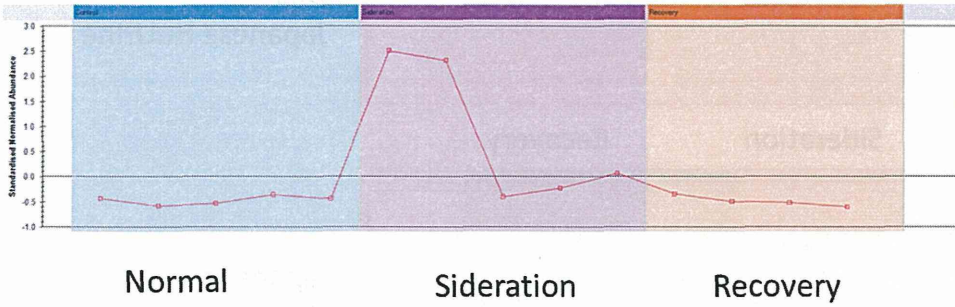


### 5. Trypsin-2

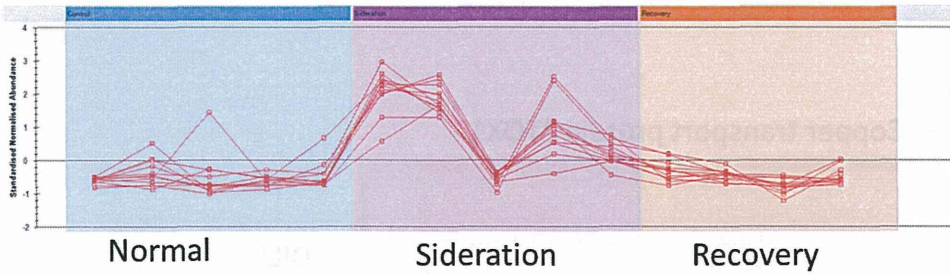


DILI  
Japanese HuUrine

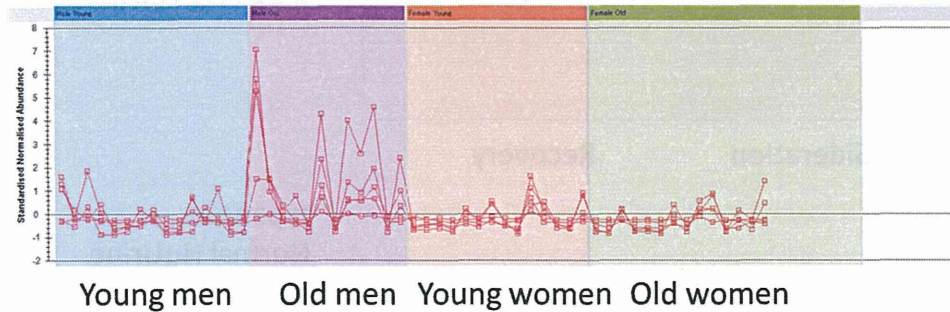
Japanese  
Normal HuUrine

Caucasian  
Normal HuUrine

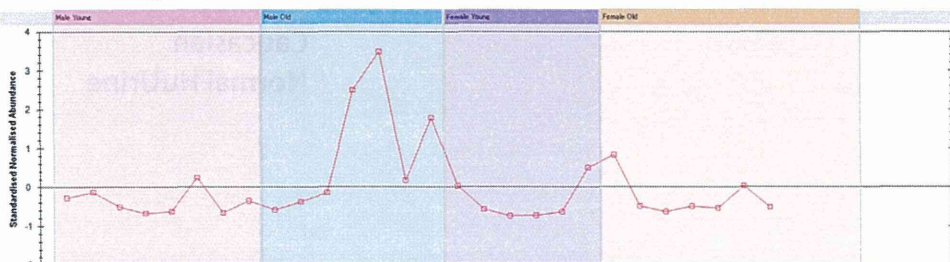
### 6. Glutamyl aminopeptidase



DILI  
Japanese HuUrine

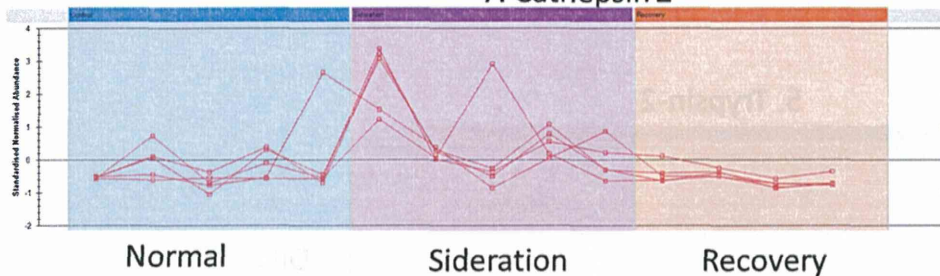


Japanese  
Normal HuUrine

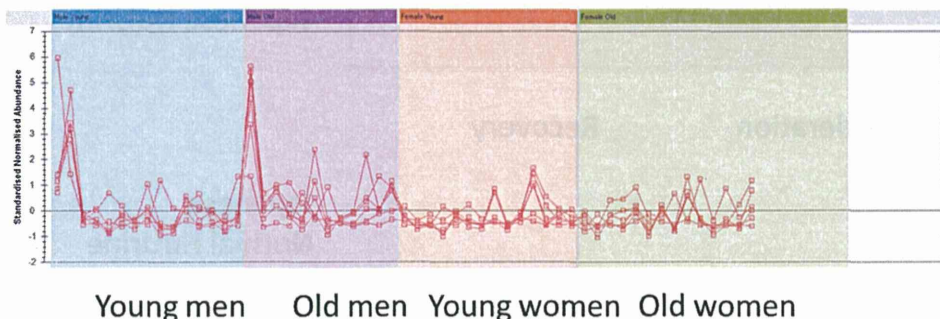


Caucasian  
Normal HuUrine

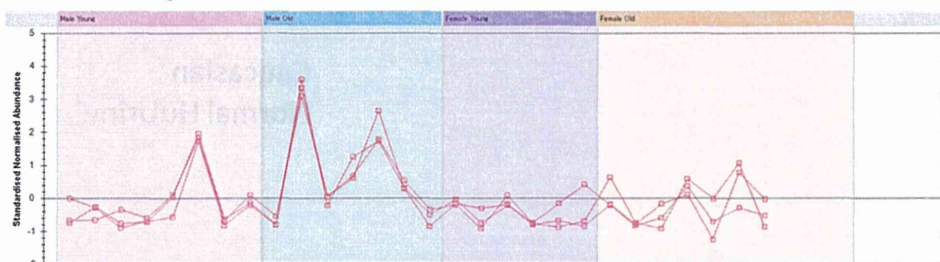
### 7. Cathepsin Z



DILI  
Japanese HuUrine

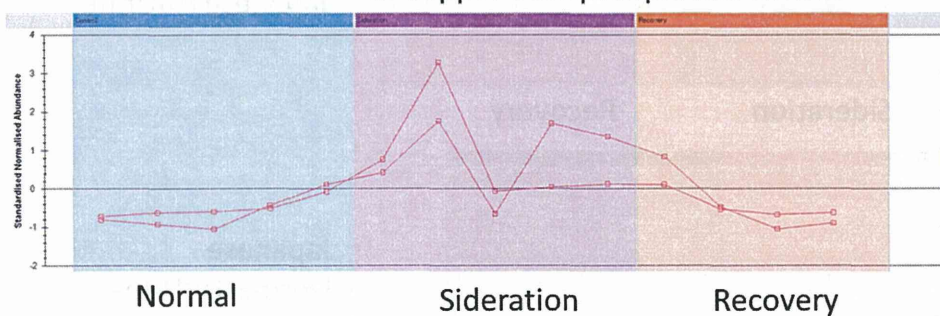


Japanese  
Normal HuUrine



Caucasian  
Normal HuUrine

### 8. Copper transport protein ATOX1

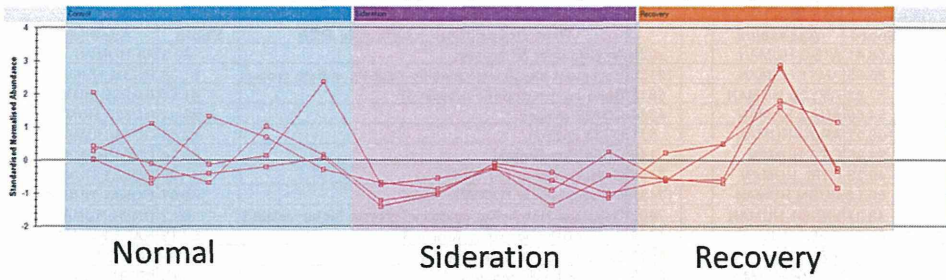


DILI  
Japanese HuUrine

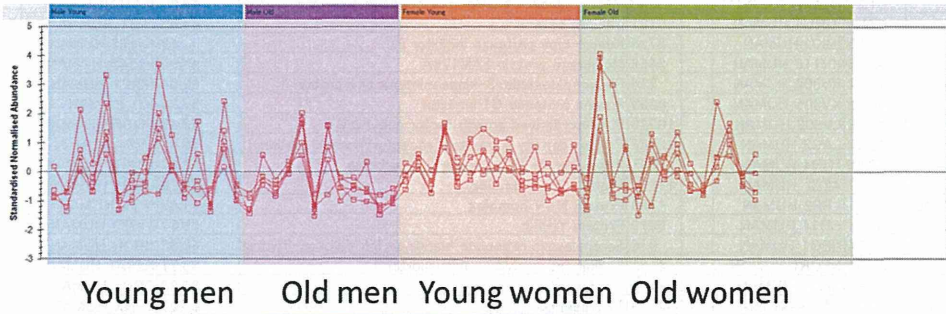
Japanese  
Normal HuUrine

Caucasian  
Normal HuUrine

### 9. Receptor-type tyrosine-protein phosphatase eta



DILI  
Japanese HuUrine

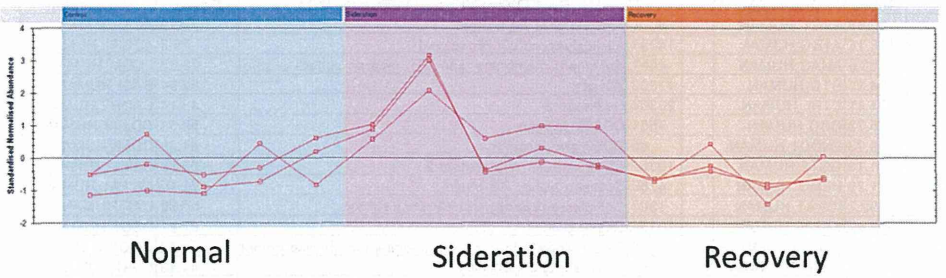


Japanese  
Normal HuUrine

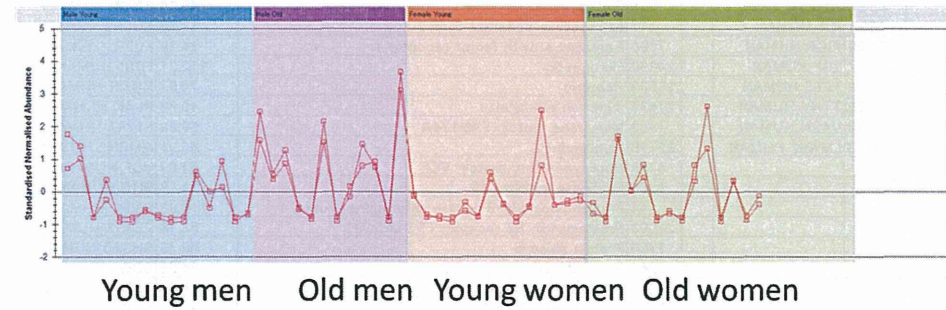


Caucasian  
Normal HuUrine

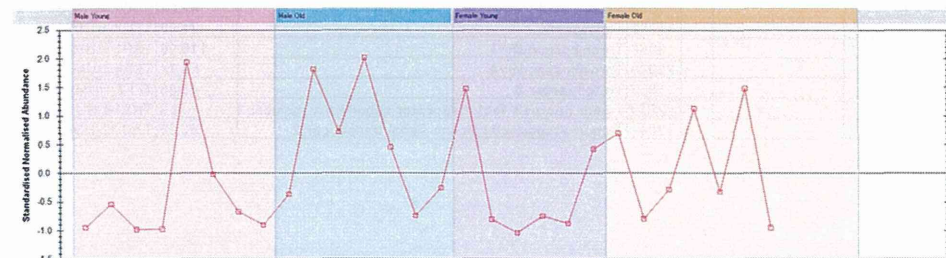
### 10. UPF0556 protein C19orf10



DILI  
Japanese HuUrine



Japanese  
Normal HuUrine



Caucasian  
Normal HuUrine

表1 日本人のコントロールサンプルのばらつきの要因となるペプチドとその同定スコア

	Prot Description Right side PCA	Score	Accession		Prot Description - Left side PCA	Score	Accession
1368	Alpha-1B-glycoprotein	68.41	A1BG_HUMAN	2025	Amyloid beta A4 protein	48.5	A4_HUMAN
4046	Alpha-amylase 1	86.35	AMY1_HUMAN	12159	Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan	51.95	PGBM_HUMAN
1094	Alpha-amylase 2B	57.22	AMY2B_HUMAN	6813	Bone morphogenetic protein 3B	41.54	BMP3B_HUMAN
15586	Alpha-N-acetylglucosaminidase	54.66	ANAG_HUMAN	4324	CD320 antigen	53.84	CD320_HUMAN
1616	Apolipoprotein D	108.02	APOD_HUMAN	571	CD44 antigen	42.46	CD44_HUMAN
4092	Biotinidase	94.95	BTD_HUMAN	149	CD59 glycoprotein	83.94	CD59_HUMAN
9042	Complement C1r subcomponent-like protein	40.23	C1RL_HUMAN	6153	Collagen alpha-1(I) chain	75	CO1A1_HUMAN
11384	Cubilin	50.12	CUBN_HUMAN	17495	Collagen alpha-1(XXVIII) chain	56.67	COSA1_HUMAN
8912	Endonuclease domain-containing 1 protein	43.37	ENDD1_HUMAN	7602	Delta and Notch-like epidermal growth factor-related receptor 3	63.2	DNER_HUMAN
5205	Extracellular superoxide dismutase [Cu-Zn]	64.62	SOXE_HUMAN	1779	Ecto-ADP-ribosyltransferase 3	53.13	NAR3_HUMAN
