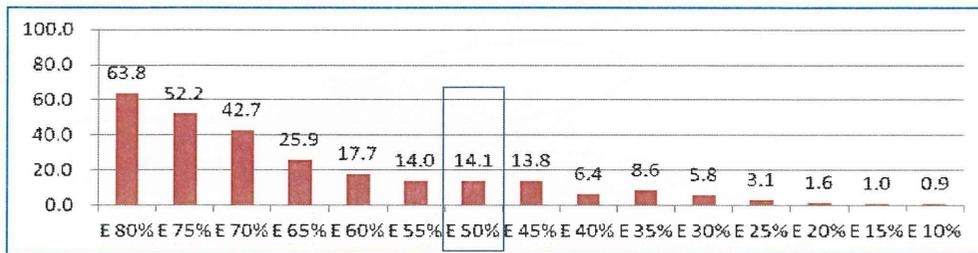


◆ 24993 Peptide peaks identified in ethanol 50% precipitation



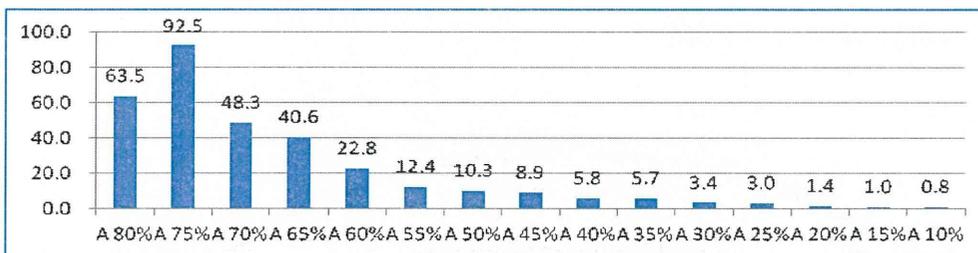
◆ 455 Proteins identified by mascot search in a single sample precipitated by ethanol 50%

図5 異なる有機溶媒濃度によるタンパク回収率の変化



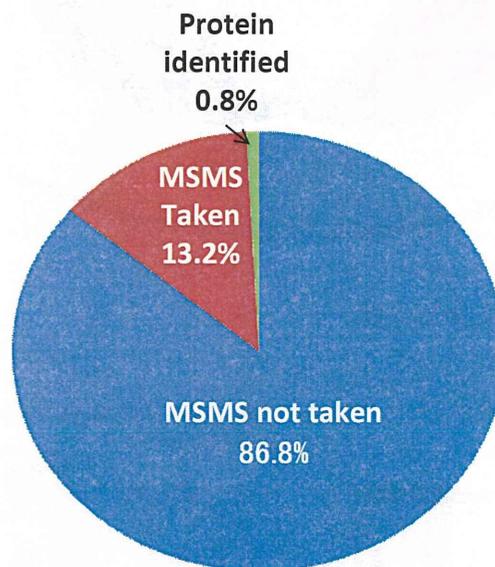
Ethanol

14.1% of protein recovered by Ethanol 50% Precipitation



Acetone

図6 MS/MS データを取得したペプチドおよび同定結果が得られたペプチドの割合



MSMS not taken	301764	86.8
MSMS taken	45858	13.2
Protein identified	2861	0.8
Total Peptide Peaks	347622	

n=47

図7 得られたプロテオームデータの主成分分析

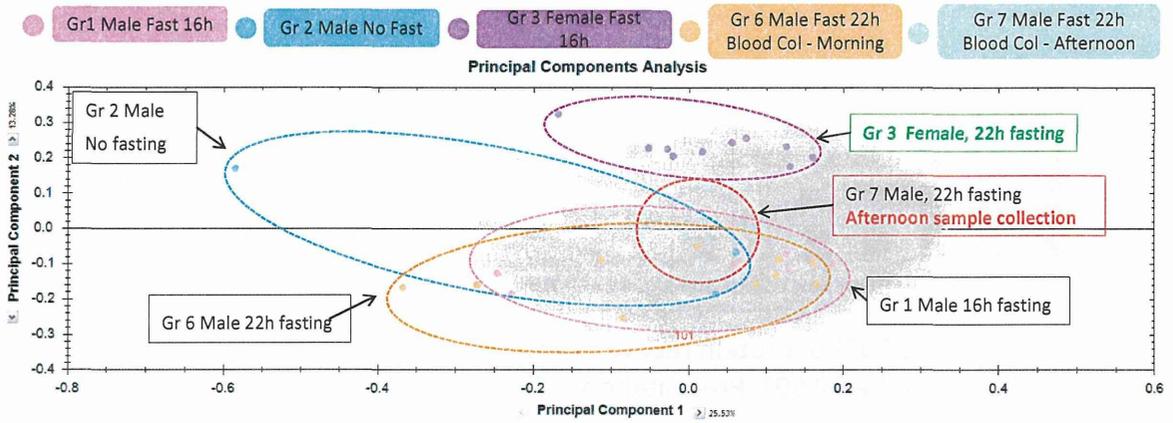


図8 雄および雌にて同定されたタンパク質とその重なり

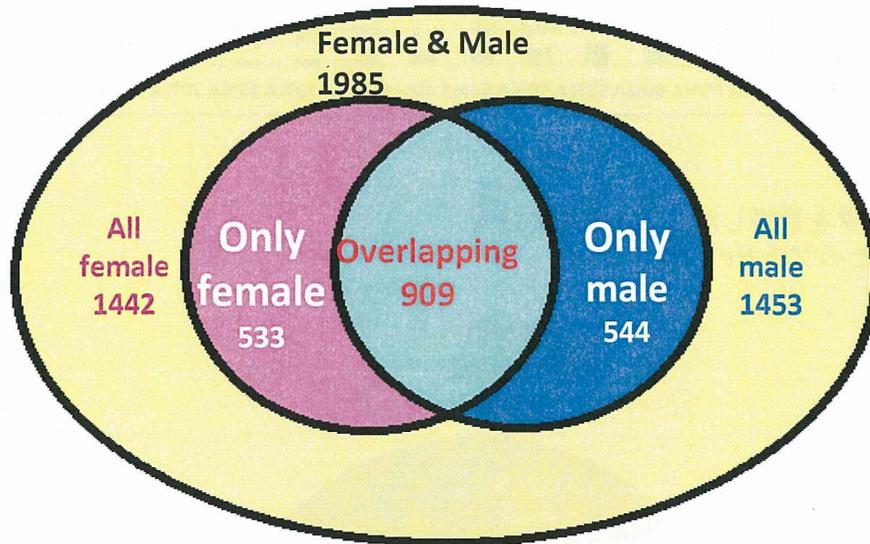
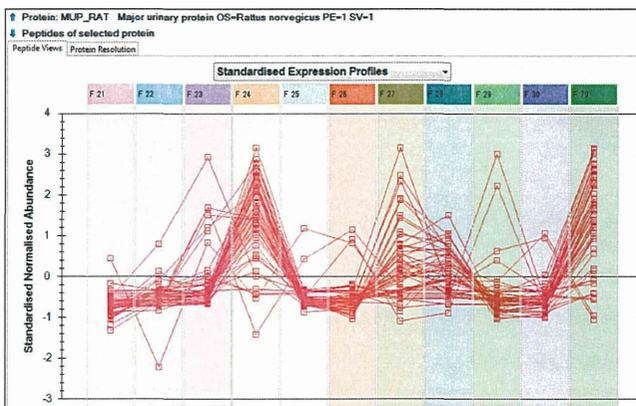
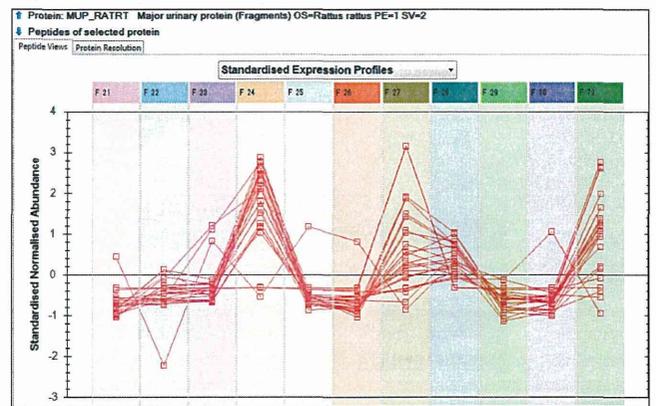


