

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10539

研究課題名(和文) スピンメタボロミクスに関する基礎的検討および臨床応用

研究課題名(英文) Fundamental consideration and clinical application of spin metabolomics in perioperative period

研究代表者

新宮 千尋 (SHINGU, Chihiro)

大分大学・医学部・准教授

研究者番号：30295191

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：生体の代謝物を網羅的に解析することをメタボロミクス解析という。体への大きな侵襲である手術に伴い、生体内の代謝は大きく変化する。我々は手術に伴う代謝の変化をベッドサイドでリアルタイムに評価することを目指している。そのための第一歩として、本課題では、血液中の代謝物の変化を核磁気共鳴法および電子スピン共鳴法(スピン共鳴解析)を用いたメタボロミクス解析を行うための基礎的技術を確立した。

研究成果の概要(英文)：Comprehensive analysis of metabolites in specimen is called metabolomics. Since surgical procedures are severely invasive to human body, metabolism under surgery is affected drastically during perioperative period. We aim to develop a real-time monitoring of perioperative metabolism at bedside. This study was conducted to establish and verify the basic procedures and protocols for "spin metabolomics" of perioperative blood samples using nuclear magnetic resonance spectroscopy and electron spin resonance spectroscopy.

研究分野：麻酔科学

キーワード：周術期 メタボロミクス 核磁気共鳴法 電子スピン共鳴法

## 1. 研究開始当初の背景

近年、生体が作り出す代謝物を網羅的に解析するメタボロミクス (メタボローム解析) が注目されている。生体内には様々な代謝で生じた多種類の化合物が様々な濃度で存在しており、メタボロミクスはこの代謝物を一括して解析し、客観的にその変化をとらえ、その因果関係を明らかにしようとする生命科学における新しい分野である。医学の分野においても疾患診断などへの応用が進んでおり、急性期医療の領域においても報告が散見されるようになった。

核磁気共鳴法 (NMR) は、電荷をもった原子核の回転を利用した有機化合物の構造解析に欠かせない分析法で、非破壊的に試料中に含まれる化合物を同定し定量できるため、メタボロミクスへの応用にその利用が拡大されている (NMR メタボロミクス)。

NMR は液体クロマトグラフィ-質量分析法 (LC/MS) などと比較して感度が低いという欠点があるが、試料の調製が容易であり、再現性が高く、非破壊的な測定であるので、生きた試料を生きたまま測定することが可能である。また、同じスペクトルデータから特定の化合物の定量を行う **targeted** 解析と、同定されていない未知の化合物を含めた **non-targeted** 解析のどちらも実行可能であるという長所をもつ。

一方、電子スピン共鳴法 (ESR) は分子中の不対電子を測定する分析法で、フリーラジカルを直接検出することのできる唯一の手段で、生体試料中にフリーラジカルが存在すれば、それを非破壊的に同定・定量することができる。生体内ではフリーラジカル種は情報伝達のメッセンジャーとして利用される一方、虚血再灌流傷害や炎症などでは種々のフリーラジカルが産生され、膜の脂質や DNA、蛋白質を過酸化して細胞を傷害するなど多くの病態に関与している。フリーラジカル種も代謝物の一つであ

ることから、生体試料中のフリーラジカルの解析もメタボロミクスの一分野と言えよう (ESR メタボロミクス)。

NMR と ESR は、両者とも試料に磁場を加えて電磁波を照射することで、共鳴、吸収を検出するという共通点を有している。我々はこれをスピンメタボロミクスと呼ぶことを提唱している。スピンメタボロミクスを行うための NMR および ESR の測定条件を決定し、データの解析手法を開発するための基礎的情報を得て、スピンメタボロミクスの臨床での応用の基礎的技術を確立する必要がある。