1173	Fibrinogen alpha chain	50.88	FIBA_HUMAN	180	Extracellular sulfatase Sulf-2	85.3	SULF2_HUMAN
5060	Galectin-3-binding protein	47.51	LG3BP_HUMAN	6359	IGF-like family receptor 1	46.5	IGFR1_HUMAN
1116	Hemopexin	51.37	HEMO_HUMAN	4033	Immunoglobulin superfamily containing leucine-rich repeats	48.95	ISLR_HUMAN
303	Ig gamma-4 chain C region	71.4	IGHG4_HUMAN	9131	Integrin beta-1	49.65	ITB1_HUMAN
186	Ig kappa chain C region	66.85	IGKC_HUMAN	3725	Kunitz-type protease inhibitor 2	42	SPIT2_HUMAN
4480	Ig kappa chain V-I region Roy	41.95	KV116_HUMAN	2488	Membrane protein FAM174A	45.04	F174A_HUMAN
7390	Ig kappa chain V-III region VG (Fragment)	40.04	KV309_HUMAN	216	Phosphoinositide-3-kinase-interacting protein 1	69.04	P3IP1_HUMAN
3552	Ig kappa chain V-III region WOL	50.22	KV305_HUMAN	8895	Plasma protease C1 inhibitor	57.84	IC1_HUMAN
625	Ig lambda chain V-III region LOI	46.42	LV302_HUMAN	10320	Platelet-derived growth factor subunit B	63.46	PDGFB_HUMAN
172	Ig lambda-2 chain C regions	86.08	LAC2_HUMAN	12782	Prolow-density lipoprotein receptor-related protein 1	52.61	LRP1_HUMAN
10615	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	58.45	ITIH4_HUMAN	8801	Prostaglandin E2 receptor EP3 subtype	53.37	PE2R3_HUMAN
6326	Leucine-rich alpha-2-glycoprotein	48.77	A2GL_HUMAN	11811	Protein HEG homolog 1	52.28	HEG1_HUMAN
39577	Low-density lipoprotein receptor-related protein 1	46.31	LRP2_HUMAN	1186	Protein NOV homolog	111.46	NOV_HUMAN
3934	Monocyte differentiation antigen CD14	51.21	CD14_HUMAN	6919	Protein YIPF3	58.67	YIPF3_HUMAN
21072	Neogenin	47.4	NEO1_HUMAN	916	Sarcoplasmic reticulum histidine-rich calcium-binding protein	40.38	SRCH_HUMAN
6864	Neuronal growth regulator 1	58.58	NEGR1_HUMAN	4161	Sodium/nucleoside cotransporter 1	65.71	S28A1_HUMAN
1580	Pancreatic alpha-amylase	88.92	AMYP_HUMAN	1102	Syndecan-1	81.24	SDC1_HUMAN
22566	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase gamma	41.02	PTPRG_HUMAN	4109	Tenascin-X	80.07	TENX_HUMAN
22079	Sialate O-acetyltransferase	44.91	SIAE_HUMAN	1273	Thrombospondin-1	96.9	TSP1_HUMAN
9035	Sulfhydryl oxidase 1	46.02	QSOX1_HUMAN	1177	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 1B	83.76	TNR1B_HUMAN
681	Vesicular integral-membrane protein VIP36	80.83	LMAN2_HUMAN	5437	Tumor-associated calcium signal transducer 2	63.93	TACD2_HUMAN
				289	WAP four-disulfide core domain protein 2	89.2	WADC2_HUMAN
				8627	Xylosyltransferase 1	50.04	XYLT1_HUMAN

