

様式3

愛媛大学沿岸環境科学研究センター  
共同利用・共同研究拠点「化学汚染・沿岸環境研究拠点」  
共同研究報告書

平成 30 年 2 月 16 日

化学汚染・沿岸環境研究拠点 拠点長 殿

申請者（研究代表者）

所属機関 千葉大学予防医学センター

職 助教

氏名 江口 哲史

e-mail a\_eguchi@chiba-u.jp

下記の共同研究について、別紙の通り報告します。

1 研究課題

ヒト、ペット動物を対象としたオミクスデータ解析に関する知見の共有

2 研究組織

氏名	所属	職	分担研究課題
代表者 江口 哲史	千葉大学予防医学 センター	助教	メタボローム分析・データ解析・分 析法共有
拠点対応教員 野見山 桂	愛媛大学沿岸環境 科学研究センター	准教授	データ提供・解析助言

3 研究内容 （別紙）

## 研究内容（別紙）

### 研究課題名

ヒト、ペット動物を対象としたオミクスデータ解析に関する知見の共有

### 代表者

千葉大学予防医学センター 江口 哲史

### 共同研究者

愛媛大学沿岸環境科学研究センター 野見山 桂

### 研究目的

近年化学物質の毒性解析手法として利用されているメタボローム分析は、未だ決定版となるプロトコルがなく、様々な分析手法が提案されている。分析・解析手法を確立には分析・解析技術の共有が不可欠であり、知見を蓄積・共有し、分析・解析技術を向上する必要がある。

本年度はまずガスクロマトグラフ-質量分析計によるメタボロームの分析法について調査を行い、導入の検討を行った。低分子代謝物の集まりであるメタボロームには様々な物性の化学物質が存在しており、一度の測定でそのすべてを分析することは困難である。また、メタボロームにはイオン性の化合物が多く含まれているため、新規に開発される分析手法の多くでは高速液体クロマトグラフ質量分析計 (LC-MS) のように、カラムを交換することにより広範囲の対象物質をターゲットにできる機器が選定される事が多い。しかしながら GC-MS は誘導体化などのサンプル前処理が必要であるものの、再現性が高いこと、ライブラリが充実しており定性能力が優れていること。また、機器の操作が比較的容易であり、他の測定機器に比べコスト面で優れているため、運用し易いという利点がある。さらに、誘導体化により広い範囲の物質をターゲットにできることから、導入のメリットがあると考え、溶出時間、スペクトル情報および、GC-MS の測定条件のそろったライブラリを選定することを目的とした。

一方、LC-MS はサンプル前処理が GC-MS に比べ比較的簡易であり、スループットに優れていること。カラムの交換により対応できる物質が多く、飛行時間型質量分析計 (ToF-MS) のように精密質量を取ることができる機器が充実していることか

ら、現在メタボローム・プロテオームの領域で広く利用されている。しかしながら定量に優れたタンデム質量分析計 (MS/MS) を使用するための溶出時間を含んだライブラリの整備は不十分であり、標準品の測定によるデータの蓄積が求められている。このため、LC-MS/MS に適用可能な溶出時間を含んだライブラリの構築をすすめるため、LC-QToF-MS を用いてメタボロームの溶出時間・スペクトルを得ることを目的とした。

## 研究内容

本年度はまず GC-MS によるメタボローム分析についての調査を行い、機器条件および測定対象がパッケージ化されたライブラリを導入した。

続いて LC-QToF-MS により、中心代謝などに関わるメタボローム約 125 種について標準品を入手、測定を進め、溶出時間およびスペクトルライブラリの作成を進めた。

情報共有として、北海道大学で開催された Chemical Hazard Symposium において、昨年度の成果であるベトナム鉛バッテリー汚染地域住民における尿中メタボロームの変動について講演を行った他、共有したデータの解析を進めることで知見の共有を行った。

## 研究内容

ライブラリ探索の結果、Nishiumi et al など報告されている (Nishiumi, S et al., 2017)、島津製作所製の Smart Metabolites Database (Shimadzu, Kyoto, Japan) を選定、愛媛大学に導入し、GC-MS によるメタボローム分析基盤を確立した。本データベースには有機酸・脂肪酸・アミノ酸・糖類を含む 568 種の代謝物ライブラリおよび各化合物の溶出時間、GC-MS 測定条件が含まれており、迅速な分析手法の立ち上げが期待できる。今後は引き続き、前処理・誘導体化条件の検討を進め、機器だけではなく、分析系全体についての検討および QA/QC 系の確立を進める。

LC-MS については Yuan et al., 2012 に記載された 258 種の代謝物のうち (Yuan, M et al, 2013)、分取が可能であった代謝物 125 種を選定し (Table 1)、5mg × 3 セット分取を行った。分取した標準品は LC-QToF-MS (Sciex X500R) に Xridge BEH Amide (3.5 μm; 4.6 mm inner diameter (i.d.) × 100 mm length) カラムを装着し、pH10

