

201427031B

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

血液・尿中バイオマーカーの非臨床・臨床
適用に関する評価要件の確立研究
(H24-医薬-指定-028)

平成 24-26 年度 総合研究報告書

研究代表者：斎藤 嘉朗 国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部
研究分担者：熊谷 雄治 北里大学 医学部 附属臨床研究センター
鈴木 孝昌 国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部
前川 京子 国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部

目 次

I. 研究代表総合報告書

血液・尿中バイオマーカーの非臨床・臨床適用に関する評価要件の 確立研究・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	2
齋藤 嘉朗（国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部）	

II. 研究分担総合報告書

副作用バイオマーカーの動向調査およびヒト副作用試料の収集・バ ンク化・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	41
熊谷 雄治（北里大学 医学部 附属臨床研究センター）	

尿中プロテオーム解析によるバイオマーカーの検出およびその評価 要件の確立・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	44
鈴木 孝昌（国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子医薬部）	

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 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・	81
齋藤 嘉朗（国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部）	

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・・・・・・・・	90
前川 京子（国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部）	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表と別刷

研究成果の刊行に関する一覧表・・・・・・・・・・・・・・・・・・	105
----------------------------------	-----

I. 研究代表総合報告書

血液・尿中バイオマーカーの非臨床・臨床適用に関する評価要件の確立研究

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
研究分担者 北里大学医学部附属臨床研究センター 教授 熊谷 雄治
研究分担者 国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子医薬部 室長 鈴木 孝昌
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
研究協力者 北里大学医学部附属臨床研究センター 特任助教 田中 理英子
研究協力者 国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部 主任研究官 齊藤 公亮

研究要旨：

バイオマーカー測定用試料として、血液・尿試料の採取や非臨床動物からヒトへの外挿性に関する評価要件を明確化し、バイオマーカー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・保管条件の違いが血液・尿中の蛋白質・内在性代謝物濃度へ与える影響を、ラット及びヒトを対象に網羅的に明らかにした。

1) 資試料の収集とデータベース構築

解析用試料として、正常ラット、ヒト健常人（白人、黒人、日本人）、およびヒト副作用試料の収集を行った。薬物性肝障害に関しては、消化器領域の専門家が参加する臨床研究事務局を設置し、具体的な検体の採取・取り扱い手順を踏まえた資試料収集体制を構築した。一方、本研究は複数の医療機関、多科にわたるものであり、臨床情報の書式が統一されておらず、情報管理が煩雑なものとなっていた。そこで、高品質かつ効率的な情報管理のための IT 技術を用いた新たなデータベース構築を行った。この体制は薬物性肝障害のみではなく、各診療領域におけるヒト副作用試料を患者背景情報・副作用情報とともに収集可能にするものであり、薬剤性臓器障害の早期発見・病勢判断のための感度、特異度の高いマーカー検索が可能となることが期待される。

2) バイオマーカー探索時に考慮すべき評価項目を明らかにするため、蛋白質は尿を、内在性代謝物は血液を対象に、試料採取や保管要件の検討を行った。

2-1) 蛋白質

尿を用いて、まずラットを対象に、LC-MS を用いたショットガンプロテオミクスによる高感度分析法を確立した。発現量の多い一部の蛋白質の存在が、より発現量の低い蛋白質の検出の障害となっていたため、尿の有機溶媒処理条件に関する検討をまず行い、1 回の分析で約 3 千種の蛋白質を測定しうる系を確立した。さらに、性差、絶食時間、採血時間、週齢差などの採取条件が蛋白質レベルに与える影響を検討した結果、性差が最も大きく影響し、雄または雌特異的に発現している蛋白質を同定した。週齢差については、高週齢の雄ラットの一部において高発現量の蛋白質が大きなバラツキの要因となることを明らかにした。絶食に関しては大きな影響は認められなかった。

次に、同様の手法を用いてヒト尿の解析を行った。ヒト尿では、千種強の蛋白質を同定した。健常白人由来のヒト尿を対象に、性差、年齢差を示す蛋白質を同定したが、サンプル間での各蛋白質レベルのバラツキはラットに比べて大きく、主成分分析では、性差、年齢差ともに明らかな傾向を示さなかった。Body Mass Index (BMI) による肥満度との関連を検討したところ、肥満度により主成分分析プロットが群分けされる傾向を見出した。次に健常日本人由来の尿サンプルに関しても解析を行い、白人と同様、性差、年齢差を示す蛋白質を同定すると共に、個人差が大きいことを確認し、そのバラツキの原因となる蛋白質群を同定した。

2-2) イオン性代謝物

血液（主として血清）を対象に、イオン性代謝物に関して、GC-MS および LC-MS を用いて解析を行った。まずヒト血漿及び血清間における顕著な代謝物レベルの差異が認められたが、どちらの基質においても同様の性差・年齢差が認められ、個々の代謝物の個人差も同程度であった。また、凍結融解に関しては一部ではあるが代謝物レベルに差異が認められ、その影響は血清において少なかった。一

方、健常日本人における性差・年齢差は、健常白人における差よりも顕著であった。また、日本人、白人、及び黒人間における人種差では、日本人とそれ以外の人種において顕著であり、白人と黒人間の差はほとんど認められなかった。

非臨床動物(ラット)を用いた検討では、ヒトと同様にイオン性代謝物レベルに性差・年齢差が認められたが、ヒトとラットにおいて共に測定可能であった代謝物は全体の約2/3であり、そのほとんどがヒト・ラット間で共通した性差・年齢差を示さなかった。また、食餌の有無によってほとんどの代謝物に差異が認められ、一部ではあるが採血時間(朝と昼)によっても代謝物レベルに差異が認められた。一方、絶食時における絶食時間の長さは代謝物レベルにほとんど影響を与えなかった。

2-3) 脂質代謝物

血液(主として血漿)を対象に、脂質代謝物に関して、LC-MS (MS) を用いて解析を行った。ラットの解析で、血漿中のバイオマーカー探索及び検証時において、食餌の有無による代謝物のレベル差は最も大きなものであった。また、一部の代謝物では、性差及び年齢差を示す代謝物が認められたが、採血時間(午前採血・午後採血)は大きな差をもたらさなかった。健常白人を対象にした解析により、血液凝固反応に関与する代謝物(プロスタグランジン等)が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が、測定用試料として好ましいと考えられた。またラットと同様、白人においても、一部の代謝物に関し、性別及び年齢は考慮すべき要件であると考えられた。さらに、一部の代謝物では、凍結融解の影響は大きく、避けるべきと示された。ラットとヒトの血中脂質代謝物の性差・年齢差に関する外挿性は低く、それぞれの探索時に別々に考慮する必要性が示唆された。また健常日本人を対象とした解析により、大多数の代謝物は、白人に比して、性差・年齢差は小さいものであったが、一部では、若年・老年間で2倍以上のレベル差を認め、年齢差は注意すべき要因と考えられた。また、イオン性代謝物同様、日本人と白人または黒人間で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、日本人の基礎データの蓄積が重要と考えられた。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。

代謝物に関しては、これらの結果から、血液中のバイオマーカー探索の際には、a) 用いる基質は血漿・血清のどちらを用いても良いが、イオン性代謝物では凍結融解の影響を受けにくい血清が、脂質代謝物では血液凝固でレベルが大きく変化する分子種が多いことから血漿が好ましいこと、b) 凍結融解の影響は比較的小さい代謝物が多いが、試料は分注して、できるだけ凍結融解を避けること、c) 背景因子(性・年齢・人種)の影響に留意し、その影響を受けにくい代謝物を選ぶこと、d) ラットとヒト間の種差が大きく、外挿が難しいこと、e) 絶食・非絶食を統一し、採血時間も可能な限り統一すること、f) 日本人と白人・黒人間の差は比較的大きいため、分子によっては注意すること、が重要であると考えられた。