表2 白人コントロールのばらつきの要因となるペプチドとその同定スコア

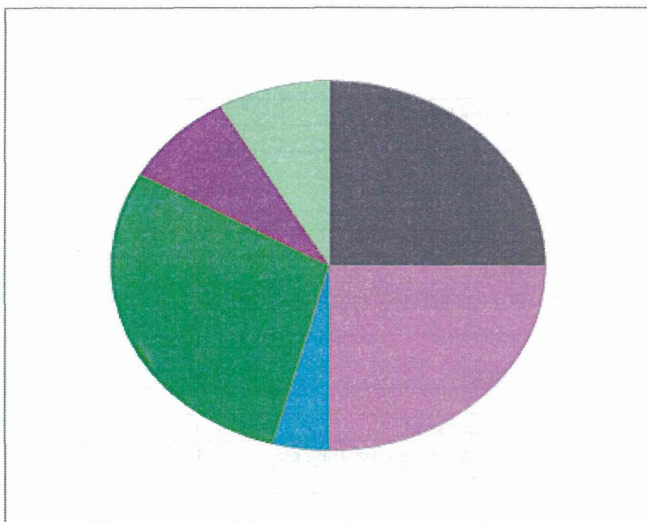
	Prot Description - Right side PCA	Score	Accession		Prot Description - Left side PCA	Score	Accession
7861	Alpha-1-antichymotrypsin	62.06	AACT_HUMAN	8084	Amyloid beta A4 protein	72.93	A4_HUMAN
9755	Alpha-1B-glycoprotein	116.16	A1BG_HUMAN	14097	Asialoglycoprotein receptor 1	79.5	ASGR1_HUMAN
16254	Alpha-N-acetylglucosaminidase	53.6	ANAG_HUMAN	4051	Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan	79.67	PGBM_HUMAN
8290	Biotinidase	94.15	BTD_HUMAN	11803	Basigin	52.94	BASI_HUMAN
10024	Complement C1r subcomponent-like protein	54.41	C1RL_HUMAN	20304	Cadherin-2	43.14	CADH2_HUMAN
6496	Corticosteroid-binding globulin	75.73	CBG_HUMAN	7551	CD209 antigen	59.53	CD209_HUMAN
6001	Endonuclease domain-containing 1 protein	59.78	ENDD1_HUMAN	65	CD59 glycoprotein	61.29	CD59_HUMAN
7819	Gamma-glutamyltranspeptidase 2	61.13	GGT2_HUMAN	10352	CD99 antigen-like protein 2	68.88	C99L2_HUMAN
7704	Hemopexin	71.29	HEMO_HUMAN	4260	Collagen alpha-1(I) chain	72.45	CO1A1_HUMAN
1235	Ig alpha-1 chain C region	99.2	IGHA1_HUMAN	1387	Complement decay-accelerating factor	67.86	DAF_HUMAN
803	Ig kappa chain V-III region VG (Fragment)	67.47	KV309_HUMAN	10156	Desmoglein-1	82.21	DSG1_HUMAN
2731	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	69.15	ITIH4_HUMAN	2552	Dihydropyridyllysine-residue succinyltransferase component	62	ODO2_HUMAN
360	Kininogen-1	60.13	KNG1_HUMAN	2359	Di-N-acetylchitinase	42.43	DIAC_HUMAN
2792	Leucine-rich alpha-2-glycoprotein	58.84	A2GL_HUMAN	575	Endosialin	49.96	CD248_HUMAN
7357	Plasma protease C1 inhibitor	108.1	IC1_HUMAN	117	Extracellular sulfatase Sulf-2	71.82	SULF2_HUMAN
2569	Polymeric immunoglobulin receptor	66.99	PIGR_HUMAN	7598	Fibroblast growth factor receptor 1	74.79	FGFR1_HUMAN
4297	Pro-epidermal growth factor	43.17	EGF_HUMAN	24890	Fibronectin	112.91	FN1_HUMAN
1521	Serotransferrin	100.48	TRFE_HUMAN	15569	Homerin	74.97	HORN_HUMAN
4441	Transthyretin	72.28	TTHY_HUMAN	27629	Junction plakoglobin	49.88	PLAK_HUMAN
3621	Vasorin	84.63	VASN_HUMAN	1959	Membrane protein FAM174A	50.89	F174A_HUMAN
834	Vesicular integral-membrane protein VIP36	80.43	LMAN2_HUMAN	22770	Multimerin-2	56.91	MMRN2_HUMAN
				4339	Neurosecretory protein VGF	61.87	VGF_HUMAN
				1322	Peptidase inhibitor 15	51.18	PI15_HUMAN
				44	Phosphoinositide-3-kinase-interacting protein 1	115.93	P3IP1_HUMAN
				21693	Prostaglandin E2 receptor EP3 subtype	58.78	PE2R3_HUMAN
				1704	Protein shisa-5	69.38	SHSA5_HUMAN
				2044	Secretogranin-1	94.85	SCG1_HUMAN
				9048	Sodium/nucleoside cotransporter 1	58.24	S28A1_HUMAN
				16909	Sulfhydryl oxidase 1	41.62	QSOX1_HUMAN
				1556	Syndecan-1	63.94	SDC1_HUMAN
				11789	Tenascin-X	74.88	TENX_HUMAN
				3068	Thrombospondin-1	110.26	TSP1_HUMAN
				26043	Thrombospondin-4	59.71	TSP4_HUMAN
				1882	Trefoil factor 3	48.86	TFF3_HUMAN
				2537	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 1B	76.3	TNR1B_HUMAN
				12541	Tumor-associated calcium signal transducer 2	63.56	TACD2_HUMAN

表3 白人と日本人で共通してばらつきの要因となったペプチドとその Molecular Functions

Molecular Function			Molecular Function		
Prot Description - Right Side PCA	Score	Accession	Prot Description - Left Side PCA	Score	Accession
1368 Alpha-1B-glycoprotein	68.41	A1BG_HUMAN	2025 Amyloid beta A4 protein	48.5	A4_HUMAN
15586 Alpha-N-acetylglucosaminidase	54.66	ANAG_HUMAN	12159 Basement membrane-specific heparan sulfate proteogly	51.98	PGBM_HUMAN
4092 Biotinidase	94.95	BTD_HUMAN	149 CD59 glycoprotein	83.94	CD59_HUMAN
9042 Complement C1r subcomponent-like protein	40.23	C1RL_HUMAN	6153 Collagen alpha-1(I) chain	75	CO1A1_HUMAN
8912 Endonuclease domain-containing 1 protein	43.37	ENDD1_HUMAN	180 Extracellular sulfatase Sulf-2	85.3	SULF2_HUMAN
1116 Hemopexin	51.37	HEMO_HUMAN	2468 Membrane protein FAM174A	45.04	F174A_HUMAN
7390 Ig kappa chain V-III region VG (Fragment)	40.04	KV309_HUMAN	216 Phosphoinositide-3-kinase-interacting protein 1	69.04	P3IP1_HUMAN
10815 Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4	58.45	ITI14_HUMAN	8801 Prostaglandin E2 receptor EP3 subtype	53.37	PE2R3_HUMAN
6326 Leucine-rich alpha-2-glycoprotein	48.77	A2GL_HUMAN	4161 Sodium/nucleoside cotransporter 1	65.71	S28A1_HUMAN
681 Vesicular integral-membrane protein VIP36	80.83	LMAN2_HUMAN	1102 Syndecan-1	81.24	SDC1_HUMAN
			4109 Tenascin-X	80.07	TENX_HUMAN
			1273 Thrombospondin-1	96.9	TSP1_HUMAN
			1177 Tumor necrosis factor receptor superfamily member 16	83.76	TNFR16_HUMAN
			5437 Tumor-associated calcium signal transducer 2	63.93	TACD2_HUMAN

**GO Molecular Function**

Total # Genes: 24 Total # function hits: 24



- binding (GO:0005488)
- catalytic activity (GO:0003824)
- receptor activity (GO:0004872)
- structural molecule activity (GO:0005198)
- transporter activity (GO:0005215)
- enzyme regulator activity (GO:0030234)
- receptor activity (GO:0004872)

表 4 薬物性肝障害患者由来尿サンプルのリスト

sample#	発症時尿	回復時尿	年齢	性別	原因薬物	タイプ
1	○	○	80	男	バクタ（スルファメトキサゾール/トリメトプリム）	肝細胞障害型
2	○	○	53	男	デバケン（バルプロ酸ナトリウム）	肝細胞障害型
3	○	—	69	女	ワーファリン（ワルファリン）	肝細胞障害型
4	○	○	54	女	メソトレキサート（メトトレキサート）	肝細胞障害型
5	○	○	63	男	カデュエット（アムロジピン・アトルバスタチン）、半夏瀉心湯	肝細胞障害型
6	○	—	77	女		

表 5 薬物性肝障害のバイオマーカー候補タンパク質

Candidates DILI including Normal Samples - Final Selection													
Accession	Peptide count	Unique peptides	Confidence score	Anova (p)	Max fold change	Highest mean condition	Lowest mean condition	Description	Ranking				
									Fold	Anova p	Conf Score	Score	Rank
A2GL	15	15	1267	0.0093	6.9	Sideration	Recovery	Leucine-rich alpha-2-glycoprotein	2	4	1	7	1
CRYAB	4	4	198	0.0012	5.3	Sideration	Control	Alpha-crystallin B chain	3	1	6	10	2
ABHEB	5	5	385	0.0019	4.9	Sideration	Control	Alpha/beta hydrolase domain-containing protein 14B	4	2	4	10	2
HMCN1	8	8	625	0.0048	2.5	Recovery	Sideration	Hemicentin-1	9	3	2	14	4
TRY2	1	1	46	0.0115	10.6	Sideration	Recovery	Trypsin-2	1	5	10	16	5
AMPE	11	11	567	0.0137	3.3	Sideration	Recovery	Glutaryl aminopeptidase	8	7	3	18	6
CATZ	5	5	258	0.0325	3.3	Sideration	Recovery	Cathepsin Z	7	9	5	21	7
ATOX1	2	2	91	0.0223	4.7	Sideration	Control	Copper transport protein ATOX1	5	8	9	22	8
PTPRJ	4	4	177	0.0131	2.1	Control	Sideration	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase eta	10	6	7	23	9
CS010	3	3	131	0.0585	4.2	Sideration	Recovery	UPF0556 protein C19orf10	6	10	8	24	10

平成 26 年度 厚生労働科学研究費補助金  
(医薬品等規制調和・評価研究事業)  
分担研究報告書

イオン性代謝物バイオマーカー探索・検証のための血液試料要件の確立、及び薬物性肝障害の  
バイオマーカー探索にかかる実践的検討

研究代表者 国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部 部長 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 主任研究官 齊藤 公亮  
研究分担者 国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部 室長 前川 京子

**研究要旨：**

バイオマーカーの医薬品開発における利用を促進するための評価要件案作成を最終目標とし、血中イオン性代謝物における日本人の性・年齢差及び、人種差を明かにすることを目的とした。また、薬物性肝障害の発症期と回復期の血中イオン性代謝物レベルを比較し、基礎データをもとに性・年齢・人種差の影響を受けにくいバイオマーカー候補を探索した。メタボローム解析によって約 500 種のイオン性内在性代謝物(アミノ酸、糖、脂質、核酸、ビタミン・補因子等)を定量した。測定した代謝物のうち、日本人において、31%が若年層(25-35 歳)において、25%が老年層(55-65 歳)において性差を示し、23%が男性において、24%が女性において年齢差を示した。性差では、ガンマグルタミルトリプトファンやガンマグルタミルバリンといったガンマグルタミルアミノ酸の差異が年齢に共通して認められた。一方、年齢差では、クエン酸及びマレイン酸といった TCA 回路に属する代謝物の差異が男性において、ガンマグルタミルアミノ酸の差異が女性において認められた。また、日本人、白人、及び黒人における人種差では、約 50%以上の代謝物が、日本人と比べ白人、黒人において差異が認められた。特に、アシルカルニチン、及びモノアシルグリセロール類について、一般的に日本人との人種差が白人、及び黒人に認められた。一方、白人と黒人間における人種差を認めた代謝物は 10%以下であった。さらに、日本人における薬物性肝障害患者の発症期と回復期の血中イオン性代謝物レベルを比較したところ、49 代謝物において有意な差異が認められた。また、これらの代謝物のうち、4 種は性・年齢・人種いずれによっても差異が認められなかった。

以上の結果から、イオン性代謝物を臨床試験においてバイオマーカーとして探索する際には、性・年齢・人種等の試料背景が交絡因子となりうることを示唆され、臨床試験におけるバイオマーカーの適格性を評価するために有用な知見を得ることができた。また、見出した 4 種の代謝物は交絡因子の影響を受けにくい薬物性肝障害のバイオマーカー候補として期待できる。