図9 雌ラットにおけるMUPタンパク質発現の個体差



Major urinary protein - MUP



Major urinary protein - MUP (Fragments)

表 1 雄、雌特異的発現タンパク質

Male Specific Protein			Female Specific Protein		
Protein abbreviation	Protein Description	Protein mass	Protein abbreviation	Protein Description	Protein mass
SPBP_RAT	Prostatic spermine-binding protein OS=Rattus norvegicus GN=Sbp PE=1 SV=1	31232	BRCA2_RAT	Breast cancer type 2 susceptibility protein homolog OS=Rattus norvegicus GN=Brca2 PE=1 SV=1	376261
22P2_RAT	Cystatin-related protein 2 OS=Rattus norvegicus GN=Crp2 PE=2 SV=1	21456	DYH12_RAT	Dynein heavy chain 12, axonemal OS=Rattus norvegicus GN=Dnah12 PE=2 SV=2	359927
22P1_RAT	Cystatin-related protein 1 OS=Rattus norvegicus GN=Andrp1 PE=1 SV=1	21446	ITPR1_RAT	Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 OS=Rattus norvegicus GN=Itp1r1 PE=1 SV=2	316486
TGM4_RAT	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 4 OS=Rattus norvegicus GN=Tgm4 PE=1 SV=1	75995	SPTA2_RAT	Spectrin alpha chain, brain OS=Rattus norvegicus GN=Sptan1 PE=1 SV=2	285261
KACA_RAT	Ig kappa chain C region, A allele OS=Rattus norvegicus PE=1 SV=1	11896	MAP1B_RAT	Microtubule-associated protein 1B OS=Rattus norvegicus GN=Map1b PE=1 SV=2	270532
REG3G_RAT	Regenerating islet-derived protein 3 gamma OS=Rattus norvegicus GN=Reg3g PE=2 SV=1	19473	ACACA_RAT	Acetyl-CoA carboxylase 1 OS=Rattus norvegicus GN=Acaca PE=1 SV=1	266678
ACTS_RAT	Actin, alpha skeletal muscle OS=Rattus norvegicus GN=Acta1 PE=2 SV=1	42366	ROCS_RAT	Proto-oncogene tyrosine kinase ROS OS=Rattus norvegicus GN=Ros1 PE=2 SV=1	263884
PSC2_RAT	Prostatic steroid-binding protein C2 OS=Rattus norvegicus GN=Pscp2 PE=1 SV=1	13162	PLCE1_RAT	1-phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate phospholipase epsilon-1 OS=Rattus norvegicus GN=Plec1 PE=1 SV=1	258595
LON5_RAT	Epididymal-specific lipocalin-5 OS=Rattus norvegicus GN=Lcn5 PE=1 SV=2	20828	TF3C1_RAT	General transcription factor 3C polypeptide 1 OS=Rattus norvegicus GN=Tf3c1 PE=1 SV=1	245004
SO1A1_RAT	Solute carrier organic anion transporter family member 1A1 OS=Rattus norvegicus GN=Slc1a1 PE=1 SV=1	75782	FA38A_RAT	Protein FAM38A OS=Rattus norvegicus GN=Fam38a PE=2 SV=2	238393
PSC1_RAT	Prostatic steroid-binding protein C1 OS=Rattus norvegicus GN=Pscp1 PE=1 SV=1	13096	CTCF_RAT	Ctcf OS=Rattus norvegicus GN=Ctcf PE=1 SV=2	22782
SVS2_RAT	Seminal vesicle secretory protein 2 OS=Rattus norvegicus GN=Vsv2 PE=1 SV=1	45568	MYO9B_RAT	Myosin-Xb OS=Rattus norvegicus GN=Myo9b PE=1 SV=1	226380
DFB5_RAT	Beta-defensin 5 OS=Rattus norvegicus GN=Defb5 PE=3 SV=1	8180	MYH3_RAT	Myosin-3 OS=Rattus norvegicus GN=Myh3 PE=2 SV=1	224746
SG2A2_RAT	Secretoglobulin family 2A member 2 OS=Rattus norvegicus GN=Sg2a2 PE=1 SV=1	11008	MYH4_RAT	Myosin-4 OS=Rattus norvegicus GN=Myh4 PE=2 SV=1	223653
MSMB_RAT	Beta-microseminoprotein OS=Rattus norvegicus GN=Mamb PE=1 SV=1	13311	PGCA_RAT	Aggrecan core protein OS=Rattus norvegicus GN=Acan PE=1 SV=2	222580
CATS_RAT	Cathepsin S OS=Rattus norvegicus GN=Ctsa PE=2 SV=1	37437	MYO18_RAT	Myosin-XVI OS=Rattus norvegicus GN=Myo18 PE=1 SV=1	213123
SMR1_RAT	SMR1 protein OS=Rattus norvegicus GN=Voa1 PE=1 SV=1	16017	PCSK5_RAT	Proprotein convertase subtilisin/kexin type 5 (Fragment) OS=Rattus norvegicus GN=Pcsk5 PE=2 SV=2	212487
AK1A1_RAT	Alcohol dehydrogenase (NADP-) OS=Rattus norvegicus GN=Akr1a1 PE=1 SV=2	36711	KIF1B_RAT	Kinesin-like protein KIF1B OS=Rattus norvegicus GN=Kif1b PE=1 SV=1	205411
LEGS_RAT	Galectin-5 OS=Rattus norvegicus GN=Lgal5 PE=1 SV=2	18414	PO210_RAT	Nuclear pore membrane glycoprotein 210 OS=Rattus norvegicus GN=Pom210 PE=1 SV=1	204643
SO1A2_RAT	Solute carrier organic anion transporter family member 1A3 OS=Rattus norvegicus GN=Slc1a3 PE=2 SV=2	75365	BRCA1_RAT	Breast cancer type 1 susceptibility protein homolog OS=Rattus norvegicus GN=Brca1 PE=1 SV=1	203004
SVS4_RAT	Seminal vesicle secretory protein 4 OS=Rattus norvegicus GN=Vsv4 PE=1 SV=1	12096	LKAP_RAT	Limkin-1 OS=Rattus norvegicus GN=Lkap PE=1 SV=1	195632
MMP3_RAT	Neutrophil collagenase OS=Rattus norvegicus GN=Mmp3 PE=2 SV=1	63528	SI1L2_RAT	Signal-induced proliferation-associated 1-like protein 2 OS=Rattus norvegicus GN=Si1a12 PE=2 SV=1	191630
PPT2_RAT	Lysosomal thioesterase PPT2 OS=Rattus norvegicus GN=Ppt2 PE=2 SV=1	34675	MADD_RAT	MAP kinase-activating death domain protein OS=Rattus norvegicus GN=Madd PE=1 SV=1	179306
SO1A5_RAT	Solute carrier organic anion transporter family member 1A5 OS=Rattus norvegicus GN=Slc1a5 PE=2 SV=2	76065	ABCC8_RAT	ATP-binding cassette transporter sub-family C member 8 OS=Rattus norvegicus GN=Abcc8 PE=1 SV=4	176668
HBB1_RAT	Hemoglobin subunit beta-1 OS=Rattus norvegicus GN=Hbb PE=1 SV=3	16083	SYNJ1_RAT	Synaptojanin-1 OS=Rattus norvegicus GN=Synj1 PE=1 SV=3	173870