## 2. 研究の目的

本研究は、スピンメタボロミクスを実施するための NMR 及び ESR の基礎的測定条件を決定し、臨床での応用の基礎的技術を確立することを目的として実施した。

## 3. 研究の方法

### NMR メタボロミクス

#### 検体

測定条件を決定するために、ラットの血漿を用いた実験を実施した。Old rat より採血し、血漿を分離し、測定までディープフリーザーにて凍結保存した。ヒト血漿は、健常ボランティアから血漿および尿を採取し、測定までディープフリーザーにて凍結保存した。

#### 検体の調製

検体にリン酸緩衝液 (pH7.4) と内部標準 (TMP) を添加した。

#### NMR 測定

試料を NMR 用試験管に入れ、NMR 分光器 (Avance-400, Bruker) にて  $^1\text{H}$  スペクトルを観測した。測定プログラム (TOPSPIN ver.3.2, ブルカー) により、試料中に含まれる代謝物とその濃度を測定した。

#### 検討事項

(1) ラット血漿を用いて、試料の調製法

と NMR 信号取得時のパルスプログラムの選択、のパラメータの最適化を行った。

(2) メタボロミクス解析プログラム AMIX を用いて、得られたスペクトルのバケット解析を行い、得られたデータが解析に耐え得るものか否か検討した。

(3) 上記(1)(2)で決定した実験プロトコールの妥当性を検討するため、ラット血漿の凍結-解凍を繰り返し、血漿中の代謝物の変化の有無を検討した。

(4) 健常ヒト血漿を用いて、決定した測定および解析の手順が臨床応用可能であることを確認した。

### ESR メタボロミクス

#### 検体

大分大学大型動物手術施設にて行われたヤギの開心術において、動脈血を採血した。

#### ESR 測定

EDTA を添加した血液を、ESR 用ディスクポータブルセルに充填し、ESR 分光器

(JES-RE1X, JEOL) のキャビティにセットした。Mn<sup>2+</sup>を外部標準として、血液中のフリーラジカルを検出した。

## 4. 研究成果

### NMR メタボロミクス

#### (1) NMR 試料の調製と測定

##### 検体の調製について

NMR 測定に際し、試料とリン酸緩衝液を血漿の場合は1:1、尿の場合は9:1の割合で混合したものを用いたところ、良好なスペクトルが得られた。内部標準としてTMPを添加した。

##### 測定パルスプログラムの選択

試料中には大量の水(軽水)が含まれ、<sup>1</sup>H-NMR 測定の際には、この水に由来する巨大な信号のみを抑制するパルスプログラム(水消しプログラム)が用意されている。当初はメーカーの推奨する標準的な水消しプログラムを利用していましたが、その抑制が十分でなく水に近いところに位置する代謝

物由来の信号の観察が困難であった。そこで、測定プログラムに含まれるさまざまなパルスプログラムを試し、最適のものを探した。CPMG といわれるパルスプログラムによる水消しが最適であると判断し、以降の測定にはこれを用いることとした(図1)。

#### (2) 解析プログラム

解析プログラム AMIX を用いて、ラット血漿から得られたスペクトルの解析を行った。まず、本課題によって整備したデータベースを用いて、代謝物の同定を試みたところ、乳酸等の主要な代謝物については同定が可能であった。しかし、個々のピーク的位置には測定条件に依存すると思われる誤差があったため、全てのピークについて相当する代謝物を同定することはできなかった。

そのため、以降の解析ではバケット解析を行った。バケット解析とは、個々のピークがどのような化合物由来か同定することなく、横軸(化学シフト[ppm])を一定の bin 幅で区切り、それぞれの bin における曲線下面積を用いた解析である。このピークが同定されていない場合でも、代謝物のプロファイルの差異を検出することが可能である。