**H. 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、かつ頑強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は始まっている。医薬品の有効性及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 倍に増えている。しかしながら、バイオマーカーの利用はまだ緒についたばかりであり、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ない。

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、 $\gamma$ -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。

バイオマーカーの探索・検証・実用化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。これまでに我々は、バイオマーカーの医薬品開発における利用を促進するための評価要件案作成を最終目標として、適切な試料採取要件(平成 24、25 年度)、非臨床動物(ラット)とヒトに於ける種差(平成 25 年度)を明らかにしてきた。例えば、イオン性代謝物の測定においては、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ことから血清の方が望ましい。また性差・年齢差が代謝物レベルに影響を与えることを白人において明らかにしているが、性・年齢差はヒトとラットで相関しなかった。また、絶食によって代謝物レベルが大きく変化するが、日内変動に影響を

受ける代謝物は少なかった。しかしながら、本邦におけるバイオマーカー利用を考慮すると、日本人における性差・年齢差や、日本人と外国人(本研究では白人、黒人)との人種差を明らかにすることが求められている。そこで本年度は、イオン性代謝物の日本人における性・年齢差及び人種差を明らかにするとともに、これらのデータを基に、薬物性肝障害に対するバイオマーカーを実践的に探索した。

## I. 研究方法：

### 1) 血液の採取と調製

健常日本人血漿は臨床試験機関に委託して収集した。年齢・性別の異なる日本人の健常ボランティア 60 名を対象に、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 時に採血を行った。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。健常ボランティアの募集条件として、①日本人であること(自己申告において、祖父母までが日本人であることにより判断)、②年齢が 30±5 歳(若年)、または 60±5 歳(老年)で、出来るだけ、BMI で、18.5 以上 25 未満、③過去一週間、医薬品の投与なし、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。

白人・黒人血漿は ProMedDx 社(Norton, MA, USA)より購入した。25-33 歳までの白人または黒人の男性健常ボランティア各 15 名を対象に、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 時に採血を行った。本研究に用いた被験者の情報、及び検体の種類を表 2 に示した。なお、白人若年男性血漿は、平成 24 年度に試料採取条件の検討に用いた血漿・血清試料と同様の個人から採血した試料を用いた。

各個人から EDTA-2K 採血管(BD バキュティナ<sup>TM</sup> 採血管 EDTA2K スプレーコート 367859 もしくは 366643 を使用)を用いて、上腕部の静脈より採血を行い、常法に従い、採血後 2 時間以内に血漿を分取し、直ちに-80℃に保存した。検体は、ドライアイス詰めて国立衛研に輸送後、1 回融解して、500 μL ずつ分注操作を行い、再度凍結した試料をメタボロン社へ送付した。

薬物性肝障害を発症した患者の急性期及び回復期の血漿の収集は、3 病院で行われた。薬物性肝障害発現時における新規 BM 開発に関する探索的研究への参加の意思があり、文書による同意が得られた患者を対象とした。薬物性肝障害の診断

基準は、2 病院では、ALT が正常上限の 2 倍、もしくは ALP (アルカリアルカリホスファターゼ) が正常上限を超える症例で、新たに薬物性肝障害が疑われ、DDWJ-2004 (Digestive Disease Week -Japan 2004) スコア 4 点以上(可能性あり以上)の患者とした。他の 1 病院は、ALT が 150 IU/L もしくは ALP が基準上限の 2 倍以上の症例とした。

採血は、薬物性肝障害の発症を確認した時点(急性期)と改善を確認した時点(回復期)とし、入院患者は早朝空腹時に採血を実施し、外来患者は随意時実施した。EDTA-2Na 添加速心採血管で採血した血液は、速やかに転倒混和し、遠心分離(3000 rpm, 10 min, 15-20 °C)を行い、血漿を分取後、1 mL ずつ、クライオジェニックバイアルに分注し、-80 度で凍結保存した。検体は、ドライアイス詰めて国立衛研に輸送後、1 回融解して、500 μL ずつ分注操作を行い、再度凍結した試料をメタボロン社へ送付した。

### 2) 抽出・測定

メタボロン社に受け取られた検体は抽出まで凍結して保存された。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ィーリ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約 150 化合物、ペプチド断片約 25 化合物、糖及びその代謝物約 25 化合物、エネルギー関連代謝物約 10 化合物、脂質及びその代謝物約 250 化合物、核酸及びその代謝物約 30 化合物、補因子・ビタミン及びその代謝物約 25 化合物、計 500 以上の化合物を測定した(表 4)。

### 3) データ解析

液体クロマトグラフィーリ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-四重極リアイオントラップ型質量分析計により得られたデータは、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分類(アミノ酸・脂質等)、及び細かい性質と代謝経路により小分類(アラニン・アスパラギン酸代謝等)により分類した。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、全検体中の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のレベルの違いにつき、Welch's t-tests による統計解析を行い、 $p < 0.05$  を有意な差と判定した。性・年齢・人種差におけるイオン性代謝物の包括的比較は PCA を用いて行った。



(倫理面での配慮)

健常日本人の血液試料を用いた研究は、研究実施機関である国立医薬品食品衛生研究所、及び研究実施医療機関等の研究倫理審査委員会の承認のもと実施した。本研究は、「臨床研究に関する倫理指針(平成26年12月22日改訂)」を遵守した。全ての健常ボランティアには、説明・同意文書にて、本研究の内容や同意撤回の権利等を十分説明した後、自由意志により文書で同意を得た。また全ての生体試料および情報は委託先の医療機関で連結不可能匿名化されてから国立衛研に提供された。

白人・黒人の血液試料を用いた研究は、ProMedDx社から市販されている血漿を使用した。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への申請は非該当とすることが認められている。

薬物性肝障害患者のBM探索は、国立医薬品食品衛生研究所倫理委員会、及び各医療施設の倫理審査委員会の承認のもとで行っており、被験者の同意も適正に得て行った。個人識別情報は対象試料とは完全に切り離されているため、個人情報の漏洩の問題はない。

## J. 研究結果：

### 1) 日本人における性差・年齢差

まず、日本人におけるイオン性代謝物の性差・年齢差を包括的にみるために、PCAをおこなったところ、それぞれの4群が分離した(図1)。第一成分が性差による分離、第二成分が年齢差による分離であった。

性差によって統計的に有意差が認められた代謝物は、若年及び老年においてそれぞれ158(31%)及び130代謝物(25%)であった。このうち61代謝物(12%)が共通しており、その主な代謝物はガンマグルタミルアミノ酸に属するガンマグルタミルバリンやガンマグルタミルトリプトファン等、ステロイドに属する2硫化アンドロスタンジオール等であった。一方、若年における性差を示す代謝物として、アシルカルニチン群に属するラウリルカルニチンやデカノイルカルニチン等が、老年における性差を示す代謝物として、グリシンやスレオニン等が認められた。

また、年齢差によって統計的に有意差が認められた代謝物は、男性及び女性においてそれぞれ119(23%)及び122代謝物(24%)であった。このうち47代謝物(9%)が共通しており、その主な代謝物はステロイドに属する男性ホルモン誘導体である1硫化アンドロスタンジオールや黄体ホルモ

ン誘導体である水酸化プレグナノロングルクロナイド等であった。一方、男性における年齢差を示す代謝物として、TCA回路群に属するクエン酸やマレイン酸等が、女性における年齢差を示す代謝物として、ガンマグルタミルアミノ酸に属するガンマグルタミルロイシンやガンマグルタミルチロシン等が認められた。

### 2) 人種差

次に、イオン性代謝物の日本人、白人、及び黒人間の人種差を包括的にみるために、PCAをおこなったところ、日本人とそれ以外の人種が分離した(図2)。一方、白人と黒人は分離しなかった。

日本人と比べ白人及び黒人において統計的な有意差が認められた代謝物はそれぞれ、248(48%)及び238(46%)代謝物であった。このうち192代謝物(37%)が共通しており、その主な代謝物は、アシルカルニチン群に属するオクタノイルカルニチンやラウリルカルニチン等、モノアシルグリセロール群に属するオレイルグリセロールやパルミトイルグリセロールであった。

一方、白人と黒人間において統計的な有意差が認められた代謝物は、PCA解析によって分離が認められなかったことと相関して、わずか43代謝物(8%)であった。

### 3) 薬物性肝障害のバイオマーカーの実践的探索

さらに、薬物性肝障害のバイオマーカーを探索するために、発症期と回復期において薬物性肝障害患者の血中イオン性代謝物を測定した。発症期と回復期の比較において、49代謝物が有意な変化を示した。

次に、これまでの我々の血中イオン性代謝物レベルに関する基礎データを基にバイオマーカー候補の絞り込みを行った(図3)。具体的には、まず、性・年齢・人種それぞれの差異に関して、非有意かつ群間の差異50%以下となるような代謝物を選択した。その結果、全ての影響を受けにくい代謝物として54代謝物が選抜された。なお、これまでに肝障害マーカー候補として提唱されている、ガンマグルタミルシトルリン及び3-水酸化ブチレートは年齢差、ピルビン酸は人種差の影響を受け、腎障害マーカー候補として提唱されている、ジメチルアルギニンは性及び年齢差、ピログルタミンは性差の影響を受けるため今回の候補からは除外対象となった。

これら54種中、発症期と回復期の比較において有意な変化が認められた49代謝物のうち4種が見いだされた。このうち2種は発症期においてレベルが低下し、残りの2種は発症期においてレベルが増加していた。

## D. 考察：

### 1) 日本人における性差・年齢差

日本人における性差・年齢差の比較において、有意に差異のあるイオン性代謝物は、性差の方が年齢差よりもわずかに多く、若年における性差が最も顕著であった。性差及び年齢差を示す代謝物は20-30%におよび、これらの代謝物に関してはバイオマーカー探索の差異の交絡因子となることが考えられた。

ガンマグルタミルアミノ酸は性差、及び女性における年齢差を示した。ガンマアミノグルタミン酸の機能に関してはまだ不明な点が多いが、最近ではガンマグルタミルアミノ酸の1種であるガンマグルタミルシトルリンが肝障害のマーカー候補として報告されている。したがって、ガンマグルタミルシトルリンのバイオマーカーとしての利用には性差・年齢差を加味する必要があることが考えられた。