DNS2B_RAT	Deoxycytidylase-2-beta OS=Rattus norvegicus GN=Dns2b PE=1 SV=1	40960	TOP2A_RAT	DNA topoisomerase 2-alpha OS=Rattus norvegicus GN=Top2a PE=2 SV=1	173853
ASMA3_RAT	Acid sphingomyelinase-like phospholipase 3a OS=Rattus norvegicus GN=Smpd3a PE=2 SV=1	50377	SLIT1_RAT	Slit homolog 1 protein OS=Rattus norvegicus GN=Slit1 PE=1 SV=1	173434
ARF1_RAT	ADP-ribosylation factor 1 OS=Rattus norvegicus GN=Arf1 PE=1 SV=2	20741	P3C2G_RAT	Phosphatidylinositol-4-phosphate 3-kinase C2 domain-containing gamma polypeptide OS=Rattus norvegicus GN=P3c2g PE=2 SV=1	173147
TERA_RAT	Transitional endoplasmic reticulum ATPase OS=Rattus norvegicus GN=Vop PE=1 SV=3	89977	RERE_RAT	Arginine-glutamic acid dipeptide repeats protein OS=Rattus norvegicus GN=Rere PE=2 SV=2	172849
RAC1_RAT	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 OS=Rattus norvegicus GN=Rac1 PE=1 SV=1	21838	MUC2_RAT	Mucin-2 (Fragment) OS=Rattus norvegicus GN=Muc2 PE=1 SV=1	172655
CR1S1_RAT	Cysteine-rich secretory protein 1 OS=Rattus norvegicus GN=Crip1 PE=2 SV=1	28741	NMD2_RAT	Glutamate (NMDA) receptor subunit epsilon-2 OS=Rattus norvegicus GN=Gria2b PE=1 SV=1	167676
ENPP5_RAT	Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family member 5 OS=Rattus norvegicus GN=Enpp5 PE=1 SV=2	54453	MRP8_RAT	Multidrug resistance-associated protein 8 OS=Rattus norvegicus GN=Mrp8 PE=2 SV=1	165771
GSTM2_RAT	Glutathione S-transferase Mu 2 OS=Rattus norvegicus GN=Gstm2 PE=1 SV=2	25857	SYNJ2_RAT	Synaptojanin-2 OS=Rattus norvegicus GN=Synj2 PE=1 SV=2	165414
GSTM4_RAT	Glutathione S-transferase Yb-3 OS=Rattus norvegicus GN=Gstm3 PE=1 SV=2	25835	NOS1_RAT	Nitric oxide synthase, brain OS=Rattus norvegicus GN=Nos1 PE=1 SV=1	161827
AKCL2_RAT	1,5-anhydro-D-fructose reductase OS=Rattus norvegicus GN=Akr1c2 PE=2 SV=1	34753	ROCK2_RAT	Rho-associated protein kinase 2 OS=Rattus norvegicus GN=Rock2 PE=1 SV=1	160475
GSTM1_RAT	Glutathione S-transferase Mu 1 OS=Rattus norvegicus GN=Gstm1 PE=1 SV=2	26088	SHAN2_RAT	SH3 and multiple ankyrin repeat domains protein 2 OS=Rattus norvegicus GN=Shank2 PE=1 SV=2	159099
MYO1E_RAT	Myosin-Ie OS=Rattus norvegicus GN=Myo1e PE=2 SV=1	127374	DMBT1_RAT	Deleted in malignant brain tumors 1 protein OS=Rattus norvegicus GN=Dmbt1 PE=1 SV=1	158871
GAS7_RAT	Growth arrest-specific protein 7 OS=Rattus norvegicus GN=Gas7 PE=2 SV=2	48529	MED23_RAT	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 23 OS=Rattus norvegicus GN=Med23 PE=2 SV=2	158069
LRSD9_RAT	Leucine-rich repeat-containing protein 59 OS=Rattus norvegicus GN=Lrmd9 PE=1 SV=1	35304	CNTF1_RAT	Contactin-associated protein 1 OS=Rattus norvegicus GN=Cntn1 PE=1 SV=1	157785
SO1A4_RAT	Solute carrier organic anion transporter family member 1A4 OS=Rattus norvegicus GN=Slc1a4 PE=2 SV=1	74857	MET_RAT	Hepatocyte growth factor receptor OS=Rattus norvegicus GN=Met PE=1 SV=1	156181
QBBS_RAT	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-5 OS=Rattus norvegicus GN=Gnb5 PE=2 SV=1	39605	RGRFR_RAT	Rab3 GTPase-activating protein non-catalytic subunit OS=Rattus norvegicus GN=Rab3gap2 PE=1 SV=2	155929
DDAH1_RAT	NG(,NG)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1 OS=Rattus norvegicus GN=Ddah1 PE=1 SV=3	31805	VOPR3_RAT	Vascular endothelial growth factor receptor 3 OS=Rattus norvegicus GN=Vegfr3 PE=1 SV=1	155029
OMD_RAT	Osteonectin OS=Rattus norvegicus GN=Ond PE=2 SV=1	60322	CSK1_RAT	Csk1 OS=Rattus norvegicus GN=Csk1 PE=1 SV=1	150882
CAH1_RAT	Carbonic anhydrase 1 OS=Rattus norvegicus GN=Cd1 PE=1 SV=1	28339	PARD3_RAT	Partitioning defective 3 homolog OS=Rattus norvegicus GN=Pard3 PE=1 SV=1	150041
ISK3_RAT	Serine protease inhibitor Kazal-type 3 OS=Rattus norvegicus GN=Spink3 PE=1 SV=2	8902	CD45_RAT	Leukocyte common antigen OS=Rattus norvegicus GN=Ptpcr PE=2 SV=2	144776
RB11B_RAT	Ras-related protein Rab-11B OS=Rattus norvegicus GN=Rab11b PE=2 SV=4	24588	RGRF1_RAT	Ras-specific guanine nucleotide-releasing factor 1 OS=Rattus norvegicus GN=Rasgf1 PE=1 SV=1	143774
FRP_RAT	Prostaglandin F2 receptor negative regulator OS=Rattus norvegicus GN=Pigra PE=1 SV=1	99638	SMC1A_RAT	Structural maintenance of chromosomes protein 1A OS=Rattus norvegicus GN=Smc1a PE=1 SV=1	143743
RGN_RAT	Regucalcin OS=Rattus norvegicus GN=Rgn PE=1 SV=3	33939	MDR1_RAT	Multidrug resistance protein 1 OS=Rattus norvegicus GN=Abcb1 PE=2 SV=1	141925
MYO1B_RAT	Myosin-Ib OS=Rattus norvegicus GN=Myo1b PE=2 SV=1	132661	L1CAM_RAT	Neural cell adhesion molecule L1 OS=Rattus norvegicus GN=L1cam PE=2 SV=3	141816
GPX5_RAT	Epididymal secretory glutathione peroxidase OS=Rattus norvegicus GN=Gpx5 PE=2 SV=1	25596	SVYC_RAT	Vallyl-tRNA synthetase OS=Rattus norvegicus GN=Vvrs PE=2 SV=2	141635
LRRC7_RAT	Leucine-rich repeat-containing protein 7 OS=Rattus norvegicus GN=Lrrc7 PE=1 SV=1	168980	CLAP2_RAT	CLIP-associating protein 2 OS=Rattus norvegicus GN=Clap2 PE=2 SV=1	141463