の塩基性溶媒を移動相に用いて測定を行った。現在は標準品の測定が終了しており、それらのデータについて解析、要約を進めている。

2017年8月2日に、北海道大学において、Chemical Hazard Symposiumに参加し、ベトナム鉛バッテリー汚染地域住民における尿中メタボロームの変動について講演を行った。ここでは結果の解釈だけではなく、ランダムフォレストなどの機械学習を用いたデータの解析や (Breiman, L. 2001)、MBROLE2.0 (López-Ibáñez, J et al, 2013)、Reactome (Joshi-Tope, G, J et al, 2005)などを用いた enrichment 解析など、データ解析手法についても解説を行い、知見を共有することができた。また、これらを通じてデータ解析の依頼を受け、交流の拡大につなげることができた。

上記、ベトナム鉛バッテリー汚染地域に関しては現在国際誌に投稿中である。

#### 引用文献

Breiman, L. (2001). Random forests. *Machine learning*, 45(1), 5-32.

Joshi-Tope, G., Gillespie, M., Vastrik, I., D'Eustachio, P., Schmidt, E., de Bono, B., ... & Lewis, S. (2005). Reactome: a knowledgebase of biological pathways. *Nucleic acids research*, 33(suppl\_1), D428-D432.

López-Ibáñez, J., Pazos, F., & Chagoyen, M. (2016). MBROLE 2.0—functional enrichment of chemical compounds. *Nucleic acids research*, 44(W1), W201-W204.

Nishiumi, S., Kobayashi, T., Kawana, S., Unno, Y., Sakai, T., Okamoto, K., ... & Kanemitsu, Y. (2017). Investigations in the possibility of early detection of colorectal cancer by gas chromatography/triple-quadrupole mass spectrometry. *Oncotarget*, 8(10), 17115.

Yuan, M., Breitkopf, S. B., Yang, X., & Asara, J. M. (2012). A positive/negative ion-switching, targeted mass spectrometry-based metabolomics platform for bodily fluids, cells, and fresh and fixed tissue. *Nature protocols*, 7(5), 872.

#### 成果発表

なし

Table 1. LC-MS 用標準品リスト

1-Methyl-Histidine	Lactate
2-Aminooctanoic acid	Leucine -isoleucine
2,3-dihydroxybenzoic acid	Lysine
4-Pyridoxic acid	Malate
7-methylguanosine	Maleic acid
Acetylcarnitine DL	Methionine
Aconitate	Methylcysteine
Adenine	Methylmalonic acid
Adenosine	Methylnicotinamide
Alanine	N-acetyl-glucosamine
Allantoin	N-acetyl-glutamate
Amino adipic acid	N-acetyl-glutamine
Arginine	N-Acetyl-L-alanine
Ascorbic acid	N-acetyl-L-ornithine
Aspartate	N-Acetylputrescine
Betaine	N6-Acetyl-L-lysine
Biotin	NADPH
Carnitine	Ng,NG-dimethyl-L-arginine
Cholic acid	Nicotinamide
Choline	Nicotinate
Citraconic acid	O-acetyl-L-serine
Citrate	Ornithine
Citrulline	Orotate
Creatine	Oxaloacetate
Creatinine	p-aminobenzoate
Cysteine	p-hydroxybenzoate
Cystine	Pantothenate
Cytosine	Phenylalanine
Deoxycholic acid	Phenyllactic acid
Deoxyinosine	Phenylpropionic acid
Dimethylglycine	Phenylpyruvate
DL-Pipecolic acid	Phosphoenolpyruvate
Flavone	Phosphorylcholine
Folate	Proline
Fumarate	Purine
Glucono-D-lactone	Putrescine
Glucosamine	Pyroglutamic acid
Glucose-1-phosphate	Pyruvate
Glutamate	Quinolate
Glutamine	Riboflavin
Glutathione	Ribose-phosphate
Glutathione disulfide	S-adenosyl-L-homoCysteine
Glycerophosphocholine	S-methyl-5-thioadenosine
Glycine	Sarcosine
Glyoxylate	Serine
Guanidoacetic acid	sn-glycerol-3-phosphate
Guanine	Succinate
Guanosine	Taurine
Histidine	Thiamine
Histidinol	Threonine
Homocysteic acid	Thymidine
Homocysteine	Thymine
Homoserine	Trehalose-sucrose
Hydroxyphenylacetic acid	Tryptophan
Hydroxyphenylpyruvate	UDP-D-glucose
Hydroxyproline	Uracil
Hypoxanthine	Uric acid
Imidazole	Uridine
Imidazoleacetic acid	Valine
Indole-3-carboxylic acid	Xanthine
Inosine	Xanthosine
Kynurenic acid	Xanthurenic acid
Kynurenine	