

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和2年 5月 28日現在

機関番号：32645  
研究種目：奨励研究  
研究期間：2019  
課題番号：19H00286  
研究課題名：ヒト生体試料中の微量代謝物の網羅的分析方法の確立

研究代表者  
相田 泰子 (AITA, Yasuko)  
東京医科大学・医学部・助手

交付決定額（研究期間全体）（直接経費）：540,000 円

## 研究成果の概要：

生体試料中の微量代謝物を広く検出できるようになることを目指し、唾液検体、血液検体を用いて前処理方法の検討を行ったが、検出される物質数に大きな変化は見られなかった。そこで、前処理方法の検討をいったん中止し、分析条件の検討を行うこととした。この新しい分析条件を用いて標準物質を測定した結果、従来用いていた分析条件で測定するよりも7物質多くの代謝物を検出することができた。この分析条件を用いて唾液検体と血液検体を測定した結果、唾液検体においては96物質、血液検体において87物質の代謝物を検出できた。

この測定方法と併せて前処理法の検討を行うことにより、工程数の削減を可能とする。

## 研究成果の学術的意義や社会的意義

メタボロミクスは代謝物を網羅的に測定でき、今現在の生体内の状態を把握するのに最適な技術である。生体内には微量の生理機能を担う分子や生理状態を反映する分子が多く存在し、バイオマーカーを探索する対象は、疾患の種類や部位により、ヒトの体液（血液、尿、唾液など）・臓器・組織と数多く存在する。検体の種類により含まれる代謝物の濃度が異なるため、同一の前処理方法では微量成分を見逃してしまう可能性がある。今回の研究成果においては従来の測定方法では検出されなかった微量代謝物の測定が可能となった。このことは疾患だけでなく様々なメタボローム研究に活用でき、同分野の研究に対する波及効果は極めて大きいと期待される。

研究分野： 分析化学

キーワード： メタボロミクス、微量代謝物、LC-TOF/MS

## 1. 研究の目的

メタボロミクスにおいては試料中に存在する代謝物レベルを一斉に、かつ網羅的に測定する技術が鍵となる。加えて個々の代謝物の定性および定量性を維持しなければならないため、代謝物を高度に分離、分析する機器分析法を用いることになる。HPLCは高分子量のタンパク質や核酸、脂肪酸、リン酸化合物および有機酸など、幅広い化学的性質をもった代謝物が測定可能であり、メタボローム研究で頻繁に利用される。しかし、溶媒選択が複雑であることやイオン性代謝物の分析ではMSとの適合性が低いことなどの注意点もある。また、個々の代謝物の分離定量という観点では、理論段数(NTP)が他の分離装置の中では比較的低いといった短所もある。試料

ごと(例えば血液、唾液、尿、臓器など)に精度の高い定量結果を得るためには、それぞれに最適な化学的・物理的な処理方法を用い、最適な条件で測定されなければならない。このため、「できる限り多くの代謝物を得るための抽出方法(破碎・抽出溶媒)を最適化する」「個々の代謝物のNTP改善」「代謝物に合わせた検出器(MS)パラメーターの最適化」などの条件検討・評価・最適化が必要不可欠である。

そこで本研究では、種々の検体に合った前処理方法を開発し、検体ごとにできるだけ多く微量な代謝物の定量値を再現性良く分析する方法を確立することを大きな目標として、検体の種類(唾液・血液)による前処理方法と、対象とする代謝物に適した分析方法の確立を目指す。

## 2. 研究成果

これまでの研究により確立している分析条件で、すでに定量できているイオン性代謝物はヒトの血液で103物質、唾液で102物質である。まずは、血液、唾液の前処理方法(分子構造に基づく溶媒との相溶性を考慮した抽出効率の向上、夾雑物の選択的な除去)を検討し、150物質の代謝物の測定・定量を可能にすることを目標とした。測定には液体クロマトグラフ・飛行時間型質量分析計(LC-TOF/MS)を用いた。唾液検体、血液検体を用いて前処理方法の検討を行った。抽出溶媒の変更や、フィルターを用いた夾雑物除去を行ったが、検出される物質数に大きな変化は見られなかった。そこで、前処理方法の検討をいったん中止し、分析条件の検討を行うこととした。

検討を行う対象としては、これまでの分析条件では検出ができなかったATP(アデノシン三リン酸)などエネルギー代謝に関連する物質を測定できることを目的とし、これらの物質の分離に適したカラムを使用して検出できる条件を確立した。この新しい分析条件を用いて標準物質を測定した結果、従来用いていた分析条件で測定するよりも7物質(当研究所が所有していた標準物質)多くの代謝物を検出することができた。これまで検出できていた物質が検出されなくなることはなかった。疾患の中でもがん細胞では、代謝のエネルギーとなるATPレベルが高いことが多く、これらの物質を測定できることはがん細胞の代謝メカニズムを解明するなど大変大きな役割を果たすことが期待される。

