OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	メタボロミクスによる胃潰瘍の血中バイオマーカー探索
Author(s)	竹内, 健一郎
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/52250
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

メタボロミクスによる
胃潰瘍の血中バイオマーカー探索

竹内　健一郎

目次

緒論 2

本論 6

第 1 章　NSAIDs 誘発胃潰瘍モデルのメタボロミクス 6

第 2 章　オメプラゾール及びファモチジンがアスピリン誘発胃潰瘍モデルの代謝プロファイルに与える影響 17

第 3 章　各種胃潰瘍モデルにおける代謝プロファイルの比較 26

結論 33

謝辞 35

実験の部 36

動物モデルの作成 36

胃潰瘍面積の測定 37

サンプルの前処理及び CE-MS の測定 38

データの解析 40

参考文献 42

Supplemental Table 47

緒論

臨床において頻繁に報告されている副作用の一つに胃潰瘍がある[1]。胃は口から届いた食物を消化するための器官であり、胃壁から胃酸を分泌し強い酸性に保つことでその消化能を維持している。一方で胃壁の表面には胃粘膜が存在しており、これが胃酸等の攻撃因子による障害から胃壁表面を守っている。しかし、薬物・ストレス等により胃粘膜の防御能が低下し攻撃因子とのバランスが崩れた際には胃壁表面が障害され胃潰瘍が惹起されることが知られている。胃潰瘍を惹起する薬物として非ステロイド性消炎鎮痛剤(NSAIDs)が知られている[2]。NSAIDsとはアスピリンやイブプロフェンをはじめとする抗炎症作用、鎮痛作用、解熱作用を有する薬剤の総称である。この薬物は関節リウマチ、変形性関節症、急性疼痛、発熱の治療を目的に頻繁に処方されている[3, 4]。臨床においてNSAIDsの服用により患者が胃潰瘍を発症するリスクが3倍高くなると報告されており[2]、NSAIDsを長期間服用している患者の実に15-30%は胃潰瘍もしくは出血を患っているとの報告もある[5]。さらに通常の胃腸管障害は痛み等の症状でその発見に至る事が多いが、NSAIDs誘発胃潰瘍においては薬物の主作用である鎮痛作用により痛み等による発見が遅れ、時としては致命傷となることもある[6]。胃潰瘍の発見が遅れる原因としてNSAIDsにより誘発された胃腸管障害を検出する容易な検査方法が存在せず、直接胃カメラ等の内視鏡を用いて発見するしか無いことが挙げられる[4]。また、NSAIDsはその処方数が多いことや入手が容易であることなどから、薬剤誘発性副作用の上位を占めている。米国での調査ではNSAIDsを服用する患者は年間1300万人程度に達し、これらの患者のうち年間10万人程度が消化管障害により入院治療を必要とし、16,500人は死に至っていることが報告されている[7]。この副作用を防ぐため、ヒスタミン2型レセプター阻害剤(H_2ブロッカー)[8] やプロトンポンプインヒビター[9] を同時に処方することが有効であると知られているが、完全に抑制することはできない[10, 11]。また、NSAIDsだけでなく現在薬物として開発されている化合物にも胃潰瘍を誘発するものが存在している。これらの薬物を開発する際には治験において内視鏡検査が必要とされるが、内視鏡検査は治験者にとって大きな負担になる。血液検査等の侵襲性が低い方法で胃潰瘍を鋭敏かつ特異的に検出することが可能となれば、NSAIDsによる胃潰瘍を未然に防ぐことができるだけでなく、このような副作用をもつ医薬品のより安全な開発・使用に繋がることが期待される。しかしながら、現在のところ胃潰瘍の指標となるバイオマーカーの開発例は存在しないため、本研究ではメタボロミクスによる胃潰瘍の早期診断バイオマーカーの探索をおこなった。

“メタボロミクス”は生体中の内因性代謝物を対象にした“オミクス”研究の一つであり、細胞や生体内の代謝物を網羅的に測定し、その変化を包括的に理解しようとする学問分野である。近年、多くの分野で基礎から応用研究に用いられるようになってきており、癌による代謝経路の変化[12]の発見や新規バイオマーカーの探索[13-15]等で多くの成果を上げている。

“メタボロミクス”により動物実験から臨床バイオマーカーを探索する方法の概要を Figure 1 に示す。まず病態モデル動物及び正常動物から血液・臓器等のサンプルを採取し代謝物の網羅的測定を行う。網羅的測定では動物から採取したサンプルを測定に適した性状にするための前処理を行った後、高感度の分析装置を用いて内因性代謝物を同定しその濃度を定量する。内因性代謝物の濃度を測定する方法としてガスクロマトグラフィー質量分析装置(GC-MS)[16, 17]、液体クロマトグラフィー質量分析装置(LC-MS)[18]、キャピラリー電気泳動質量分析装置(CE-MS)[19, 20]、や核磁気共鳴装置(NMR)[21]を基盤とした手法がこれまでに確立されている。しかしながら、“メタボロミクス”研究はサンプル中に含まれる内因性代謝物を網羅的に解析する研究方法であるものの、単独の測定法ですべての代謝物を一度に測定する方法は現状では存在しない。但し、生体内の主要な代謝物の88%はイオン性物質であることが報告されており[22]、イオン性物質の分析に威力を発揮する測定機器を選択すれば、ほぼ全ての生体内代謝物を網羅して測定することは可能である。

CE-MS はキャピラリーに高電圧を印加して、分子の電荷とイオン半径に基づいて分離した後、質量分析装置で高感度に定量分析する装置であり、イオン性物質を高分離・高感度で

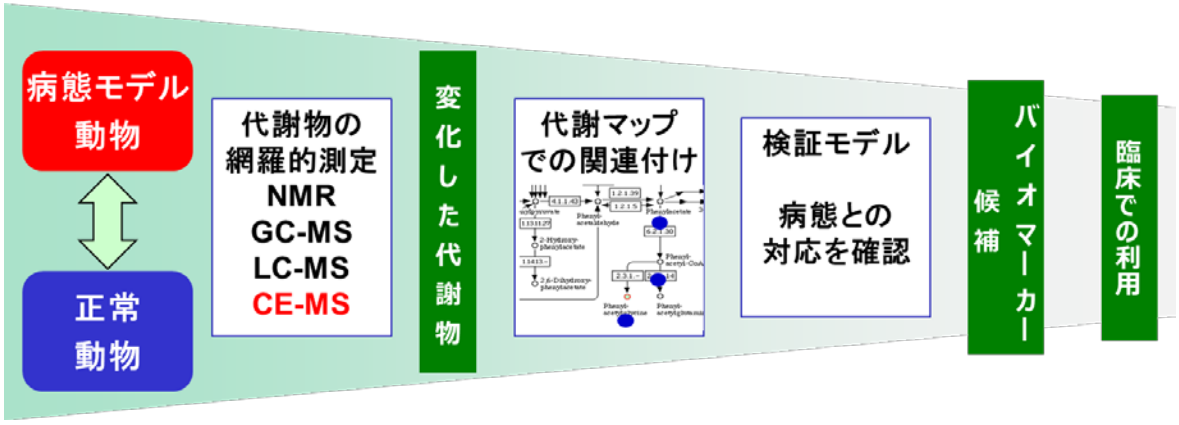


Figure 1: メタボロミクス研究の流れ。病態モデル動物及び正常動物から採取したサンプルを NMR, GC-, LC-, CE-MS を用いてサンプル内の代謝物濃度を測定する。そこから病態モデル動物で特徴的に変化する抽出し、代謝物を代謝マップ上で解析して病態動物でどのような変化がどうして起こっているのかを検討してバイオマーカー候補とする。見出したバイオマーカー候補は臨床研究を行うことで、臨床応用が開始される

測定できるという優れた特徴を持つ[23]。そのため、本研究では測定機器としてCE-MSを選択し、代謝物の網羅的測定を行った。

各種測定法により代謝物の網羅的測定が完了すると、次に、正常動物と病態モデル動物のサンプルから得られた各 CE-MS スペクトルを比較して、病態モデル動物で特徴的にみられる変化を反映する代謝物の同定を行う。同定の際は、取得したスペクトル自体を図と捉えそれを比較し特徴的に変化するピークを見出した後、そのピークに由来する内因性代謝物を同定する方法[21]とスペクトル上のピークに起因する内因性代謝物をあらかじめ同定・定量したのち、正常動物と病態モデル動物のサンプル中に含まれる内因性代謝物の量を比較する方法[13]の大きく2つに分けられる。本研究では後者の方法を採用し、あらかじめ個々のスペクトルと代謝物標準液のスペクトルを比較することでスペクトル上の各ピークに起因する内因性代謝物を同定・定量した。最後に得られた各サンプルにおける内因性代謝物の種類及び濃度のリストを用いて、比較対象のサンプル間で特徴的な変化を示す代謝物及びその代謝物の代謝マップ上の周辺代謝物がどのように変化しているかを評価し、比較対象が生体としてどのような反応を示しているかを評価した。この方法ではあらかじめ標品を測定して取得したスペクトルの分子量及び検出される時間のデータベースと動物で測定されたスペクトルでの分子量及び検出された時間を比較することで同定・定量を行う。そのため同定できる代謝物はあらかじめデータベースに含まれるものに限られるためデータベースに含まれない代謝物についてはその変化の有無を評価することはできないが、データベースに含まれる 500 程度の代謝物に関しては全て同定・定量されるため各代謝物が変化として捕えられたのか否かを正確に評価することができた。

通常のメタボロミクスではこれらの行程を経てバイオマーカー候補を提示し、研究を終了することが多いが、実際には、変動する要因や機序、どの程度広い範囲で使用できるかが明確ではないため、メタボロミクスの結果だけで臨床研究者からバイオマーカー候補として認められることは少ない。そこで本研究ではより実用化に近づけるため単にバイオマーカー候補を探索するだけでなく、候補となる代謝物の濃度が変動する要因とその機序およびプロファイルも含めて明らかにし、実際のバイオマーカー開発につながることを目的に実験を行った。

本論文では、第1章においてNSAIDs胃潰瘍の早期診断に向けたバイオマーカー候補の探索を目的とし、代表的なNSAIDsであるアスピリン及びイブプロフェンを単回経口投与して胃潰瘍を惹起したラットの胃及び血液サンプルのメタボロミクスを行った。その結果、CE-MS

による測定で得られた 580 代謝物のデータから胃潰瘍の惹起を特異的に反映していると思われる 7 つの内因性代謝物を抽出した。さらにこれらの内因性代謝物の血中濃度との相関を確認して、有意な相関関係が確認された cis-aconitate, succinate, o-acetylcarnitine, 3-hydroxybutanoic acid, proline 及び hydroxyproline の 5 つを胃潰瘍のバイオマーカー候補とした。

第 2 章では第 1 章でバイオマーカー候補とされた代謝物群の変動要因および機序を明らかにすることを目的に、胃酸の放出を抑制する事で NSAIDs による胃潰瘍の惹起を抑制する作用がある事が知られている H_2 ブロッカー[8] 及びプロトンポンプインヒビター[9] をアスピリンの投与 30 分前に投与しアスピリンによる胃潰瘍惹起の過程を途中で止めた場合の内因性代謝物の変化を確認した。この検討において、アスピリンの単独投与で見られた変化が H_2 ブロッカーやプロトンポンプインヒビターを共投与する事で正常に戻った場合、その変化は惹起された胃潰瘍を直接反映するバイオマーカーであり、NSAIDs による胃潰瘍の原因となる過程に依存したバイオマーカーとは区別できると期待される。この検討の結果、バイオマーカー候補のうち hydroxyproline が胃潰瘍の惹起により直接変化するバイオマーカー候補であること、その他のバイオマーカー候補は胃潰瘍が惹起される過程で副次的に変化するバイオマーカーであることを確認した。

第 3 章ではバイオマーカー候補の変動機序及びその適応範囲を明らかにすることを目的にエタノールやストレス等 NSAIDs 投与以外の要因で胃潰瘍を誘発させたラットについてバイオマーカー候補の変動パターンを NSAIDs で誘発した場合のそれと比較した。胃潰瘍は胃において攻撃因子と防御因子のバランスが崩れることで惹起されることが知られているが、バランスが崩れる機序はその原因により大きく異なっている。そのためこの検討においてすべてのモデルでバイオマーカー候補の変動が共通して見られた場合はそのバイオマーカー候補は胃潰瘍が惹起されたことにより変動したものであること、他方 NSAIDs モデルでのみ確認されたバイオマーカー候補は薬物によって胃潰瘍が惹起される過程でのみ見られる変化であることを明らかにすることができる。そこでこの検討によりバイオマーカー候補の変動する原因を再確認するとともに、バイオマーカー候補がどの様な目的に使えるかを明らかにする事を試みた。その結果、hydroxyproline の減少については今回検討した全てのモデルで確認され、hydroxyproline が NSAIDs 投与による胃潰瘍の惹起を示すのみならず胃潰瘍の原因を問わず用いることが出来る有力な胃潰瘍のバイオマーカーとなりうると期待された。

本論

第1章　NSAIDs 誘発胃潰瘍モデルのメタボロミクス

第1節　実験の目的及び概要

NSAIDs により誘発される胃潰瘍を含め、胃潰瘍の惹起を血中で検出するバイオマーカーは現在知られていない。そこで NSAIDs で誘発された胃潰瘍におけるバイオマーカー候補を抽出することを目的に検討を行った。24 時間絶食したラットにアスピリン (Aspirin) 及びイブプロフェン (Ibuprofen) の薬効量及び胃潰瘍を惹起する用量を単回経口投与して、投与後 1 時間、5 時間及び 24 時間に屠殺したラットより、胃及び血清を採取し、胃の抽出物及び血清についてメタボロミクスを行った。惹起された胃潰瘍の程度は胃潰瘍（粘膜の赤色巣）の面積を測定することで評価し、内因性代謝物濃度が胃潰瘍の発症に相関して動くか否かを確認した。

解析は毒性量のアスピリン及びイブプロフェンを投与された動物の胃と無処置群の動物の胃との間で濃度が変化した内因性代謝物をバイオマーカー候補として抽出した後、その内因性代謝物が血中において臓器内濃度と相関することを確認した。薬物によってもたらされる変化のうち胃潰瘍と関連のない変化をバイオマーカー候補とすることを避けるため、無処置群に加え胃潰瘍が惹起されない用量のアスピリン及びイブプロフェンを投与する群を設定し、バイオマーカー候補がこの用量では変化しないことも確認した。

第2節　胃潰瘍面積

Table 1 に胃潰瘍（粘膜の赤色巣）の面積及び胃潰瘍が観察された動物数をまとめて記載した。

対照群及びアスピリンとイブプロフェンの薬効量であるアスピリンの 3 mg/kg 投与群及びイブプロフェン 8 mg/kg 投与群では、投与後いずれの剖検時にも消化管障害を示す所見は認められなかった。