Accession	Peptides	Anova (p)	Max fold	Description
ALBU_RAT	66	0.00909	4.74	Serum albumin
PSC2_RAT	4	0.00479	3.41	Prostatic steroid-binding protein C2
MOES_RAT	17	0.00183	3.24	Moesin
ARK73_RAT	4	0.04016	2.84	Aflatoxin B1 aldehyde reductase member 3
APOH_RAT	5	0.02499	2.60	Beta-2-glycoprotein 1
TCO2_RAT	6	0.00099	2.50	Transcobalamin-2
AADAT_RAT	4	0.00502	2.44	Kynurenine/alpha-aminoadipate aminotransferase mitochondrial
ACTC_RAT	7	0.03024	2.38	Actin, alpha cardiac muscle 1
NHRF1_RAT	12	0.03024	2.11	Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF1

平成 24 年度 厚生労働科学研究費補助金
(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)
分担研究報告書

動向調査、ヒト副作用試料のバンク化およびイオン性メタボローム解析

研究分担者 国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部 斎藤 嘉朗
研究協力者 国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部 前川 京子
研究協力者 国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部 齊藤 公亮

研究要旨：

本研究はヒト血液試料に関し、安定的に測定しうるバイオマーカー測定用試料の採取に関する必要要件を明確化し、その成果をバイオマーカーの適格性確認ガイドライン等の一部として利用することを目的とし、年齢・性別の異なる白人の健常ボランティア 60 名から、食事制限下で血漿・血清を採取し、血漿・血清中におけるイオン性内在性代謝物濃度への試料採取条件（血漿・血清差）、試料背景（年齢差、男女差）及び試料保管条件（反復凍結融解の有無）の影響を明らかにした。297 種のイオン性内在性代謝物（アミノ酸・糖・小分子脂質・核酸・ビタミン・補因子等代謝物）をメタボローム解析を用いて定量した。全体として、血漿・血清間の差異が最も大きく、次いで年齢差・男女差であり、反復凍結融解の有無の差異はほとんど認められなかった。また、血漿・血清どちらに関しても、年齢差・男女差は同様に認められ、年齢差は女性において、男女差は若年においてより大きく認められた。一方、凍結融解の有無による差異は血清と比べ血漿において大きく認められた。血漿・血清間で差異が認められた代謝物は血液凝固に関わる脂質代謝物を始めとして、アミノ酸及び糖代謝物であった。さらに、個々の代謝物によって、試料間における検出率、及び同一試料背景内における個体差が異なっていた。以上の結果から、イオン性内在性代謝物をバイオマーカーとして測定する際には、1) 血液試料として、血漿・血清のいずれでも利用可能だが、凍結融解の影響を考慮すると血清が望ましいこと、2) 検出率が高く、試料背景間及び試料背景内における差異の小さい代謝物をバイオマーカーとして選択すること、3) 以上を満たせない場合には、これら背景的差异に対する、病気や薬剤反応性などによる差異の相対的な大きさを考慮すること、が示唆された。また、文献情報を基に、バイオマーカー開発動向調査を行うと共に、重篤副作用試料の収集を開始した。

A. 研究目的：

バイオマーカーは、臨床的な最終評価指標（エンドポイント）を、早期に、簡便に、かつ頑健に反映するサロゲート（代替え）マーカーとしての利用が医薬品開発において始まっている。医薬品の有効性および安全性の指標となり、医薬品開発が効率化されるため、バイオマーカーを利用した世界の臨床試験年間登録数はこの 10 年間で約 30 倍に増加している。しかしバイオマーカーの利用はまだ緒に就いたばかりであり、その適格性（確立）に関する評価要件のガイドラインは、1 例の概要案を除き世界的にもない。バイオマーカーの探索・検証・利用を推進するためには、その適格性に関して、実データを反映した評価要件の明確化が必要である。

バイオマーカー測定用試料としては、低侵襲的に採取でき、臨床現場に多用される血液及び尿が汎用される。実際、血中ビリルビン、AST、ALT、

γ -GTP などは、薬物性肝障害の診断バイオマーカーとして、また、尿中 NAG、 $\beta 2$ ミクログロビン、L-FABP などは腎障害の診断バイオマーカーとして臨床で用いられている。

診断に多用される血液は、血漿・血清どちらかを調製して用いられることが多い。一方で、これまでに、バイオマーカー候補となる一部の蛋白質や内在性代謝物レベルには血漿・血清間差が報告されており、測定結果への影響が懸念されている。また、一部の内在性代謝物レベルにおける年齢差、男女差、人種差、食事影響等が報告されており、これらも測定結果への影響が懸念される。本研究では、ヒト血液試料に関し、安定的に測定しうるバイオマーカー測定用試料の採取に関する必要要件を明確化することを目的として、イオン性内在性代謝物濃度への試料採取条件（血漿・血清差）、試料背景（年齢差、男女差）及び試料保管条件（凍結融解の有無）の影響を、メタボローム解析を用

いて網羅的に明らかにした。また、文献情報を基に、バイオマーカー開発動向調査を行うと共に、重篤副作用試料の収集を開始した。

B. 研究方法：

1) 血液の採取と血漿・血清の調製

年齢・性別の異なる健常白人の血漿および血清を、ProMedDx 社 (Norton, MA, USA) より購入した。当該血液は、採血の前日の午後 8 時より、14 時間以上の絶食 (水のみ可) 下で、午前 10 時に上腕部の静脈より採血し、2 時間以内に血漿・血清 (それぞれ約 3mL) を分取して、直ちに -80°C に保存したものである。被験者は、年齢 (若年・老年) 及び性別 (男・女) により、若年男性、若年女性、老年男性、老年女性からなる 4 群とし、各群 15 名とした。本研究に用いた被験者の情報、及び検体の種類を表 1 に示した。

血漿・血清検体は、納品後、1 回融解して、500 μL ずつ分注操作を行った後、再度凍結 (計 2 回) した。また、若年男性の血漿及び血清に関しては、別途 500 μL ずつ分注操作を行い、凍結融解が計 10 回 (-80°C にて 30 分以上凍結後、氷上で融解) となるよう行った。試料は、委託先であるメタボロン社でのイオン性メタボローム解析に供した。

2) 抽出・測定

試料はメタボロン社標準手法によって抽出され、液体クロマトグラフ-リニアイオントラップ型質量分析計及びガスクロマトグラフ-四重極リニアイオントラップ型質量分析計によって解析された。アミノ酸及びその代謝物 73 化合物、ペプチド 29 化合物、糖及びその代謝物 21 化合物、エネルギー関連代謝物 5 化合物、小分子脂質及びその代謝物 144 化合物、核酸及びその代謝物 11 化合物、補因子・ビタミン及びその代謝物 14 化合物、計 297 化合物を測定対象とした (表 2)。

3) データ解析

質量分析データは、メタボロン社ライブラリーに基づき、代謝物の同定を行った。同定した代謝物は性質により大項目 (アミノ酸・脂質等)、及び細かい性質と代謝経路により小項目 (アラニン・アスパラギン酸代謝等) として分類した。老年女性検体群の 1 検体に関しては、血清中に EDTA-2K を検出したことから解析から除外した。イオン性代謝物のレベルはイオンピーク値により定量を行い、日間による測定値の変動を補正した。測定限界以下の代謝物のレベルは、全検体中で測定可能であった最低値を代入し統計解析を行った。各検体群間のイオン性代謝物レベルの違いにつき、paired t-tests (血漿・血清間の比較、

及び反復凍結融解の有無による比較) または、Welch's t-tests (男女間、及び年齢間の比較) 等による統計解析を行い、 $p < 0.05$ を有意な差、 $0.05 < p < 0.1$ をそれに準ずる差と判定した。全検体間におけるイオン性代謝物の包括的比較は直交部分最小二乗法判別分析 (OPLS-DA) モデルを用いて行った。

4) 国内外における血液・尿中バイオマーカーの開発動向調査と重篤副作用試料の収集

国内外における血液・尿中バイオマーカーの開発動向は、文献調査により行った。また重症薬疹、横紋筋融解症、間質性肺障害を対象に、発症患者からの血液の収集とゲノム DNA の抽出を行った。

(倫理面での配慮)

本研究のうち、重篤副作用試料の収集に関しては、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に基づき、機関研究倫理審査委員会の承認を得て遂行した。また健常ボランティア試料のメタボローム解析は、ProMedDx 社から市販されている血漿、血清を使用した研究である。ProMedDx 社において被験者から適切な同意を取得後、採取された試料であり、個人情報と連結不可能匿名化されていることから、機関研究倫理審査委員会において、審査の非該当とされた。

C. 研究結果：

1) 全検体間のイオン性代謝物レベルの包括的比較

OPLS-DA モデルによって、全検体間のイオン性代謝物を包括的に比較したところ、血漿・血清間の差異が最も大きく、次いで年齢差・男女差であり、反復凍結融解の有無の差異はほとんど認められなかった。また、血漿・血清どちらに関しても、年齢差・男女差は同様に認められ、年齢差は女性において、男女差は若年において大きく認められた。反復凍結融解の有無の差異は、血清と比べ血漿において大きく認められた。