この分析条件を用いて唾液検体と血液検体を測定した結果、唾液検体においては91物質、血液検体において83物質の代謝物を検出できたが、従来の検出できていた物質数より、大きな向上は見られなかった。そこで、HPLCの移動相に機器の金属イオンを不活性化する添加剤を加えることにより、分析条件の改良を試みた。結果、唾液中では5物質(Malate、Glycerol-3-phosphate、Phosphoenolpyruvate、2,3-Diphosphoglycerate、Fructose-1,6-bisphosphate)、血液中では4物質(Malate、Phosphoenolpyruvate、2,3-Diphosphoglycerate、Fructose-1,6-bisphosphate)の代謝物が検出された。この改良を加えることにより、生体サンプル中の微量成分を検出することに成功した(図1)。

今回は、イオン性代謝物を対象としていたため、唾液よりも脂溶性物質の多く含まれる血液検体で検出できた代謝物数が少なかった可能性があ

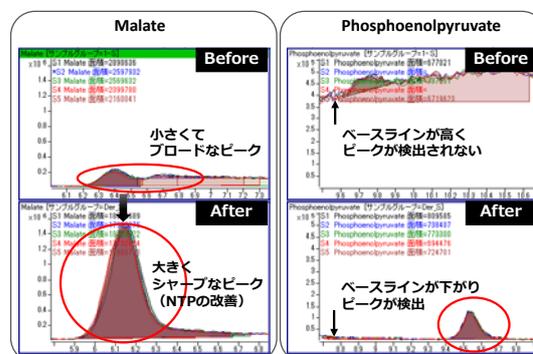


図1 分析条件の改良により検出可能になった代謝物のピークの例

る。しかし、解析の対象をノンターゲットとすることにより、これまでの測定では見られなかった検体由来の未知ピークの検出される可能性がある。これにより、そのピークが例えば健常者の検体と患者の検体で大きな違いがある場合には、加えて同定作業を行い、代謝物を特定することで重要なバイオマーカーの発見につながる。同定作業を行うための標準物質ライブラリーの拡張を行うことで、検出可能物質数を増やすことができるだろう。その他に、考えられる原因としては、今回用いた唾液検体、血液検体ともに、以前用いた試料と異なるものを使用していたため、検出される代謝物の数に違いが見られたと推測されるが、生体試料の測定に使用される LC-TOF/MS などの測定装置は、測定を重ねるにつれ MS 部分に汚れが蓄積し、そのために感度が低下し、代謝物が検出できなくなることがある。今回のデータを採取した時期は、装置のメンテナンスから半年ほど経っていたこともあり、MS の感度が低下し、検出できる代謝物が減少した可能性も考えられる。測定を繰り返し、この検出できなくなる物質をパラメーター物質として、装置の状態を把握することも、正確なメタボロームデータを取るうえで今後の課題となる。

メタボローム解析では、検体の採取、保存・輸送に始まり、前処理、測定と非常に多くの工程数がある。検体に合わせて、前処理方法を検討するうえで、工程数の削減も視野に入れなければならない。前処理過程での工程数の削減が可能となれば、複雑な作業におけるヒューマンエラーの減少が実現し、より正確なメタボロームデータが得られることとなる。そのことは、特定の対象疾患のみならず、幅広いメタボローム研究に活用でき、他施設での共同研究においても、データを共有することが可能となり、ますますのメタボローム研究の発展が考えられる。今後、尿検体をはじめ様々な検体においても前処理方法と分析条件を用いて測定を行い、種々の検体に適した測定方法の確立を目指す。そして種々の検体に適した高感度・高精度な分析条件の確立を実現していく（図 2）。

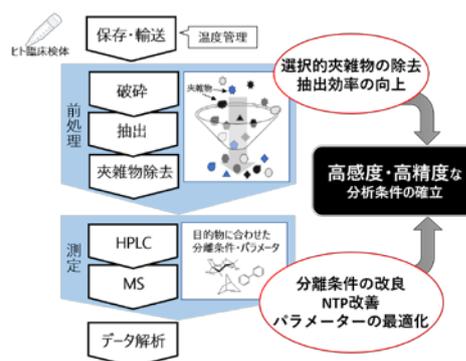


図 2 メタボローム解析のプロセス中での高感度化のポイント

### 3. 主な発表論文等

なし

### 4. 研究組織

研究協力者

研究協力者氏名：富田 淳美

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。