アスピリンで胃潰瘍を惹起される用量である 300 mg/kg 投与群では、投与後 1 時間には胃潰瘍は確認されなかったが、投与後約 5 時間に全例で潰瘍が認められた。投与後約 24 時間には回復傾向が観察され 4 例中 1 例のみで胃潰瘍が認められた。胃潰瘍の面積が最大であったのは投与後約 5 時間であった。

イブプロフェンで胃潰瘍が惹起される用量である 800 mg/kg 投与群についても、投与後 1

時間では胃潰瘍は確認されなかったが、投与後約 5 時間に全例で潰瘍が認められた。投与後 24 時間において胃潰瘍面積の縮小が観察されており、回復傾向は確認されたもののすべての動物で胃潰瘍の惹起が観察された。胃潰瘍の面積の平均が最大であったのは投与後約 5 時間であった。

Table 1: 本検討で確認された胃潰瘍面積 [24]

	Control	Aspirin		Ibuprofen	
		3 mg/kg	300 mg/kg	8 mg/kg	800 mg/kg
1 hr	ND (0/4)	ND (0/4)	ND (0/4)	ND (0/4)	ND (0/4)
5 hr	ND (0/4)	ND (0/4)	2.48 ± 1.14 (4/4)	ND (0/4)	18.08 ± 18.72 (4/4)
24 hr	ND (0/4)	ND (0/4)	0.08 ± 0.15 (1/4)	ND (0/4)	3.76 ± 4.33 (4/4)

Data are expressed as mean ± standard deviation of the area of ulceration (mm^2).
Values in parentheses are the incidence rate of animals with gastric ulceration.
ND: not detected

第3節　胃抽出物中のメタボロミクス

CE-MS で 580 種の低分子代謝物 (Supplemental Table 1) の臓器内濃度を決定した。これ以外に代謝物を同定できないピークもスペクトル上では観察されたが、今回は同定されたもののみを解析対象とした。

580 種の低分子代謝物の濃度情報を用いて投与後の時間毎に主成分解析(Principal component analysis、 PCA) を行った。代謝物プロファイルを最も顕著に表す PC1 及び PC2 のスコアを各時点について 2 次元プロットで示したものを Figure 2 に示す。また、それぞれの解析の PC1 及び PC2 の寄与率を Table 2 に示す。投与後 1 時間及び 5 時間において、対照群と胃潰瘍が確認されたアスピリンの 300 mg/kg 投与群及びイブプロフェンの 800 mg/kg 投与群との間で臓器内代謝物濃度のパターンが異なっていることが示された。投与後 24 時間には胃潰瘍が確認されたアスピリンの 300 mg/kg 投与群及びイブプロフェンの 800 mg/kg 投与群の動物は対照群と近い位置にプロットされており、代謝物濃度のパターンが正常レベルに回復してきたと考えられた。これは第 2 節で述べた胃潰瘍面積の変化と類似していた。剖検時に胃潰瘍が確認されなかったアスピリンの 3 mg/kg 投与群及びイブプロフェンの 8 mg/kg 投与群は対照群と大きな差は確認されず、PCA により観察された対照群と胃潰瘍が観察された群との差は胃潰瘍が誘発されたことにより惹起されたものであると考えられた。

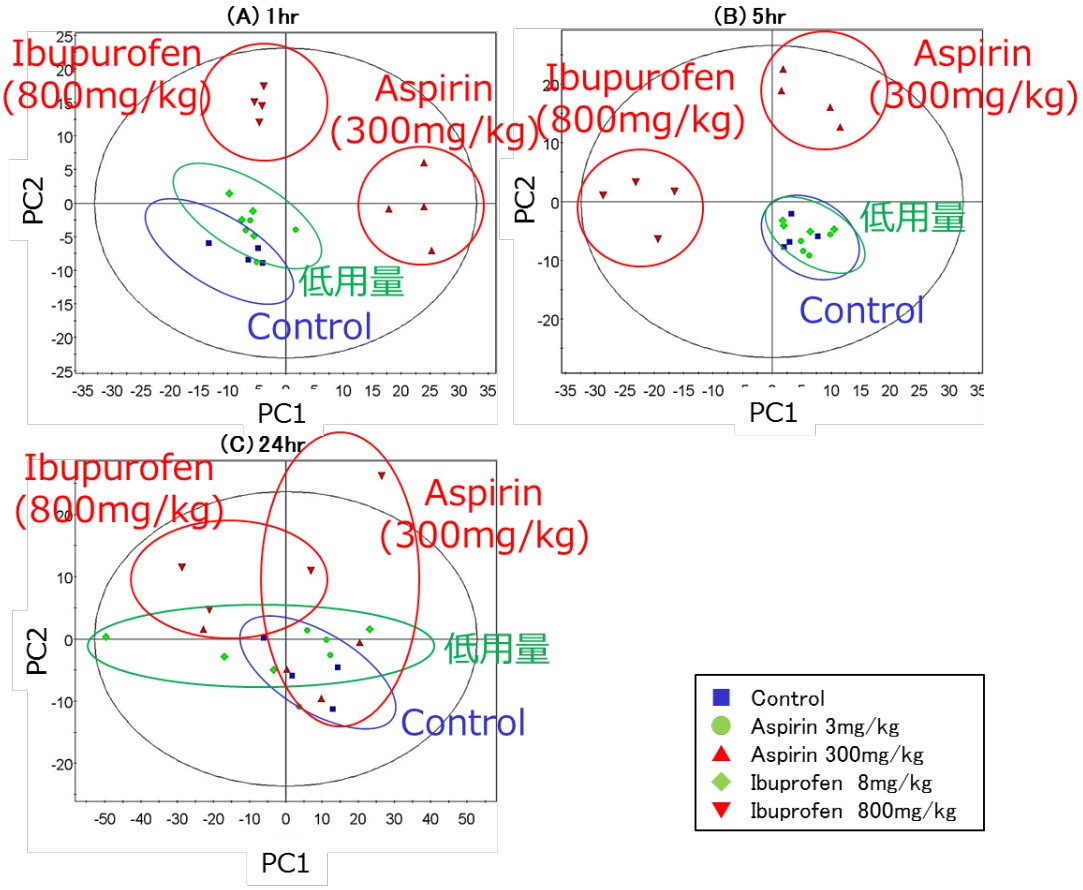


Figure 2: 臓器内代謝物濃度について PCA を行った結果[24]を PC1 及び PC2 のスコアプロットとして時点毎に 2 次元プロットで示した。 (A)が投与後 1 時間、(B)が投与後 5 時間、(C)が投与後 24 時間を示す。投与後 1 時間及び 5 時間において 300 mg/kg のアスピリンもしくは 800 mg/kg のイブプロフェンを投与した群が対照群と別の場所にプロットされた。この変化は投与後 24 時間には見られなかった。低用量のアスピリンもしくはイブプロフェンを投与した群ではこの違いは観察されなかった。

Table 2: PCA における各軸の寄与率

	1hr	5hr	24hr
PC1	0.353	0.350	0.589
PC2	0.172	0.235	0.118

Orthogonal Partial Least Squares discriminant analysis (O-PLS-DA)法で正常動物と病態動物の差が大きいと予測された内因性代謝物について Dunnett の多重検定を行った。いずれかの薬物においていずれかの測定時点で有意な変化を示した代謝物の濃度及びを PC1 における負荷量を Table 3 に示す。 citrate, cis-aconitate, succinate, o-acetylcarnitine, 3-hydroxybutanoic acid, proline, hydroxyproline の有意な減少が胃潰瘍を惹起している動物で確認された。これらの代謝物の ion electropherogram は Figure 3 に示す。それぞれ CE-MS の分離したピークとして確認されており、正確に同定・定量されていることを確認した。

Table 3: 臓器内で変化が見られた代謝物と臓器内濃度 [24] 及び O-PLS-DA の結果得られた PC1 における負荷量

Metabolite	Time point	Control	Aspirin 3 mg/kg	Aspirin 300 mg/kg	Ibuprofen 8 mg/kg	Ibuprofen 800 mg/kg	Load (PC1)
citrate	1 hr	194±21	202±23	120±25 (**)	202±26	135±39 (*)	0.111
	5 hr	190±18	187±33	120±8 (**)	172±23	124±19 (**)	0.067
	24 hr	269±75	203±42	213±50	175±60	169±52	0.070
cis-aconitate	1 hr	4.7±0.3	4.4±0.5	2.8±0.7	4.6±0.6	3.6±1.0	0.021
	5 hr	5.4±0.6	4.6±1.0	3.1±0.4 (**)	4.1±1.0 (*)	3.1±0.9 (**)	0.013
	24 hr	7.7±2.0	5.6±0.7	5.7±1.0	4.9±1.6 (*)	3.7±1.1 (**)	0.022
succinate	1 hr	235±34	252±30	227±28	229±29	139±27 (**)	0.029
	5 hr	220±7	231±14	195±8 (*)	205±11	155±11 (**)	0.094
	24 hr	349±60	323±44	295±80	270±110	278±87	0.062
o-acetyl carnitine	1 hr	201±14	196±9	150±20 (*)	206±36	149±29 (*)	0.161
	5 hr	205±9	198±39	128±13 (**)	164±12	131±25 (**)	0.122
	24 hr	237±41	237±33	193±41	195±75	145±39	0.171
3-hydroxy butanoic acid	1 hr	565±141	575±110	285±67 (*)	445±234	188±60 (**)	0.163
	5 hr	690±326	610±211	206±40 (*)	394±130	404±134	0.060
	24 hr	596±298	397±217	317±227	326±206	175±70 (*)	0.137
proline	1 hr	339±23	325±28	274±24 (**)	329±25	317±18	0.140
	5 hr	274±23	303±24	247±10	292±22	233±17 (*)	0.112
	24 hr	434±78	433±35	428±131	367±134	385±98	0.100
hydroxy proline	1 hr	158±14	130±10 (*)	113±8 (**)	128±19 (*)	130±10 (*)	0.064
	5 hr	118±23	128±13	65±11 (**)	118±24	89±21 (*)	0.043
	24 hr	171±46	154±28	145±36	122±37	100±26	0.088

Mean concentration (nmol/g tissue) and standard deviation.
Asterisks indicate statistically significant differences. **: $p<0.01$, *: $p<0.05$.

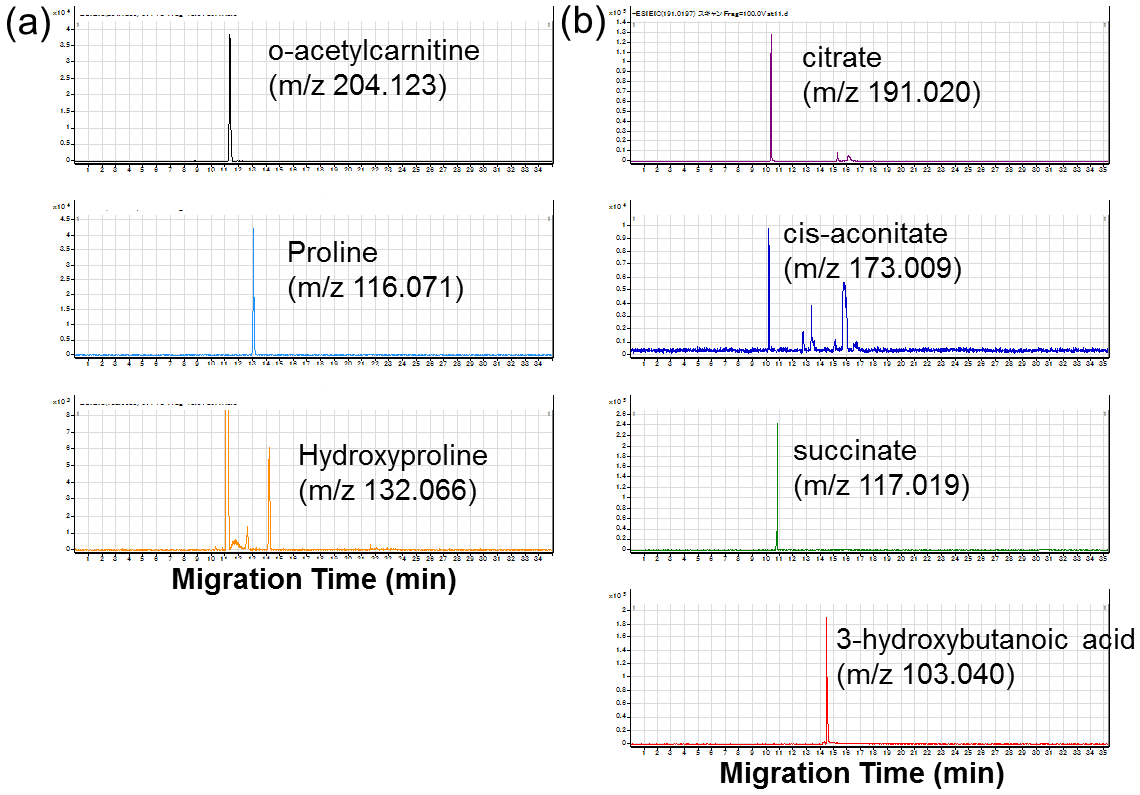


Figure 3: 選択した代謝物の CE-TOF-MS ion electropherogram (胃のスペクトルより、(a)は陽イオン (b)は陰イオンモードで取得) [24]

得られた代謝物と代謝マップ上近傍にある代謝物の変化をマップ上に示したところ(Figure 4A)、薬物により TCA サイクル、脂肪の β 酸化が抑制されていることが予想された。一方で TCA サイクルの上流に存在する糖代謝には影響が見られなかった。加えて proline 及び hydroxyproline 量の減少から、臓器内のコラーゲン量減少が予想された (Figure 4B) 。

