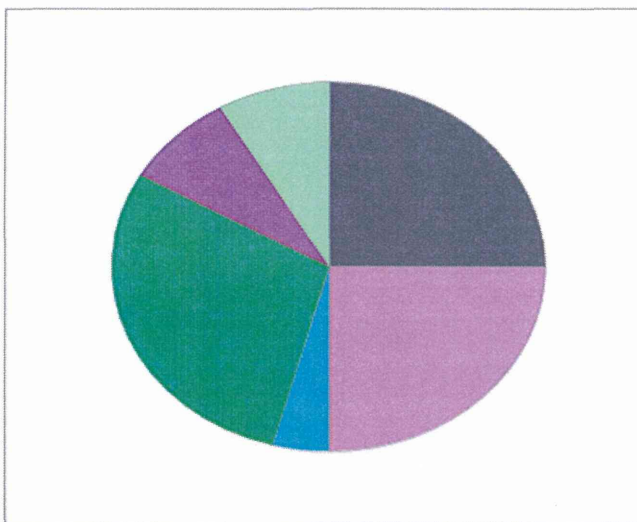


表6 白人と日本人で共通してばらつきの要因となったペプチドとその Molecular Functions

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
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	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	TNRF16_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 7 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	Glutamyl 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 24-26 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）
研究分担総合報告書

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試料採取方法、及び試料背景因子による変動を明かにすることを目的とした。また、これらの基礎データを基に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、試料背景因子の影響を受けにくいバイオマーカー候補を探索した。

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、測定時期が異なっており一概には言えないものの、性差・年齢差は日本人において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。

これらの結果から、血液中のイオン性バイオマーカー探索の際には、1) 用いる基質は血漿・血清のどちらを用いても良いが、血清の方が凍結融解の影響を受けにくいこと、2) 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) 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、が必要であると考えられた。また、イオン性代謝物に関しては種差が大きく、外挿が難しいことが考えられた。これらを踏まえて、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、4 種の代謝物が性差・年齢差・人種差に差異が認められないバイオマーカー候補として同定された。

これらの結果から、イオン性代謝物をバイオマーカーとして探索・検証する際の評価要件として、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。

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、 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、 β 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・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。しかし、血液中からバイオマーカーを探索・検証する際に適用しうるガイドラインは存在しない。そこで本研

究は、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の一環として、血中イオン性代謝物に関し、特に問題となる測定用試料の採取条件、試料背景因子の影響を明らかにし、さらにそれを用いて実践的にバイオマーカー探索を行うことを目標とした。

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。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、年齢差、男女差、人種差、食事影響等の測定結果への影響も懸念されるところである。従って、バイオマーカー探索・検証時には、これらの交絡因子を適切に評価することが必要と考えられるが、これまで網羅的に明らかとされた研究は非常に少なく、評価要件の作成には知見が乏しい。そこで本研究では、まず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、性差、人種差）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。

一方、医薬品の有効性・安全性に関する非臨床試験では、ラット等の実験動物が用いられており、有効性・安全性に関するバイオマーカーの探索・検証・利用を推進するためには、実験動物におけるイオン性代謝物についての基礎データも求められている。また、一部の内在性代謝物レベルについて食事影響等が報告されている。そこで、本研究では、次にラット血液試料(血清)に関し、1)イオン性代謝物の試料背景差(性差・年齢差)を明らかにすること、2)イオン性代謝物レベルにおける食事影響を明らかにすること、を目的とし、各検体群間における血中代謝物レベルの差異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たたき台を得るべく、得られた知見の実践的な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) ヒト血液の採取と調製

ヒト血液は、採血の前日の午後8時より、採血当日の午前10時まで食事制限を行い（水のみ可とし）、14時間以上の絶食下で、午前10時に採血を行った。ただし、薬物性肝障害患者血液は、採血時間をコントロールすることが難しいため、入院中は早朝空腹時、外来中は外来時に採血を行