3) 薬物性肝障害のマーカー候補解析

内在性代謝物バイオマーカー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・尿の解析を行った。尿蛋白質から複数のバイオマーカー候補を同定したが、炎症反応の初期段階に誘発されることが知られている Leucine-rich α 2-glycoprotein が含まれていた。またイオン性代謝物では49種が、脂質代謝物では13種が有意差を示したが、このうち、イオン性4種、脂質4種の代謝物が性、年齢、人種の影響を受けにくいものであった。

4) 結論

3年間の研究結果から、臨床試験においてバイオマーカーを探索する際には、性、年齢、人種、凍結融解の回数等の試料背景が交絡因子となりうることを示唆された。バイオマーカーの探索・検証における評価要件として、各因子の影響を明確に示すことが必要である。さらに本研究では、各分子毎にその影響の大きさを明らかにしたことから、今後、論文発表後に国立衛研のホームページ上に公開してバイオマーカー探索時に広く利用頂く予定である。

A. 研究目的:

バイオマーカー(バイオマーカー)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バイオマーカーの開発が望まれる。一方で、バイオマーカーの適格性(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、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)、 γ -GTPなどは、薬物性肝障害の診断バイオマーカーとして臨床・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.) や非ヒストン核蛋白質である 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バイオマーカーとなりうる事が報告されている。しかし血液や尿からバイオマーカーを探索・検証する際に適用しうる評価要件は存在しない。評価要件として、特に問題となるのは、測定用試料の採取条件、試料背景因子や保管条件である。

評価要件の確立のための試料としては、健常のヒトまたはラットの血液および尿を対象にした。一方で、実際の副作用試料を対象にするため、複数診療科にまたがる臨床研究体制を構築し、薬物性肝障害等の臨床試料と背景情報を収集した。さらに収集した症例情報の統一的管理・閲覧のためのデータベースも併せて構築した。

蛋白質マーカーについては、比較的微量な蛋白質を測定しやすい尿を対象に、LC-MS を用いたショットガンプロテオミクス法による網羅的定量プロテオーム解析を応用し、まず実験動物として汎用されるラットを用いて、性差、年齢、絶食、採取時間などの試料採取条件が与える影響に関して知見を得た。次に、同様の解析を健常白人に関して行い、評価要件としての解析を行うとともに、ラットデータとの比較による種差の検討を行い、実験動物からヒトへの外層性に関して考察した。さらに、健常日本人についても同様の検討を行うと共に、マーカーとして致命的になる個体差が大きい蛋白質の同定を行い、ネガティブリストを作成した。さらに薬物性肝障害患者の尿サンプルを用いた、バイオマーカー候補蛋白質の実践的

探索を行い、これまでの知見からマーカー候補分子の選択に関して考察を行った。

代謝物に関しては、尿中に脂質代謝物がほとんど含まれないため、血液を対象に検討を行った。種は、ラットおよびヒト(白人、日本人、黒人)とした。血液のマトリックスとしては、血漿および血清が、用いられる。従って、まず内在性代謝物濃度への試料採取条件(血漿・血清差)の検討を行い、さらに試料背景(年齢差、性差、人種差)や採取条件(採取時間)及び試料保管条件(連続凍結融解の有無)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。さらに、本研究では、評価要件案作成時の実例を得るべく、得られた知見の利用を兼ねて薬物性肝障害のバイオマーカー探索を行った。

B. 研究方法:

1) ラット血液・尿の採取

8週齢及び10週齢の雄性・雌性 Cr1:CD(SD) ラットは日本チャールス・リバー株式会社 (Yokohama, Japan) より購入し、それぞれ10週齢及び30週齢まで、国立医薬品食品衛生研究所の動物実験施設にて馴化した。実験日前日までは、飼料(CRF1)及び水は自由摂取とした。馴化したラットは実験日前日に、非絶食群、16時間、または22時間絶食群に振り分け、午前10時(午前採取群)もしくは午後4時(午後採取群)に、イソフルラン麻酔下で腹大動脈より全採血し、常法に従ってEDTA血漿および血清を採取した。血漿と血清は採血後2時間以内に分取し、直ちに -80°C に保存した。尿は代謝ゲージにて絶食期間中に採取した。検体は、1回融解して、分注操作を行った後、再度凍結し、2回目に融解した検体を測定用試料とした。なお、検討した要因は、雌雄、年齢、食餌の有無、採血時間(午前・午後)であり、それぞれの要因の比較に用いた全7群のラットの検体情報を表1にまとめた。

2) 健常白人、黒人、日本人の血液の採取

白人血漿・血清・尿、及び黒人血漿は ProMedDx 社 (Norton, MA, USA) より、適正なインフォームドコンセントを確認後、購入した。年齢・性別の異なる白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、採取当日の午前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時に採取を行った。白人被験者は、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2に

示した。黒人は、若年男性 15 名のみを対象とし、上記の白人と同様の条件下で採取を行った。

3) 健常日本人の血液・尿の採取

健常日本人血液・尿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、採取の前日の午後 8 時より、採取当日の午前 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 時に採取を行った。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 3 に示した。

血液中のメタボロームレベルに及ぼす人種差の影響を検討するため、日本人、白人、黒人若年男性の血液中のメタボロームレベルを比較した。被験者の情報を表 4 に示した。

4) ヒト血漿・血清の調整と保存条件

各個人から EDTA-2K 採血 (BD バキュティナ™ 採血管 EDTA2K スプレーコート 367859 もしくは 366643 を使用) 及び凝固剤を用いない条件下 (BD バキュティナ™ 採血管 凝固促進用シリカ微粒子入り 367820 を使用) で上腕部の静脈より採血を行い、常法に従い、同一個人より採血後 2 時間以内に血漿・血清（それぞれ約 3mL）を分取し、直ちに -80℃ 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、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 4）。尿も同様とした。

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、白人若年男性の血漿及び血清に関しては、凍結融解を 10 回（-80℃ 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 2）。

5) 薬物性肝障害発症患者の血液・尿の収集

5-1) 北里大学における薬物性肝障害資試料の収集

北里大学医学部附属臨床研究センターおよび北里大学東病院消化器内科が中心となり、計画を作成した（図 1）。各診療科において発生した薬物性肝障害患者を対象とし、肝障害発生時および回

復時の血液・尿検体を採取することとした。また、検体を研究代表者の所属機関である国立医薬品食品衛生研究所へ匿名化の上送付する手順を作成した。被験者の選択基準、除外基準は以下の通りである。

【患者群の選択基準】

1) 薬物性肝障害と診断された患者

<診断基準>

ALT が正常上限の 2 倍、もしくは ALP 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た者

2) 本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

【患者群の除外基準】

1) 急性・慢性ウイルス肝炎、無症候性キャリア、アルコール性肝障害、過栄養性脂肪肝、自己免疫性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、胆石症、閉塞性黄疸、ショック肝などの疾患を有する者

2) DDWJ-2004 スコア 4 点以下の者

3) 医師が本臨床研究の対象として不適格と判断した者

本研究は消化器内科日高中央医師を臨床研究責任者とし、北里大学・病院倫理委員会の審査を受け、施行を承認された。円滑な遂行のため、関連する診療科において、本研究責任者、研究分担者が訪問し、研究計画の説明会を複数回行った。また、研究施行に必要な資料をとりまとめたファイル作成、ss の作成を行い、配布した。また複数の診療科をまたいだ臨床情報の一元化を目的とし、オンラインデータベースの構築を試みた。

本臨床研究体制は以下の通りである。

・事務局

- 北里大学医学部臨床研究センター
- ・CRC 派遣（IC 取得補助、検体採取）
- ・CRF 作成
- ・データベース作成・管理

・研究参加診療科

-北里大学東病院 消化器内科（研究責任者）、消化器外科、精神神経科、整形外科、神経内科、北里大学病院消化器内科

以上のような研究の流れをとりまとめたポケットメモを関連する医師に配布、該当症例出現時の注意を喚起した（図 2-3）。

オンラインデータベースシステム（図 4 に概要）は、データサーバは本学医学部情報センター内に

以下のラック式のサーバを設置した。

- ・ProLiant DL320 (HP 製)
- メモリ: 8GB、ハードディスクドライブ: 500GB (RAID1)、OS: Windows Server 2003 R2
- ・データ管理アプリケーション