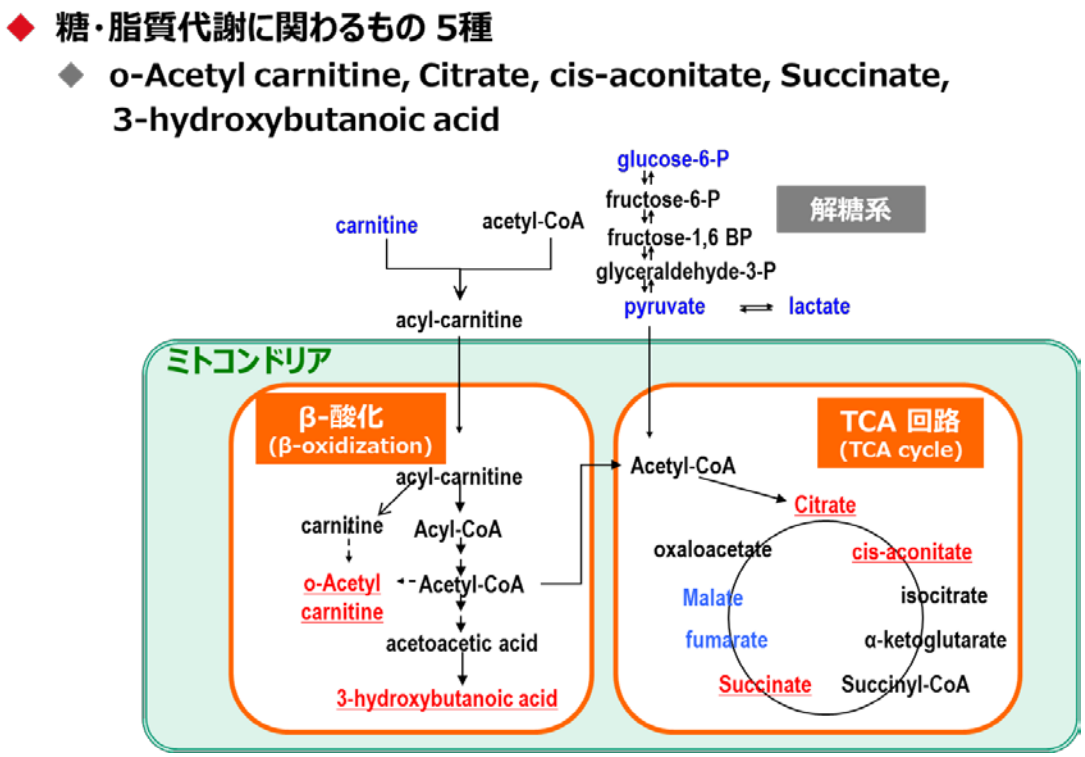


Figure 4A : 300 mg/kg のアスピリンもしくは 800 mg/kg のイブプロフェンを投与したことにより変化した代謝物のうち糖及び脂質の代謝に関連する 5 代謝物の代謝マップ上での位置を示す。胃潰瘍が惹起された動物の胃内において減少していた代謝物を赤字で、変化していなかった代謝物を青字で示した。黒字は微量であったためその変化を十分議論できなかったものを示す。

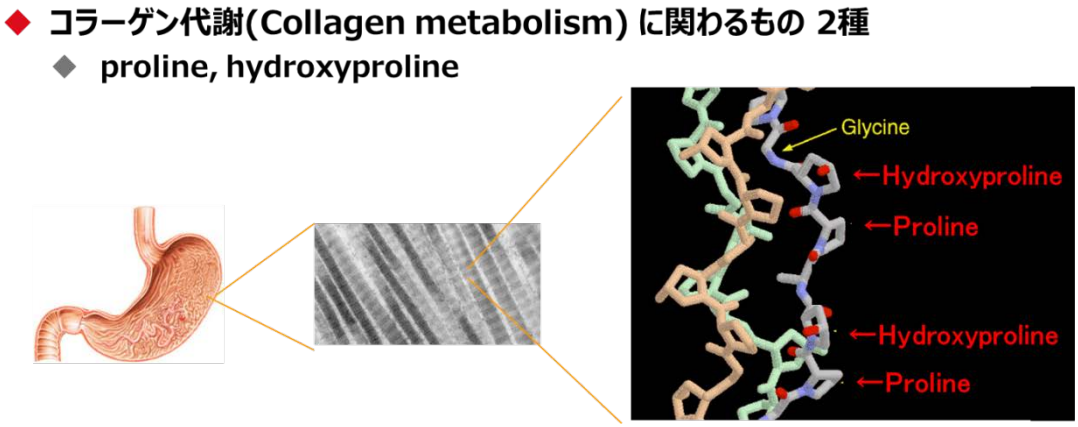


Figure4B : 300 mg/kg のアスピリンもしくは 800 mg/kg のイブプロフェンを投与したことにより変化した代謝物のうち Proline 及び Hydroxyproline はコラーゲンに豊富に含まれるアミノ酸であった。このことから臓器内におけるコラーゲン量の減少が疑われた。

第4節　血清のメタボロミクス

CE-MS での測定により 581 種の低分子代謝物 (Supplemental Table 1) の血中濃度を決定した。これ以外に代謝物を同定できないピークもスペクトル上では観察されたが、今回は同定されたもののみを解析対象とした。

581 低分子代謝物の濃度を用いて投与後の時間毎に PCA を行った。各時点における PC1 及び PC2 のスコアを 2 次元プロットで示したものを Figure 5 に示す。それぞれの解析における PC1 及び PC2 の寄与率は Table 4 に示した。2 次元プロット上において血清での変化と臓器内での変化は類似したものであった。すなわち、投与後 1 時間及び 5 時間において、

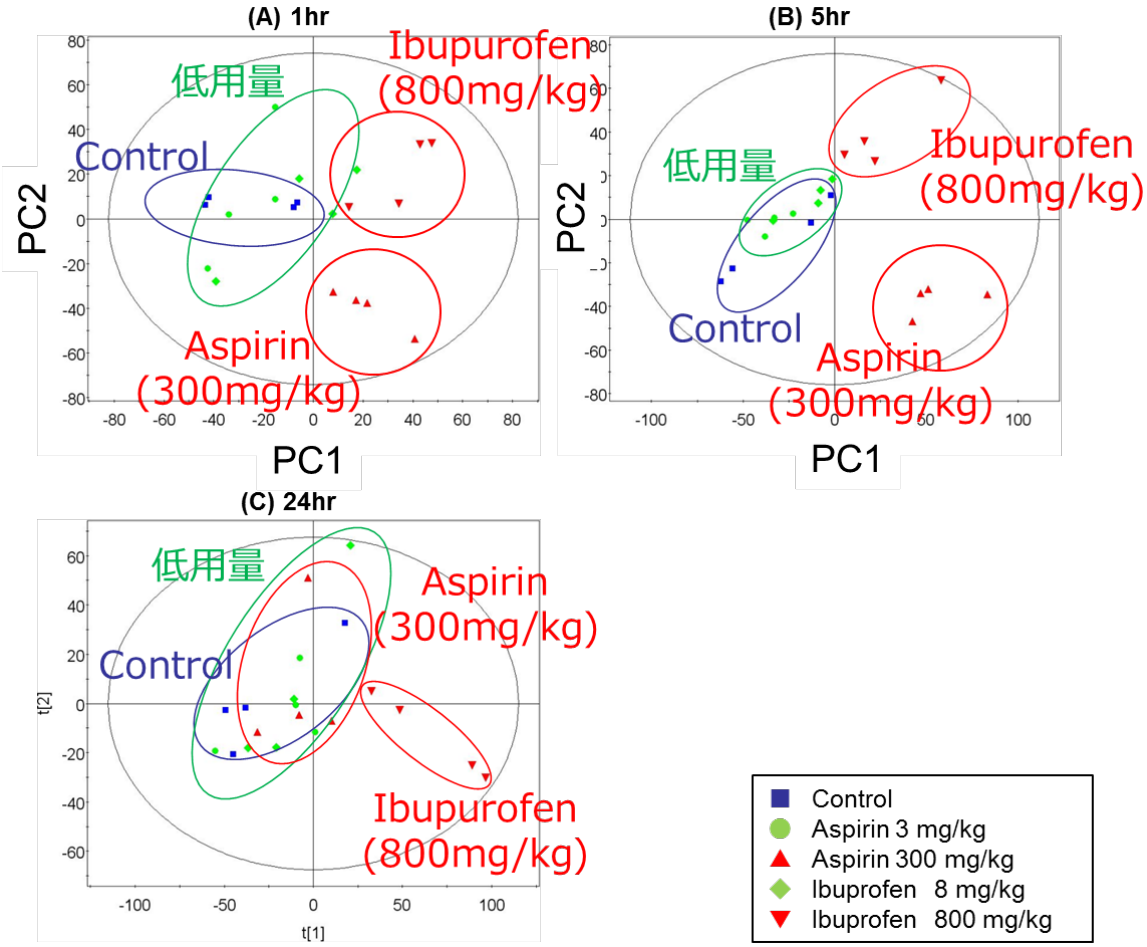


Figure 5: 血中代謝物濃度について PCA を行った結果[24]を PC1 及び PC2 のスコアプロットとして時点毎に 2 次元プロットで示した。(A)が投与後 1 時間、(B)が投与後 5 時間、(C)が投与後 24 時間を示す。投与後 1 時間及び 5 時間において 300 mg/kg のアスピリンもしくは 800 mg/kg のイブプロフェンを投与した群が対照群と別の場所にプロットされた。この変化は投与後 24 時間には見られなかった。低用量のアスピリンもしくはイブプロフェンを投与した群ではこの違いは観察されなかった。

Table 4: PCA における各軸の寄与率

	1hr	5hr	24hr
PC1	0.336	0.463	0.515
PC2	0.273	0.214	0.177

対照群と胃潰瘍が確認されたアスピリンの 300 mg/kg 投与群及びイブプロフェンの 800 mg/kg 投与群との間で血中代謝物濃度のパターンが異なっていることが分かった。一方、投与後 24 時間には胃潰瘍が確認されたアスピリンの 300 mg/kg 投与群及びイブプロフェンの 800 mg/kg 投与群の動物は対照群と同じ位置周辺にプロットされており、血中代謝物濃度のパターンが正常レベルに回復したと考えられた。これは第 2 節で述べた胃潰瘍面積の変化と類似していた。また、胃潰瘍が確認されなかったアスピリンの 3 mg/kg 投与群及びイブプロフェンの 8 mg/kg 投与群は対照群と大きな差は確認されず、PCA により観察された対照群と胃潰瘍が観察された群との差は胃潰瘍が誘発されたことにより惹起されたものであると考えられた。

胃内因性代謝物のメタボロミクスの結果抽出された低分子代謝物の血中濃度の平均及びすべての動物を用いて臓器内濃度と血中濃度の相関性を検定した結果を Table 5 に示す。cis-aconitate, succinate, o-acetylcarnitine, 3-hydroxybutanoic acid, proline, hydroxyproline の明確な減少は血中においても確認されたが、citrate の減少は血中においては有意性を示さなかった。また、血中で明確な減少が確認された代謝物群のうち succinate を除くすべての代謝物の血中濃度はその胃内濃度と有意な相関を示しており、血中濃度を測定することで胃内濃度をある程度予測できると考えられた。succinate は臓器内濃度と有意な相関を示しておらず、血中濃度を測定することで臓器内濃度を予測することはできないと考えられた。

Table 5: 抽出された代謝物の血中濃度及び臓器内濃度と血中濃度の相関性 [24]

Metabolite	Time point	Control	Aspirin		Ibuprofen		Correlation
			3 mg/kg	300 mg/kg	8 mg/kg	800 mg/kg	
citrate	1 hr	112±5	99±10	99±14	112±13	113±8	Yes
	5 hr	116±9	106±10	97±13	103±6	100±10	
	24 hr	106±7	96±6	94±18	96±5	84±3	
cis-aconitate	1 hr	5.3±0.2	5.0±0.8	4.7±0.5	5.4±0.5	5.7±0.6	Yes
	5 hr	5.8±0.6	5.6±0.6	4.2±0.3 (**)	5.3±0.5	5.1±0.4	
	24 hr	5.8±0.9	5.4±0.1	5.0±0.8	5.5±0.1	5.2±0.3	
succinate	1 hr	20±2	19±3	18±1	18±1	18±2	No
	5 hr	22±2	20±1 (*)	24±1	20±1	19±0 (**)	
	24 hr	19±1	19±2	17±1	18±2	21±3	
o-acetyl carnitine	1 hr	11.4±1.5	11.6±1.6	11.8±4.4	12.4±2.1	8.8±1.4	Yes
	5 hr	15.6±3.9	14.3±1.6	8.7±1.0 (**)	9.8±1.3 (*)	7.3±2.6 (**)	
	24 hr	15.1±3.6	17.0±2.6	15.1±0.7	20.6±8.9	8.0±2.4	
3-hydroxy butanoic acid	1 hr	1299±241	1253±130	579±101 (**)	983±343	466±152 (*)	Yes
	5 hr	1515±731	1260±261	320±102 (**)	880±203 (*)	660±213 (**)	
	24 hr	971±477	725±235	501±299	699±293	311±128 (*)	
proline	1 hr	160±18	157±19	116±18 (**)	137±13	135±14	Yes
	5 hr	150±14	141±10	118±14 (*)	149±16	104±16 (**)	
	24 hr	138±5	153±13	139±26	140±10	127±20	
hydroxy proline	1 hr	57±5	51±5	40±8 (**)	50±3	51±3	Yes
	5 hr	52±6	53±4	28±4 (**)	52±6	41±5 (*)	
	24 hr	47±5	46±10	38±10	43±5	30±8 (*)	

Mean concentration (nmol/mL) and standard deviation.
Asterisks indicate statistically significant differences. **: $p<0.01$, *: $p<0.05$.
NS: not significant

第5節　小括

本検討では NSAIDs で誘発された胃潰瘍のバイオマーカー候補を抽出することを目的に、代表的な NSAIDs であるアスピリン及びイブプロフェンをラットに単回経口投与して胃潰瘍を惹起させ、胃潰瘍の重篤度を反映する内因性代謝物を胃の抽出物及び血中で探索した。

その結果、胃潰瘍の惹起により cis-aconitate, succinate, o-acetylcarnitine, 3-hydroxybutanoic acid, succinate, proline, hydroxyproline の有意な減少が臓器内で観察されることを確認した。これらのうち cis-aconitate, o-acetylcarnitine, 3-hydroxybutanoic acid, proline, hydroxyproline については、血中でもその減少が臓器内の変化を反映することが示された。このことからこれら 5 つの内因性代謝物の変化は胃潰瘍の惹起を血中で検出できるバイオマーカー候補として有望であると考えられた。

臓器内において citrate, cis-aconitate, succinate の減少が観察された。TCA 回路の中間体であるこれらの代謝物の減少は、胃潰瘍を惹起された動物において TCA サイクルが抑制されている可能性を疑わせた。同じ TCA サイクル中に含まれる fumarate, malate については変化が確認されなかったが、これらは他の代謝系から供給されたためその変化が捉えられなかったものと考えられた。一方で代謝マップ上において TCA サイクル上に存在している解糖系に関与している内因性代謝物には対照群と胃潰瘍が惹起された動物群では違いは確認されなかった。正常な生体であれば解糖系はグルコースの代謝に関与する代謝経路であり、その最終産物である pyruvate が TCA サイクルに取り込まれてエネルギー産生を行う。解糖系は細胞質内で行われる代謝経路であり、TCA サイクルはミトコンドリアの中で行われる代謝経路である。このことから胃潰瘍惹起群においては、ミトコンドリアの機能に何らかの影響が出ていることが疑われた。また、本検討で同様に低下が確認された o-acetylcarnitine 及び 3-hydroxybutanoic acid は脂質の代謝経路の一つであるβ酸化の最終産物でありこれらの減少はβ酸化により代謝される脂質が減少していることを示している。β酸化もミトコンドリア内で行われるエネルギー産生系の一つであり、ミトコンドリア機能低下により低下することが知られている。実際 NSAIDs はミトコンドリアの膜電位を調整する mitochondrial permeability transition pores (PTPs)を開口して[25] ミトコンドリアの膜電位を喪失させ、ミトコンドリアの機能障害を誘発し、TCA 回路が作動しなくなり、電子伝達と酸化的リン酸化による ATP 生成が障害されることが知られている[26-31]。