った。各個人から上腕部の静脈より採血を行い、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。血漿の分取にはEDTA-2Kを用いた。白人・黒人についてはProMedDx社（Norton, MA, USA）より適切に同意が得られた試料を購入した。また倫理審査委員会の承認の下、日本人については臨床研究機関に依頼して収集を行った。薬物性肝障害患者に関しては、北里大学等の共同研究医療機関にて収集した。検体は、ドライアイス詰めにて国立衛研に送付された。送付後、500μLずつ分注操作を行い、再度凍結した試料を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。また、白人若年男性の血漿及び血清に関しては、別途500μLずつ分注操作を行い、連続凍結融解を10回（-80℃にて30分以上凍結後、氷上で融解）行った検体も送付した。ヒト血液に関しては、白人4群（若年成人男性、若年成人女性、老年成人男性血清、老年成人女性）、日本人4群（若年成人男性、若年成人女性、老年成人男性、老年成人女性）、及び黒人1群（若年成人男性）の各15検体と薬物性肝障害発症期12検体（血漿）、薬物性肝障害回復期8検体（血漿）を用いた（表1）。

2) ラット血液の採取と調製

Sprague-Dawley ラットは日本チャールズブリバー（神奈川県）から8週齢の雄・雌を購入した。ラットは10匹ずつ雄5群、雌2群に分け、雄4群（群1、群5-7）、雌1群（群2）は10週齢（若年）、雄1群（群3）、雌1群（群4）は30週齢（老齢）まで飼育した。群1-4は午後6時より16時間の絶食（水のみ可）下、群5は非絶食下、群6は午後0時より22時間の絶食下、午前10時に採血し、群7は午後6時より22時間の絶食下、午後4時に採血した。血液試料は2時間以内に血清を分取して、直ちに-80℃に保存した。本研究に用いた検体の情報を表2に示した。血液試料は、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。

3) 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、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、時期・検体によって異なるが最大計500以上の化

化合物を測定した (表 3)。

4) データ解析

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、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。

(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た後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、国立医薬品食品衛生研究所、北里大学等の各医療施設の倫理審査委員会の承認の下、「臨床研究に関する倫理指針」に準拠して行っており、被験者の同意も適正に得て行った。個人識別情報は、連結可能匿名化された資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。

C. 研究結果：

個々の細かいデータについては毎年ごとの報告書において述べているので、本分担総括報告書では包括的な内容について総括報告では述べる。

1) 血漿・血清差

まず、白人において、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%以上の代謝物で高検出感度(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。

2) 凍結融解

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) 食餌・採血時間

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 4)。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%の代謝物しか変化しなかった。

4) 性差・年齢差

性差・年齢差の影響に関しては、白人及び日本人において検討を行った。白人においては若齢、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1)。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齢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。

また、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。

一方、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5)。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。

5) 人種差

人種差に関しては、日本人、白人、及び黒人の若年男性に検体群を併せて検討を行った(図2)。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。

6) 薬物性肝障害のバイオマーカーの実践的探索

最後に、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54代謝物を選抜した(図3)。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性は性及び年齢差、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。絞り込みの結果、4種の代謝物が選択された(図4)。

D. 考察:

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、及び血清は性差・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慮するうえでは、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。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。

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、このような本研究において薬物性肝障害のマーカー探索を行ったように、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。

3) 非臨床からの外挿

医薬品の毒性や安全性については、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。

4) 薬物性肝障害マーカー

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

本研究を通して、イオン性代謝物をバイオマーカーとして用いる際の試料採取要件、及び試料背景因子についての有用な知見を得ることができた。また、4 種の代謝物は試料背景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) 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.
- 3) 斎藤嘉朗、前川京子、齊藤公亮、佐藤陽治、鈴木孝昌 タンパク質・内在性代謝物バイオマーカーを利用した医薬品開発の活性化にむけて. *国立医薬品食品衛生研究所報告*, 131, 20-24. 2013.
- 4) 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. *薬学雑誌*, 133: 1373- 1379, 2013.
- 5) Saito K., Maekawa K., Pappan K. L., 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*, 10: 402-413, 2014.
- 6) 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.
- 7) 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.