Promasys ver. 7.1 (OmniComm 社)

データベースへのアクセス権限は以下の通りとした。

システム管理者: 北里大学臨床研究センター

データ入力者: 北里大学病院消化器内科 医師

北里大学東病院消化器内科 医師

閲覧者: 国立医薬品食品衛生研究所

5-2) 国立衛研における副作用試料の収集

重症薬疹、横紋筋融解症、および間質性肺炎の資試料の収集を別途行った、また薬物性肝障害の血液についても収集を行ったが、薬物性肝障害としての判定基準は、北里大学での収集と若干異なる場合もあった。

5-3) 試料の収集と保管

採取は、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・採尿を実施し、外来患者は随時実施した。定法に従って血漿または血清を分取後、1 mL ずつ、クライオジェニックバイアルに分注し、 -80°C で凍結保存した。尿も同様とした。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。

6) 蛋白質の網羅的解析 (プロテオーム解析)

尿からの蛋白質画分の抽出、精製の手法として、有機溶媒 (アセトン、アセトニトリル、エタノール) による蛋白質の沈殿条件について検討した。尿を遠心分離して不溶性物質を除去した後、QubitTM spectrometer (Invitrogen) にて蛋白質濃度を測定した。蛋白質 $15\mu\text{g}$ 相当量の尿をとり、所定量の有機溶媒を加え、蛋白質を沈殿させた。この際の、温度、時間に関しても検討を加えた。遠心分離後、上清を除き、沈殿を同一溶媒で洗浄した。再び遠心分離後、上清を除き、沈殿を 0.1% Rapigest (Waters) に溶解した。蛋白質画分の調製後、トリプシンによる消化を促進するために、以下の蛋白質 S-S 結合の還元とアルキル化の処理を行なった。即ち、蛋白質溶液にジチオスレイトールを加え、 60°C で 30 分間反応させ室温に戻した後、ヨードアセトアミドを加え、遮光して室温にて 30 分間反応させた。還元アルキル化したサンプル溶液にそのままトリプシン溶液 (Trypsin

Gold, Promega) を $0.25\mu\text{g}/\mu\text{l}$ となるように加え、 37°C で一晩消化した。消化液を精製後、ナノ LC-MS 解析に用いた。

ナノ LC として、ADVANCE S Nano LC System (Michrome) を使用した。オートサンプラーにて試料を導入し、配管には内径 $50\mu\text{m}$ のヒューズドキャピラリーチューブを用い、C-18 逆相カラム (AMR, ZAPLOUS) およびトラップカラム (CERI, L-column micro) を使用した。移動相は A (水 0.1% ギ酸), B (アセトニトリル, 0.1% ギ酸) の 2 種類の組成の溶媒を用い、B2% から B98% へのグラジエントをかけてペプチドを順次カラムより溶出させた。サンプルの必要量、最適なグラジエント組成、流速等の測定条件について検討を行なった。

質量分析装置としては、ESI-四重極/FT 型タンデム質量分析装置 Q-Exactive (Thermo Fisher) を用い、前述のナノ LC とオンライン接続し、LC-MS としての測定を行った。通常の測定は、ポジティブモードを使用した。ZAPLOUS 逆相 C18 カラム (AMR 製 $0.1\text{mm} \times 50\text{mm}$) にてペプチドを分離後、ナノスプレーインターフェース (Captive Spray, AMR) にて質量分析装置へと導入した。

Q-Exactive 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、データ依存的 MS/MS 測定を同時に行なった。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) を用い、比較プロテオーム解析に利用した。

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、ペプチドマスマフィンガープリンティング法による蛋白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。

なお、健常白人の尿試料の解析では、肥満度に関しては、BMI を指標に、低体重 (< 18.5)、適正体重 ($18.5 \leq \text{BMI} \leq 24.9$)、過体重 ($25 \leq \text{BMI} \leq 29.9$)、肥満 ($30 \leq \text{BMI}$) として分類した。

また、健常日本人 60 試料中、5 例に関しては、十分な質のデータが得られなかったため、解析からは除外した。日本人サンプルに関しては白人ほど肥満度に大きなバラつきがなかったため、 $\text{BMI} < 20$ 、 $20 \leq \text{BMI} \leq 23$ 、 $\text{BMI} > 23$ の 3 群に分けて解析を行った。

また薬物性肝障害臨床検体は、肝障害発生時および回復後に採取されたものをセットで用いた。入手した臨床検体の内訳を表1に示した。男女各3名、6名の患者より得られたサンプルを使用した。このうち女性2検体については、回復後のサンプルが得られず、発症時のみの解析となった。肝障害のタイプについては、情報が得られていない1名を除き、すべて肝細胞障害型であった。患者の年齢は53~80歳と比較的高齢であった。陰性対象として比較的年齢の近い日本人正常尿サンプルを用いて、肝障害発症時に特徴的に変化を示す蛋白質の探索を行った。

7) イオン性代謝物の網羅的解析 (イオン性メタボローム解析)

測定は、メタボロン社に委託した。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・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測定された。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。アミノ酸及びその代謝物、ペプチド断片、糖及びその代謝物、エネルギー関連代謝物、脂質及びその代謝物、核酸及びその代謝物、補因子・ビタミン及びその代謝物等、時期・検体によって異なるが最大計500以上の化合物を検出した(表5)。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、前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。

8) 脂質代謝物の網羅的解析 (脂質メタボローム解析)

ヒト血漿から、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, SL)・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、SL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・フーリエ変換型リニアイオントラップ型質量分析計(UFLC-Orbitrap、超高性能液体クロマトグラフは島津Prominence UFLC、フーリエ変換型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LTQ Orbitrap XL)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。

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、2群間の脂質分子種レベルの違いにつき統計学的有意差の判定を行った。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、群間での統計学的有意差の判定を行った。

統計学的有意差の判定では、ラットを用いた解析では、種々の条件(雌雄差、週齢差、食事の有無、採血時間)間の脂質分子種レベルの違いにつき、Welch's t testによる統計解析を行い、 $p < 0.05$ を有意な差と判定した。ヒトを用いた解析では、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、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。

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の保持時間、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。

(倫理面での配慮)

動物実験は、「国立医薬品食品衛生研究所 動物実験の適正な実施に関する規程」に従い、動物実験委員会の承認のもと、実験を行った。

白人・黒人の血液・尿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。

健常日本人の血液・尿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)、及び臨床研究指針を遵守した。全ての健常ボランティアには、説明・同意文書にて、本研究の内容及び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してから国立衛研に提供された。

薬物性肝障害をはじめとする副作用患者試料の収集は、北里大学等の各医療施設、国立医薬品食品衛生研究所の倫理審査委員会の承認の下で行い、被験者の同意も適正に得た。「臨床研究に関する倫理指針」の他、一部は「ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針」に準拠して行った。個人識別情報は、連結可能匿名化された資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。

C. 研究結果：

1) ヒト副作用資試料の収集とシステム構築

1-1) ヒト副作用資試料の収集

ヒト薬物性肝障害に関しては、北里大学での収集分 6 例を含む計 12 例を収集した。また、他の重篤副作用に関しては、間質性肺障害 36 例、横紋筋融解症 34 例、重症薬疹 7 例の資試料収集をそれぞれ行った。

1-2) データベースシステム構築

データベースを構築した。現在、「薬剤性肝障害発症時における新規バイオマーカー開発に関する探索的研究」において登録された被験者 5 例の情報がテストデータとして格納されている。例数は少ないものの、構築したデータベースは順調

に機能していることが確認された。

2) 蛋白質の網羅的解析 (プロテオーム解析)

2-1) 高感度プロテオーム解析系の確立

ラット尿プロテオームを対象に、検討を行った。まず標準的な解析法であるアセトン 80%、 -20°C 、1 時間処理の条件で蛋白質の沈殿を行い、トリプシン消化後、LC-MS/MS 測定を行ったところ、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。最も同定されたペプチド数の多かつたのが、雄特異的蛋白質とされる major urinary protein (MUP)であった。この他、上位にランクされた蛋白質として urinary protein 1,2,3 (UP1, UP2, UP3)があり、低濃度蛋白質の検出を阻害していると考えられた。通常のプロテオーム解析においては、なるべく多くの蛋白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。しかし、これら高濃度蛋白質の除去を目的に、有機溶媒とその終濃度、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蛋白質の変性処理の影響について検討を行った。