2) 血漿・血清間のイオン性代謝物レベルの比較

血漿・血清間のイオン性代謝物レベルの差異は、年齢間及び男女間でほぼ同様の結果を示した。解糖系産物である糖・エネルギー関連代謝物 (クエン酸・ピルビン酸等) 及び、血液凝固反応により分解されるポリペプチド (ブラジキニン) は血漿中で、血液凝固反応の産物である小分子脂質等 (2-パルミトイルグリセロール、1-アラキドニルグリセロール等) 及び、血液凝固に伴うタンパク分解産物であるアミノ酸・ジペプチド等 (フェニルアラニルフェニルアラニン、アルギニン、アス

パラギン酸等)は血清中で有意に高いレベルを示した。血漿と血清間で2倍以上の差があった代謝物は、若年男性で27種、老年男性で25種、若年女性で32種、老年女性で38種、であった。

3) 年齢間のイオン性代謝物レベルの比較

年齢間のイオン性代謝物レベルの差異は、血漿・血清間でほぼ同様の結果を示した。年齢間においてレベルに有意な差のある代謝物は男性よりも女性で多く認められた。男性では、クエン酸回路に関わる代謝物(クエン酸・マレイン酸等)が老齢で有意に高いレベルを示した。男性において若年または老年において有意に高いレベルを示した代謝物は、上記以外の各代謝経路において特徴ある分布が認められなかった。女性では、脂肪酸(ミリストレイン酸・リノレン酸等)及び黄体ホルモン代謝物(硫化プレグナンジオール・硫化プレグネノロン等)が若年において、アミノ酸(システイン・3-メチルヒスチジン等)及び胆汁酸代謝物・中性脂質(グリコール酸・タウロコール酸等)が老年において有意に高いレベルを示した。また、メチル基供給源であるジメチルグリシン、蛋白質の分解の指標であるC-マンノシル化トリプトファン、フェニルアラニンの腸内細菌による異化産物と考えられるフェニルアセチルグルタミン等のレベルが、性別及びマトリックスに関係なく、若年と比較して老年で有意に高かった。若年と老年間で2倍以上の差があった代謝物は、男性血漿で11種、男性血清で13種、女性血漿で11種、女性血清で12種、であった。

4) 男女間のイオン性代謝レベルの比較

男女間のイオン性代謝レベルの差異は、血漿・血清間でほぼ同様の結果を示した。男女間においてレベルに有意な差のある代謝物は老年よりも若年で多く認められた。若年では、アミノ酸(ピログルタミン・シトルリン等)が男性において、脂肪酸(ミリスチン酸・パルミトオレイン酸等)が女性において有意に高いレベルを示した。またホルモン類に関しては男性ホルモン代謝物(硫化アンドロスタンジオール・硫化デヒドロイソアンドロステロン等)が男性で、黄体ホルモン代謝物(硫化プレグナンジオール・硫化プレグネノロン等)が女性において有意に高いレベルを示した。老年では、男性ホルモン代謝物(硫化アンドロスタンジオール・硫化デヒドロイソアンドロステロン等)が男性において有意に高いレベルを示した。本代謝物群以外に、老齢において、男性または女性で有意に高いレベルを示した代謝物は認められなかった。男女間で2倍以上の差があった代謝物

は、若年血漿で7種、老年血清で8種、若年血漿で5種、老年血清で2種、であった。

5) 凍結融解の有無間のイオン性代謝レベルの比較

凍結融解処理10回と2回のイオン性代謝レベルの差異は、血清と比べ血漿で大きく認められた。ヘモグロビン・ポルフィリン代謝物(ビリルビン・ビリベジン等)は血漿・血清どちらにおいても変化が認められ、ポリペプチド・プリン代謝物(ブラジキニン・イノシン等)は血漿のみ変化が認められた。凍結融解前後で2倍以上の差が認められた代謝物は、血漿で8種、血清で4種であった。

6) 検出率及び同一試料背景内の差異

今回測定した一部のイオン性代謝物は血漿(ブラジキニン等)または血清(グリシルバリン等)のみで検出された。また、血漿・血清どちらについても検出率80%を超える代謝物は全体の75%程度であった。

また、同一試料背景内における個体差についても代謝物により異なり、同一試料背景内のRSD(relative standard division)が0.5以下の代謝物は血漿・血清どちらについても全体の55%程度であった。

5) 国内外における血液・尿中バイオマーカーの開発動向調査と重篤副作用試料の収集

開発動向としては、腎障害マーカーとしてKim-1も有用であることが報告されている。さらに抗がん剤ゲムシタビンによる重篤な血液毒性(好中球減少および血小板減少)の発症と血中のハプトグロビンのレベルが有意に相関すること、血清中のアポリポ蛋白質Eのレベルが89%の正確性で肝障害患者と健常人を区別しうること等が報告されている。代謝物マーカーとしては、肝障害に関してALT+ γ -グルタミルシトルリンのレベルがマーカーとなりうること、急性腎障害患者の血清を対象とした研究でアシルカルニチンや数種のアミノ酸レベルの増加やリゾフォスファチジルコリンの減少が報告されている。

重篤副作用試料の収集に関しては、間質性肺障害33例、横紋筋融解症13例、重症薬疹1例に関し、発症患者からのインフォームドコンセントの取得後、血液の収集およびゲノムDNAの抽出を行った。ゲノムDNAについては、分注後、 -80°C で保存した。

D. 考察:

1) 試料採取条件について

今回の比較対象において、測定したイオン性代謝物全般における差異のうち血漿・血清間の差異が最も大きいものであった。また、血漿・血清どちらの検体についても、年齢差・男女差が同様に認められた。さらに、血漿・血清いずれの検体についても、同様の検出率及び同一試料背景内における個体差を示した。以上の結果から、一般的にイオン性内在性代謝物をバイオマーカーとして測定する場合には、血漿・血清のいずれもマトリックスとして利用可能であることが示唆された。しかし、一部のイオン性代謝物は血漿・血清間において検出率が異なっており、特定の代謝物を測定する場合、血漿・血清のうち、検出率の高い試料採取を選択する必要があると考えられた。また、本研究では、食事制限及び同一採血時間で検討を行っているため、食事及び採血時間については今後の検討課題である。

2) 試料背景について

今回の試料背景間の比較において、年齢差においては男性と比べ女性、男女差については老年と比べ若年において測定したイオン性代謝物全般における差異が大きく認められた。これらのことから、イオン性代謝物をバイオマーカーとして測定する場合には、年齢差・男女差のうち、若年女性に対する差異について特に注意する必要があると示唆された。一方、本研究では、同一人種で検討を行っているため、人種差については今後の検討課題である。

女性における年齢差については若年において脂肪酸が、老年においてアミノ酸が高いレベルを示した。これらの代謝物について、女性における年齢差が大きく認められた原因については現在のところ明らかではない。しかしながら、老年女性と比べ若年女性において代謝物が高いレベルを示した黄体ホルモンは、糖類からの脂質合成を促進することが報告されている。一方、黄体ホルモンが低下する老年では、糖類よりアミノ酸が合成される割合が高くなるため、アミノ酸レベルが高い可能性が考えられた。これらのことから、黄体ホルモンの影響が、女性において年齢差が大きく認められた原因の1つであると考えられた。

若年における男女差については男性においてアミノ酸が、女性において脂肪酸が高いレベルを示した。一方、老年においてはこれらの差異は認められなかった。黄体ホルモン代謝物は若年のみにおいて男性と比べ女性で高いレベルを示しており、若年において認められた男女差についても黄体ホルモンが関わっていることが考えられた。

3) 試料保管条件について

今回検討した試料保管条件である反復凍結融解の影響は、測定したイオン性代謝物全般における差異がほとんど認められなかった。したがって、反復凍結融解のイオン性内在性代謝物への影響は小さいことが示唆された。一方、血清と比べ血漿において、代謝物レベルに有意な差のある代謝物が多く認められた。また、ヘモグロビン・ポルフィリン代謝物に関しては血漿・血清に関わらず、代謝物レベルが凍結融解により変化していた。このことから、血漿を用いる場合、及びバイオマーカーとしてヘモグロビン・ポルフィリン代謝物を選択する場合には凍結融解の影響を注意する必要があると考えられた。凍結融解と共に、採血後の血液保存温度（例えば常温保存時間等）は採取病院間における統一が難しいため、その影響は今後の検討課題である。