胃潰瘍は胃酸やペプシンなどの攻撃因子と防御因子のバランスが崩れることによって起こることが知られている。NSAIDs による胃潰瘍ではその機序は明確になっていないものの、薬

物によるミトコンドリアの機能低下に起因する胃粘膜保護作用の低下がその原因の一つとして疑われている[32]。これら事から TCA サイクル及び脂質の β 酸化の低下は NSAIDs によるミトコンドリアの機能低下及びそれに続く胃粘膜保護作用の低下を反映しているものと考えられた (Figure 6)。

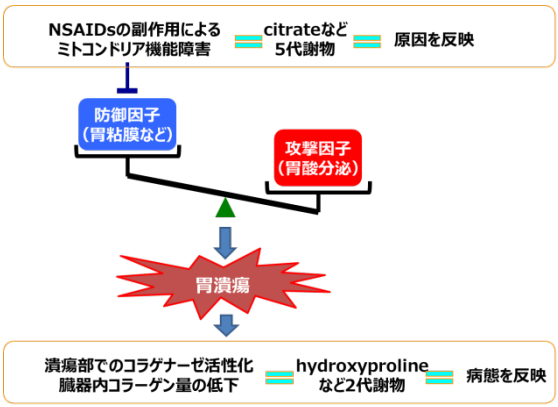


Figure 6: メタボロミクスにより予想される変化と NSAIDs 誘発胃潰瘍との関連を示す。TCA 回路や β 酸化の低下は NSAIDs の副作用によるミトコンドリア機能障害を、コラーゲン代謝物量の低下は臓器内コラーゲン量の低下を示すものと思われた。

今回の検討では proline 及び hydroxyproline の減少も確認された。hydroxyproline は生体内においてはコラーゲンに特徴的に含まれるアミノ酸であり、コラーゲンの分解により供給される。また proline はコラーゲンに豊富に含まれるアミノ酸の一つであり、I 型コラーゲンにおいては全体の約 20% を proline 及び hydroxyproline が占める。これらのことから proline 及び hydroxyproline の減少は胃においてコラーゲン量が減少していることを反映しているものと予想された。NSAIDs により胃潰瘍が惹起された際、胃の潰瘍部位においてはコラーゲンを分解するコラゲナーゼの活性が上昇し、胃のコラーゲン量が減少している事が報告されている[33]。 本試験で見られたコラーゲン量の減少はコラゲナーゼの活性上昇による臓器内コラーゲン量の低下を反映したものであると考えられた (Figure 6)。

以上まとめると、

段階 1. NSAIDs 投与により、PTP が開口されミトコンドリア機能が低下する。

段階 2. これにより胃の防御能が低下し、ここに胃酸等の攻撃因子の作用を受けることにより胃潰瘍が惹起される。

段階 3. 胃潰瘍が惹起されると潰瘍部分でコラゲナーゼの活性化が始まり、胃の中でのコラーゲン量が低下する

という過程で NSAIDs による胃潰瘍は惹起されていると考えられるが、この現象のうちミトコンドリアの機能低下がメタボロームでは TCA サイクル及び β 酸化の低下として現れ、コラーゲン量の低下が proline 及び hydroxyproline の低下として観察されたものと考えられた。血中では cis-aconitate, o-acetylcarnitine, 3-hydroxybutanoic acid, proline, hydroxyproline が有意な減少を示し、さらに胃内濃度と有意な相関を示していることも確認できた。このことからこれら

の内因性代謝物は血中濃度を測定することで胃内の変化をある程度予測できる、胃潰瘍のバイオマーカー候補となりうることが明らかとなった。

第2章　オメプラゾール及びファモチジンがアスピリン誘発胃潰瘍モデルの代謝プロファイルに与える影響

第1節　実験の目的及び概要

第 1 章においてアスピリン及びイブプロフェンの 2 つの NSAIDs で共通して変動する 5 つのバイオマーカー候補を見出した。そして、これらの変化は NSAIDs によるミトコンドリア機能の低下(TCA サイクル及び β 酸化の低下)及び潰瘍が誘発されたことによるコラーゲン量の低下により惹起されたと考えた。臨床においては、しばしば H_2 ブロッカー[8] 及びプロトンポンプインヒビター[9] が NSAIDs による胃潰瘍を回避する目的で投与されている。 これらの薬物は攻撃因子である胃酸の分泌を抑制し、攻撃因子を弱めることで NSAIDs により誘発される胃潰瘍を抑制している。そのため、H_2 ブロッカーやプロトンポンプインヒビターと NSAIDs を共投与して胃潰瘍を抑制した動物のメタボロミクスを行うことで胃潰瘍惹起のどの段階に関係する変化であるかを示すことができると期待できる (Figure 7)。そこでアスピリンを投与する投与 30 分前に H_2 ブロッカー(ファモチジン)及びプロトンポンプインヒビター(オメプラゾール)を投与して胃潰瘍を抑制した場合、アスピリンによって惹起される低分子代謝物のプロファイルがどのように変化するかを調べた。

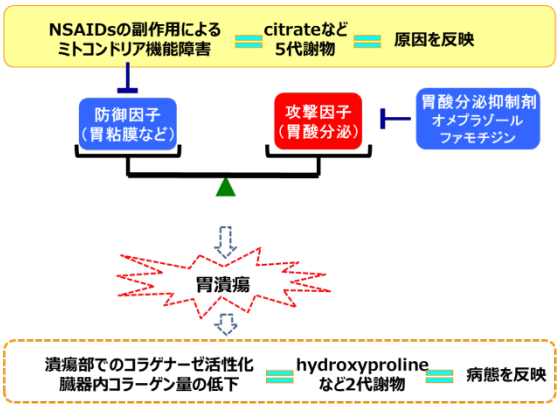


Figure 7:　本検討のイメージ。本検討ではアスピリン誘発胃潰瘍を胃酸分泌抑制剤で抑制した場合の低分子代謝物パターンの変化を確認して、NSAIDs による胃潰瘍惹起のどの段階を反映するバイオマーカーであるのかを明らかにする。

第2節　胃潰瘍の診断

Table 6 に胃潰瘍面積及び胃潰瘍が観察された動物数をまとめて記載した。アスピリンのみを投与した群では全例に胃潰瘍が観察されたが、ファモチジン及びオメプラゾールとアスピリンを共投与した動物及び対照群では胃潰瘍は観察されなかった。

Table 6: 本検討で確認された胃潰瘍面積 [34]

Group	Control	Aspirin	Aspirin with omeprazole	Aspirin with famotidine
Test article	Vehicle	Aspirin 100 mg/kg	Aspirin 100 mg/kg	Aspirin 100 mg/kg
Co-administration (administered 30 min. before test article administration)	Vehicle	Vehicle	Omeprazole 60 mg/kg	Famotidine 5 mg/kg
Number of animals	4	4	4	4
Severity of gastric ulceration	ND (0/4)	5.70 ± 5.43 (4/4)	ND (0/4)	ND (0/4)

Data are expressed as mean ± standard deviation of the area of ulceration (mm^2)
Values in parentheses are the incidence rate of animals with gastric ulceration.
ND: not detected

第3節　胃抽出物中のメタボロミクス

CE-MS での測定により 577 の低分子代謝物 (Supplemental Table 1) の臓器内濃度を決定した。これ以外に代謝物を同定できないピークもスペクトル上では観察されたが、今回は同定されたもののみを解析対象とした。PCA の結果、各サンプルの PC1 及び PC2 のスコアを Figure 8A に 2 次元プロットで示した。この解析での寄与率は PC1 が 0.363, PC2 が 0.169 であった。2 次元プロット上において対照群とアスピリンを投与した各群の間に明確な違いが

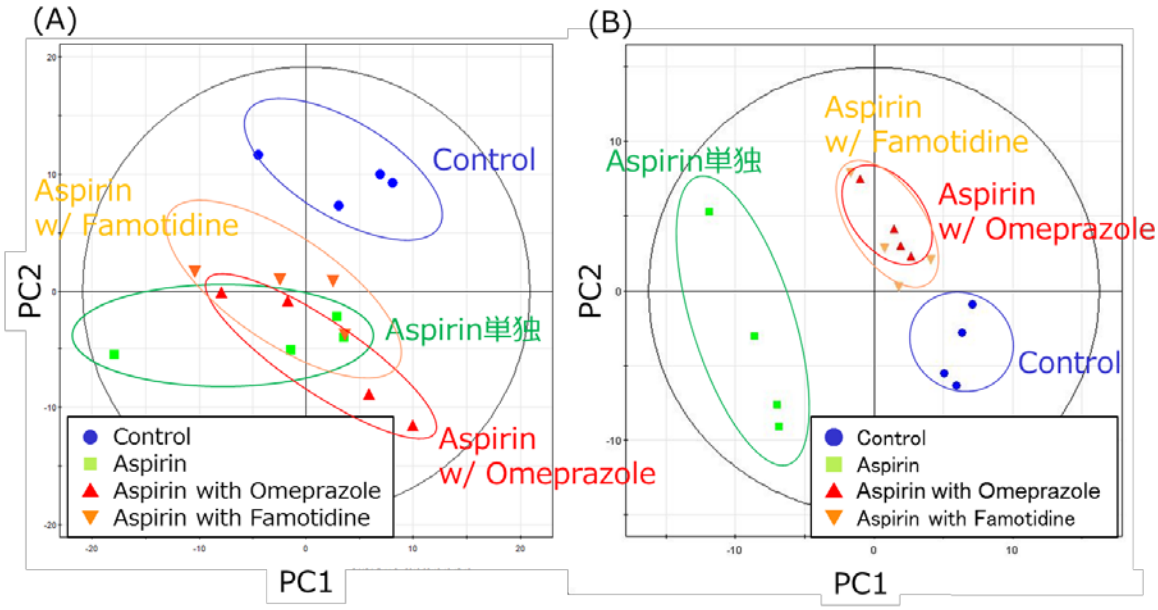


Figure 8: 臓器内代謝物濃度について PCA (A)及び PLS-DA (B)を行った結果 [34] を PC1 及び PC2 のスコアを 2 次元プロットで示した。PCA ではアスピリンによる違いのみ抽出され、共投与による影響は確認されなかった。PLS-DA では胃潰瘍が惹起したことによる違いが抽出された。

みられたものの、ファモチジン及びオメプラゾールを投与したことによる違いは 2 次元プロット上で確認する事は出来なかった。そこで胃潰瘍の診断結果をもとに Partial Least Squares discriminant analysis (PLS-DA)を行い、PC1 及び PC2 のスコアを 2 次元プロット (Figure 8B,

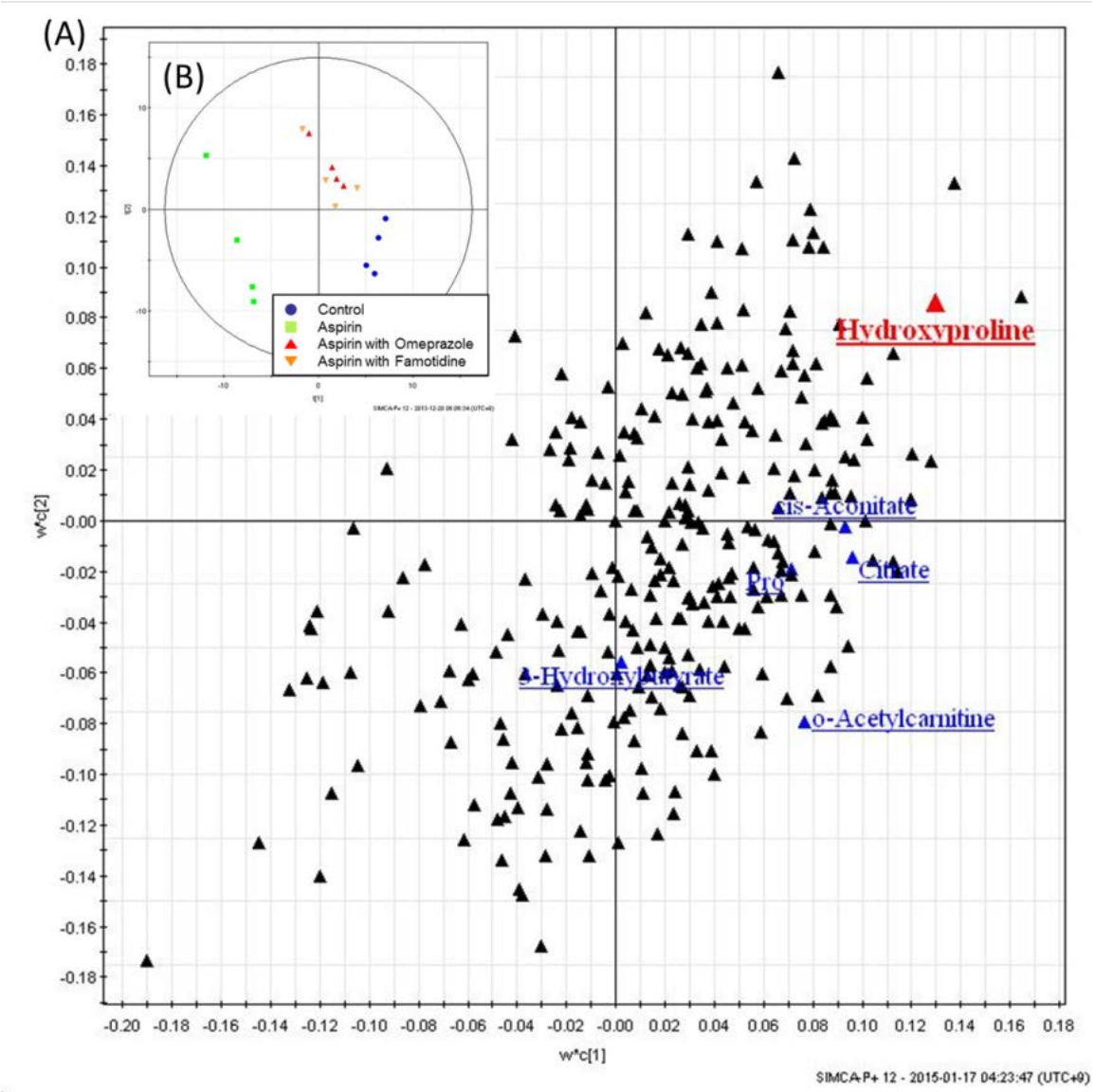


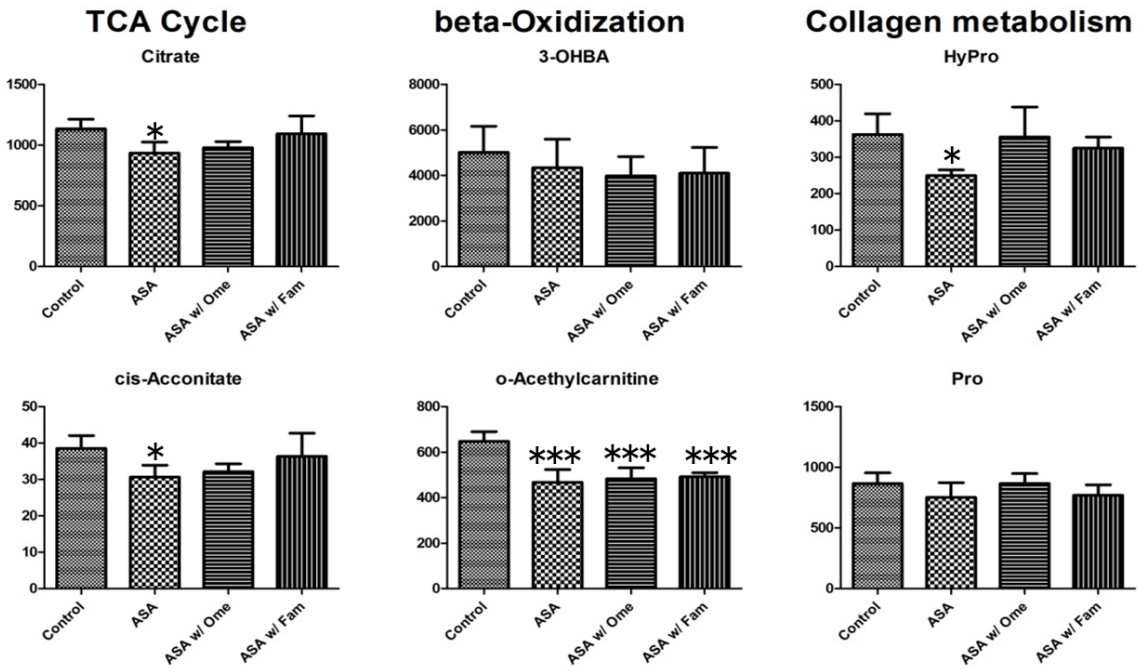
Figure 9: 臓器内代謝物濃度について行った PLS のローディングプロット(A)及びスコアプロット(B)[34]。 第 1 章でバイオマーカー候補とされた代謝物では hydroxyproline の減少(図中に赤で示した)が病態に相関する変化として捕えられた。第 1 章で変化が確認されたその他の代謝物は図中に青で示した。