図 5 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蛋白質の変化を調べた結果を示した。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た。さらに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蛋白質数の結果等も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、同定蛋白質数として 455 が検出、同定された。一方、この際の蛋白質の回収率に関して検討を行ったところ、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、高発現量の蛋白質の除去効果により、検出できるペプチドの総数が増えたと考えられる。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とした。その他の条件については、大きな影響は認められなかった。

2-2) ラット尿を用いた解析 (性差、週齢差、食事影響)

全サンプルを統合して得られたペプチドピークの総数は 347,622 であり、同定された蛋白質の総数は、1,954 であった。さらに、得られたペプチドピークのうち、蛋白質として同定され Progenesis のフィルターをクリアした (信頼度の

高いもの) 総数は 2,861 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% であった。

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 6 に示す。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。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、1 個体のみ外れ値を示した結果であった。しかし、絶食と非絶食群の間には、主成分分析上、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、大きな差が見られ、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。雌雄差に関してもう少し詳しく検討を行った結果、図 7 示すように、雌雄共通して発現する蛋白質 909 に対し、雄のみで発現する蛋白質は 544、雌のみで発現する蛋白質は 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 6 にリストした。雄特異的蛋白質としては、前立腺や精巣など雄特異的臓器にて発現する蛋白質が含まれていた。雌特異的蛋白質には、BRCA1,2, IP₃ 受容体、PIP₂ など機能的に注目される蛋白質も含まれていた。

なお、絶食時間の差に関しては、大きな影響を受けなかった。

週齢差に関しては、雄の各個体は比較的近いパターンを示したのに対し、雌の老齢群においては比較的他と違うパターンを示した。

2.3) 白人尿を用いた解析 (性差、年齢差、肥満度影響)

健康白人の男女各 15 例に対して、25-35 歳の若年群と、55-65 歳の老齢群とを設定した。プロテオーム測定結果の主成分分析を図 8 に示す。

ヒト尿サンプルの場合、主成分分析によりラットに見られたような群内でのまとまりは見られず、性差や年齢差を越えて個体間のバラツキが大きかった。そこで BMI 値を算出し、これを基準に正常体重 (Normal weight)、過体重 (Overweight)、肥満 (Obese) の 3 群に分類した。この群分けによる情報を主成分分析プロットに導入すると、図 9 に示したように、肥満度によって群分けがされる傾向が認められた。即ち、肥満度によって第二主成分 (PC2) 方向に分類される傾向にあり、肥満群のサンプルは全てグラフの上半分に位置した。

性特異的な発現を示す蛋白質の同定結果を図 10-11 に示す。男性特異的な蛋白質のうち半数以

上がケラチン類であった。トップヒットした Glutamyl aminopeptidase は腎近位尿細管上皮に発現する蛋白質である。Bromodomain testis-specific protein については、その名のとおり男性特異的であるが、活性酸素除去酵素である Catalase が性差を示した点は注目される。尿中カタラーゼは尿路感染や炎症のマーカーとして用いられており、その利用には性差に注意が必要である。女性特異的な発現を示す蛋白質も同様にリストアップされたが、トップヒットである $\alpha 2$ -macrogloblin-like protein であった。

年齢差を示す特徴的な蛋白質を図 12 に示した。明らかな年齢差を示す蛋白質は少なく、若年群で発現の高い蛋白質として CD59、Interferon induced protein with tetratricopeptid repeats 2、multimerin-1、sulphydryl oxidase-1 の 4 種類のみが同定された。CD59 は赤血球の膜抗原であり、その他の蛋白質についても、主に血液由来であると考えられる。

さらに、肥満度により発現差の見られた蛋白質群は 460 と多数見られたが、その一部を図 13 に示した。これらの蛋白質は肥満度の影響を受けやすい点で注意が必要である。

2.4) 日本人尿を用いた解析 (性差、年齢差、肥満度影響、個体差)

データが得られた 55 サンプルに関し、検出された総ペプチド数(2-7 価)は、218,755 個であり、1,282 蛋白質が同定された。同定された蛋白質の情報を基に主成分分析を行ったところ図 14 のような結果が得られた。年齢および性別により分けられた 4 群を色分けしてプロットしたが、これら要素による明らかな傾向は得られず、ランダムなばらつきが認められた。肥満度については、明らかな影響は認められなかった。

次に、性差に特徴的な動きを示す蛋白質の抽出を行った。その結果、まず男性に特異的な発現を示す蛋白質の例として、 β -microseminoprotein が同定された(図 15)。これは前立腺にて分泌され精液に含まれる蛋白質のため、女性では全く発現が見られない。逆に、女性特異的に発現している蛋白質の例として、Annexin A1、Protein S100-A11、Protein S100-A7、Annexin A2 が同定された(図 16)。このうち、Annexin A1 と A2 は、白人サンプルの解析においても、女性特異的蛋白質として見つかった。

年齢差については、老齢者で発現が増加する蛋白質の例として、N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase のデータを図 18 に示した。さらに、特定の群に特異的に発現する蛋白質として、男性老齢者群に高発現を示す蛋白質が認められた

(Leucine rich α 2-glycoprotein 、 α 1B-glycoprotein、 α/β hydrolase domain-containing protein 14B 等)。

また主成分分析 (図 14) で第一主成分 (PC 1) 方向に大きなばらつき (個体差) が認められたことから、そのペプチドをリストアップした (表 7)。このリストを、先に得られている白人での個体差に寄与する蛋白質データ (表 8) と比較することにより、共通した要因となっている蛋白質をまとめた。黄色い印をつけた蛋白質が両者に共通のものであり、それらを表 9 にまとめた。さらに、GO 解析においてそれぞれの蛋白質が示す分子機能 (Molecular Function) に関する情報を加えた。

2-5) 薬物性肝障害患者の尿の解析

発症時 6 サンプル、回復時 4 サンプルが利用可能であった。尿プロテオーム解析の常法に従って検討を行ったところ、検出された総ペプチド数 (2-7 価) は、271,873 個であり、1,274 蛋白質が同定された。日本人由来正常コントロール尿を対照として使用し、肝障害発症時に特異的に発現変化する蛋白質を検索した。

最上位にランクされた Leucine-rich α 2-glycoprotein は、炎症反応に関与する蛋白質として最近注目されているが、薬物による肝障害が自己免疫反応等の炎症を伴うメカニズムで誘導されていると考えると興味深い。ただし、この蛋白質はコントロールデータの解析より、男性高齢者に特異的に高い発現が見られており、肝障害のマーカーとして使えるかどうかは、さらに検討が必要である。その他、肝障害発現時に特異的に発現が上昇する蛋白質として、 α -crystallin B chain、 α/β hydrolase domain-containing protein 14B 等が、発現減少する蛋白質として、Hemicentin-1、Receptor-type tyrosine-protein phosphatase eta が同定された。

3) イオン性代謝物に関する解析

3-1) 白人試料を用いた血漿・血清差と凍結融解影響

若年男性、老年男性、若年女性及び老年女性の血漿・血清を用いて、OPLS-DA モデルを用いて多変量解析による分離を行った。その結果、血漿・血清間において最も顕著な分離を示し、血漿・血清各群では同様の性・年齢による分離が認められた。次に、各イオン性代謝物の検出感度について、血漿・血清間の比較を行った。血漿・血清ともに 75%以上の代謝物で高い検出割合 (80%以上) を示した。さらに、各検体群内におけるばらつきを、relative standard deviation を用いて比較した。

血漿・血清ともに同様なばらつきを示した。一方、血漿・血清間で統計的に有意な差異が認められた代謝物は約 1/3 程度に上り、そのうち半数については 50%以上の差異が認められた。そのうち主に変化が認められたのは、モノアシルグリセロール類、必須脂肪酸類、及びアラニン・アスパラギン酸代謝物類であった。

