

## 別紙 研究内容

### 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。

このため本年度では液体クロマトグラフ-タンデム飛行時間型質量分析計 (LC-QToFMS) を用いたヒト・ペット動物への化学物質曝露影響をメタボローム解析について、試料の前処理からデータ解析について共有することを目的とした。

### 研究概要

本年度は LC-QToFMS によるノンターゲット分析に関し、試料の前処理、測定条件、品質管理と品質保証 (QA/QC)、データの取扱について検討を進めた。本検討結果は愛媛大学で開催された **Chemical Hazard Symposium** において発表した。また、本年度は愛媛大学から提供を受けたデータについて、本研究で共有した手法に基づいて追加解析を試みた。

また、昨年度北海道大学で開催された **Chemical Hazard Symposium** で発表したベトナム鉛バッテリーリサイクル地域住民尿中のメタボローム解析について追加解析を進め、国際誌に投稿・受理された。

## 研究内容

### LC-QToFMS を利用した分析系の確立

本年度は LC-QToFMS によるメタボロームの分析法について調査を行った。共同研究室で稼働している Sciex TripleToF 5600+により、分析の QA/QC および測定データの取扱について手法確立を試みた。試料は Xridge BEH Amide (3.5  $\mu\text{m}$ ; 4.6 mm inner diameter (i.d.)  $\times$  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した (Eguchi et al., 2016; Soga et al., 2009; Yuan et al., 2012)。測定により得られた MS データの解析には MS-DIAL (Tsugawa et al., 2015) を利用した。

試料は 5 回の繰り返し測定、測定シーケンスはランダム化し、測定順からのバイアスを回避した。また、QC サンプルとして全試料から一部を分取・混合した試料を作成し、10 検体に 1 回測定した (Figure 1)。Positive モードでの分析時データからピークを抽出したところ、1 検体から 3000-4000 種のピークが抽出されたが、すべての QC サンプルから検出されたピークは 200 種類程度、かつ、その中で変動係数が 30%を下回っていたピークは 150 種類程度であったため、これらのピークを解析に用いるワークフローを定めた。その他の測定モードにおいても同様の処理を行うことで、変動が小さく、かつ安定して検出される物質をモニター可能な系を確立できた。

また、本研究で得た MS-DIAL を用いた測定データの取扱技術を利用し、愛媛大学・Wadsworth Center で測定された ToFMS データについて annotation を試み、化合物の同定数を増やすことができた。

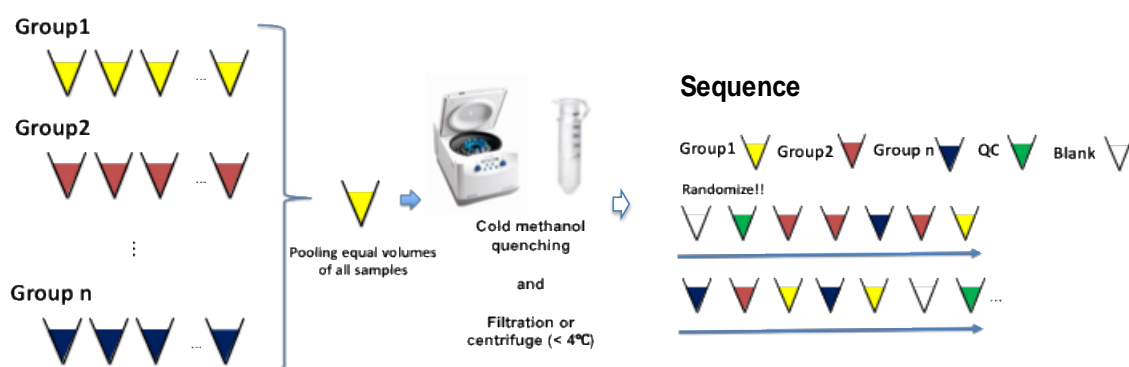


Figure.1 分析のフロー

## ベトナム鉛バッテリーリサイクル地域住民尿中のメタボローム解析

本研究は愛媛大学および千葉大学の倫理委員会より承認を受けた研究である。研究対象は成人のみとし、ベトナムの鉛バッテリーリサイクル地域住民 (n=44)、 対照地域住民 (n=51) より 2010-2011 年に採取した尿検体を測定に供した。