Table 7: 第 1 章で変化が確認された代謝物の PC1 及び PC2 における負荷量

	PC1	PC2
citrate	0.09591	-0.01435
cis-aconitate	0.09319	-0.00234
3-hydroxybutyrate	0.00221	-0.05594
o-acetylcarnitine	0.07673	-0.07929
proline	0.07151	-0.01881
hydroxyproline	0.12999	0.08624

Figure 9B) すると胃潰瘍が惹起されたアスピリン群と胃潰瘍が惹起されなかったその他の群で差が確認された。PLS-DA により得られた各パラメータのローディングプロットを Figure 9A、第 1 章で変化が確認された代謝物の PC1 及び PC2 における負荷量を Table 7 に示す。第 1 章で変化が確認された代謝物の中では hydroxyproline の減少のみが胃潰瘍の惹起された動物群で特徴的にみられる変化として抽出された。

第 1 章で胃において変化が確認された citrate, cis-aconitate, o-acetylcarnitine, 3-hydroxybutanoic acid, proline, 及び hydroxyproline の臓器内濃度を Figure 10 に示した。アスピリンのみを投与した群では citrate, cis-aconitate, o-acetylcarnitine, 3-hydroxybutanoic acid 及び hydroxyproline が有意な減少を示した。citrate 及び cis-aconitate の有意な減少はファモチジンを共投与する事で効果の縮小傾向が認められたが、対照群のそれよりは低い値を示した。しかし、オメプラゾールを共投与してもアスピリンのみを投与した動物との違いは



	Control	Aspirin	Aspirin with Omeprazole	Aspirin with Famotidine
citrate	1135±78	936±90 (*)	978±49	1094±148
cis-aconitate	39±3	31±3	32±2	36±6
3-hydroxybutyrate	5016±1152	4339±1260	3979±843	4104±1128
o-acetylcarnitine	648±42	467±55 (**)	483±47 (**)	493±17 (**)
hydroxyproline	363±57	250±15(*)	356±82	325±30

Mean concentration (nmol/g tissue) and standard deviation.
Asterisks indicate statistically significant differences. **: $p<0.01$, *: $p<0.05$.
ASA: Aspirin、 Ome: Omeprazole、 Fam: Famotidine、 3-OHBA: 3-hydroxybutanoic acid
Figure 10: 第 1 章の試験で変化が見られた代謝物の臓器内濃度 [34]

認められなかった。o-acetylcarnitine 及び 3-hydroxybutanoic acid の減少はファモチジンもしくはオメプラゾールを共投与してもアスピリンのみを投与したときと違いは認められなかった。一方 hydroxyproline の有意な減少はファモチジン及びオプラゾールを共投与する事で対照群と同等レベルに回復した。proline は第 1 章の検討ではその有意な減少が確認されたが、本検討ではアスピリンのみを投与した群を含め、全ての群でその変化が認められなかった。

第4節　血清のメタボロミクス

CE-MS を用いて 515 種の低分子代謝物 (Supplemental Table 1) の血中濃度を測定した。これ以外に代謝物を同定できないピークもスペクトル上では観察されたが、今回は同定されたもののみを解析対象とした。

PCA の結果を PC1 及び PC2 のスコアの 2 次元プロットとして Figure 11A に示す。この解析での寄与率はそれぞれ PC1 0.187, PC2 0.149 であった。2 次元プロット上では対照群とアスピリンを投与した各群の間に明確な違いがみられたが、ファモチジン及びオメプラゾールを投与したことによる違いは確認する事は出来なかった (Figure 11A)。そこで胃潰瘍の診断結果をもとに PLS-DA を行ったところ、PC1 及び PC2 のスコアを 2 次元プロット (Figure 11B) すると胃潰瘍が惹起されたアスピリン群と胃潰瘍が惹起されなかったその他の群で差が確認された。

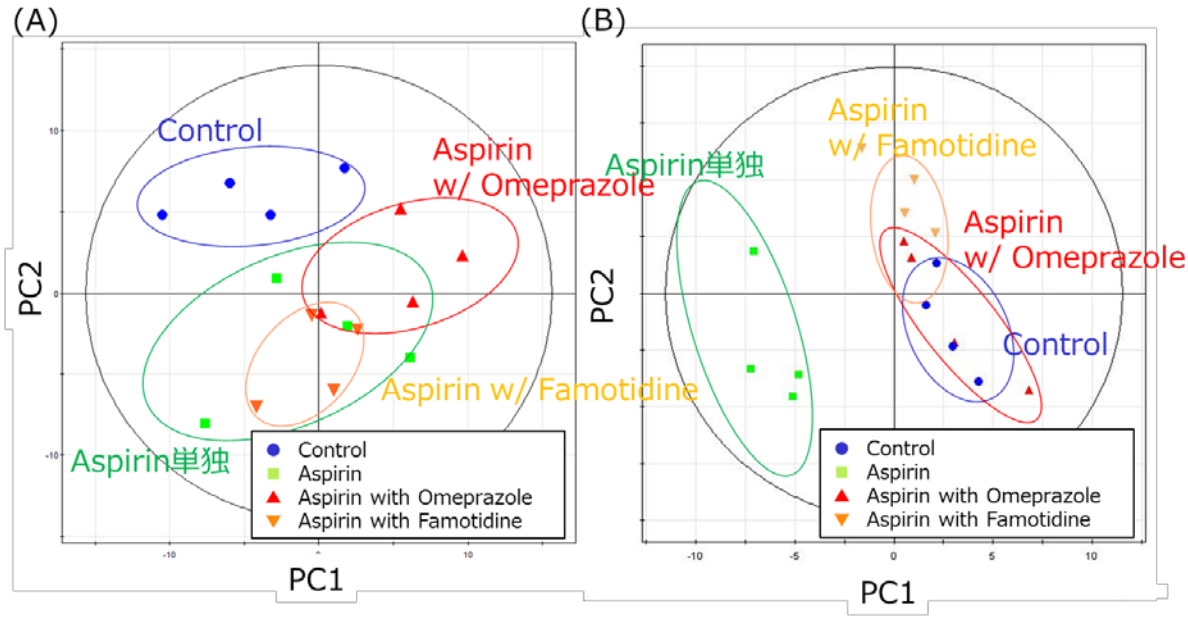


Figure 11：血中代謝物濃度について PCA (A)及び PLS-DA (B)を行った結果 [34] を PC1 及び PC2 のスコアを 2 次元プロットで示した。PCA ではアスピリンによる違いのみ抽出され、共投与による影響は確認されなかった。PLS-DA により胃潰瘍が惹起したことによる違いが確認された。

PLS-DA により得られた各パラメータのローディングプロットを Figure 12A に示す。また、第 1 章で変化が確認された代謝物の PC1 及び PC2 における負荷量を Table 8 に示す。hydroxyproline の減少のみが臓器内と血中で共通した変化として確認できた。

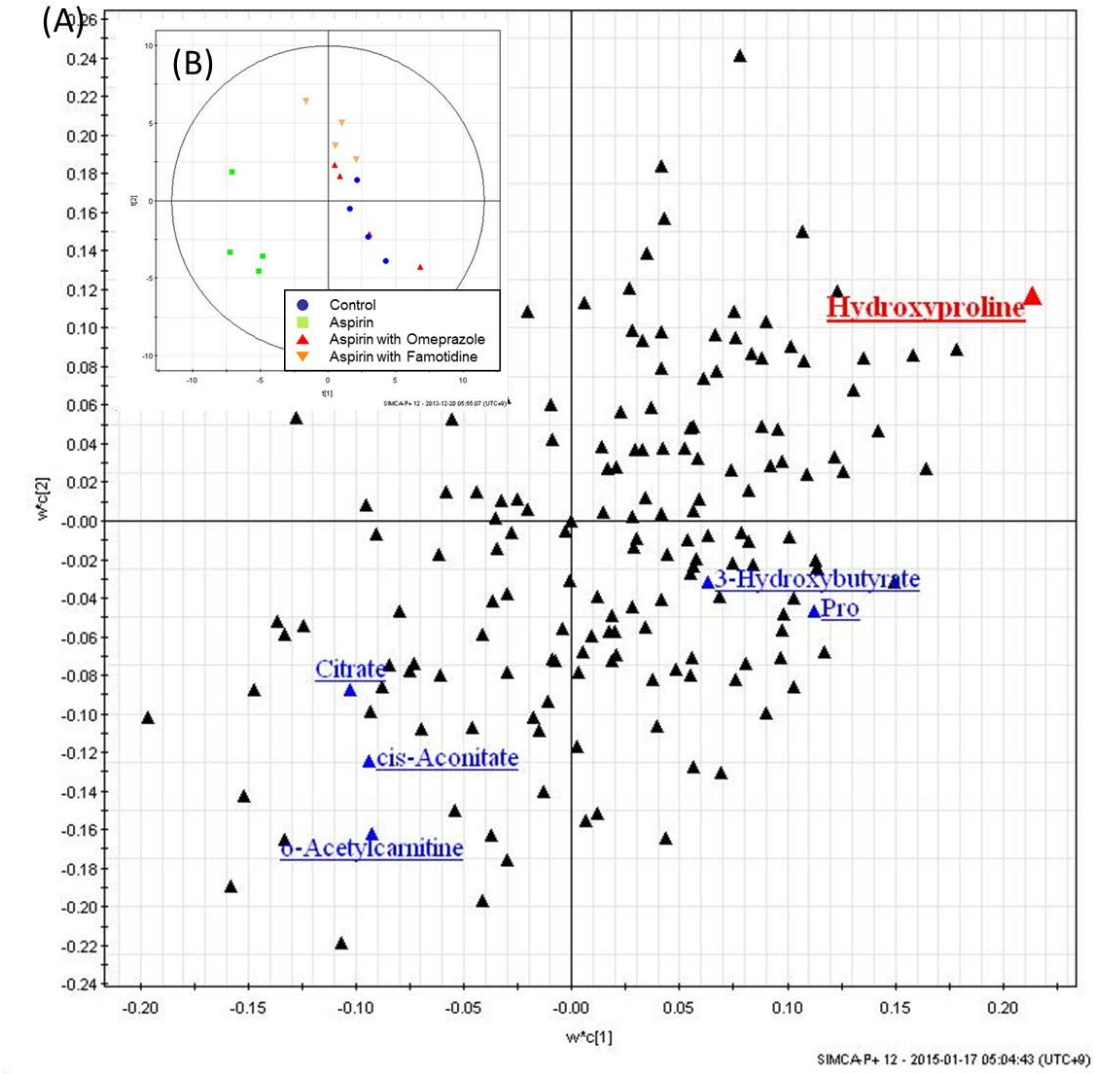


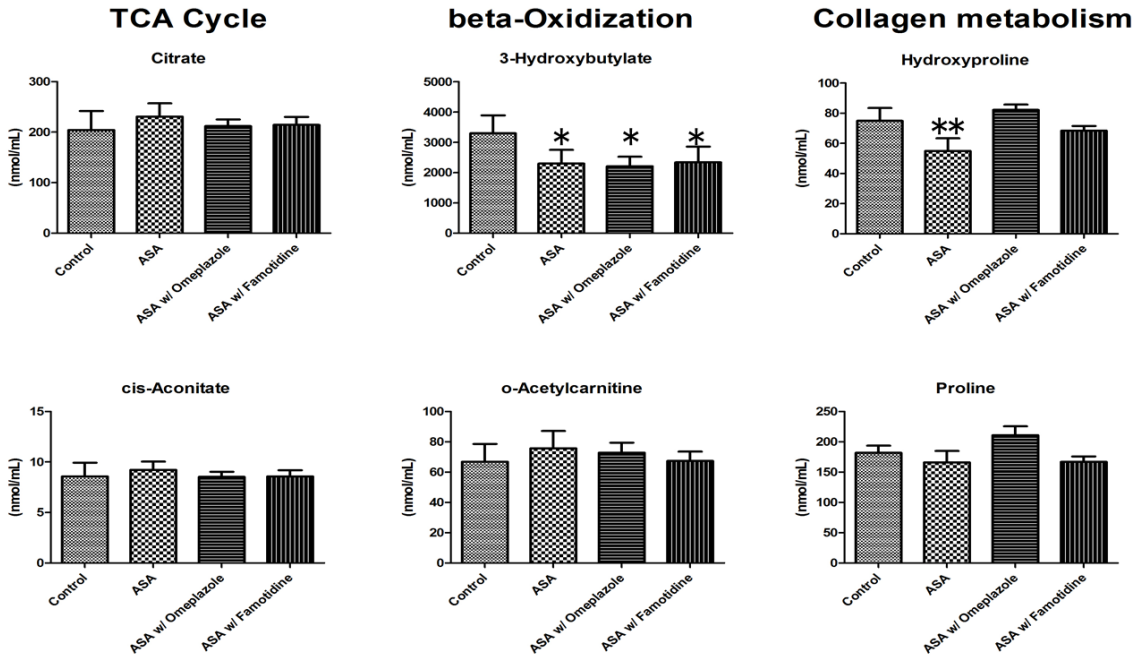
Figure 12: 血中代謝物濃度について行った PLS のローディングプロット(A)及びスコアプロット(B)[34]。第 1 章で変化が確認された代謝物では hydroxyproline の減少(図中に赤で示した)が病態に相関する変化として捕えられた。第 1 章で変化が確認されたその他の代謝物は図中に青で示した。