凍結融解による影響は白人若年男性の血漿・血清を用いて行った。2 回の凍結融解のみの群に対して、さらに 8 回の凍結融解を追加した群を比較した。凍結融解によるイオン性代謝物レベルの差異は血漿・血清においてそれぞれ、14%と 6%の代謝物で認められ、血清の方が少なかった。そのうち主に変化が認められたのは、ヘモグロビン・ポルフィリン代謝物類であった。

3-2) 白人・日本人血清を用いた性差・年齢差解析

性差に関しては、白人において、若齢、老齢それぞれ 15%及び 9%の代謝物で性差が認められた。一方、日本人においては、若齢、老齢それぞれ 31%及び 25%の代謝物で性差が認められた (図 18)。白人において性差が認められた代謝物は主に、男性ホルモン等のステロイド類であり、その性差は日本人においても共通していた。一方、ガンマグルタミルアミノ酸については日本人において性差が認められたものの、白人においてはほとんど性差が認められなかった。また、白人におけるアミノ酸類の性差は若年のみで認められていたが、日本人においてはアミノ酸の性差は年齢に関係なく認められていた。

年齢差に関しては、白人において、男性、女性においてそれぞれ 9%及び 31%の代謝物で認められた。一方、日本人においては、男性、女性においてそれぞれ 23%及び 24%の代謝物で認められた。白人において年齢差が認められた代謝物は主に、女性における脂肪酸やアミノ酸類であった。日本人においてはアミノ酸類に関してはある程度共通していたものの、脂肪酸については男性、女性共に年齢差を示さなかった。一方、ガンマグルタミルアミノ酸については日本人において女性で年齢差が認められたものの、白人においてはほとんど年齢差が認められなかった。

3-3) 白人、黒人、日本人間の人種差の解析

人種差に関しては、血漿を用いて、日本人、白人、及び黒人の若年男性について検討を行った (図 19)。日本人と比べ白人及び黒人において 48%及び 46%の代謝物が統計的に有意差を示した。このうち 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、わずか8%であった。

3-4) ラット血清を用いた性差・年齢差の解析

ラットにおける性差・年齢差は、性差について、若齢、老齢それぞれ、38%、49%の代謝物で認められた(表 10)。主に性差が認められた代謝物は脂質代謝に関わるカルニチン及びアシルカルニチンであった。また、年齢差については雄、雌それぞれ 35%、30%の代謝物で認められた。主に年齢差が認められた代謝物としてはアミノ酸(チロシン)及び核酸(5,6-ジヒドロウラシル)とその関連代謝物であった。さらに、非臨床動物からヒトへの外挿性に関する知見を得るために、ラットにおけるイオン性代謝物レベルの性差・年齢差と白人における結果を比較した。ヒト・ラット間で共通して性差が認められた代謝物は 5% (若齢)及び 0.5%(老齢)であった。一方、共通して年齢差が認められた代謝物は 0%(雄)及び 1%(雌)のみであった。

3-5) ラット血清を用いた食餌・採血時間影響の解析

ラットにおいて、食餌の有無により 50%の代謝物が有意差を示した(表 11)。これらのうち 29%が絶食によって有意に増加し、21%が有意に減少した。また、これらの主な代謝物は、脂肪酸(ステアリン酸)及び炎症性メディエーター(12, 13-ジヒドロキシオクタデセノイン酸

(12, 13-DiHOME)、コルチコステロン等)食事由来代謝物(ブドウ糖、フルクトース等)であった。一方、異なる採血時間において 15%の代謝物が有意差を示した。これらの主な代謝物は、アミノ酸類であった。絶食時間についての比較では、22 時間絶食と 16 時間絶食でわずか 1%の代謝物しか差が認められなかった。

3-6) 薬物性肝障害のバイオマーカーの実践的探索

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、これまでに得た基礎データから性、年齢及び人種差の全ての影響を受けにくい代謝物として 4 代謝物を選抜した(図 20、図 21)。

4) 脂質性代謝物に関する解析

4-1) 白人血液を用いた血漿・血清差、性差、年

年齢差、凍結融解影響に関する解析

年齢及び性別の異なる 60 名の白人より採取した血漿・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 228 種の脂質代謝物が同定された。一方、上層のギ酸メチル画分から 23 種の高度不飽和脂肪酸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 12 に示した。これらの 251 種の代謝物につき、試料採取条件(マトリックス差、男女差、年齢差)・試料保管条件(凍結融解の回数)の影響を検討した。

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、若年男性の血漿と血清の比較で 34 種(14%)、若年女性の血漿と血清の比較で 82 種(33%)が有意に異なるレベルを示した。表 13 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。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。多くの脂肪酸代謝物もマトリックスの違いにより、有意に変動した。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、アラキドン酸(AA)の代謝物である 12-hydroxyeicosatetraenoic acid(12-HETE、血漿に対する血清の比 1.6 倍)等が、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(同 0.4 倍)等が見出された。以上より、マトリックスにより一部の血液中の脂質レベルが大きく変動することから、今後の検討は、すべて血漿を用いて行った。

性別が代謝物のレベルに与える影響を検討した結果、若年の男女の比較で 16 種(6%)、老年の男女の比較で 61 種(24%)が有意に異なるレベルを示した(表 13)。年齢に関わらず、多くの 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。さらに、老年ではスフィンゴミエリン(SM)分子種に加え、ドコサペンタエン酸(DPA)及びドコサヘキサエン酸(DHA)を含む GPL・コレステロールエステル(ChE)のレベルに有意な男女差が認められ、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(TG)分子種のレベルが老年男性と比較して老年女性で有意に高かった。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)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。

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、男性の若年・老年の比較で 8 種

(3%)、老年の男女の比較で 81 種 (32%) が有意に異なるレベルを示した。(表 13)。男性では年齢差を認めた脂質は少なく、20:5ChE や 5-HEPE (hydroxyeicosapentaenoic acid) 等、エイコサペンタエン酸 (EPA) を含む一部の脂質が若年男性と比較して老年男性で有意に増加した。女性血漿では、多くの LPC 分子種、DPA 及び DHA を含む PC 及び ChE、さらに多くの TG 分子種のレベルが有意な年齢差を認め、若年女性と比較して老年女性で有意にレベルが高かった。一方、脂肪酸代謝物では、18-HETE、及び 14,15-diHETrE が若年女性と比較して老年女性で有意に減少した。

凍結融解が脂質代謝物レベルに与える影響を検討した結果、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、201 種 (80%) の代謝物が有意にレベルの相違を示し、凍結融解によりレベルが減少する代謝物が大多数 (194 種、77%) であった。DG 分子種のレベルが反復凍結融解により大きく減少すると共に、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。さらに脂肪酸代謝物では、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。一方、コレステロールのレベルが減少し ChE のレベルが増加した。

4-2) 日本人血漿を用いた性差、年齢差の解析

年齢及び性別の異なる 60 名の健常の日本人の血漿から 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 GPL 及び SL が同定された。また Bligh & Dyer 法の上層のギ酸メチル画分が 38 種の AA、EPA、DHA 代謝物が検出された。検出された脂質クラスの内訳を表 12 に示した。

性別が代謝物のレベルに与える影響を検討した結果、若年男女の比較では 10 種が、老年男女の比較では 21 種が性差を示した。表 14 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。SM 分子種の性差は、白人と同様、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 (男性に対する女性の比 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 GPL 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。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 (17-HDoHE) 見出されたが、日本人男女間で有意差を示した oxFA 代謝物は、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。

性別が代謝物のレベルに与える影響を検討し

た結果、若年男女の比較では 49 種が、老年男女の比較では 39 種が年齢差を示した。表 14 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したが、一部のエーテル型 PC (ePC) 分子種は、若年と比較して老年で減少した (若年に対する老年の比 0.56-0.82 倍)。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、EPA または 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。白人・日本人で一一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)。