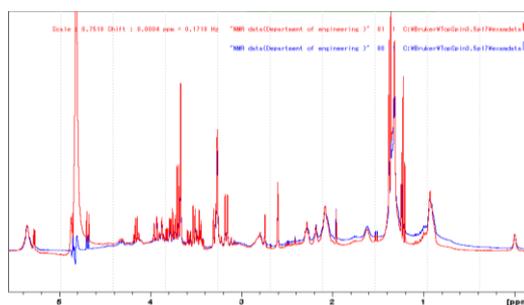


図1. 水消しプログラムによる水由来信号の抑制の比較。標準的な水消しプログラム(Noesypr1d, 青)では水の近傍の代謝物由来の信号も抑制されて小さくなってしまふ。CPMG法(CPMGpr1d, 赤)では、水の抑制は弱いものの水の近傍の代謝物のピークがしっかりと認められる。

(3) 凍結-解凍の繰り返しがラット血漿中の代謝物に与える影響

ここまでで決定された手技・手法を用いて、標記検討を行った。主成分分析により、凍結-解凍の回数別にプロットしたところ、いずれも同様の分布を示した。即ち、10回程度の凍結-解凍の繰り返しであれば、代謝物のプロファイルは変化しないことが示された(図2)。

(4) 健常ヒト血漿への応用

健常ヒト血漿をラット血漿同様のプロトコールにて測定した。上記(3)と同等のスペクトルが得られ、ヒト由来検体への臨床応用が可能であることが示された。

### ESR メタボロミクス

ヤギの開心術の周術期の血液中のフリーラジカルの検出を試みた。当初は採血直後にスピントラップ剤(CYPMPO)を加えて、ヒドロキシルラジカル等の検出を試みたが、何も検出されなかった。しかし、その際に予想していなかったアスコルビン酸フリーラジカル (AFR) が出現していることに気付いた。そこで、スピントラップ剤を添加せず、EDTAのみ添加した全血を経時的にESR測定したところ、手術前と比較して開心術中にAFRが増加し、手術終了時に術前と変わらない状態に戻ることが明らかになった(図3, 4)。アスコルビン酸は、体内で発生する種々のフリーラジカルを消去する機構の最下流に位置する。ヤギは、アスコルビン酸を体内で合成できることから、今回検出したAFRは、開心術によるストレスでフリーラジカルの産生量が増加し、その結果として最終的な処理産物であるAFRが増えたことを捉えたものと考えられる。