Table 8: 第 1 章で変化が確認された代謝物の PC1 及び PC2 における負荷量

	PC1	PC2
citrate	-0.10262	-0.08775
cis-aconitate	-0.09412	-0.12448
3-hydroxybutyrate	0.06314	-0.03173
o-acetylcarnitine	-0.09229	-0.16203
proline	0.11258	-0.04656
hydroxyproline	0.21336	0.11659

hydroxyproline 以外に臓器内と血中でともに増加した代謝物は確認されず、また血中のみで特異的に変化したバイオマーカー候補も存在しなかった。

第 1 章で胃において変化が確認された citrate, cis-aconitat, o-acetylcarnitine, 3-hydroxybutanoic acid, proline 及び hydroxyproline の臓器内濃度を Figure 13 に示した。アスピリンのみを投与した群では 3-hydroxybutanoic acid, hydroxyproline の有意な減少が確認された。これらの変化のうち 3-hydroxybutanoic acid の有意な減少はファモチジンもしくはオメプラゾールを共投与してアスピリンによる胃潰瘍を抑制しても変化は見られなかったが、hydroxyproline の有意な減少はファモチジンもしくはオメプラゾールを共投与する事で対象群と同等レベルに回復した。第 1 章の検討で変化が確認された citrate, cis-aconitate, o-acetylcarnitine, proline についてはアスピリンのみを投与した群を含めてすべての群でその変化が認められなかった。



	Control	Aspirin	Aspirin with Omeprazole	Aspirin with Famotidine
citrate	204±38	231±26	212±13	215±15
cis-aconitate	8.6±1.4	9.2±0.8	8.5±0.5	8.6±0.6
3-hydroxybutyrate	3299±592	2294±459 (*)	2211±312 (*)	2334±527 (*)
o-acetylcarnitine	67±12	76±12	73±7	67±6
hydroxyproline	75±8	55±8 (**)	82±3	68±3

Mean concentration (nmol/mL) and standard deviation.
Asterisks indicate statistically significant differences. **、 p<0.01 *、 p<0.05.
ASA: Aspirin、 Ome: Omeprazole、 Fam: Famotidine、 3-OHBA: 3-hydroxybutanoic acid
Figure 13: 第 1 章の試験で変化が見られた代謝物の血中濃度 [34]

第5節　小括

本章では第 1 章で見出した 2 種類の NSAIDs に共通して変動する複数のバイオマーカー候補の変動機序を明らかにすることを目的に、胃酸の分泌を抑制する事で NSAIDs による胃潰瘍の惹起を抑制する作用がある事が知られている H_2 ブロッカー[8] 及びプロトンポンプインヒビター[9] をアスピリンと共投与して、アスピリンによる胃潰瘍の惹起が胃酸分泌阻害により抑制された場合に内因性代謝物プロファイルがどのように変化するかを調べた。アスピリンによる胃潰瘍は薬物が胃の防御能を抑制したところに攻撃因子である胃酸が分泌されることで惹起されることが知られている。すなわち、本検討においてアスピリンの単独投与で見られた変化が H_2 ブロッカーやプロトンポンプインヒビターの共投与により正常に戻った場合はそのマーカー候補は胃潰瘍が惹起されたことにより変化するバイオマーカーであることが分かる。一方でアスピリンの単独投与で見られた変化が共投与によって正常レベルに戻らなかった場合は、そのマーカー候補は NSAIDs による防御因子の低下を示し胃潰瘍が起こりうる状態にあることを示すが、胃潰瘍そのものを直接反映していないことが分かる。

PCA 解析では胃潰瘍の惹起による代謝物パターンの明確な変化は検出されなかったが、胃潰瘍の診断結果を教育セットとして PLS-DA を行ったところ胃潰瘍が惹起されたアスピリン群と胃潰瘍が惹起されなかったその他の群で代謝物パターンの差が確認された。そのローディングプロットからは臓器内及び血中で共通して観察される変化として hydroxyproline の減少が確認された。実際 hydroxyproline の減少はアスピリンの単独投与群のみで認められファモチジンもしくはオメプラゾールを共投与する事で対照群と同等レベルまで回復していることも確認できた。hydroxyproline は生体内においてコラーゲンの中に特異的に含まれるアミノ酸であることが知られており、その減少は臓器内におけるコラーゲン量の減少を反映しているものと考えられる。これらは潰瘍を起こした臓器においてコラゲナーゼの活性が上昇し、コラーゲン量が減少する事 [33] に起因していると考えられた。本検討において同量のアスピリンを投与してもファモチジンもしくはオメプラゾールを共投与して胃潰瘍を抑制するとその減少が認められなかったことから、胃酸分泌抑制剤により潰瘍が抑制されたことにより臓器

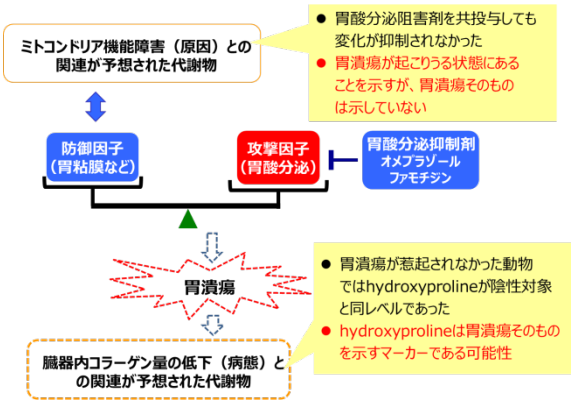


Figure 14：本章の結果のまとめ

内のコラーゲン量の減少も抑制され hydroxyproline の減少が観察されなかったものと考えられた。このことから hydroxyproline は NSAIDs による胃潰瘍惹起を直接反映するマーカーとなることが期待された。(Figure 14)

一方、第 1 章でマーカー候補として期待していた citrate, cis-aconitate, o-acetylcarnitine, 3-hydroxybutanoic acid についてはファモチジンもしくはオメプラゾールを共投与してアスピリンによる胃潰瘍を抑制しても変化は見られなかった。o-acetylcarnitine, 3-hydroxybutanoic acid はいずれも脂質の β 酸化の最終産物の一つであり、その減少はミトコンドリアにおける脂質の β 酸化を介したエネルギー供給の低下を意味していると考えられる。アスピリンをはじめとする NSAIDs はミトコンドリアの膜電位を調整する PTP を開口することで [25] ミトコンドリアの機能を失わせるため、これが胃粘膜保護作用の低下を招くことが報告されている [32]。今回のデータからファモチジンもしくはオメプラゾールでは脂質の β 酸化の活性低下による胃粘膜保護作用の低下は抑制できないことが明らかになった。一方でこれらの動物では胃潰瘍が惹起されていないことから脂質の β 酸化の活性低下は胃潰瘍惹起の危険因子とはなりうるものの、直接結びついているわけではないと考えられた (Figure 14)。

TCA 回路の中間体である citrate 及び cis-aconitate の有意な減少はアスピリン投与群及びオメプラゾールとアスピリンを投与した群では確認され、ファモチジンとアスピリンを投与した群では減少傾向が確認された。TCA 回路を行う酵素群はミトコンドリアに存在しており、この代謝経路はミトコンドリア内で行われる。そのため、TCA 回路の中間体の減少は β 酸化同様 NSAIDs によるミトコンドリアの機能障害によるものと考えられる。だがこの検討ではファモチジンを共投与することでこれらの代謝物の減少が軽減された。この原因は不明であるが、ファモチジンと同じ H_2 ブロッカーであるシメチジンを前投与したラットに NSAIDs を投与した場合 TCA 回路の中間体である 2-oxoglutarate がシメチジンにより回復傾向を示すことが報告されており [35]、 H2 ブロッカーには NSAIDs による TCA 回路の活性低下を何らかの形で回復させる能力がある可能性が示唆された。

血中においては 3-hydroxybutanoic acid 及び hydroxyproline は臓器内での変化と同様の変化を示した。一方で o-acetylcarnitine, citrate 及び cis-aconitate は血中でその変化を検出することができなかった。この事から血中 3-hydroxybutanoic acid は NSAIDs による胃潰瘍の発現の危険性を示す血中バイオマーカー、 血中 hydroxyproline 量は NSAIDs による胃潰瘍惹起そのものを示すバイオマーカーとなりうることが判明した。

第3章　各種胃潰瘍モデルにおける代謝プロファイルの比較

第1節　実験の概要

第 1 章及び第 2 章の検討において、NSAIDs により惹起される胃潰瘍を血中濃度の変化で検出できる低分子代謝物を見出し、他の薬物投与を併用した結果との比較により作用機序を考察した。その結果、血中 hydroxyproline 量の変化は NSAIDs による胃潰瘍の惹起を予測できる、胃潰瘍のバイオマーカーとなりうることが期待された。ラットで胃潰瘍を誘発する病態モデルとしては第 1 章及び第 2 章で用いた NSAIDs により誘発するモデル以外にエタノールで誘発するモデルやストレスで誘発するモデルが知られている [36]。

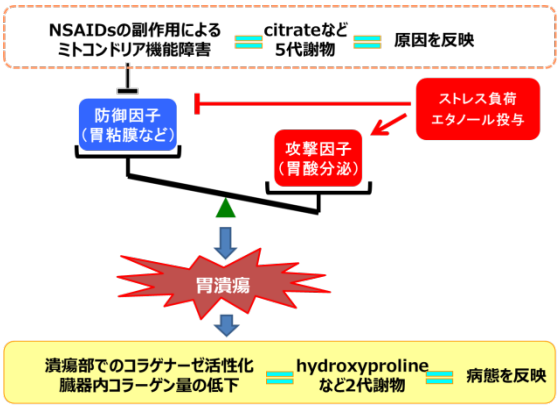


Figure 15: 本検討のイメージ。本検討ではアスピリン以外の原因で胃潰瘍を惹起した場合の代謝物プロファイルの変化を確認して。各モデルで共通の変化及び異なる変化を見極めることで、バイオマーカーの変動の機序を明らかにする。

胃潰瘍は胃粘膜等の防御因子と胃酸等の攻撃因子のバランスが崩れることにより誘発されるが、その原因はモデルにより様々である。エタノールの場合、粘膜の生成が抑制されることや胃粘膜における血流量が低下することにより胃の防御作用を低下させること、活性酸素種の生成や細胞の増殖抑制、炎症反応の増進といったエタノールそのものの胃表面への攻撃が胃潰瘍を惹起していると言われている [37]。また、ラットを長期間精神的ストレス状態に置くと胃潰瘍が惹起されるが、これらはストレスによる胃酸やペプシンの分泌増加と胃の防御作用の低下が原因であると言われている [38]。このようにモデルによって胃潰瘍の要因は異なるが、最終的に表現型として胃潰瘍を惹起していることから、これら 3 つのモデルで共通の変化か異なる変化かを見極めることでバイオマーカーの変動の機序が明らかにできると期待される (Figure 15)。また、もし 3 つのモデルで共通して変化するバイオマーカー候補が存在すれば、このバイオマーカー候補は NSAIDs のみならず、様々な誘因による胃潰瘍を検出できるバイオマーカーであることが期待される。一方 NSAIDs 誘発モデル以外では同様の変化を示さなかった場合、そのバイオマーカー候補の変化は NSAIDs により胃潰瘍が起こりうる状態にあることを示すが、他の誘因による胃潰瘍の全てを判別できるものではないことが分かる。そこで本章ではエタノール及び低温ストレスによって胃潰瘍を惹起した動物モデルの胃での内因性代謝物の変化とアスピリン投与による変化を比較し、要因の大きく異なる 3 つの胃潰瘍

モデルの作用機序の違いを明らかにして、第 1 章で見出したバイオマーカー候補の変化の機序を薬物の影響以外の要因も考慮に入れて明らかにするとともに、バイオマーカー候補の変化が NSAIDs 以外の胃潰瘍においても適用が可能かを検討した。

第2節　胃潰瘍の診断

Table 9 に胃潰瘍面積及び胃潰瘍が観察された動物数を記載した。いずれの群においても死亡はみられず、対照群を除く全ての群で全例に胃潰瘍による出血が認められた。

Table 9:　本検討で確認された胃潰瘍面積 [39]

Model	Control	Ethanol	Stress	Aspirin
Test article	Vehicle	Ethanol 5 mL/kg	Vehicle	Aspirin 300 mg/kg
Room temperature (for 5hr after dosing)	19 to 25 °C	19 to 25 °C	6 °C	19 to 25 °C
Number of animals	8	4	4	4
Severity of gastric ulceration	ND (0/8)	12.42 ± 5.90 (4/4)	2.30 ± 1.47 (4/4)	1.58 ± 1.60 (4/4)

Data are expressed as mean ± standard deviation of the area of ulceration (mm^2).
Values in parentheses are the incidence rate of animals with gastric ulceration.
ND: not detected

第3節　胃抽出物中のメタボロミクス

CE-MS で 576 の低分子代謝物 (Supplemental Table 1) の臓器内濃度を決定した。代謝物を同定できないピークもスペクトル上では観察されたが、今回は同定されたもののみを解析対象とした。576 の低分子代謝物の濃度を用いて PCA を行った結果を PC1 及び PC2 のスコアを 2 次元プロットとして Figure 16 に示す。この解析での寄与率は PC1 0.396, PC2 0.198 であった。アスピリン及びエタノールで胃潰瘍を誘発したモデルは対照群と明確な差を示したが、ストレスにより胃潰瘍を誘発した動物は他のモデルに比べ対

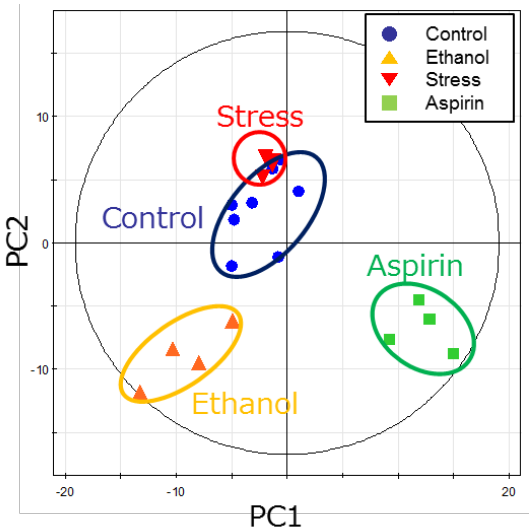


Figure 16: 臓器内代謝物濃度について PCA を行った結果を PC1 及び PC2 のスコアを 2 次元プロットで示す。アスピリン及びエタノールモデルは対照群と異なるパターンを示したが、ストレスモデルは対照群と類似のプロファイルであると予想された。