アシルカルニチン群は若年において性差が認められた。この差異をもたらす生物学的背景として、カルニチンは脂肪酸の $\beta$ 酸化に関与することから、脂質代謝における性差の関与が考えられた。

TCA回路に属する代謝物は男性において年齢差が認められた。この差異をもたらす生物学的背景として、TCA回路はミトコンドリアの重要な機能であり、酸化ストレス等の老化によって機能が低下する。したがって、そのTCA回路に属する代謝物が老化マーカーとなることが考えられた。

### 2) 日本人における性差・年齢差の白人との比較

測定・解析手法の改良により今回測定可能であった代謝物が516代謝物であったのに対し、以前に白人において性差・年齢差を検討するために測定した代謝物は297代謝物であったため単純な比較はできないが、いくつかの代謝物に関しては同様の傾向が認められた。例えば、ステロイドホルモン類に関して、男性ホルモンは男性において高いレベルを示した。また、TCA回路に属する代謝物に関しては、男性において年齢差を示し、高齢で高いレベルを示していた。

一方、日本人における性差・年齢差と白人における性差・年齢差が異なった代謝物も存在した。例えば、白人においては脂肪酸（ミリストレイン酸・リノレン酸等）に女性において年齢差が認められたが、日本人においては、年齢差は認められなかった。その原因としては、人種的な影響と、食習慣の影響が主に考えられる。

### 3) 人種差について

人種差の比較において、日本人とそれ以外の人

種における差異が顕著であり、有意に差異のあるイオン性代謝物は、50%近く認められた。近年では、国際共同治験なども積極的に行われるようになってきている。そのような際には、これらの代謝物に関して、バイオマーカー探索の差異の交絡因子となることが考えられた。

日本人とそれ以外の人種において、アシルカルニチン類及びモノアシルグリセロール類に顕著な人種差が認められた。カルニチンは脂肪酸の $\beta$ 酸化に関与し、モノアシルグリセロールは脂肪蓄積・分解等に関与している。したがって、これらの人種差の原因として、脂質代謝の人種差が原因と考えられた。

一方、イオン性代謝物に関しては白人と黒人の人種差はほとんど認められなかった。過去の文献では、性別、年齢をコントロールしていないが、白人、黒人、及びヒスパニックを比較し、イオン性代謝物レベルには人種差があまりないことが報告されている。当該文献ではアメリカで同時に検体を集めており、これらの人種においてはあまり食習慣に差異が無かったと考えられる。実際に食習慣が脂質代謝に影響を与えることも示唆されている。したがって、更なる検討が必要であるが、今回認められた日本人とそれ以外の人種における人種差は、食習慣の影響を強く受けている可能性が考えられた。

### 4) 薬物性肝障害のバイオマーカー候補

薬物性肝障害の発症期及び回復期において差異が認められた代謝物は、49代謝物認められた。これらの代謝物のうち、4種は性・年齢・人種いずれにおいても影響を受けにくい代謝物であった。したがって、これら4代謝物は薬物性肝障害の有用なバイオマーカー候補となることが示唆された。

一方、これまでに肝障害マーカー候補として提唱されている、ガンマグルタミルシトルリン、3-水酸化ブチレート及びピルビン酸、及び腎障害マーカー候補として提唱されている、ジメチルアルギニン及びピログルタミンは性・年齢・人種いずれかの影響を受けていた。したがって、これらのマーカー候補の実用化には、影響する試料背景について注意する必要があると考えられる。

## E. 結論

イオン性代謝物を臨床試験においてバイオマーカーとして探索する際には、性・年齢・人種等の試料背景が交絡因子となりうるということが示唆され、臨床試験におけるバイオマーカーの適格性を評価するために有用な知見を得ることができた。また、見出した4種の代謝物は交絡因子の影響を

受けにくい薬物性肝障害のバイオマーカー候補として期待できる。

F. 健康危険情報  
特になし

G. 研究発表：

1. 論文発表

- 1) Saito K, Maekawa K, Ishikawa M, Senoo Y, Urata M, Murayama M, Nakatsu N, Yamada H, Saito Y.: Glucosylceramide and Lysophosphatidylcholines as Potential Blood Biomarkers for Drug-Induced Hepatic Phospholipidosis. *Toxicol Sci.*, 2014; 141: 377-386.
- 2) Saito K, Ishikawa M, Murayama M, Urata M, Senoo Y, Toyoshima K, Kumagai Y, Maekawa K, Saito Y. Effects of sex, age, and fasting conditions on plasma lipidomic profiles of fasted sprague-dawley rats. *PLoS One.*, 2014; 9: e112266.
- 3) Saito K, Maekawa K, Pappan KL, Urata M, Ishikawa M, Kumagai Y, Saito Y. Differences in metabolite profiles between blood matrices, ages, and sexes among Caucasian individuals and their inter-individual variations. *Metabolomics*, 2014; 10: 402-413.

2. 学会発表

- 11) Maekawa K., Saito K., Pappan K. L., Ishikawa M., Urata M., Tajima Y., Inoue M., Kumagai Y., Saito Y.: IMPACT OF GENDER, AGE AND FED/FASTED STATE OF RATS ON THEIR SERUM HYDROPHILIC METABOLITES 29<sup>th</sup> JSSX/19<sup>th</sup> NA-ISSX meeting (2014.10、米国・サンフラ

ンシスコ市)

- 12) Saito Y., Saito K., Ishikawa M., Urata M., Tajima Y., Inoue M., Kumagai Y., Pappan K.L., Maekawa K.: Metabolomic profiles in rat blood vary between genders, ages and fasting conditions, and their qualitative comparisons with human samples. 2014 AAPS annual meeting (2014.11、米国・サンディエゴ市)
- 13) Maekawa K., Saito K., Ishikawa M., Minamino N., Kumagai Y., Saito Y.: Metabolomic biomarker exploration highlights issues of species specificity. KSCPT-JSCPT Joint Symposium (2014.11、韓国・プサン)
- 14) 斎藤嘉朗, 齊藤公亮, 児玉進, 熊谷雄治, 前川京子 ヒト試料を用いたバイオマーカー研究のためのレギュラトリーサイエンス。第35回日本臨床薬理学会学術総会 (2014.12、愛媛)
- 15) Saito Y., Maekawa K., Saito K.: Safety Biomarker Exploration by Metabolomics. 3<sup>rd</sup> Annual Seoul-Kitasato Joint Symposium (2015.1、東京)
- 16) 斎藤嘉朗, 齊藤公亮, 前川京子 Metabolomicsの安全性バイオマーカー研究への応用。第21回HAB研究機構学術年会 (2015.5、東京)

H. 知的財産権の出願・登録状況：

1. 特許出願
2. 実用新案登録
3. その他

(参考文献)

表 1 日本人被験者情報

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]	32 [25-35]	60 [55-64]	32 [25-35]	60 [55-65]
BMI(中央値) [検体値・幅]	21.98 [18.53-23.52]	23.11 [20.21-25.15]	20.30 [18.64-24.98]	21.27 [18.36-24.68]

表 2 人種差の比較に用いた被験者情報

検体群	日本人	白人	黒人
検体数	15	15	15
年齢(中央値) [検体値・幅]	32 [25-35]	29 [25-33]	29 [26-33]
BMI(中央値) [検体値・幅]	21.98 [18.53-23.52]	26.15 [18.01-36.64]	22.24 [17.77-34.03]

表 3 薬物性肝障害バイオマーカー探索に用いた被験者情報

検体群	発症期	回復期
検体数	12	8
年齢(中央値) [検体値・幅]	66 [29-80]	58.5 [29-80]
性別 Male/Female	4/8	3/5

表 4 測定したイオン性代謝物の大分類と主な代謝物

大分類	主な代謝物
アミノ酸	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
ペプチド	ガンマグルタミルバリン・ブラジキニン・フェニルアラニルフェニルアラニン
糖	ピルビン酸・乳酸・ブドウ糖
エネルギー	クエン酸・リン酸・マレイン酸
脂質	2-グリセロパルミチン酸・1-グリセロアラキドン酸・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・硫化アンドロゲンジオール・硫化デヒドロイソアンドロステロン
核酸	イノシン・キサンチン・ウラシル
補因子・ビタミン	ビリルビン・ビリベジン・パントテン酸