4-3) 白人、黒人、日本人間の人種差の解析

日本人、白人、黒人若年男性の血漿中の脂質代謝物レベルを比較した。黒人の oxFA 代謝物、及び日本人の中性脂質の解析が未解析であることから、本解析は 128 種の GPL 及び SL を対象に行った。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 14 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 (16:0/20:5PC, 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。

4-4) ラット血漿中の脂質代謝物の性差、週齢差、食事影響、採血時間に関する解析

ラット血漿試料から、Bligh & Dyer 法の下層 (有

機層)において 226 種の脂質代謝物が同定された。一方、Bligh & Dyer 法の上層のギ酸メチル画分から 36 種の AA、EPA、DHA 代謝物が同定された。脂質クラスごとに同定された分子種数を表 12 に示した。これらの 262 種の代謝物につき、試料採取条件(雌雄差、週齢差、食餌の有無、採血時間)の影響を検討した。

有意に雌雄差を示した代謝物は、262 種の総同定代謝物のうち、若齢(10 週齢)で 110 種(42%)、老齢(30 週齢)で 142 種(54%)見出され、うち 67 種(26%)の代謝物が若齢・老齢に共通して雌雄差を示した。表 15 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。SM 及び ChE 分子種が、週齢に関わらず、雄と比較して雌で有意に高いレベルを示し、数種の TG 分子種が週齢に関わらず、雄と比較して雌で有意に低いレベルを示した。老齢においてのみ雌雄差が認められる代謝物として、EPA、DHA 及びその代謝物が見出され、雌で高いレベルを示した。

有意に週齢差を示した代謝物は、総同定代謝物のうち、雄で 76 種(29%)、雌で 101 種(39%)見出され、雌雄に共通して週齢差を示した代謝物は 16 種(6%)と少なかった。雄のみで週齢差を示す代謝物として数種の EPA 及び DHA 代謝物が見出され、若齢の雄と比較して老齢の雄では有意にレベルが低かった。雌のみで週齢差を示す代謝物として数種の TG 及び ChE 分子種が見出され、若齢の雌と比較して老齢の雌では有意にレベルが高かった

16 時間絶食群と食餌群間で有意に変動する代謝物は、183 種(70%)であり、内訳としては、絶食群と比較して、食餌群で増加する代謝物が 148 種(56%)であり、食餌群で減少する代謝物は 35 種(13%)であった。食餌により、リン脂質・中性脂質全般が有意に増加した。逆に、絶食により、AA、及びそのリポキシゲナーゼ(LOX)系代謝物、高度不飽和 TG が有意に増加した。一方、食餌の有無に影響されない代謝物は 79 種(30%)が見出されたが、これらは、ePC、一部の SM、コレステロール、DHA・DPA 含有 ChE であった。また 22 時間絶食群は、16 時間絶食群と同様の結果を示した。

午前採血群と午後採血群で有意に変動する代謝物は、262 種の総同定代謝物のうち 17 種(6%)であり、今回検討した条件のうち、最も変動の少ない要件であった。

4-5) ラット及びヒト白人血漿サンプルにおける試料採要件(性別・年齢)に関する外挿性

表 12 に示すように、ラットと白人の血漿で同定された代謝物と比較すると、総代謝物数は、白

人 251 種、ラット 262 種とほぼ同程度であったが、ヒトでは ePCe が 20 種同定されたのに対し、ラットでは 3 種の分子種のみ同定された。一方、ChE や TG は、ラットの方がヒトより多くの分子種が検出された。

性差の外挿性に関しては、SM や老齢における高度不飽和脂肪酸を含有する GPL・ChE において、一部ラットと白人に共通して性差が認められた(図 22)。一方、TG 分子種においてヒト及びラットで認められた性差は増減の方向が反対であった。また老齢ラットにおいて EPA、DHA 及びその代謝物の顕著な雌雄差が認められたが、ヒトとの外挿性は認められなかった。

年齢差の外挿性に関しては、数種の TG 及び ChE 分子種において、雌性ラットと白人女性に共通して年齢差が認められた。一方で、雄性ラットで認められた数種の EPA 及び DHA 代謝物の顕著な週齢差はヒトでは認められなかった(図 23)。

4-6) 薬物性肝障害のバイオマーカーの実践的探索

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。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。

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、247 種のピークが検出された。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っていたことから、肝細胞障害型の薬物性肝障害を呈した 9 患者 15 サンプルのみを用いて、OPLS-DA 解析による急性期と回復期の 2 群の判別を試みた。この結果、スコアプロット(図 24A)による 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。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、11 種のピークが見出された(図 24B)。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(図 25)。

oxFA 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。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(図 26)。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:

バイオマーカー測定用試料として、血液・尿試

料の採取や非臨床動物からヒトへの外挿性に関する評価要件を明確化し、バイオマーカー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・保管条件の違いが血液・尿中の蛋白質・内在性代謝物濃度へ与える影響を、ラット及びヒトを対象に網羅的に明らかにした。

1) 資試料の収集とデータベース構築

解析用試料として、正常ラット、ヒト健常人(白人、黒人、日本人)、およびヒト副作用試料の収集を行った。特に、副作用試料については、薬物性肝障害 12 例、間質性肺障害 36 例、横紋筋融解症 34 例、重症薬疹 7 例の収集を行うことができ、今後の利用が期待できる。また構築したデータベースは、複数の診療科にまたがる円滑な情報共有を可能にするものであり、薬剤性臓器障害の早期発見・病勢判断のための感度、特異度の高いマーカー検索に大きく寄与することが期待される。

2) 蛋白質・内在性代謝物に関する評価要件の検討

バイオマーカー探索時に考慮すべき評価項目を明らかにするため、蛋白質は尿を、内在性代謝物は血液を対象に、試料採取や保管要件の検討を行った。

2-1) 蛋白質

2-1-1) 解析系の最適化

血液の場合には、アルブミン、IgG 等の数種の高発現量の蛋白質が 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。一方、尿に関しては、高発現量の蛋白質が血液中ほど顕著ではないため、解析がしやすい。本研究では、まず尿について抽出条件を最適化した。即ち、尿中にも種類は少ないながら、比較的発現量の高い蛋白質があり、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。このため、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。

2-1-2) ラットにおける背景要因の影響

ラットについて、性差、週齢差、絶食の影響を検討した。性差については大きな差が認められ、性特異的に発現する蛋白質を同定した。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、バイオマーカー候補を同定した場合には、性差についてその影響評価が重要である。また週齢差に関しても、雌雄共通して発現する蛋白質 909 に対し、雄のみで発現する蛋白質は 544、雌のみで発現する蛋白質は 533 とどちらも約 1/3 程度を占めるなど、大きな差が認められた。

一方で、絶食時間に関しては、大きな影響は認められなかった。

従って、ラット尿中蛋白質に関しては、性差、さらには年齢差が評価要件と考えられた。

2-1-3) ヒトにおける背景要因の影響

健常白人由来尿では、性差、年齢差を示す蛋白質も同定されたが、個体差の方が大きかった。そのため、肥満度による相関を調べたところ、性差、年齢差には認められなかったグループ化が主成分分析の第二主成分方向に認められたことより、ヒトの尿プロテオームに関する個体差の要因の一つとして、肥満度が重要なファクターとなることが分かった。健常日本人の場合も白人と同様に、性差、年齢差を上回る個人差によるばらつきが認められた。そこで、白人、日本人両者において、主成分分析における第一主成分のばらつきへの寄与の大きいペプチドを探索した。多くのペプチドが共通する蛋白質由来であり、これらの蛋白質の変動が、プロテオームプロファイルの個人差を導く要因となっていることが示唆された。これらの蛋白質の分子機能という観点から考察を加えたところ、“binding”、“catalytic activity”、“receptor activity”の 3 つの機能が抽出された。一方、日本人試料についても肥満度の影響を見るため BMI 値によるサブグループ分けをしたが、はっきりとした傾向は認められなかった。日本人の場合には、白人のような極端に肥満度の高い個人が少なかったため、差が出にくかったとも考えられる。健常日本人において、性特徴的な蛋白質の探索を行った。男性特異的に発現する蛋白質 β -microseminoprotein は前立腺にて産生される蛋白質である。女性特異的な発現を示した蛋白質は、Annexin A1, A2, S100-A7, A11 と類似した二つの蛋白質群であり、それぞれの発現に関連性が存在する可能性が考えられる。Annexin については白人サンプルでも女性特異的蛋白質として検出されており、人種差は認められなかった。S100 蛋白質群はカルシウム結合蛋白質である。次に、年齢差を示した蛋白質としては、男女とも高齢者で上昇するものとして PGRP2 が同定された。一方、男性高齢者のみに特異的に発現する蛋白質は、多くのものが該当した。特に Leucine-rich α 2-glycoprotein に関しては、肝障害の探索においてバイオマーカー候補として同定されてきており、男性高齢者のサンプルを用いた影響が懸念される。バイオマーカーの検討においては、同一患者の発症中と回復後を比較しているため、個人差のバイアスによる影響は排除できるが、絶対値の値をもとに診断を下す場合には注意が必要である。 α/β hydrolase domain-containing protein 14B