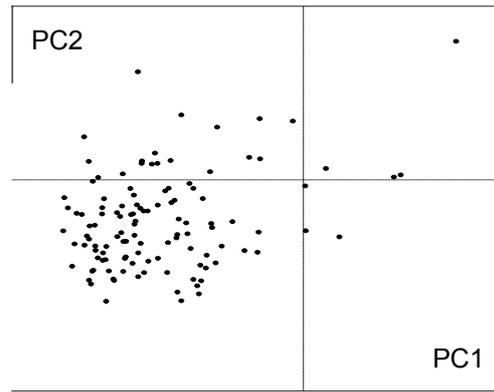


図2. ラット血漿中の代謝物のバケット解析。凍結-解凍を10回繰り返しても、第一主成分-第二主成分平面上の分布に変化は認められなかった。

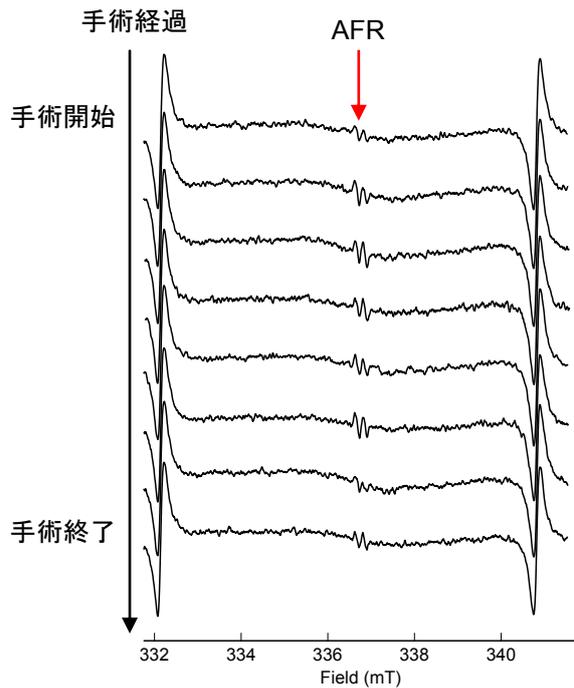


図3. ヤギ周術期血液中に検出されたアスコルビン酸フリーラジカル (AFR, 下向き矢印). 両端は外部標準の  $Mn^{2+}$ 由来の信号である。術中は、術前と比べてAFRが増加し、手術終了時には術前のレベルに復していた。

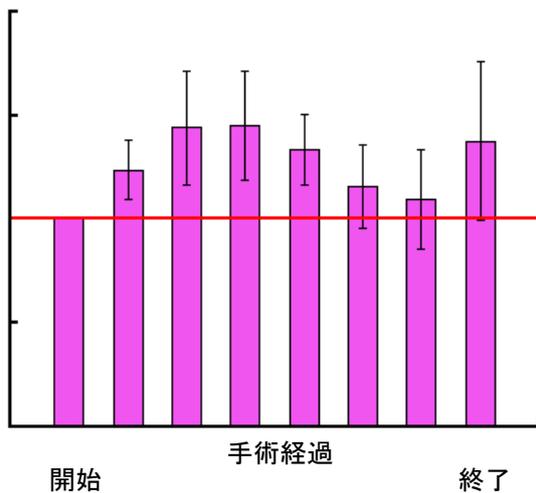


図4. 周術期ヤギ血液中のアスコルビン酸フリーラジカル (AFR) の経時的変化. 縦軸は AFR の相対量を示す (赤線が手術開始時). 平均  $\pm$  95%信頼区間を示す (n = 19).

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者, 研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

1. Tokumar O, Matsumoto S, Mizoguchi T, Kawashima T, Ogata K, Miyamoto S, Kitano T. Direct observation of ascorbyl free radicals (vitamin C radicals) in blood of perioperative animals. J Physiol Sci 68(Suppl 1):S185, 2018. (査読なし)

[学会発表] (計 4 件)

1. 徳丸治, 松本重清, 岡本啓太郎, 溝口貴之, 尾方和枝, 北野敬明. 周術期の血液から検出されるアスコルビン酸フリーラジカルについて. 第 69 回日本酸化ストレス学会学術集会 (2016.08.30-31, 仙台)
2. 松本重清, 和田伸介, 栗林由英., 牧野剛典, 小山淑正, 古賀寛教, 山本俊介, 内野哲哉, 新宮千尋, 西田欣弘, 徳丸治, 北野敬明. 救急重症患者における血症ビタミン C ラジカルのリアルタイム測定法の検討. 第 69 回日本酸化ストレス学会学術集会 (2016.08.30-31, 仙台)
3. 河島毅之, 岡本啓太郎, 溝口貴之, 松本重清, 西田欣広, 宮本伸二, 徳丸治, 北野敬明. 周術期の血液中に検出されるアスコルビン酸フリーラジカル. 第 7 回癌・炎症と抗酸化能研究会 (2016.11.25-26, 別府)
4. Tokumar O, Matsumoto S, Mizoguchi T, Kawashima T, Ogata K, Miyamoto S, Kitano T. Direct observation of ascorbyl free radicals (vitamin C radicals) in blood of perioperative animals. 第 95 回日本生理学会大会 (2018.3.28-30, 高松)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.oita-u.ac.jp/anesth/index.html>

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

新宮 千尋 (SHINGU, Chihiro)  
大分大学・医学部・准教授  
研究者番号: 30295191

(2) 研究分担者

徳丸治 (TOKUMARU, Osamu)  
大分大学・福祉健康科学部・教授  
研究者番号: 40360151

(3) 連携研究者

( )

研究者番号:

(4) 研究協力者

( )