図1 日本人性差・年齢差におけるPCA解析

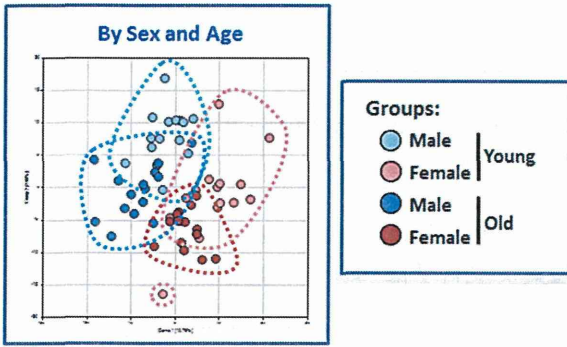


図2 人種差におけるPCA解析

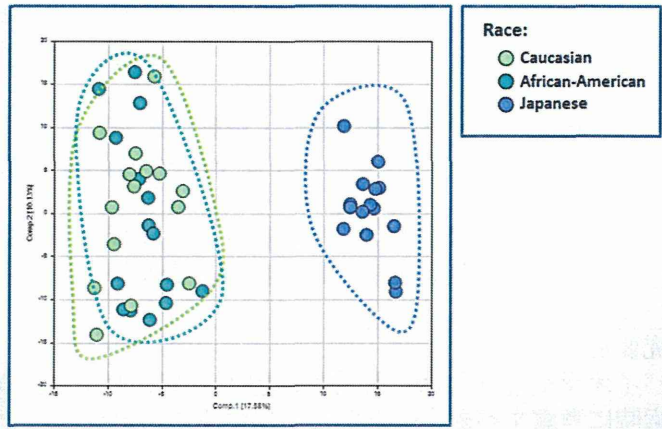


図3 肝障害バイオマーカー候補の絞り込み

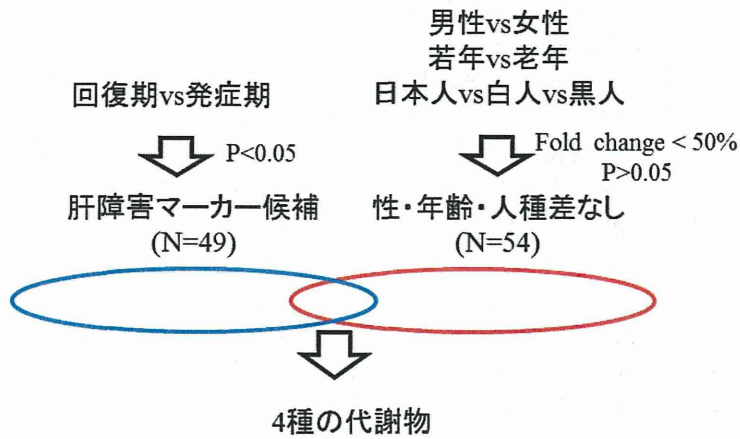
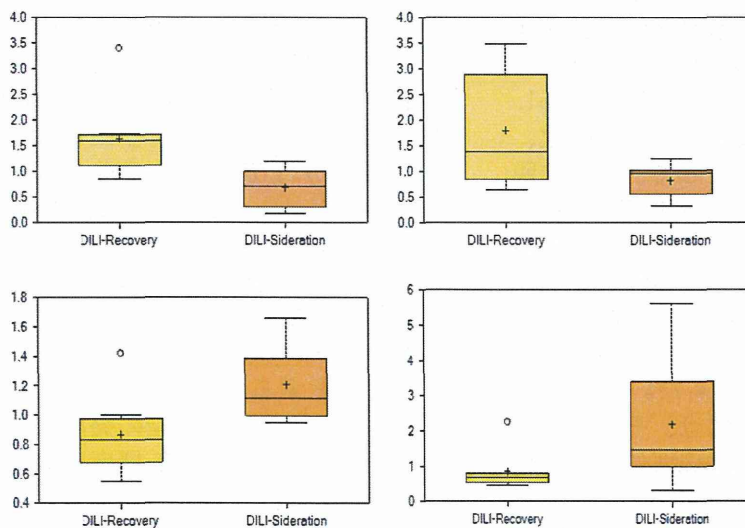


図4 選抜された肝障害バイオマーカー候補



平成 26 年度 厚生労働科学研究費補助金  
(医薬品等規制調和・評価研究事業)  
分担研究報告書

脂質バイオマーカー探索・検証のための血液試料要件の確立、及び薬物性肝障害の  
バイオマーカー探索にかかる実践的検討

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：

バイオマーカー (BM) 測定用試料として、ヒト血液試料の採取に関する必要要件を明確化し、BM 探索時に考慮すべき事項を明らかにすることを目的として、試料採取条件の違い (日本人の男女差及び年齢差、人種差) が血漿中の内在性代謝物濃度へ与える影響を、脂質に関して網羅的に明らかにした。年齢・性別の異なる日本人の健常ボランティア 60 名、及び若年男性からなる白人・黒人の健常ボランティア各 15 名から、食事制限下で血漿を採取し、抽出操作の後、高速液体クロマトグラフィー質量分析計 (LC-MS/MS) を用いて網羅的に脂質代謝物を測定した。128 種のグリセロリン脂質・スフィンゴ脂質を同定し、そのレベルを、男女間、若年・老年間、人種間で比較した。有意に異なるレベルを示した代謝物の割合は、男女間、若年・老齢間、及び人種間それぞれの比較 2 群間の最大で、総同定代謝物数の 16% (男女差)、31% (年齢差)、及び 47% (人種差) であり、年齢差と人種差において 2 倍以上のレベル差を認める代謝物が存在した。以上より、BM 探索及び検証時において、一部の代謝物に関し、年齢は考慮すべき要件であること、血漿中の代謝物プロファイルには顕著な人種差が存在することから、本邦の BM 探索には、日本人の内在性代謝物濃度に関する基礎データが必要であること、が強く示唆された。

内在性代謝物 BM を実践的に探索するため、薬物性肝障害を発症した患者の急性期と回復期の血液の網羅的脂質メタボローム解析を行い、7 種のグリセロリン脂質・スフィンゴ脂質と、6 種の酸化脂肪酸代謝物が肝細胞障害性の薬物性肝障害の発症時の BM 候補であることを見出した。これらの 13 種には、日本人健常人で男女差を認めた代謝物が 2 種、年齢差を認めた代謝物が 1 種、人種差を認めた代謝物が 9 種含まれていたが、急性期と回復期の比較 2 群間では患者の性別及び年齢に有意な偏りはないことを確認した。今後は、本 BM 候補に関して、さらに検体数を増やした検討が必要である。

K. 研究目的：

バイオマーカー (BM) は、「客観的に測定され、評価される特性値であり、正常な生物学的プロセス、病理学的プロセス、または治療的処置に対する薬理学的反応の指標」と定義され (Biomarkers Definitions Working Group. Clin. Pharmacol. Ther., 69, 89-95, 2001)、医薬品開発の効率化、及び医薬品の適正使用に資するとして、その非臨床・臨床試験での使用が注目されている。特に、臨床試験後期における開発中止の約 3 割が安全性の問題であることから、医薬品の安全性を適切に評価可能な BM の開発が望まれる。一方で、BM 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。BM 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。

BM 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、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)、 $\gamma$ -GTP などは、薬物性肝障害の診断 BM として臨床・非臨床で用いられているが、特異度・感度は十分ではない。近年、網羅的オミックス解析技術の進歩により、マイクロ RNA (miRNA) の一種である miR-122 (Hepatology. 2011, 54(5):1767-76.) や非ヒストン核タンパク質である High mobility group box-1 (HMGB-1, J Hepatol 2012, 56(5): 1070-1079) が、非臨床・臨床における薬物性肝障害の BM となりうることで報告されており、規制当局による適格性確認のためのデータの蓄積が期待される。一方、ゲノムを出発点とするオミックスの最下流に位置する内在性代謝物は、表現型の発現に深く寄与していることから、今後の BM 探索研究の対象に挙げられるであろう。

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性

差、年齢差、食事影響、日内変動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。これらの影響を網羅的に明らかにし、安定的に測定しうる BM 測定用試料の採取に関する必要要件を明確化することは、BM の利用促進を通して、新薬の効果的創出につながると期待できる。我々は、すでに、内在性代謝物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、非臨床で多用されるラット血液試料を対象に、試料採取条件（雌雄差、週齢差、食事影響、採血時間）が内在性代謝物濃度に及ぼす影響を、脂質に関して網羅的に明らかにした。さらに、健常白人の血液試料を用いて同様の検討を行い、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）が脂質代謝物濃度に及ぼす影響を、網羅的に明らかにした。一方で、血液中の代謝物濃度は、遺伝的背景の違いや食習慣、腸内細菌叢に大きく影響をうけることから、本邦の BM 探索には、日本人の内在性代謝物濃度に関する基礎データが必要と考えられる。日本における評価要件には日本人のデータが必要である。そこで、本年度は、健常日本人の血液試料を用いて、試料採取条件（男女差、年齢差）が脂質代謝物濃度に及ぼす影響を明らかにすると共に、これまでに実施した白人血液試料を用いた結果から得られた知見と比較した。さらに、これまでの研究成果に基づき、内在性代謝物 BM を実践的に探索するため、薬物性肝障害を発症した患者の急性期と回復期の血液の網羅的脂質メタボローム解析を行い、薬物性肝障害の BM 候補を探索した。

#### L. 研究方法：

##### (1) 健常日本人、白人、黒人の血液の採取と血漿の調製

健常日本人血漿は臨床試験機関に委託して収集した。年齢・性別の異なる日本人の健常ボランティア 60 名を対象に、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 時に採血を行った。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（それぞれ、JMY, JFY, JMO, JFO と略す）からなる 4 群とし、各群 15 名とした。健常ボランティアの募集条件として、①日本人であること（自己申告において、祖父母までが日本人であることにより判断）、②年齢が 30±5 歳（若年）、または 60±5 歳（老年）で、出来るだけ、BMI で、18.5 以上 25 未満、③直近一週間、医薬品の投与なし、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-A に示した。

白人・黒人血漿は ProMedDx 社 (Norton, MA,

USA) より購入した。25-33 歳までの白人または黒人の男性健常ボランティア各 15 名を対象に、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 時に採血を行った。本研究に用いた被験者の情報、及び検体の種類を表 1-B に示した。なお、白人若年男性血漿は、平成 24 年度に試料採取条件の検討に用いた血漿・血清試料と同様の個人から採血した試料を用いた。

各個人から EDTA-2K 採血管 (BD バキュテイナ™ 採血管 EDTA2K スプレーコート 367859 もしくは 366643 を使用) を用いて、上腕部の静脈より採血を行い、常法に従い、採血後 2 時間以内に血漿を分取し、直ちに -80°C に保存した。検体は、ドライアイス詰めにて国立衛研に輸送後、1 回融解して、110  $\mu$ L 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。

##### (2) 薬物性肝障害発症患者の血液の採取

薬物性肝障害を発症した患者の急性期及び回復期の血漿の収集は、3 病院で行われた。薬物性肝障害発現時における新規 BM 開発に関する探索的研究への参加の意思があり、文書による同意が得られた患者を対象とした。薬物性肝障害の診断基準は、2 病院では、ALT が正常上限の 2 倍、もしくは ALP (アルカリアルカリホスファターゼ) が正常上限を超える症例で、新たに薬物性肝障害が疑われ、DDWJ-2004 (Digestive Disease Week -Japan 2004) スコア 4 点以上 (可能性あり 以上) の患者とした。他の 1 病院は、ALT が 150 IU/L もしくは ALP が基準上限の 2 倍以上の症例とした。

採血は、薬物性肝障害の発症を確認した時点 (急性期) と改善を確認した時点 (回復期) とし、入院患者は早朝空腹時に採血を実施し、外来患者は随意時実施した。EDTA-2Na 添加遠心採血管で採血した血液は、速やかに転倒混和し、遠心分離 (3000 rpm, 10 min, 15-20 °C) を行い、血漿を分取後、1 mL ずつ、クライオジェニックバイアルに分注し、-80 度で凍結保存した。検体は、ドライアイス詰めにて国立衛研に輸送後、1 回融解して、110  $\mu$ L 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。