についても、同様の結果が得られた。

従って、ヒト尿中の蛋白質に関しては、性差、年齢差と共に、個人差が大きな評価要件となり、少なくとも大きな個人差に寄与する蛋白質をバイオマーカー候補として選定することは避けるべきと考えられた。

2-1-4) 薬物性肝障害試料の解析

薬物性肝障害患者の尿試料については、発症時と回復時のサンプルをセットで入手できたので、両者の比較から肝障害特異的なバイオマーカーの探索を試みた。この際陰性対象として、日本人由来のコントロールサンプル数検体を用い、同時に解析を行った。使用した薬物に関しては多岐にわたっているため、肝障害において共通して変化する蛋白質を標的とし、10種類の蛋白質をバイオマーカー候補蛋白質としてリストアップした。統計的有意性、変化率、同定スコアなどの観点から順位付けした結果、最も有望な蛋白質として、Leucine-rich α 2-glycoproteinが同定された。本蛋白質は関節リウマチ等の自己免疫疾患における新規の炎症マーカーとなることが報告されている。既に、本蛋白質に関しては抗体を用いた市販のELISA検査キットが利用可能である。

2-2) イオン性代謝物に関する検討

2-2-1) 試料採取要件

試料採取要件に関する検討の結果、臨床において頻繁に用いられる血液検体の基質である血漿、及び血清は、イオン性代謝物プロファイルに関して大きな差異を示した。また、血漿および血清は性差・年齢差といった試料背景因子の影響を同様に示した。また、代謝物の検出力、同一群内のばらつきに関しても血漿・血清ともに同様であった。したがって、血中代謝物の測定における試料採取に関しては、血漿、血清どちらでもよいが統一する必要があると考えられる。一方、凍結融解に関しては、軽微なものの影響が認められたことから、可能な限り避けるのが望ましい。また、凍結融解の影響については、血漿の方が血清よりも受ける影響が大きかった。したがって、凍結融解による影響を考える上では、血清の方が血液試料として望ましいと考えられた。一方、非臨床実験の結果から、食事によるイオン性代謝物への影響は大きく、採血時間（午前採血、午後採血）による影響も認められた。したがって、採血前には可能な限り絶食し、採血時間も統一する必要があると考えられる。一方、絶食は一定時間以上であればそれ以上は影響しないことも明らかになった。今後はイオン性代謝物レベルが安定する絶食時間を検討していく必要があると考えられる。

2-2-2) 試料背景因子

試料背景因子がイオン性代謝物レベルに与える影響についての検討の結果、性別、年齢、人種といった背景因子がそれぞれ影響度合いに差異があるものの、最大50%程度の代謝物に影響を与えることが示唆された。また、性差・年齢差などの背景因子自体にも人種差が存在することが示唆された。したがって、イオン性代謝物がバイオマーカー候補として同定された際には、このような試料背景因子の差異について留意し、実用化を進めていく必要が考えられた。また、今後バイオマーカーを探索する際には、背景因子の影響を受けにくい代謝物を優先的に選択することが、その後の臨床応用を有利に進めていくための手段となると考えられた。

2-2-3) 非臨床からの外挿

医薬品の毒性に関する検討は、まず非臨床動物を用いて行われており、バイオマーカー探索についても同様のアプローチが考えられる。本研究から、性差・年齢差について、イオン性代謝物のヒト及びラット間の相関がほとんど認められなかった。このことから、少なくとも一部の代謝物変動はヒトとラットにおいて異なっている可能性が考えられた。したがって、今後、非臨床試験によって見出したバイオマーカーのヒトへの外挿を考える際には、まず、毒性や安全性マーカーについての種差を検討する必要があると考えられる。

2-2-4) 薬物性肝障害マーカー

すでに、薬物性肝障害に関して血清中ALTと γ -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バイオマーカー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.）。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。

2-3) 脂質性代謝物に関する検討

2-3-1) ラットに関する検討

試料採取条件の違いがラット血漿中の脂質代謝物濃度へ与える影響を明らかにするため、そのレベルを、雌雄間、週齢間、食餌の有無（16時間絶食、非絶食）、採血時間（午前採血・午後採血）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、雌雄間、若齢・老齢間、食餌の有無、及び採血時間のそれぞれの比較2群間の最大で、総同定代謝物数の54%（雌雄差）、39%（週齢差）、70%（食餌の有無）、及び6%（採血時間）であった。変動倍率は、0.3-5.8倍（雌雄差）、0.2-2.8倍（週齢差）、0.2-41.9倍（食餌の有無）、0.7-1.9倍（採血時間）であった。以上より、食事影響が最も考慮すべき要因であり、食餌量の統一が難しいことから絶食が好ましいことが示唆された。一方で、絶食時には、非絶食時と比較してアラキドン酸のLOX代謝物のレベルが有意に高く、これらは炎症・抗炎症のマーカーでもあることから、探索するバイオマーカーの種類によっては、非絶食下での試験が望ましい場合があると考えられる。また一部の代謝物に関し、性別及び年齢は考慮すべき要件であると考えられた。一方、採血時間（午前・午後）の違いにより変動する代謝物は少なく、変化率も低いことから、試料要件として採血時間を考慮する必要性は低いと考えられた。

2-3-2) 白人血液に関する検討

試料採取条件の違いがヒト血漿中の脂質代謝物濃度へ与える影響を明らかにするため、白人の血漿・血清中脂質レベルについて、マトリックス差、男女差、年齢差、凍結融解の回数で比較した。有意に異なるレベルを示した代謝物の割合は、血漿・血清間、男女間、若年・老年間、及び凍結融解の回数のそれぞれの比較2群間の最大で、総同定代謝物数の33%（マトリックス差）、24%（男女差）、32%（年齢差）、及び80%（凍結融解の回数）であった。変動倍率は、0.4-3.9倍（マトリックス差）、0.5-2.2倍（男女差）、0.6-3.6倍（年齢差）、0.4-1.5倍（凍結融解の回数）であった。ほとんどすべてのoxFA代謝物が、血漿・血清間で有意なレベル差を示したが、これは、血清中で、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。また、男女間、及び若年・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、一部にレベルが大きく異なる分子も認められた。よって、ラットと同様、ヒトにおいても血漿中のバイオマーカー探索及び検証時において、一部の代謝物に関し、性差及び年齢差は考慮すべき要件であると考えられた。また、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80%程度に減少したことより、試料は分注して保管すべきであることが示された。

2-3-3) ラット及びヒト白人血漿サンプルにおける試料採要件（性別・年齢）に関する外挿性

ラットとヒトでは、検出された代謝物が一部異なるため、直接の比較は難しいものの、試料採取要件の違いにより有意にレベル差を認めた代謝物の割合、及びその変動倍率は、性差・年齢差いずれの場合もヒトよりラットの方が大きかった。よって、これらの要因の違いが血漿中の脂質代謝物レベルに及ぼす影響は、ヒトよりラットの方が大きいことが示唆される。また、性差、年齢差を認めた代謝物は、一部、白人とラットで共通してが、ほとんどの代謝物では、白人とラットで一致しておらず、外挿性は低いことが示された。従って、試料採要件（性別・年齢）に関しては、ラット、ヒトそれぞれのバイオマーカー探索・検証時に、別々に考慮すべき必要性が考えられた。