4) 国内外における血液・尿中バイオマーカーの開発動向調査と重篤副作用試料の収集

調査した範囲で、Kim-1等を除く多くのケースでは、副作用特異性が不明で、検証もなされておらず、臨床現場での利用に至っていない。さらに、多くのケースでは、採取条件の影響も不明であった。

重篤副作用試料の収集に関しては、死亡率が高い、QOLの低下を伴う後遺症が残り安い重篤副作用である間質性肺障害、横紋筋融解症、重症薬疹に関し、患者試料の収集を開始した。特に間質性肺障害に関しては、1年間で多くの症例を集積することができた。しかし、被疑薬は多様であり、より多くの症例の集積が必要である。

E. 結論

バイオマーカー測定用試料（血液）に関し、食事制限下ヒト試料を対象にメタボローム解析を行い、血清・血漿間、男女間、年齢間で、異なるレベルを示す内在性代謝物を明らかにした。それぞれの条件で2倍以上の差が認められた代謝物は、注意すべきである。

臨床におけるバイオマーカー診断に際しては、検体を選択することは不可能であり、検体間において普遍的なバイオマーカーが求められる。したがって、イオン性内在性代謝物をバイオマーカーとして測定する際には、1) 血液試料として、血漿・血清のいずれでも利用可能だが、凍結融解の影響を考慮すると血清が望ましいこと、2) 検出率が高く、試料背景間及び試料背景内における差異の小さい代謝物をバイオマーカーとして選択すること、3) 以上を満たせない場合には、これら背景的差異に対する、病気や薬剤反応性などによる差異の相対的な大きさを考慮すること、が示

唆された。また、文献情報を基に、バイオマーカー開発動向調査を行うと共に、重篤副作用患者試料の収集とバンク化を開始した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表：

1. 論文発表

- 1) 斎藤嘉朗、前川京子、鹿庭なほ子：日本人を対象にしたゲノム・メタボローム解析によるバイオマーカー探索. Pharmstage, 2012. 9, 1-4, 2012.
- 2) 斎藤嘉朗、前川京子、田島陽子、児玉進、黒瀬光一：市販後安全性確保に係るバイオマーカーと診断. レギュラトリーサイエンス学会誌. 3, 43-55, 2013.

2. 学会発表

- 1) 斎藤嘉朗、鹿庭なほ子、杉山永見子、黒瀬光一、前川京子：臨床的に重要な副作用のゲノム

解析に関する取り組みの現況と今後のメタボロミクス解析の必要性等について。第 39 回日本毒性学会学術年会（2012.7、仙台市）

- 2) 斎藤嘉朗、前川京子、佐井君江、鹿庭なほ子、黒瀬光一：ヒト試料を用いたバイオマーカー研究の現状と問題点。第 33 回日本臨床薬理学会学術総会（2012. 11、沖縄県宜野湾市）
- 3) 斎藤嘉朗、佐井君江、鹿庭なほ子、田島陽子、石川将己、最上(西巻)知子、前川京子：バイオマーカー探索研究とその臨床応用に向けての課題。日本薬学会第 133 年会（2013. 3、横浜市）

H. 知的財産権の出願・登録状況：

1. 特許出願

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表 1 本研究に用いた被験者情報と検体の種類

検体群	若年男性	老年男性	若年女性	老年女性
検体数	15	15	15	15
年齢(中央値) [検体値・幅]	29 [25-33]	59 [55-64]	28 [25-34]	59 [55-63]
BMI(中央値) [検体値・幅]	26.2 [18.0-36.6]	24.5 [19.5-34.9]	35.4 [24.9-49.7]	32.7 [26.1-43.3]
matrices	血漿・血清	血漿・血清	血漿・血清	血漿・血清

表 2 測定したイオン性代謝物の大分類と主な代謝物

大分類	代謝物数	主な代謝物
アミノ酸	73	グリシン・セリン・スレオニン・グルタミン酸・アルギニン・システイン・3-メチルヒスチジン・ピログルタミン・シトルリン
ペプチド	29	ブラジキニン・フェニルアラニルフェニルアラニン
糖	21	ピルビン酸・乳酸・ブドウ糖
エネルギー	5	クエン酸・リン酸・マレイン酸
小分子脂質	144	2-パルミトイルグリセロール・1-アラキドニルグリセロール・グリコール酸・タウロコール酸・ミリストレイン酸・リノレン酸・ミリスチン酸・パルミトオレイン酸・硫化プレグナンジオール・硫化プレグネノロン・硫化アンドロスタンジオール・硫化デヒドロイソアンドロステロン
核酸	11	イノシン・キサンチン・ウラシル
補因子・ビタミン	14	ビリルビン・ビリベジン・ヘム

平成 24 年度 厚生労働科学研究費補助金
(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)
分担研究報告書

脂溶性メタボロームバイオマーカー探索・検証のための
ヒト血液試料の採取及び保管に関する要件の検討

研究分担者 国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部 前川 京子
研究協力者 国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部 齊藤 公亮

研究要旨：

ヒト血液試料に関し、安定的に測定しうるバイオマーカー測定用試料の採取に関する必要要件を明確化し、その成果をバイオマーカーの適格性確認ガイドライン等の一部として利用することを目的として、内在性代謝物濃度への試料採取条件（男女差、年齢差、血漿・血清差）及び試料保管条件（凍結融解の回数）の影響を、脂質に関して網羅的に明らかにした。

年齢・性別の異なる白人の健常ボランティア 60 名から、食事制限下で血漿・血清を採取し、確立済みの網羅的脂質メタボローム解析系を用いて、血液中の脂質代謝物を相対定量した。さらに、一部の血漿及び血清に関しては、上記の検体に加え、凍結融解を 10 回繰り返した検体についても測定用試料として用いた。254 種の脂質代謝物を同定し、そのレベルを、血漿と血清間、男女間、および年齢（若年・老年）間、凍結融解の有無で比較した。血漿と血清間では、主として血液凝固反応に関与する脂質に、レベルの違いが認められた。男女間、および若年・老年間では、概して比較 2 群間で同様のレベルを示す代謝物が多かったものの、一部にレベルが異なる分子 ($p < 0.01$, fold changes > 1.5) も認められた。凍結融解を繰り返すことで、多くの脂質代謝物のレベルが 70-80%程度に減少した。以上より、探索したバイオマーカーが、これらに該当する場合には、試料選択において注意を要すること、測定用試料の保管には十分注意すること、が示唆された。

A. 研究目的：

バイオマーカーは、臨床的な最終評価指標（エンドポイント）を、早期に、簡便に、かつ頑健に反映するサロゲート（代替え）マーカーとしての利用が医薬品開発において始まっている。医薬品の有効性および安全性の指標となり、医薬品開発が効率化されるため、バイオマーカーを利用した世界の臨床試験年間登録数はこの 10 年間で約 30 倍に増加している。しかしバイオマーカーの利用はまだ緒に就いたばかりであり、その適格性（確立）に関する評価要件のガイドラインは、1 例の概要案を除き世界的にもない。バイオマーカーの探索・検証・利用を推進するためには、その適格性に関して、実データを反映した評価要件の明確化が必要である。

バイオマーカー測定用試料としては、低侵襲的に採取でき、臨床現場に多用される血液及び尿が汎用される。実際、血中ビリルビン、AST、ALT、 γ -GTP などは、薬物性肝障害の診断バイオマーカーとして、また、尿中 NAG、 $\beta 2$ ミクログロビン、L-FABP などは腎障害の診断バイオマーカーとして臨床で用いられている。また、臨床現場での利用に至っていないものの、文献レベルでは血液中

の代謝物が薬物有害反応による診断バイオマーカーとなることが報告されており、例えば、肝障害に関して血清中 ALT+ γ -グルタミルシトルリンのレベルがマーカーとなりうること、急性腎障害患者を対象とした研究では、血清アシルカルニチンや数種のアミノ酸レベルの増加、リゾフォスファチジルコリンの減少が報告されている。