##### (3) 脂質抽出・メタボローム測定

ヒト血漿 (各 100  $\mu$ L) 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。

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 の保時時間、精密質量及びマススペクトルに基づき、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、Mann-Whitney U-test (男女差、年齢差、人種差の比較) による統計解析を行い、 $p < 0.05$  を有意な差と判定した。さらに、同定できた全ピークを用いて、部分最小二乗法判別分析 (PLS-DA) を行い (SIMCA-P+ 12, Umetrics, Umea, Sweden)、群間の類縁性や個体間変動を把握した。

薬物性肝障害患者の血漿サンプルでは、UPLC-TOFMS のネガティブイオンモードで検出されたすべてのピークを用いて急性期と回復期の 2 群間で直交部分最小二乗法判別分析 (OPLS-DA) を行い (SIMCA-P+ 12)、スコアプロットより群間の類縁性や個体間変動を把握した。OPLS-DA 解析の S-プロットにより、2 群の判別に寄与するピークを抽出し、UPLC-TOFMS の保時時間、精密質量及びマススペクトルのデータに基づき、代謝物の同定を行った。Mann-Whitney U-test による統計解析を行い、 $p < 0.05$  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、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、 $p < 0.05$  を有意な差と判定した。

(倫理面での配慮)

健常日本人の血液試料を用いた研究は、研究実施機関である国立医薬品食品衛生研究所、及び研究実施医療機関等の研究倫理審査委員会の承認のもと実施した。本研究は、「臨床研究に関する倫理指針」(平成 26 年 12 月 22 日改訂) を遵守した。全ての健常ボランティアには、説明・同意文書にて、本研究の内容や同意撤回の権利等を十分説明した後、自由意志により文書で同意を得た。また全ての生体試料および情報は委託先の医療機関で連結不可能匿名化されてから国立衛研に提供された。

白人・黒人の血液試料を用いた研究は、ProMedDx 社から市販されている血漿を使用した。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への申請は非該当とすることが認められている。

薬物性肝障害患者の BM 探索は、国立医薬品食品衛生研究所倫理委員会、及び各医療施設の倫理審査委員会の承認のもとで行っており、被験者の同意も適正に得て行った。個人識別情報は対象試料とは完全に切り離されているため、個人情報の漏洩の問題はない。

### M. 研究結果：

1) 健常日本人、白人、黒人血漿中の脂質代謝物の同定と群間の判別

年齢及び性別の異なる 60 名の健常日本人、及び白人・黒人若年男性各 15 名の血漿から Bligh & Dyer 法の下層 (有機層) においてネガティブイオンモードで 128 種のグルセロリン脂質及びスフィンゴ脂質が同定された。検出された脂質クラスの内訳を表 2 に示した。

まず、同定された 128 種の脂質を用いて、多変量解析により群間の類縁性や個体間変動を把握した。日本人の若年男性、若年女性、老年男性、老年女性 (それぞれ、JMY, JFY, JMO, JFO と略す) 各 15 名からなる 4 群における部分最小二乗法判別分析 (PLS-DA) の結果を図 1-A に示す。若年・老年間で不完全ながら群間の分離が認められたが、同じ年齢層の男女間では明確な分離は認められなかった。日本人、白人、黒人の若年男性 (JMY, CMY, AMY と略す) 各 15 名からなる 3 群における PLS-DA の結果を図 1-B に示す。日本人と白人・黒人間で明確な群間の分離が認められたが、白人と黒人間の分離は不明瞭であった。

一方、Bligh & Dyer 法の上層のギ酸メチル画分 42 種の脂肪酸代謝物が同定された。脂質クラスの内訳は、リノール酸代謝物が 2 種、リノレン



酸代謝物が2種、アラキドン酸(AA)代謝物が22種、エイコサペンタエン酸(EPA)代謝物が8種、ドコサヘキサエン酸(DHA)代謝物が8種であった。

## 2) 日本人男女間の脂質代謝物レベルの比較

128種のグルセロリン脂質及びスフィンゴ脂質のうち、若年男女の比較では10種が、老年男女の比較では20種が性差を示した。表3に有意差を示した脂質クラスの内訳と増減の方向を示した。平成24年度に実施した白人と同様、SM分子種の性差が日本人においても認められたが、白人と比較して日本人では有意差を認めた分子種数は少なく、変動倍率は小さかった。すなわち、白人では同定された22種のスフィンゴミエリン

(SM)分子種のうち、若年で8種、老年で19種が性差を示した(有意差を示した分子種の男性に対する女性の変動倍率1.24-1.89倍)が、日本人では、同定された26種のうち、若年で1種、老年で11種のみが性差を示した(変動倍率1.15-1.39倍)。さらに、老年では、SM以外に、高度不飽和脂肪酸を含有すると予想されるホスファチジルコリン(PC)分子種、ホスファチジエタノールアミン(PE)分子種が性差を示し、本結果は白人の老年男女から得られた性差の結果と一致した。老年で日本人・白人ともに性差を認めた代表的な分子種として、41:2 SM(日本人の老年男性血漿に対する老年女性血漿の比1.39倍、白人の老年男性血漿に対する老年女性血漿の比1.67倍)や40:6PE(同1.39倍、1.60倍)が挙げられた。

脂肪酸代謝物では、老年においてのみ男女差を示す代謝物が1種見出され、17-HDoHE(老年男性血漿に対する老年女性血漿の比0.74倍)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。また、日本人男女間で有意差を示した酸化脂肪酸代謝物は、平成24年度に実施した白人男女間で有意差を示した代謝物とは一致しなかった。

## 3) 日本人若年・老年間の脂質代謝物レベルの比較

128種のグルセロリン脂質及びスフィンゴ脂質のうち、若年男女の比較では40種が、老年男女の比較では31種が年齢差を示した。表3に有意差を示した脂質クラスの内訳と増減の方向を示した。有意な増減を認めた代謝物の大多数は、男女を問わず、若年と比較して老年で増加が認められ、脂質クラスは多岐にわたっていた(表3)。一方、エーテルPC(ePC)は、男性で3種、女性で6種、若年と比較して老年で減少した。代表的な

分子種として、38:4ePC(男性若年血漿に対する男性老年血漿の比0.72倍、女性若年血漿に対する女性老年血漿の比0.56倍)が挙げられた。ePC分子種の老年での減少は、白人では認められず、日本人に特有であった。

脂肪酸代謝物では、男性で9種、女性で7種が若年・老年間で有意なレベルの違いを示し、うち7種の代謝物は、男女共通して年齢差を示した。これらの代謝物は、エイコサペンタエン酸(EPA)またはドコサヘキサエン酸(DHA)のリポキシゲナーゼ代謝物であり、すべての代謝物で、若年と比較して老年で有意に高いレベルを示した。特に8-hydroxyeicosapentaenoic acid(8-HEPE、若年に対する老年の比、男性で1.57倍、女性で2.19倍)や10-HDoHE(同、1.30倍と2.10倍)は、若年と比較して老年で顕著に増加した。平成24年度に実施した白人と比較すると、白人・日本人で一致して年齢差を示した代謝物は5-HEPEのみであり、男性において、若年と比較して老年で有意に高いレベルを示した(白人で2.24倍、日本人で1.79倍)。

## 4) 人種間の脂質代謝物レベルの比較

128種のグルセロリン脂質及びスフィンゴ脂質のうち、白人と日本人の若年男性間の比較では45種が、黒人と日本人の若年男性間の比較では60種が性差を示した。表3に有意差を示した脂質クラスの内訳と増減の方向を示した。日本人と比較して、白人または黒人で有意な増減を示した分子種は、白人・黒人間で共通するものが多かったが、脂質のクラスは多岐にわたっていた。変化率が最大の分子種としては、日本人と比較して、白人及び黒人で有意に高いレベルを示した分子種が40:5 PC(18:0/22:5 PC、日本人若年男性に対する白人若年男性の比2.03倍、日本人若年男性に対する黒人若年男性の比2.58倍)であり、白人及び黒人で有意に低いレベルを示した分子種が36:5 PC(16:0/20:5 PC、日本人若年男性に対する白人若年男性の比0.27倍、日本人若年男性に対する黒人若年男性の比0.36倍)であった。その他、特徴的な変化としては、日本人若年男性と比較して、黒人・白人男性では、数種のSM分子種が有意に低いレベルで存在していた。一例として、42:2SM(日本人若年男性に対する白人若年男性の比0.64倍、日本人若年男性に対する黒人若年男性の比0.58倍)が挙げられた。

## 5) 薬物性肝障害のBM探索

薬物性肝障害の発症時における血漿12名、回復期における血漿8名が集積された。同一人より急性期と回復期の血漿がペアで集積可能であ

った症例が8名であり、急性期のみ集積され、回復時の血漿が欠番である症例が4名であった。また、臨床病型としては、肝細胞障害型が9名、混合型が2名、不明が1名であった。患者の内訳と臨床検査値を表4に示す。

総計12名の急性期と回復期の血漿20サンプルからBligh & Dyer法の下層（有機層）において、UPLC-TOFMSのネガティブイオンモードで247種のピークが検出された。検出されたすべてのピークを用いて、急性期と回復期の2群におけるOPLS-DA解析によるスコアプロットを図2に示す。全臨床病型（肝細胞障害型・混合型・不明）を含む12患者20サンプル（図2A）では、混合型のサンプル（サンプル番号23, 27）がプロットのほぼ中央に位置し2群間の判別が不明瞭であった（ $R^2Y=0.787$ ,  $Q^2=0.263$ ）。一方、肝細胞障害型のみを含む9患者15サンプル（図2B）では2群間の判別が明瞭であり、本モデルを用いた急性期と回復期のサンプル判別の予測性も良好であった（ $R^2Y=0.973$ ,  $Q^2=0.639$ ）。

これらより、肝細胞障害型と混合型は、ALT値等の臨床検査値の変動パターンが大きく異なると共に（表4）、内在性代謝物の変動パターンも異なると予想され、それぞれのサンプルは別々にBM候補を探索すべきと考えた。そこで、まず肝細胞障害型サンプルのみを用いたS-プロットから、急性期と回復期の判別に寄与するピークとして、 $|p| > 0.05$ かつ $|p(\text{corr})| > 0.6$ の範囲にあるピークを抽出したところ、11種のピークが見出された（図2C）。このうち、8種が同定可能であり、統計学的有意差を認めなかった1種のピークを除く7種のピークにおいて回復期のレベルが急性期のレベルより高かった。これらの分子種レベルの各個人における変動を図3に示した。