263 種の尿中メタボロームは既報に改良を加え (Eguchi et al., 2016; Soga et al., 2009; Yuan et al., 2012)、高速液体クロマトグラフ-タンデム質量分析計 (HPLC-MS/MS) で測定した。各地域住民の血中鉛濃度および尿中  $\delta$ -aminolevulinic acid 濃度は既報で報告されたデータを用いた (Noguchi et al., 2014)。

得られた尿中メタボロームデータは、データクリーニングおよび白色化の後、正規化付き線形回帰分析、正規化付きロジスティック回帰分析、Mann-Whitney U test, Spearman's rank test の 4 種手法で解析を試み、3 種以上の手法で抽出されたメタボロームを鉛曝露のバイオマーカー候補とした。抽出した因子は MBROLE2 により enrichment analysis を行った (Lopez-Ibanez et al., 2016)。この結果、false discovery rate (FDR) < 0.05 で抽出されたパスウェイを曝露により変動した生体内パスウェイとして解析を試みた。

解析の結果、10 種のメタボロームがマーカー候補物質として抽出され、それらはアミノ酸・ポルフィリンの代謝に関わるパスウェイに関連していた。また、変動していたパスウェイについて検討したところ、中枢神経毒性や膀胱へのダメージ、ヘム合成に関連する可能性が示唆され、鉛バッテリーリサイクルを通じた鉛曝露が、ヒトの代謝系に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

本研究結果は国際誌である *Environmental Pollution* に投稿/受理された (Eguchi et al., 2018) (Figure 2)。

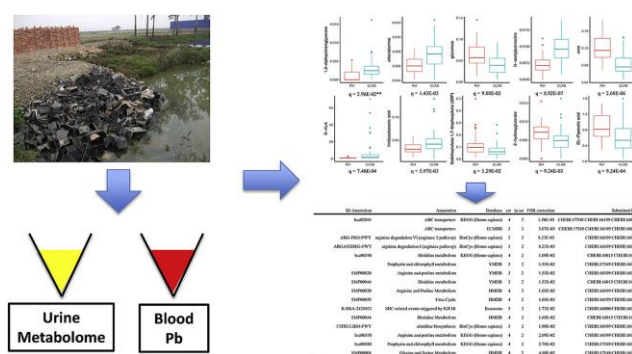


Figure 2 Graphical abstract of *Environmental pollution*, (2018) 242, 98-105. (Under a Creative Commons license)

## 引用文献

- Eguchi, A., et al., 2016. The effects of early postnatal exposure to a low dose of decabromodiphenyl ether (BDE-209) on serum metabolites in male mice. *J Toxicol Sci.* 41, 667-75.
- Eguchi, A., et al., 2018. Alterations in urinary metabolomic profiles due to lead exposure from a lead-acid battery recycling site. *Environmental Pollution.* 242, 98-105.
- Lopez-Ibanez, J., et al., 2016. MBROLE 2.0-functional enrichment of chemical compounds. *Nucleic Acids Res.* 44, W201-4.
- Noguchi, T., et al., 2014. Exposure assessment of lead to workers and children in the battery recycling craft village, Dong Mai, Vietnam. *Journal of Material Cycles and Waste Management.* 16, 46-51.
- Soga, T., et al., 2009. Metabolomic profiling of anionic metabolites by capillary electrophoresis mass spectrometry. *Anal Chem.* 81, 6165-74.
- Tsugawa, H., et al., 2015. MS-DIAL: data-independent MS/MS deconvolution for comprehensive metabolome analysis. *Nat Methods.* 12, 523-6.
- Yuan, M., et al., 2012. A positive/negative ion-switching, targeted mass spectrometry-based metabolomics platform for bodily fluids, cells, and fresh and fixed tissue. *Nat Protoc.* 7, 872-81.

## 成果発表

- Eguchi, A., et al., 2018. Alterations in urinary metabolomic profiles due to lead exposure from a lead-acid battery recycling site. *Environmental Pollution.* 242, 98-105.