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)
 - 4) Saito K., Maekawa K., Pappan K.L., Urata M., Ishikawa M., Kumagai Y., Saito Y.: The difference in the metabolite profiles between plasma and serum, ages or sexes, and their inter-individual variations in human subjects. 10th international ISSX meeting (2013. 10、カナダ・トロント市)
 - 5) Saito K., Maekawa K., Pappan K.L., Urata M., Ishikawa M., Kumagai Y., Saito Y.: The difference in the hydrophilic metabolite profiles between plasma and serum in human subject. 28th JSSX meeting (2013. 10、東京)
 - 6) 石川将己、前川京子、齊藤公亮、浦田政世、田島陽子、村山真由子、妹尾勇弥、熊谷雄治、斎藤嘉朗：ラット血清中の内因性代謝物レベルの雌雄差に関する網羅的検討。第 134 回日本薬学会年会 (2014. 03、熊本)
 - 7) 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 29th JSSX/19th NA-ISSX meeting (2014. 10、米国・サンフランシスコ市)
 - 8) 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)
 - 9) 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)
 - 10) 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)
 - 11) Saito Y., Maekawa K., Saito K.: Safety Biomarker Exploration by Metabolomics. 3rd Annual Seoul-Kitasato Joint Symposium (2015. 1、東京)
 - 12) 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 本研究に用いたヒト検体情報と種類

検体群	1	2	3	4	5	6
検体数	15	15	15	15	15	15
人種	白人	白人	白人	白人	日本人	日本人
性	男	男	女	女	男	男
年齢	25-35	55-65	25-35	55-65	25-35	55-65
BMI	18-37	20-35	25-50	26-43	19-24	20-25
基質	血漿・血清	血漿・血清	血漿・血清	血漿・血清	血清	血清
凍結融解	+	-	-	-	-	-
検体群	7	8	9	検体群	11	12
検体数	15	15	15	検体数	12	8
人種	日本人	日本人	黒人	人種	日本人	日本人
性	女	女	男	肝障害	発症期	回復期
年齢	25-35	55-65	25-35	年齢	29-80	29-80
BMI	19-25	18-25	18-34	基質	血漿	血漿
基質	血清	血清	血清			
凍結融解	-	-	-			

表2 本研究に用いたラット検体情報と種類

検体群	1	2	3	4	5	6	7
検体数	10	10	10	10	10	10	10
性	雄	雌	雄	雌	雄	雄	雄
週齢	10	10	30	30	10	10	10
体重	349±21 g	228±15 g	578±37 g	305±24 g	406±27 g	362±33 g	348±13 g
絶食	16時間	16時間	16時間	16時間	なし	22時間	22時間
採血	午前10時	午前10時	午前10時	午前10時	午前10時	午前10時	午後4時

表3 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・キサントシン・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

表4 ラットで食餌の有無、採血時間、絶食時間により異なるレベルを示した代謝物のまとめ

Statistical Comparisons				
	食事の有無 (vs fed)		採血時間 (22 hr AM vs 22 hr PM)	絶食時間 (16 hr AM vs 22 hr AM)
	16 hr AM	22 hr AM		
Number of statistically different levels of metabolites P < 0.05	156	163	47	4
Direction of differences and metabolite numbers	90 (↑ by fasting)	96 (↑ by fasting)	23 (AMで↑)	2 (16 hrで↑)
	69 (↓ by fasting)	73 (↓ by fasting)	24 (PMで↑)	2 (22 hrで↑)

表5 ラットで試料背景差（性差・年齢差）により異なるレベルを示した代謝物のまとめ

Statistical Comparisons				
	Gender comparison		Age comparison	
	Young	Old	Male	Female
Number of statistically different levels of metabolites P < 0.05	119	154	109	93
Direction of differences and metabolite numbers	↑ in Male / ↑ in Female	↑ in Male / ↑ in Female	↑ in Young / ↑ in Old	↑ in Young / ↑ in Old
	73/46	48/106	93/16	36/57
Common	38・39 (Male・Female)		29・9 (Young・Old)	