一方で、診断に多用される血液や尿では、マーカー候補となる蛋白質や内在性代謝物レベルの一部に男女差、年齢差、食事影響等が報告されており、測定結果への影響が懸念されている。本研究では、ヒト血液試料に関し、安定的に測定しうるバイオマーカー測定用試料の採取に関する必要要件を明確化することを目的として、内在性代謝物濃度への試料採取条件（男女差、年齢差、血漿・血清差）及び試料保管条件（凍結融解の回数）の影響を、脂質に関して網羅的に明らかにした。

B. 研究方法：

(1) 血液の採取と血漿・血清の調製

ヒト血漿・血清は ProMedDx 社 (Norton, MA, USA) より購入した。採血は、年齢・性別の異なる

る健常白人で、採血の前日の午後 8 時より、採血当日の午前 10 時まで食事制限（水のみ可）を行い、14 時間以上の絶食下で午前 10 時に、EDTA-2K 及び凝固剤を用いない条件下で上腕部の静脈より採血を行ったものである。採血後は 2 時間以内に血漿・血清（それぞれ約 3mL）を分離し、直ちに -80°C に保存された。若年男性、若年女性、老年男性、老年女性からなる 4 群の各群 15 名分を購入した。提供された被験者の情報、及び検体の種類を表 1 に示した。

購入した血漿・血清は、1 回融解して、110 μL ずつ分注操作を行った。分注検体は再度凍結し、2 回目に融解した検体を測定用試料とした（表 1）。

(2) 血漿・血清の保存条件

試料保管条件の違いがメタボローム濃度に与える影響を明らかにするため、若年男性の血漿及び血清に関しては、凍結融解を 10 回（ -80°C にて 30 分以上凍結後、氷上で融解）繰り返した検体についても測定用試料とし、凍結融解を 2 回行った通常試料と比較した（表 1）。

(3) 脂質抽出・メタボローム測定

ヒト血清・血漿（各 100 μL ）から、内部標準物質 (IS) 存在下、中性条件で Bligh & Dyer 法により脂溶性代謝物を抽出し、下層（有機層）及び上層（水層）を分取した。グリセロリン脂質

(Glycerophospholipids, GPL)・スフィンゴ脂質 (Sphingolipids, SP)・中性脂質等の脂溶性の高い代謝物を含む下層は、超高性能液体クロマトグラフ-飛行時間型質量分析計 (UPLC-TOFMS、超高性能液体クロマトグラフは Waters 社 ACQUITY UPLC、飛行時間型質量分析計は Waters 社 LCT Premier XE) を用いて、脂質代謝物を網羅的に相対定量した。並行して、GPL、SP の脂肪酸の組成を同定する目的で、超高性能液体クロマトグラフ-リニアイオントラップ型質量分析計 (UFLC-LTQ、超高性能液体クロマトグラフは島津 Prominence UFLC、リニアイオントラップ型質量分析計は、サーモフィッシャーサイエンティフィック社 Finnigan LTQ) を用いて、同定された脂質代謝物の構造解析を行った。

酸化脂肪酸 (oxidative fatty acids, oxFA) を含む上層は、さらに Oasis HLB Vac RC cartridge (Waters 社) を用いて固相抽出を行い、ギ酸メチル画分を分取し、サンプルとした。超高速液体クロマトグラフ-三連四重極リニアイオントラップ型質量分析計 (UPLC-MS/MS、高速液体クロマトグラフは Waters 社 ACQUITY UPLC、三連四重極リニアイオントラップ型質量分析計は AB SCIEX 社 QTRAP5500) を用いたネガティブイオンモードで

の多重反応モニタリング法にて測定した。

(3) データ解析

UPLC-TOFMS により得られたデータは、2DICAL (三井情報株式会社) を用いてピークを抽出し、UPLC-TOFMS の保持時間、精密質量及びマススペクトル、さらに UFLC-LTQ の構造解析のデータに基づき、代謝物の同定を行った。相対定量には、内部標準物質 (IS) により補正を行った全ピークの height 値を用い、種々の条件間の脂質分子種レベルの違いにつき、Wilcoxon signed-rank test (血漿と血清間の比較、及び凍結融解の回数による比較) または、Mann-Whitney U-test (男女差、及び年齢差の比較) による統計解析を行い、 $p < 0.01$ を有意な差と判定した。

UPLC-MS/MS より得られたデータは、MultiQuant ソフトウェア (AB SCIEX 社) を用いて検出された代謝物ピークの面積値を求めた後、IS により抽出操作の補正を行い、補正後のピークにつき、Wilcoxon signed-rank test (血漿と血清間の比較、及び凍結融解の回数による比較) または、Mann-Whitney U-test (男女差、及び年齢差の比較) による統計解析を行い、 $p < 0.01$ を有意な差と判定した。

(倫理面での配慮)

本研究は ProMedDx 社から市販されているヒト試料（血漿、血清）を使用する研究である。ProMedDx 社において被験者から適切な同意を取得後、採取された試料であり、個人情報と連結不可能匿名化されていることから、機関研究倫理審査委員会において、審査の非該当とされた。

C. 研究結果：

1) 食事制限下のヒト血液中の脂質代謝物の同定
年齢及び性別の異なる 60 名の血漿・血清からなる 120 サンプルから、Bligh & Dyer 法の下層（有機層）において 229 種の脂質代謝物が同定された。検出された脂質クラスの内訳と、主要な分子種を表 2 に示した。

一方、Bligh & Dyer 法の上層のギ酸メチル画分から 25 種の脂肪酸代謝物が同定された。脂質クラスの内訳は、リノレン酸代謝物が 2 種、アラキドン酸 (AA) 代謝物が 13 種、エイコサペンタエン酸 (EPA) 代謝物が 4 種、ドコサヘキサエン酸 (DHA) 代謝物が 6 種であった。

2) 血漿・血清間の脂質代謝物レベルの比較

マトリックス差（血漿・血清差）が代謝物レベルに与える影響を検討した結果、数種のリゾフォスファチジルコリン (LPC) 及びジアシルグリセ

ロール (DG) 分子種が、男女及び年齢に関わらず、血漿に比較して血清中で有意に高いレベルを示した。1.5 倍以上の違いを示した具体的な分子種として、16:0LPC (1.6 倍、若年男性の血漿に対する同血清の比)、18:0LPC (同 1.6 倍)、34:1DG (同 1.9 倍)、34:2DG (同 1.7 倍)、36:3DG (同 1.8 倍) 等が同定された。一方で、検出された脂質代謝物 (表 2) のうち、上記以外には、血漿・血清間において、全 4 群に共通して、レベルの違いを認める分子種は見出せなかった。

一方、脂肪酸代謝物のうち、血漿に比較して血清中でレベルの増加が認められた分子種として、AA の代謝物である 12-hydroxyeicosatetraenoic acid (12-HETE、同 1.6 倍)、Thromboxane B₂ (TXB₂、同 1.7 倍) 等、及び DHA の代謝物である 4-hydroxydocosahexaenoic acid (4-HDoHE、同 3.3 倍) 等が見出された。逆に、血漿に比較して血清中でレベルの減少が認められた分子種としては、8-HETE (0.4 倍)、10-HDoHE (0.5 倍) 等が見出された。

3) 男女間の脂質代謝物レベルの比較

性別が代謝物のレベルに与える影響を検討した結果、マトリックス・年齢に関わらず、多くのスフィンゴミエリン (SM) 分子種が男性と比較して女性で有意に高いレベルを示した。違いが認められた分子種として、36:2SM (1.7 倍、若年男性血漿に対する若年女性血漿の比)、38:2SM (同 1.5 倍)、42:4SM (同 1.7 倍) 等が挙げられた。

さらに、老年では SM 分子種に加え、ドコサペンタエン酸 (DPA) 及び DHA を含むグリセロリン脂質・コレステロールエステルのレベルに有意な男女差が認められた。違いが認められた分子種として、40:6 フォスファチジルコリン (PC、18:0/22:6PC、1.6 倍、老年男性血漿に対する老年女性血漿の比)、40:6 フォスファチジルエタノールアミン (PE、18:0/22:6PE、同 1.6 倍)、40:6 エタノールアミンプラズマローゲン (pPE、18:0p/22:6 PE、同 1.8 倍)、22:6 コレステロールエステル (22:6ChE、同 1.7 倍) 等が挙げられ、いずれも老年男性と比較して老年女性で有意に高いレベルを示した。さらに、高度不飽和脂肪酸を含むと推定される一部のトリアシルグリセロール (TGs) のレベルが老年男性と比較して老年女性で高く、60:10 TG (同 2.1 倍) 等が見出された。