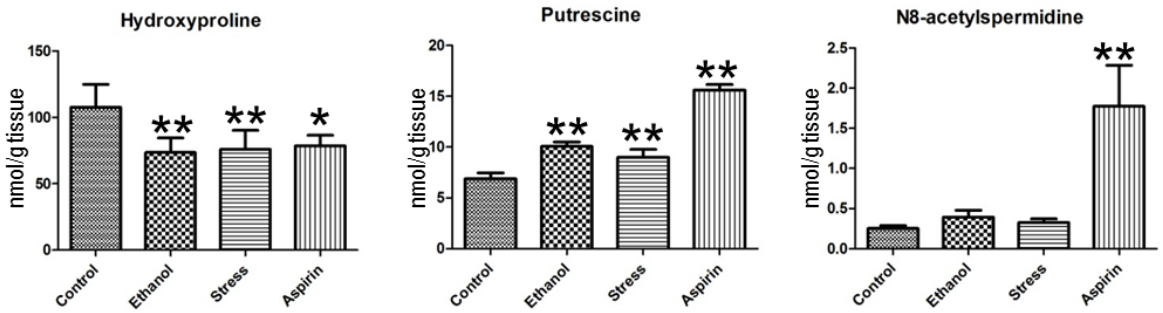
照群に近い位置にプロットされた。

それぞれの胃潰瘍モデルと対照群の各代謝物の臓器内濃度を t-検定によって有意差検定し、いずれかのモデルにおいて有意な変化が認められた代謝物を Supplemental Table 2 に一覧にして提示した。また、全てのモデルで有意な変化が認められた代謝物のリストを Table 10 に示した。エタノールで胃潰瘍を誘発したモデルで 57 代謝物、ストレスで胃潰瘍を誘発したモデルで 39 代謝物、アスピリンで胃潰瘍を誘発したモデルで 80 代謝物の有意な変動が確認された。これらのうち、hydroxyproline の低下と putrescine と N8-acetylspermidine の増加が 3 つのモデルで共通に確認された。これらの代謝物の量の変化は Figure 17 に示す。またこれらの代謝物は Figure 18 に示すように、単一なピークとして確認されており、各代謝物は正確に同定・定量されていることが確認された。

Table 10: すべてのモデルで同様に有意な増減が確認された代謝物 [39]

Metabolite	Model		
	Ethanol	Stress	Aspirin
hydroxyproline	Decrease (p<0.01)	Decrease (p<0.05)	Decrease (p<0.01)
N8-Acetylspermidine	Increase (p<0.05)	Increase (p<0.05)	Increase (p<0.01)
putrescine	Increase (p<0.01)	Increase (p<0.01)	Increase (p<0.01)

Values in parentheses are statistically significant differences (t-test between model and control).
All metabolites which changed in each model are listed in Supplemental Table 2.



	Control	Ethanol	Stress	Aspirin
hydroxyproline	108±17	74±11 (**)	76±14 (**)	78±8 (*)
putrescine	6.9±0.6	10.1±0.4 (**)	9.0±0.8 (**)	15.6±0.6 (**)
N8-acetylspermidine	0.25±0.04	0.39±0.09	0.33±0.05	1.77±0.51 (**)

Mean concentration (nmol/g tissue) and standard deviation.
Asterisks indicate statistically significant differences. **、 p<0.01 *、 p<0.05.

Figure 17: hydroxyproline, putrescine, N8-acetylspermidine の臓器内濃度 [39]

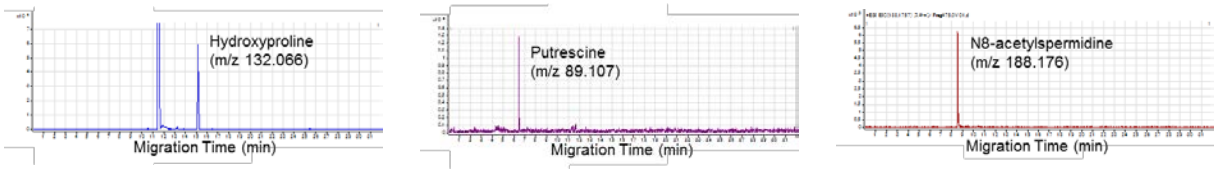
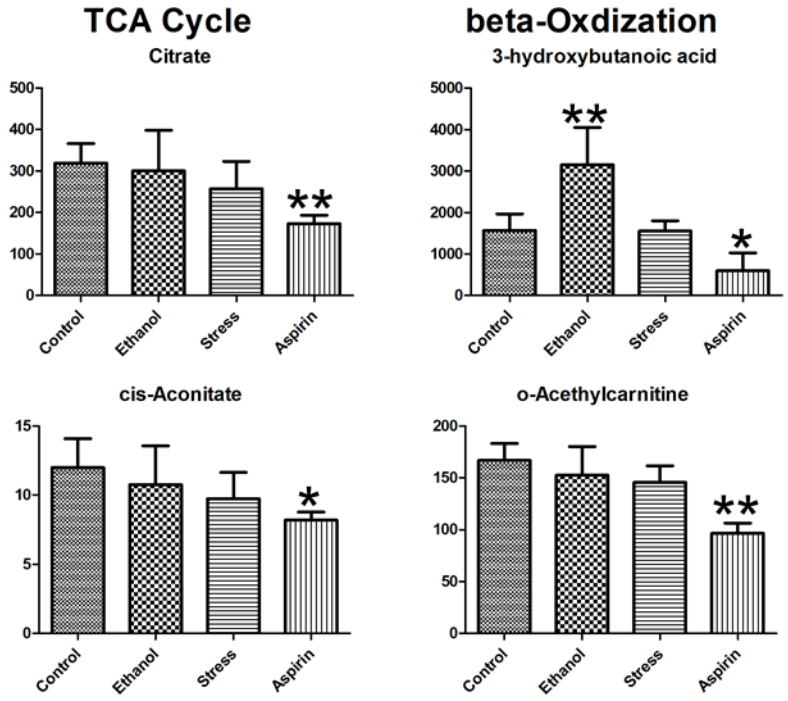


Figure 18: hydroxyproline, putrescine, N8-acetylspermidine の CE-TOF-MS ion electropherogram (胃のスペクトルより、全て陽イオンモードで取得)[39]

第1章でバイオマーカー候補として挙げられた6代謝物のうちhydroxyproline及びproline以外の代謝物の変化をFigure 19に示す。citrate, cis-aconitate及び o-acetylcarnitineの臓器内濃度はアスピリンモデル以外では変化しなかった。3-hydroxybutanoic acid はアスピリンモデルのみで減少し、ストレスモデルでは変化せず、エタノールモデルでは増加した。



	Control	Ethanol	Stress	Aspirin
citrate	320±47	300±98	257±66	174±19 (**)
cis-aconitate	12.0±2.1	10.8±2.8	9.8±1.9	8.2±0.6 (*)
3-hydroxybutyrate	1568±397	3147±900 (**)	1554±247	596±433 (*)
o-acetylcarnitine	167±16	153±28	146±16	97±10 (**)

Mean concentration (nmol/g tissue) and standard deviation.
Asterisks indicate statistically significant differences. **、 p<0.01 *、 p<0.05.
Figure 19: 第 1 章の試験で変化が見られた代謝物の臓器内濃度 [39]

第4節　血清のメタボロミクス

CE-MS で 577 の低分子代謝物 (Supplemental Table 1) の血中濃度を決定した。これ以外に代謝物を同定できないピークもスペクトル上では観察されたが、今回は同定されたもののみを解析対象とした。

577 の低分子代謝物の濃度を用いて PCA を行った結果を PC1 及び PC2 のスコアを 2 次元プロットとして Figure 20 に示す。この解析での寄与率は PC1 0.621, PC2 0.135 であった。アスピリン及びエタノールで胃潰瘍を誘発したモデルは対照群と明確な差を示したが、ストレ

スにより胃潰瘍を誘発した動物は対照群とほぼ同じ位置にプロットされた。

臓器内において 3 モデルで共通して変化が認められた hydroxyproline 及び putrescine の血中濃度を Figure 21 に示す。hydroxyproline の減少は血中においても同様に観察されたが putrescine は血中では変化しなかった。N8-acetylspermidine の血中濃度は検出限界以下であった。

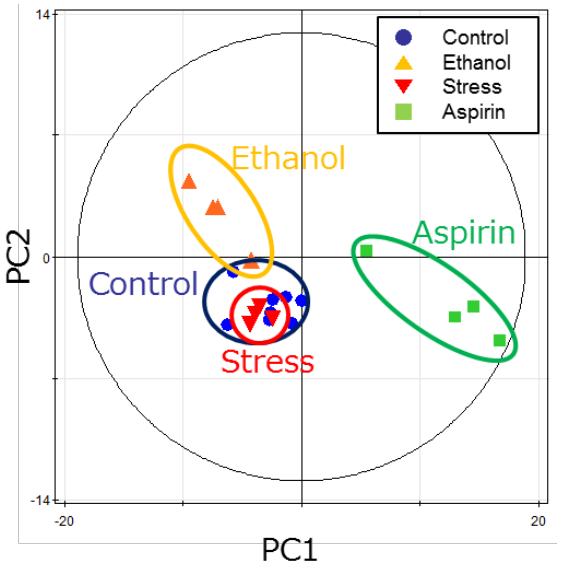
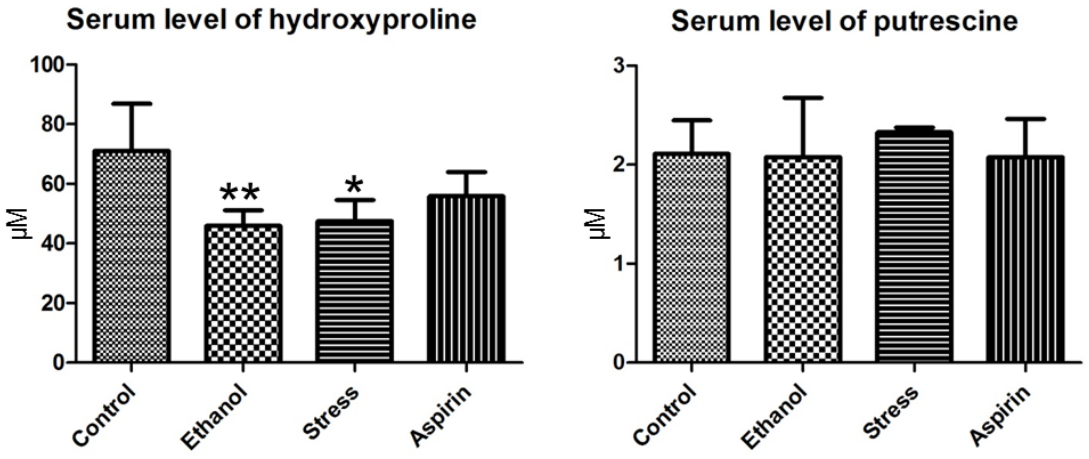


Figure 20：血中代謝物濃度について PCA を行った結果を PC1 及び PC2 のスコアを 2 次元プロットで示す。臓器の結果同様アスピリン及びエタノールでモデルは対照群と明確な差を示したが、ストレスモデルは対照群と類似のプロファイルであると予想された。



	Control	Ethanol	Stress	Aspirin
hydroxyproline	71±16	46±5 (**)	47±7 (*)	56±8
putrescine	2.1±0.3	2.1±0.6	2.3±0.1	2.1±0.4
N8-acetylspermidine	ND	ND	ND	ND

Mean concentration (nmol/g tissue) and standard deviation.
Asterisks indicate statistically significant differences. **、 p<0.01 *、 p<0.05.
ND: not detected
Figure 21: hydroxyproline、 putrescine、 N8-acetylspermidine の血中濃度 [39]

第5節　小括

本章では、第 1 章で見出したバイオマーカー候補の変化が何に起因するものなのかを明らかにするとともに、バイオマーカー候補の変化が NSAIDs 以外の胃潰瘍においても使えるか否かを明らかにすることを目的にエタノール及び低温ストレスによって胃潰瘍を惹起した動物モデルでの内因性代謝物の変化とアスピリンによって胃潰瘍を惹起した動物モデルでの変化を比較した。

その結果第 1 章で見られた変化のうち、臓器内における citrate、 cis-aconitate、及び o-acetylcarnitine の減少はアスピリンで胃潰瘍を誘発したモデル以外では検出されなかった。また臓器内の 3-hydroxybutanoic acid 濃度はアスピリンで胃潰瘍を誘発したモデルでは減少したが、ストレスにより胃潰瘍を誘発した場合は変化せず、エタノールで胃潰瘍を誘発したモデルでは増加した。 一方で hydroxyproline の減少については今回検討した全てのモデルで確認された。また、本章の検討ではこれまで顕著な変化が観察されていなかった putrescine 及び N8-acetylspermidine の増加も確認した。

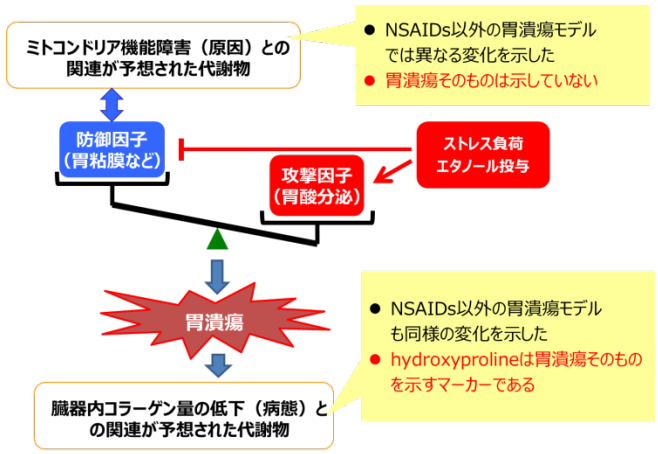


Figure 22：本章の結果のまとめ

第 1 章においてみいだした、citrate, cis-aconitate, o-acetylcarnitine 及び 3-hydroxybutanoic acid の減少は、第 2 章において各種阻害剤により胃潰瘍を抑制しても、胃潰瘍の有無に関係なく変化したことから、NSAIDs によるミトコンドリアの機能障害が原因であると考察してきた。今回、他の機序で胃潰瘍が惹起することが知られているエタノールによる胃潰瘍モデル及びストレスによる胃潰瘍モデルではこれらの変化が確認できなかったことから、これらの代謝物の変化は NSAIDs 投与に起因すること、 胃潰瘍そのものを示すものでは無く NSAIDs により胃潰瘍が起こりうる状態を示すものであることを改めて確認した。

hydroxyproline の減少は本章で検討したすべてのモデルで共通して確認された。hydroxyproline の減少は潰瘍部位におけるコラゲナーゼの活性が上昇及びコラーゲン量が減少している事[33]が原因と考えてきたが、潰瘍部位におけるコラーゲン量の低下は NSAIDs 以外の別の胃潰瘍モデルにおいても報告されており[40, 41-43]、今回の変化も臓器内における