酸化脂肪酸解析では、Bligh & Dyer法の上層のギ酸メチル画分から52種の脂肪酸代謝物が同定された。脂質クラスの内訳は、リノール酸代謝物が4種、リノレン酸代謝物が3種、アラキドン酸（AA）及びその代謝物が23種、エイコサペンタエン酸（EPA）及びその代謝物が11種、ドコサヘキサエン酸（DHA）及びその代謝物が11種であった。このうち、急性期と回復期の2群間で有意にレベルが異なる代謝物が6種見出された。4種の酸化脂肪酸の変動を図4に示した。有意差の認められた4種の代謝物は回復期と比較して急性期において有意に高いレベルを示した。

#### D. 考察：

1) 日本人における血漿中の脂質メタボローム探索における試料採取要件

グルセロリン脂質及びスフィンゴ脂質のうち、日本人で有意な性差を示した代謝物の割合は、若年及び老年で、それぞれ7.8%（10/128種）及び15.6%（20/128種）であり、有意差を示した代謝物の変動倍率は、0.75倍～1.64倍の範囲にあった。検出された代謝物が一部異なるため、白人と日本人間の厳密な比較は難しいが、平成24年度に実施した白人において性差を示した代謝物の割合は、若年及び老年でそれぞれ10.9%（14/128種）及び35.9%（46/128種）であり、変動倍率は、0.60倍～1.89倍の範囲にあったことから、日本人の血漿中のグルセロリン脂質及びスフィンゴ脂質代謝物の性差は、白人より小さく、臨床的意義は低いことが示唆される。また、若年において性差を示した代謝物は、白人と日本人で全く一致しなかったが、老年で性差を示した代謝物は、SM分子種や不飽和度の高いPE, PC分子種で一部、一致が認められた。

グルセロリン脂質及びスフィンゴ脂質のうち、日本人で有意な年齢差を示した代謝物の割合は、男性及び女性で、それぞれ31.3%（40/128種）及び24.2%（31/128種）であり、有意差を示した代謝物の変動倍率は、0.56倍～2.28倍の範囲にあった。平成24年度に実施した白人において性差を示した代謝物の割合は、若年及び老年でそれぞれ0.8%（1/128種）及び25.8%（33/128種）であり、変動倍率は、2.04倍（老年で増加する代謝物のみ）の範囲にあったことから、日本人の血漿中のグルセロリン脂質及びスフィンゴ脂質代謝物の年齢差は、白人より大きいことが示唆される。男性及び女性で年齢差を示した代謝物は、一部、日本人と白人で一致していたが、ePC分子種の老年での減少は、白人では認められず、日本人に特有であった。

また、血漿中の酸化脂肪酸代謝物についても、そのレベルが性差・年齢差を示す代謝物が見出されたが、これらは、日本人と白人でほとんど一致しなかった。

以上より、日本人において一部の血漿中の脂質代謝物レベルは、性差・年齢差を示すことが明らかになり、BM探索・検証の際に注意を要することが示唆された。

2) 血漿中の脂質メタボローム探索における人種差の影響

グルセロリン脂質及びスフィンゴ脂質のうち、日本人と白人または黒人間で有意な人種差を示した代謝物の割合は、日本人と白人の間では35.2%（45/128種）、日本人と黒人の間では46.9%（60/128種）であり、有意差を示した代謝物の変動倍率は、0.27倍～2.58倍の範囲にあった。血

液中の代謝物濃度は、遺伝的背景の違いや食習慣、腸内細菌叢に大きく影響をうけると考えられ、本邦の BM 探索には、日本人の内在性代謝物濃度に関する基礎データが必要であることが強く示唆された。また、海外の論文等で報告された脂質メタボローム BM を日本人で検証する際には、基準となる健常人のレベルが大きく異なる場合があることを念頭に置くべきと考えられた。

### 3) 薬物性肝障害の BM 探索

すでに、薬物性肝障害に関して血清中 ALT と  $\gamma$ -グルタミルシトルリンのレベルの組み合わせが、他の肝臓疾患と薬物性肝障害を判別できる疾患 BM であることが報告されている (J Hepatol 2011, 55: 896-905.) また、アセトアミノフェン (APAP) 多量服用による肝障害発症小児患者では、健常小児や APAP を治療投与量範囲内で服用して肝障害非発症小児患者と比較して、血清中のアシルカルニチンの濃度が高いことも報告されている

(Biomark Med 2014, 8(2), 147-159.)。今回、我々は薬物性肝障害を発症した患者の急性期 (12 名) と回復期 (8 名) の血漿を用いたメタボローム測定結果を多変量解析を用いて解析したところ、臨床病型 (肝細胞障害型・混合型) に分けて解析すべきと考えられた。そこで、肝細胞障害型の薬物性肝障害の急性期と回復期を判別可能な BM 候補を探索したところ、7 種のグルセロリン脂質・スフィンゴ脂質と、6 種の酸化脂肪酸が見出された。これらの 13 種には、日本人健常人で男女差を認めた代謝物が 2 種、年齢差を認めた代謝物が 1 種、人種差を認めた代謝物が 9 種含まれていた。一方で、今回のバイオマーカー探索のデザインでは、急性期と回復期の血液は原則として同一人物から採取しており、欠損値を考慮した場合も急性期と回復期の 2 群間では患者の性別及び年齢に有意な偏りはなかった。6 種の酸化脂肪酸代謝物は急性期でレベルが高く、いずれも炎症反応に進展に関与していることが示唆される代謝物であった。一方で、グルセロリン脂質、スフィンゴ脂質の BM 候補 7 種は、回復期と比較して急性期でレベルが低く、薬物性肝障害発症時の患者の栄養状態の悪化を反映している可能性も考えられる。

今回の発症患者は、被疑薬が一樣ではなく、薬物性肝障害の診断基準であり、感度を示す DDW-J2004 スコアも多様であることから、今後は、これらの情報にも考慮した解析が必要とも考えられる。薬物性肝障害の急性期のメタボロームレベルを日本人健常人と比較することも重要である。さらに、患者検体の集積を継続し、検出力を確保した状態での解析を行う必要がある。

## E. 結論

試料採取要件の違いが、血漿中脂質メタボロームレベルに与える影響を明らかにするため、食事制限下で、性別・年齢の異なる日本人を対象に血漿メタボローム解析を行った。大多数の代謝物は、性別・年齢により、そのレベルが大きく変化することはなかったが、一部の脂質代謝物は、若年・老年間で 2 倍以上のレベル差が認められ、BM 探索及び検証時において、探索した BM 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、性差・年齢差を示す代謝物は、日本人と白人で一致する分子種も認められたが、一部、日本人特有の分子種も認められた。

また、日本人、白人、黒人の若年男性を対象に血漿メタボロームの人種差を解析した結果、日本人と黒人または白人の間では、脂質メタボロームプロファイルが大きく異なることが示され、日本人の BM 探索には、日本人の基礎データの蓄積が重要と考えられた。

内在性代謝物 BM を実践的に探索するため、薬物性肝障害を発症した患者の急性期と回復期の血液の網羅的脂質メタボローム解析を行い、7 種のグルセロリン脂質・スフィンゴ脂質と、6 種の酸化脂肪酸代謝物が肝細胞障害性の薬物性肝障害の発症時の BM 候補であることを見出した。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表 :

### 1. 論文発表

1) Saito K, Maekawa K, Ishikawa M, Senoo Y, Urata M, Murayama M, Nakatsu N, Yamada H, Saito Y.: Glucosylceramide and Lysophosphatidylcholines as Potential Blood Biomarkers for Drug-Induced Hepatic Phospholipidosis. *Toxicol Sci.*, 2014; 141: 377-386.

2) Saito K, Ishikawa M, Murayama M, Urata M, Senoo Y, Toyoshima K, Kumagai Y, Maekawa K, Saito Y. Effects of sex, age, and fasting conditions on plasma lipidomic profiles of fasted sprague-dawley rats. *PLoS One.*, 2014; 9: e112266.

3) Saito K, Maekawa K, Pappan KL, Urata M, Ishikawa M, Kumagai Y, Saito Y. Differences in metabolite profiles between blood matrices,

ages, and sexes among Caucasian individuals and their inter-individual variations.

Metabolomics, 2014; 10: 402-413.

4) 前川京子、斎藤嘉朗、薬物性肝障害の遺伝的素因、別冊「医学のあゆみ」内科領域の薬剤性障害 肝・肺を中心に 2014年11月：11-18.

## 2. 学会発表

1) Saito K, Urata M, Toyoshima K, Ishikawa M, Murayama M, Tajima Y, Senoo Y, Takemoto K, Kumagai Y, Maekawa K, Saito Y.: Comparison of plasma lipidomic profile of humans with preclinical animals. 19th North American ISSX and 29th JSSX Joint Meeting (2014.10, San Francisco, CA, USA).

2) Maekawa K, Saito K, Pappan K, Ishikawa M, Urata M, Tajima Y, Murayama M, Kumagai Y, Saito Y.: Impact of gender, age, fed/fasted state of rats on their serum hydrophilic metabolites. 19th North American ISSX and 29th JSSX Joint Meeting (2014.10, San Francisco, CA, USA).

3) Saito Y, Saito K, Ishikawa M, Urata M, Tajima Y, Inoue M, Kumagai Y, Pappan K, Maekawa K.: Metabolomic profiles in rat blood vary between genders, ages and fasting conditions, and their qualitative comparisons with human samples. 2014 AAPS Annual Meeting and Exposition (2014. 11 San Diego, CA, USA).

4) Maekawa K, Saito K, Ishikawa M, Minamino M, Kumagai Y, Saito Y.: Metabolomic biomarker exploration highlights issues of species specificity. KSCPT-JSCPT Joint symposium (2014.11, Busan, Korea).

5) 斎藤嘉朗、齊藤公亮、児玉進、熊谷雄治、前川京子：ヒト試料を用いたバイオマーカー研究のためのレギュラトリーサイエンス。第35回日本臨床薬理学会学術総会(2014.12, 愛媛)

## 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

特になし