脂肪酸代謝物では、老年において男女差を示す代謝物が見出され、18-HETE (0.5 倍、老年男性血漿に対する老年女性血漿の比) 及び 5,6-dihydroxyeicosatrienoic acid (5,6-diHETrE、同 0.7 倍) 等が老年男性と比較して老年女性で有意にレベルが低かった。

4) 若年・老年間の脂質代謝物レベルの比較

年齢差が脂質代謝物のレベルに与える影響を検討した結果、男女を問わず、20:5ChE (若年男性血漿に対する老年男性血漿の比、1.5 倍) が、若年と比較して老年で有意に増加した。上記に加え、男性血漿では、36:5PC (16:0/20:5 PC、同 1.4 倍) が、女性血漿では、多くの LPC 分子種、DPA 及び DHA を含む PC 及び ChE、さらに多くの TG 分子種のレベルが有意な年齢差を認めた。具体的な分子種として、16:1LPC (1.7 倍、若年女性血漿に対する老年女性血漿の比)、22:6LPC (同 1.8 倍)、40:6PC (18:0/22:6PC、同 1.7 倍)、20:6ChE (同 1.6 倍)、56:7 TG (同 2.3 倍) 等が、挙げられた。

脂肪酸代謝物では、男性において 5-hydroxyeicosapentaenoic acid (5-HEPE、2.2 倍、若年男性血漿に対する老年男性血漿の比) が若年と比較して老年で顕著に増加した。一方、女性では、18-HETE (0.6 倍、若年女性血漿に対する老年女性血漿の比)、11,12-diHETrE (同 0.8 倍) 及び 14,15-diHETrE (同 0.8 倍) が若年と比較して老年で有意に低下した。

5) 凍結融解が脂質代謝物レベルに与える影響

凍結融解を 10 回繰り返したサンプルでは、凍結融解を 2 回行ったサンプルと比較して、血漿・血清を問わず、コレステロールのレベルが減少し (0.7 倍、若年男性血漿における、凍結融解 2 回に対する凍結融解 10 回の比)、ChE のレベルが増加した (18:2ChE で同 1.3 倍)。さらに DG 分子種のレベルが反復凍結融解により減少し、34:1 DG で 0.5 倍に減少した。一方、ほぼすべての GPL・SM、及び多くの TG 分子種は、凍結融解により、20%程度のレベルの減少が認められた。

脂肪酸代謝物では、すべての分子種のレベルが反復凍結融解により 0.7 倍程度に低下した。

D. 考察:

1) 食事制限下のヒト血液中の脂質代謝物の同定

UPLC-TOFMS 及び UPLC-MS/MS を用いた網羅的脂質メタボローム解析システムにより、ヒト血漿及び血清から合計で 229 種の脂質代謝物と 25 種の脂肪酸代謝物を同定した。検出された分子種 (表 2) は、GPL、SM、TG、ChE 等の主要な脂質分子種の他、生理活性脂質であるリゾリン脂質 (LPL) やセラミド (Cer)、セラブノシド (CB)、DG、oxFA 等であった。すでに SM、20-HETE 等は、文献レベルでそれぞれ疾患及び医薬品の副作用のバイオマーカーとなりうる事が報告されており (文献 1、2)、これらの分子種を対象に、その血中レベ

ルに対する試料採取条件、及び試料保管条件の影響を明らかにすることは有用と考えられた。

2) 血漿と血清間の脂質代謝物レベルの比較

食事制限下のヒト血漿と血清間の比較において、血清中の数種の LPC 及び DG 分子種が、男女及び年齢に関わらず、血漿と血清間でレベルの違い（血清で 1.5 倍以上の高値）を認めた。また、AA の代謝物（12-HETE、TXB₂、8-HETE 等）のレベルが、血漿と血清中では異なること（1.5 倍以上の変化）が示された（表 3）。これは、血清中では、血液凝固反応に伴い、ホスホリパーゼ C が活性化してアラキドン酸カスケードが進行し、血小板由来の代謝物が血清中に放出されたためと考えられる。よって、これらの代謝物がバイオマーカー候補となる場合は、より生体内の濃度を反映すると考えられる血漿の方が、測定用試料として優れていると考えられる。

一方で、ほとんどの GPL、SP や TG、及び ChE には、血漿・血清間でレベルの差は認められなかったことから、両マトリックスで安定に測定が可能と考えられた。

3) 男女間の脂質代謝物レベルの比較

食事制限下のヒト血漿または血清において、多くの SM 分子種が男性と比較して女性において 1.5 倍以上の高値を示し、SM の代謝に関与する酵素の発現と性ホルモンとの関連性が示唆された。また、DPA 及び DHA を含むグリセロリン脂質及びコレステロールエステルは、老年においてのみ男性と比較して女性の方が高いレベルを示した。老年のみで差が認められる理由は不明であるが、すでに報告がある lipoprotein-associated phospholipase A2 の活性は女性の方が男性より低いこと（文献 3）が一因と考えられた。同様に、アラキドン酸の P450 代謝物である 18-HETE のレベルが、老年女性で老年男性より低いことが示された。基質となるアラキドン酸には有意な男女差が認められなかったことから、合成酵素（CYP4A、4F 等）活性の性差が示唆された。

以上より、血漿・血清中に存在する脂質の一部は、そのレベルが 1.5 倍以上の男女差を示すこと、若年と比べ老年では男女差を示す脂質分子種の数が増加すること、が明らかになった（表 3）。

4) 若年・老年間の脂質代謝物レベルの比較

20:5ChE のレベルが、男女に関わらず、若年と比較して老年で増加したが、その機序は不明である。男性血漿では、EPA を含む 36:5PC（16:0/20:5 PC）や EPA の酸化代謝物である 5-HEPE も若年と比較して老年でそのレベルが高く、食事内容の変

化も含めて加齢と EPA との関連が示唆された。また、女性血漿では、多くの LPC 分子種、DPA 及び DHA を含む PC 及び ChE、及び多くの TG 分子種のレベルに有意な年齢差が認められ、女性ホルモンの減少に伴い、脂質代謝が変化することが示唆された。

以上より、血漿・血清中に存在する脂質の一部には、若年（25-33 歳）と老年（55-64 歳）間で 1.5 倍以上のレベル差を示す分子種が存在すること、男性と比較し、女性では、年齢差を示す脂質分子種が多いこと、が明らかになった（表 3）。

6) 凍結融解が脂質代謝物レベルに与える影響

血漿・血清ともに、ほとんどの脂質代謝物は、凍結融解による有意なレベルの変化が認められ、分解、もしくは氷上で融解時に酵素反応が進行したことが示唆された。よって、バイオマーカー測定用試料の保管の際には、分注操作等を行い、過度な凍結融解を避けるべきことが示された。

E. 結論

メタボローム用試料（血液）に関し、食事制限下ヒト試料を対象にメタボローム解析を行い、血清・血漿間、男女間、年齢間で、異なるレベルを示す内在性代謝物を明らかにした。血清は、血液凝固に伴うアラキドンカスケードの進行により、LPC や、DG、及び数種のエイコサノイドの濃度が血漿中とは異なり、これらの脂質を対象とする際には、より生体内の濃度を反映する血漿の方が、測定用試料としては適していると考えられた。

さらに、男女間、年齢間の比較では、脂質代謝物に関してはほぼ同様のレベルであるものの、一部にはレベルが異なる分子（1.5 倍以上、表 3）もあることを示した。探索したバイオマーカーが、これらの分子に該当する場合には、試料選択において注意を要することが示唆された。

また、測定用試料は、凍結融解を避け、十分注意して保管することすべきことが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表：

1. 論文発表

1) Ishikawa M, Tajima Y, Murayama M, Senoo Y, Maekawa K, Saito Y., Plasma and serum from nonfasting men and women differ in their lipidomic profiles. Biol Pharm Bull. 2013;36(4):682-5.