図1 日本人性差・年齢差におけるPCA解析

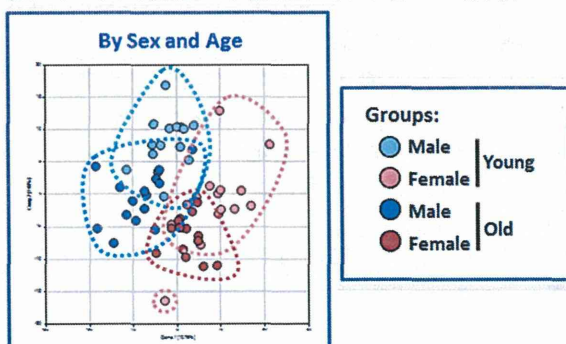


図2 人種差におけるPCA解析

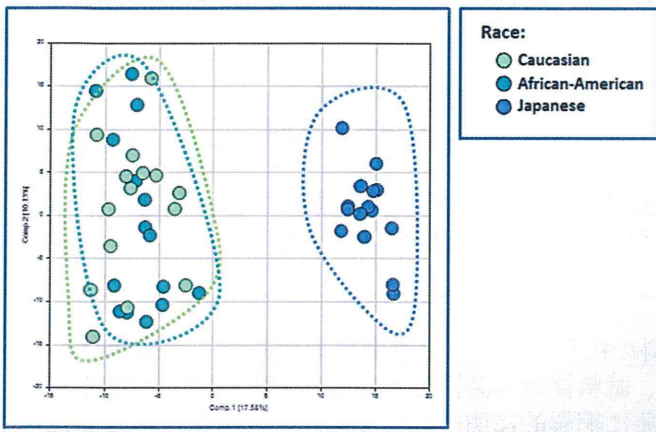


図3 肝障害バイオマーカー候補の絞り込み

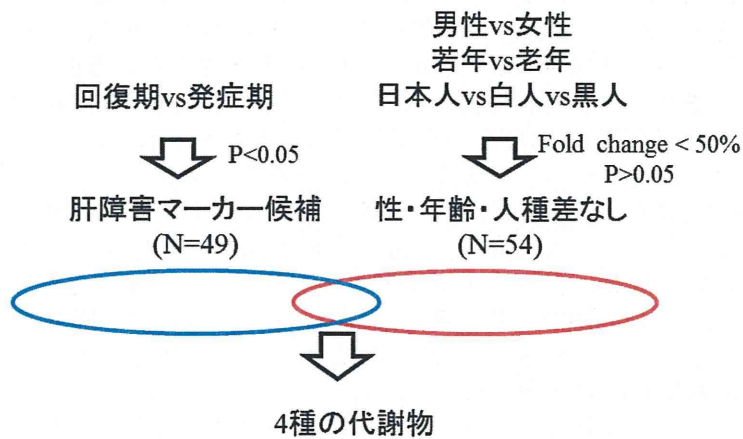
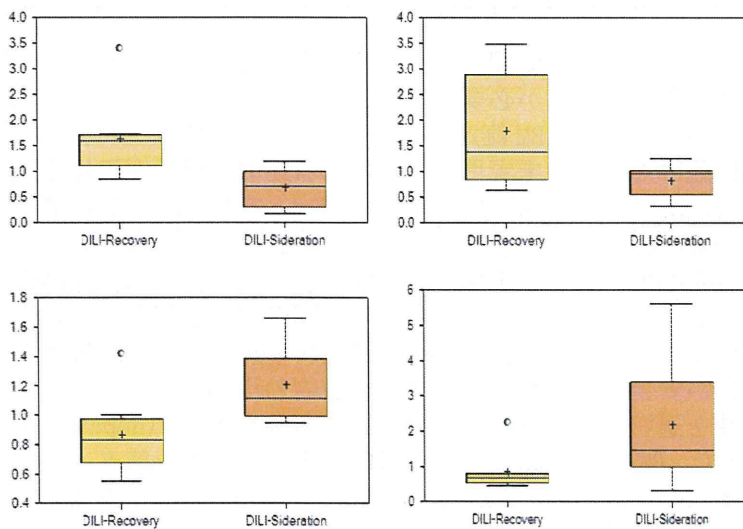


図4 選抜された肝障害バイオマーカー候補



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、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・保管条件の違いが血液中の内在性脂質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。ラットを対象にした解析により、血漿中の BM 探索及び検証時において、食餌影響は、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が、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ことが示唆された。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と考えられたが、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。白人を対象にした解析により、マトリックス (血漿・血清) は早期に統一すべき事項であり、血液凝固反応に関与する代謝物が BM 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、白人においても血漿中の BM 探索及び検証時において、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、試料は分注して保管し、凍結融解の繰り返しは避けるべきであることが示された。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。日本人を対象とした解析により、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 倍以上のレベル差を認め、BM 探索及び検証時において、年齢差は注意すべき要因であると考えられた。また、人種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 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。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ことから、日本人のデータに基づき、日本における評価要件を明確にする必要性が示された。

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。これらの 13 種のうち 4 種は、性、年齢、人種の影響を受けにくいものであった。

A. 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)、 γ -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 となりうることを報告さ