2-3-4) 健常日本人血漿に関する検討

健常日本人では、中性脂質が未解析であるため、GPL及びSL、oxFA代謝物に関して試料採取条件に関する検討を行った。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6%（10/166種）及び13%（21/128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。有意差を示した代謝物数、及び変動倍率を白人と日本人で比較した場合、白人の方が大きく、日本人の血漿中のGLP、SL、oxFAの性差は、白人より小さいことが示唆された。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SM分子種や不飽和度の高いGPLで一部、一致が認められた。

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30%（49/166種）及び23%（39/166種）であり、有意差を示した代謝物の変動倍率は、0.56倍～2.36倍の範囲にあった。白人と日本人で有意差を示した代謝物数、及び変動倍率を比較した場合、いずれも日本人の

方が大きかった。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 oxFA 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、2 倍以上の年齢差を示すことが明らかになり、バイオマーカー探索・検証の際に注意を要することが示唆された。性差に関しては、差が 2 倍以下で、考慮する必要性は低いと考えられた。

2-3-5) 人種差の検討

GPL 及び SL 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、食習慣や腸内細菌叢等に影響をうけることから、本邦でのバイオマーカー探索や海外で報告されたマーカーの日本人での適用に際には、日本人の内在性代謝物濃度に関する基礎データが重要であることが強く示唆された。

3) 薬物性肝障害のバイオマーカー探索

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バイオマーカー候補を探索したところ、7 種の GPL・SL と、6 種の oxFA 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 oxFA 代謝物は急性期でレベルが高く、いずれも炎症反応の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、GPL・SL のバイオマーカー候補 7 種は、急性期で回復期と比較してレベルが低く、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。

E. 結論

バイオマーカー測定用試料として、血液・尿試料の採取や非臨床動物からヒトへの外挿性に関する評価要件を明確化し、バイオマーカー探索時に

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・保管条件の違いが蛋白質や内在性代謝物濃度へ与える影響を、ラット及びヒトを対象に網羅的に明らかにした。

1) 資試料の収集とデータベース構築

解析用試料として、正常ラット、ヒト健常人(白人、黒人、日本人)、およびヒト副作用試料の収集を行った。薬物性肝障害に関しては、臨床研究事務局を設置し、資試料収集体制を構築すると共に、収集症例の情報管理のためのデータベース構築を行った。

2) バイオマーカー探索時に考慮すべき評価項目

蛋白質は尿を、内在性代謝物は血液を対象に、試料採取や保管要件の検討を行った。

2-1) 蛋白質

尿を用いて、まずラットを対象に、LC-MS を用いたショットガンプロテオミクスによる高感度分析法を確立した。性差、絶食時間、採血時間、週齢差などの採取条件が蛋白質レベルに与える影響を検討した結果、性差が最も大きく影響し、雄または雌特異的に発現している蛋白質を同定した。週齢差については、高週齢の雄ラットの一部において高発現量の蛋白質が大きなバラツキの要因となることを明らかにした。絶食に関しては大きな影響は認められなかった。

次に、健常白人由来のヒト尿を対象に、性差、年齢差による影響を検討した。性差、年齢差を示す蛋白質を同定したが、サンプル間での各蛋白質レベルのバラツキはラットに比べて大きく、主成分分析では、性差、年齢差ともに明らかな傾向を示さなかった。一方、肥満度により主成分分析プロットが群分けされる傾向を見出した。次に日本人由来の尿サンプルに関しても解析を行い、白人と同様、性差、年齢差を示す蛋白質を同定すると共に、個人差が大きいことを確認し、そのバラツキの原因となる蛋白質群を同定した。

2-2) イオン性代謝物

血液(主として血清)を対象に解析を行った。まずヒト血漿及び血清間における顕著な代謝物レベルの差異が認められたが、どちらのマトリックスにおいても同様の性差・年齢差が認められ、個々の代謝物の個人差も同程度であった。また、凍結融解に関しては一部ではあるが代謝物レベルに差異が認められ、その影響は血清において少なかった。一方、日本人では、性差・年齢差は白人よりも顕著であった。また、日本人、白人、及び黒人間における人種差では、日本人とそれ以外の人種において顕著であり、白人と黒人間の人種差はほとんど認められなかった。

非臨床動物(ラット)を用いた検討では、ヒトと同様にイオン性代謝物レベルに性差・年齢差が認められたが、ヒトとラットにおいて共に測定可能であった代謝物は全体の約2/3であり、そのほとんどがヒト・ラット間で共通した性差・年齢差を示さなかった。また、食餌の有無によってほとんどの代謝物に差異が認められ、一部ではあるが採血時間(朝と昼)によっても代謝物レベルに差異が認められた。一方、絶食時における絶食時間の長さは代謝物レベルにほとんど影響を与えなかった。

2-3) 脂質代謝物

血液(主として血漿)を対象に解析を行った。ラットを対象にした解析により、食餌影響は、最も考慮すべき要因であった。また、一部の代謝物で性差・年齢差が認められ、重要評価要件であるが、採血時間(午前採血・午後採血)を考慮する必要性は低いと考えられた。健常白人を対象にした解析により、血液凝固反応に關与する脂質(プロスタグランジン等)の代謝物が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が、測定用試料として好ましいと考えられた。またラット同様、性差・年齢差は考慮すべき要件であると考えられた。さらに、一部の代謝物では、凍結融解の影響は大きく、避けるべきと示された。ラットとヒトの血中脂質代謝物の性差・年齢差に關する外挿性は低く、それぞれの探索時に別々に考慮する必要性が示唆された。また日本人を対象とした解析により、大多数の代謝物は、白人に比して、性差・年齢差は小さいものであったが、一部の脂質代謝物は、若年・老年間で2倍以上のレベル差を認め、年齢差は注意すべき要因であった。また、イオン性代謝物同様、日本人と白人または黒人間で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、日本人の基礎データ蓄積が重要と考えられた。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。

代謝物に關する血液中のバイオマーカー探索の際には、これらの結果から、評価要件として、1) 用いるマトリックスは血漿・血清のどちらを用いても良いが、イオン性代謝物は凍結融解の影響を受けにくい血清の方が、脂質代謝物では血液凝固でレベルが大きく変化する分子種が多いことから血漿が好ましいこと、2) 凍結融解の影響は比較的小さい代謝物が多いが、試料は分注して、できるだけ凍結融解を避けること、3) 背景因子(性・年齢・人種)の影響に留意し、その影響を受けにくい代謝物を選ぶこと、4) ラットとヒト間

の種差が大きく、外挿が難しいこと、5) 絶食・非絶食を統一し、採血時間も可能な限り統一すること、6) 日本人と白人・黒人間の人種差は比較的大きいため、分子によっては注意すること、が重要であると考えられた。

3) 薬物性肝障害のマーカー候補解析

内在性代謝物バイオマーカー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・尿の解析を行った。尿蛋白質から複数のバイオマーカー候補を同定したが、炎症反応の初期段階に誘発されることが知られている Leucine-rich α 2-glycoprotein が含まれていた。またイオン性代謝物では49種が、脂質代謝物では13種が有意差を示したが、このうち、イオン性4種、脂質4種の代謝物が性、年齢、人種の影響を受けにくいものであった。

4) 結論

3年間の研究結果から、蛋白質・代謝物からバイオマーカーを探索する際には、性、年齢、人種、凍結融解の回数等の試料背景が交絡因子となりうることを示唆され、評価要件として各因子の影響を明確に示すことが必要である。本研究では、各分子毎にその影響の大きさを明らかにしたことから、今後、論文発表後に国立衛研のホームページ上に公開してバイオマーカー探索時に広く利用頂く予定である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表:

1. 論文発表

- 1) 熊谷雄治: 国内臨床試験における心臓安全性評価の現状と将来。谷本学校毒性質問籍, 14, 20-35, 2012.
- 2) 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.
- 3) 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