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。そこで本研究では、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、健常人（白人・一部は日本人においても検討）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。さらに、ラットとヒトとの試料採取要件（年齢・性別）に関する外挿性や、血漿中の代謝物レベルの人種差（白人、黒人、日本人）について検討を行った。

最終的に、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。

B. 研究方法：

(1) ラット血液の採取と血漿の調製

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（午前採血群）もしくは午後 4 時（午後採血群）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 血漿を採取した。血漿は採血後 2 時間以内に分取し、直ちに -80°C に保存した。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、及び黒人血漿は ProMedDx 社 (Norton, MA, USA) より購入した。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。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 (CMY, CFY, CMO, CFO と略す) 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-A に示した。黒人は、若年男性 (AMY と略す) 15 名のみを対象とし、上記の白人と同様の条件下で採血を行った。

(2) 健常日本人の血液の採取

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 2-B に示した。血漿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、黒人若年男性の血漿中のメタボロームレベルを比較した。被験者の情報を表 2-C に示した。

(3) ヒト血漿・血清の調整と保存条件

各個人から EDTA-2K 採血 (BD バキュテイナTM 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 バキュテイナTM 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°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 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 2A-C)。白人試料は、血清・血漿を対象とし、日本人・黒人試料は血漿を対象とした。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°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 2-A)。

(4) 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 (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°C 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、110 μ 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。

(5) 脂質抽出・メタボローム測定

ヒト血漿 (各 100 μ 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, 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ィー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ィー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ィー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。

(6) 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。

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

C. 研究結果：

1) ラット血漿中の脂質代謝物の同定、及び試料採取条件に関する検討

ラット血漿サンプルから、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種のアラキドン酸(AA)、エイコサペンタエン酸(EPA)代、ドコサヘキサエン酸(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3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4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。スフィンゴミエリン(SM)及びコレステロールエステル(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、数種のトリアシルグリセロール(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、雄性ラットで76種(29%)、雌性ラットで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、エーテル型PC(ePC)、一部のSM、コレステロール、DHA・ドコサペンタエン酸(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。

2) 白人血漿・血清中の脂質代謝物の同定、及び試料採取/保管条件に関する検討

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、Bligh & Dyer 法の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3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5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、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 5)。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 SM 分子種に加え、DPA 及び DHA を含む GPL・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 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 5)。男性では年齢差を認めた脂質は少なく、20:5ChE や 36:5PC (16:0/20:5PC)、5-HEPE (hydroxyeicosapentaenoic acid) 等、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、11,12-diHETrE (dihydroxyeicosatrienoic acid)、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。

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

表 3 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、ヒトではエーテル型ホスファチジルコリン (PCe) 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、コレステロールエステル (ChE) やトリアシルグリセロール (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 1)。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 代謝物の顕著な年齢差はヒトでは認められなかった (図 2)。

4) 日本人血漿中の脂質代謝物の同定、及び試料採取条件に関する影響

年齢及び性別の異なる 60 名の健常の日本人、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 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 3 に示した。中性脂質は現在解析中であり、以下の試料採取要件 (男女差、年齢差) に関する検討では、中性脂質を除いた全 166 種の代謝物を対象とした。

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 6 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 6 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 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）。

5) 人種間の脂質代謝物レベルの比較

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 6 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。

6) 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 7 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。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 (表 7) ことから、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、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 3A) 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 ($R^2Y=0.973$, $Q^2=0.639$)。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 3B)。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 4 に示した。

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。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。6 種の oxFA の変動を図 5 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) ラット血漿中の脂質代謝物の同定、及び試料採取条件に関する検討

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、ラットの血漿中から 262 種の脂質代謝物を同定し、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、ラット血漿中の BM 探索及び検証時において、食事影響は、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、ラット血漿で、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、今回検出された代謝物に関しては、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) 白人血漿・血清中の脂質代謝物の同定、及び試料採取/保管条件に関する検討

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・血清中から 251 種の脂質代謝物を同定し、そのレベルを、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と考えられる。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、白人においても血漿中の BM 探索及び検証時において、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。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。

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（表 4-5、図 1）。よって、これらの要因の違いが血漿中の脂質代謝物の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（図 1-2）。以上より、試料採要件（性別・年齢）に関しては、ラット、ヒトそれぞれの BM 探索・検証時に、別々に考慮すべき必要性が考えられた。

4) 健常日本人血漿中の脂質代謝物の同定、及び試料採取条件に関する影響

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。中性脂質を除いた代謝物を対象として、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 GPL、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代謝物は、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。中性脂質を除いた代謝物を対象として、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く、日本人の血漿中の GPL、SL、oxFA の性差は、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 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、BM 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、今後 TG 分子種の解析が必要であるが、GPL、SL、oxFA に関して、考慮する必要性は低いと考えられた。

5) 血漿中の脂質メタボローム探索における人種差の影響

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、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 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 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 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 BM 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。

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・試料保管条件の違いが、血液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、非臨床で多用されるラット、及びヒトを対象に、網羅的脂質メタボローム解析を行った。ラットを対象にした解析により、血漿中の BM 探索及び検証時において、食事影響は、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が、探索するバイオマーカーの用途によっては、非絶食下での試験が望ましい場合があることが示唆された。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) を考慮する必要性は低いと考えられた。

白人を対象にした解析により、マトリックスは早期に統一すべき事項であり、血液凝固反応に関与する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、白人においても血漿中の BM 探索及び検証時において、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、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。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。

日本人を対象とした解析により、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倍以上のレベル差を認め、BM探索及び検証時において、年齢差は注意すべき要因であると考えられた。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ことから、注意を要すると考えられた。また、人種間では、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oxFA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) 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.
- 2) Ishikawa M, Maekawa K, Saito K, Senoo Y, Urata M, Murayama M, Tajima Y, Kumagai Y, Saito Y: Plasma and Serum Lipidomics of Healthy White Adults Shows Characteristic Profiles by Subjects' Gender and Age. *PLoS One* 2014; 9: e91806.
- 3) Saito Y, Sai K, Kaniwa N, Tajima Y, Ishikawa M, Nishimaki-Mogami T, Maekawa K: Biomarker exploration and its clinical use. *Yakugaku Zasshi.* 2013;133:1373-9.
- 4) 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(3): 402-413.
- 5) 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.

6) 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.

7) 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」内科領域の薬剤性肝・肺を中心に2014年11月:11-18.

2. 学会発表

- 1) 石川将己, 田島陽子, 村山真由子, 妹尾勇弥, 前川京子, 斎藤嘉朗. 非食事制限下におけるヒト血液中の脂質代謝物レベルに対する試料採取要件の検討. 第85回日本生化学会(平成24年12月)
- 2) 石川将己, 前川京子, 妹尾勇弥, 田島陽子, 浦田政世, 村山真由子, 脇坂真美, 熊谷雄治, 斎藤嘉朗. ヒト血液中脂質代謝物レベルの血漿・血清差, 男女差, 年齢差に関する網羅的検討. 日本薬学会第133年会(平成25年3月)
- 3) 斎藤嘉朗, 鹿庭なほ子, 佐井君江, 花谷忠昭, 中村亮介, 前川京子: ゲノミクスおよびメタボロミクス解析によるバイオマーカー探索. 第16回日本医薬品情報学会学術大会. 2013.8(名古屋)
- 4) 田島陽子, 前川京子, 妹尾勇弥, 浦田政世, 石川将己, 村山真由子, 頭金正博, 斎藤嘉朗: ヒト尿中脂質代謝物の基本的性質(性差および年齢差、安定性)に関する網羅的検討. 第86回日本生化学会大会. 2013.9(横浜)
- 5) 石川 将己, 前川 京子, 妹尾 勇弥, 田島 陽子, 齊藤 公亮, 浦田 政世, 村山 真由子, 脇坂 真美, 熊谷 雄治, 斎藤 嘉朗: バイオマーカー探索・検証のための、ヒト血液中高度不飽和脂肪酸代謝物レベルに関する基盤的検討. 第86回日本生化学会大会. 2013.9(横浜)
- 6) 前川京子, 石川将己, 妹尾勇弥, 田島陽子, 齊藤公亮, 浦田政世, 村山真由子, 熊谷雄治, 斎藤嘉朗: バイオマーカー探索・検証のためのヒト血液中脂質代謝物レベルに関する網羅的検討. 日本薬物動態学会. 2013.10(東京)
- 7) 齊藤公亮, 前川京子, 浦田政世, 村山真由子, 妹尾勇弥, 石川将己, 田島陽子, 中津則之, 山田弘, 斎