コラーゲン量の減少に起因したものであると考えられた (Figure 22)。

さらに、本章の検討ではこれまでの検討では顕著な変化が観察されていなかった putrescine 及び N8-acetylspermidine の増加も確認した。putrescine は spermidine や spermine の前駆体である。spermidine や spermine 及びそのアセチル化誘導体である N1-acetylspermidine や N8-acetylspermidine は細胞増殖に関与している代謝物と考えられており[44]、炎症部位においても増加することが報告されている[45, 46]。 spermidine, spermine 及び N1-acetylspermidine の臓器内濃度を Figure 23 に示すが、 spermine 及び spermidine の増加はアスピリンで誘発した胃潰瘍モデルのみで観察され、 その他のモデルでは増加は確認されなかった。N1-acetylspermidine はアスピリンで誘発した胃潰瘍モデルのみで検出されており、対照群を含めその他のモデルでは検出限界以下であった。しかし、今回すべてのモデルで変化が観察された putrescine 及び N8-acetylspermidine についても、アスピリンで誘発した胃潰瘍モデルにおいてより強くその変化が認められていることから、その感度に違いがあるにしろすべての代謝物は胃潰瘍により惹起された炎症に誘発されたものと予想された。

血中においては hydroxyproline の減少のみが確認された。原因を問わず見られる変化であること、臓器内 hydroxyproline 量の変化を血中の変化として捕えることが可能なことを考えると、血中 hydroxyproline は胃潰瘍の原因を問わず用いることができる血中バイオマーカーとなりうることが期待された。

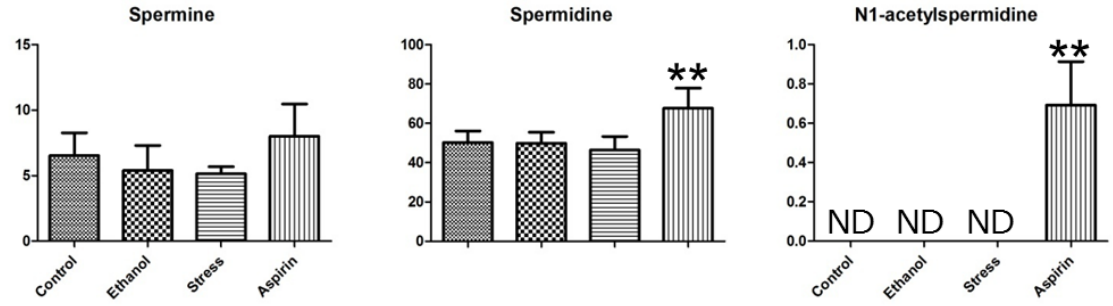


Figure 23: spermidine、 spermine、 及び N1-acetylspermidine の臓器内濃度 Aspirin 誘発モデルでのみ増加傾向もしくは有意な増加が確認された。

結論

胃潰瘍は臨床において頻発する薬物性副作用の一つである[1]。その原因として関節リウマチ、変形性関節症、急性疼痛、発熱の治療を目的に[3]頻繁に処方される NSAIDs がこの副作用を持つことが挙げられる[2]。NSAIDs による胃潰瘍を検出する現状においての唯一の方法は胃カメラ等の内視鏡検査[4]であり血液検査でこれを検出する有用な方法は存在しない。また、通常の胃腸管障害の自覚症状である痛みは、NSAIDs が誘発する胃潰瘍においては NSAIDs の鎮痛作用により抑制されるため、発見時には既に致命傷となることも多い[6]。NSAIDs は解熱鎮痛薬として非常に有益な化合物であり、もしこの毒性の存在や進行度を血中で検出できる指標を見出すことができれば、より適切な NSAIDs の利用を促進することが期待される。そこで本研究では血中において高感度に薬物誘発胃潰瘍を検出できるバイオマーカーを見出すことを目的に、NSAIDs で胃潰瘍を誘発した動物の臓器中及び血中の内因性代謝物の変化を調べ、バイオマーカー候補の探索を行った。さらに見出されたバイオマーカーの濃度変化の変動機序及び有用性を確認することを目的に NSAIDs により惹起される胃潰瘍を胃酸分泌抑制剤により阻害した場合の内因性代謝物の変化及び NSAIDs 以外の原因で胃潰瘍が惹起された場合の内因性代謝物の変化についても検討した。

本研究で行った検討で得られた結果を Table 11 にまとめる。最終的に胃潰瘍の血中マーカー候補として hydroxyproline を見出し、そのプロファイルとして以下の事を明らかにした。

- 胃潰瘍の発症に伴って減少し、回復すると正常値に戻る。
- 臓器内の変化量とよく相関し、その減少は胃潰瘍の発現を意味している。
- 胃酸分泌抑制剤によって胃潰瘍を阻止した場合には変化しない。
- NSAIDs により誘発される胃潰瘍のみならずエタノールやストレスによる胃潰瘍でも変化する。

以上の結果から血中 hydroxyproline 濃度は NSAIDs のみならず、様々な要因により胃潰瘍が惹起されたことを血液検査で検出することができるバイオマーカーとなりうることが期待された。このバイオマーカーの変化は胃潰瘍部位で共通してみられるコラーゲン量の減少に起因するものと考えているが[40-42]、潰瘍部位におけるコラーゲン量の変化はヒトにおいて胃潰瘍の最大の間接的要因として問題となっているヘリコバクターピロリ菌により誘発された胃潰瘍においても報告されている[43]。 このことから、血中 hydroxyproline 濃度の減少は臨床において様々な原因で惹起された胃潰瘍を鋭敏に検出できる初の血中バイオマーカーとなりう

る可能性を秘めている。 一方で血中 hydroxyproline は胃潰瘍のみならず、食事、皮膚疾患、骨疾患、肝障害等でも変動することが予想される。これらが hydroxyproline による胃潰瘍の検出にどの程度影響を及ぼすかは臨床試験で見極める必要がある。

また、本研究においてはバイオマーカーの変動機序を明らかにするため全てのモデルで共通して変動する代謝物に注目して研究を行ったが、同時に各モデルで代謝物パターンが異なることも示された。今後はこの異なる代謝物パターンに注目して研究を行うことで、今回抽出された hydroxyproline を含めた複数のバイオマーカーを測定することで胃潰瘍の要因をも推定することができるバイオマーカー群を見出せる可能性も期待された。

Table 11: 本研究で確認された代謝物の変動のまとめ

Biomarker	Limitation of indication	Changes in Stomach				Changes in serum
		NSAIDs-model		Ethanol -Model	Stress -Model	
			Effects of inhibitors			
hydroxyproline	Useful for all gastric ulcer model	Decrease	Yes	Decrease	Decrease	Yes
proline	Not sensitive	Decrease	No	Not Change	Not Change	Yes
citrate	Not useful as a serum biomarker	Decrease	No	Not Change	Not Change	No
cis-aconitate	Only useful for NSAIDs-model	Decrease	No	Not Change	Not Change	Yes
o-acetyl carnitine	Only useful for NSAIDs-model	Decrease	No	Not Change	Not Change	Yes
3-hydroxybutanoic acid	Only useful for NSAIDs-model	Decrease	No	Increase	Not Change	Yes
putrescine	Not useful as a serum biomarker	Increase	-	Increase	Increase	No
N8-acetylspermidine	Not useful as a serum biomarker	Increase	-	Increase	Increase	No

謝辞

本研究は厚生労働科学研究費補助金(創薬基盤推進研究事業)を用いて、慶應大学先端生命科学研究所、東京大学医学部付属病院及びアステラス製薬の共同研究として行った研究結果である。本研究を行うにあたり，多くのご指導，ご討論いただきました共同研究のメンバーである慶應大学生命科学研究所 曽我 朋義 教授、大石 麻希さん、遠藤 慶子 さん、太田 紗菜 さん、東京大学医学部附属病院 薬理動態学講座 本間 雅 特任准教授、アステラス製薬株式会社 トランスレーショナルサイエンス研究所 鈴村 謙一 室長、同 安全性研究所 奈良岡 準 主管研究員、大畠 武二 室長に心より感謝の意を表します。

本研究を行う機会を与えていただき，常にご理解，ご鞭撻を賜りました，アステラス製薬株式会社 安全性研究所 関 二郎 元所長、宮前 陽一 所長及び同研究所 創薬毒性研究室 大畠 武二 室長に心より感謝の意を表します。

学位申請を行うにあたり，終始ご指導，ご鞭撻を賜りました，大久保 忠恭 教授、吉田 卓也 准教授、河原 一樹 助教をはじめとする大阪大学大学院薬学研究科高分子化学分野の方々に深く感謝の意を表します。

本論文を査読していただき，ご指導いただきました大阪大学大学院薬学研究科 宇野 公之 教授，高木 達也 教授に深謝いたします。

さらに，本研究の途上においてご協力いただいた，アステラス製薬株式会社 安全性研究所の方々に心より感謝の意を表します。

最後に，私の研究生活に常に理解を示し，支援してくれた家族に感謝の意を表します。

実験の部

動物モデルの作成

各章で用いた動物モデルは以下のように作成した。

第 1 章　NSAIDs 誘発胃潰瘍モデル

アスピリンはナカライテスク株式会社からイブプロフェンは和光純薬工業株式会社から購入した。日本チャールスリバー株式会社から購入した CD(SD)系の雄性ラット 60 匹を無作為に 5 群(各群 12 匹)に分けアスピリンの 3 及び 300 mg/kg、イブプロフェンの 8 及び 800 mg/kg 及び対照群のいずれかの群とした。投与前日より 24 時間絶食した後、薬物を 0.5 w/v% メチルセルロース（MC）溶液に懸濁して単回経口投与した。対照群は薬物投与群と同じ時点で絶食し、薬物を含まない 0.5 w/v% メチルセルロース（MC）溶液を薬物投与群と同量経口投与した。投与後 1、5、24 時間に各 4 匹ずつペントバルビタールナトリウム水溶液（6.48 mg/mL、5 mL/kg）を腹腔内投与して麻酔を行い、血液を採取した後、放血安楽死させ、胃を摘出した。採取した血液は室温放置後遠心分離（4 ºC、 4600 x g で 10 分間）して血清を採取した。胃は大弯に沿って切開後、肉眼的に観察し、胃内部の写真撮影を行った。胃及び血清はその後 CE-MS を用いた内因性代謝物の濃度測定に供した。剖検時に撮影した写真から画像解析ソフトを用いて胃潰瘍面積を測定した。

本試験はアステラス製薬株式会社の動物実験倫理委員会及び株式会社新日本科学　安全性研究所の動物実験倫理委員会によりプロトコールの承認も受けた後、株式会社新日本科学の実験動物倫理指針に従って実施した。

第 2 章　オメプラゾール及びファモチジンとアスピリンの共投与モデル

アスピリンは第 1 章と同じものを用いた。ファモチジン及びオメプラゾールは和光純薬工業株式会社から購入した。日本チャールスリバー株式会社から購入した CD(SD)系の雄性ラット 16 匹を 1 群 4 匹の 4 群に分けた。投与前日より 24 時間絶食した後、一つの群にはファモチジンの 5 mg/kg を、他の 1 群にはオメプラゾールの 60 mg/kg を 0.5 w/v% MC 溶液に懸濁して経口投与した。残りの 2 群には媒体である 0.5 w/v% MC 溶液を経口投与した。これらの薬物を投与した 30 分後にファモチジンの 5 mg/kg、オメプラゾールの 60 mg/kg、及び 0.5 w/v% MC 溶液を投与した 3 群にアスピリンの 100 mg/kg を 0.5 w/v% MC 溶液に懸濁して経

口投与した。0.5 w/v% MC 溶液を経口投与したもう 1 群には再度 0.5 w/v% MC 溶液を経口投与し、対照群とした。アスピリンの投与後 5 時間にイソフルランを吸引させて麻酔を行い、血液を採取した後、放血安楽死させ、胃を摘出した。採取した血液は室温放置後遠心分離（4ºC、4600 x g で 10 分間）して血清を採取した。胃は大弯に沿って切開後、肉眼的に観察し、胃内部の写真撮影を行った。胃及び血清はその後 CE-MS を用いた内因性代謝物の濃度測定に供した。剖検時に撮影した写真から画像解析ソフトを用いて胃潰瘍面積を測定した。

本試験はアステラス製薬株式会社の動物実験倫理委員会によりプロトコールの承認をうけたのち、アステラス製薬の実験動物倫理指針に従って実施した。

第 3 章　各種胃潰瘍モデル

アスピリンは第 1 章と同じものを用いた。エタノールはナカライテスク株式会社から購入した。日本チャールスリバー株式会社から購入した CD(SD)系の雄性ラット 20 匹を試験に使用した。すべての動物を投与前日より 24 時間絶食した後、4 匹にアスピリンの 300 mg/kg を 0.5 w/v% MC 溶液に懸濁して投与した。他の 4 匹にはエタノールの 5 mL/kg を経口投与した。残りの 12 匹には 0.5 w/v% MC 溶液を経口投与し、うち 4 匹を低温室(室温 4-6℃)で飼育し、ストレス負荷による胃潰瘍を惹起した。残りの 8 匹は室温で飼育し、この試験の対照群とした。それぞれの投与後 5 時間にイソフルランを吸引させて麻酔を行い、血液を採取した後、放血安楽死させ、胃を摘出した。採取した血液は室温放置後遠心分離（4ºC、4600 x g で 10 分間）して血清を採取した。胃は大弯に沿って切開後、肉眼的に観察し、胃内部の写真撮影を行った。胃及び血清はその後 CE-MS を用いた内因性代謝物の濃度測定に供した。剖検時に撮影した写真から画像解析ソフトを用いて胃潰瘍面積を測定した。

本試験はアステラス製薬株式会社の動物実験倫理委員会によりプロトコールの承認をうけたのち、アステラス製薬の実験動物倫理指針に従って実施した。

胃潰瘍面積の測定

剖検時に撮影した写真から、第 1 章の試験では analySIS ソフトウェア（Soft Imaging System GmbH）を、第 2 章及び第 3 章の試験では WinROOF image analysis software (Mitani Corporation, Tokyo, Japan)を用いて胃潰瘍面積を測定した。

サンプルの前処理及び CE-MS の測定

サンプルの前処理及び測定はすべての試験において同様に行った。

サンプルの前処理、測定（胃）

採取した胃は細かく裁断した後 Methionine sulfone, 2-(n-morpholino)-ethanesulfonic acid (MES) および D-Camphol-10-sulfonic acid (CSA) を各 20 μM 添加したメタノール溶液 1 mL 中でホモジネートし、3000 x g で 10 分間遠心分離をして上清を得た。これにクロロホルム 500 μL 及び水 200 μL を加えて、4 ℃、4600 x g で 20 分間遠心分離し、水-メタノール層を採取した。限外ろ過フィルター（分画分子量 5000 Da）にとり 4 ℃、9100 x g で 12 時間遠心分離した。ろ液を遠心エバポレーターで蒸発・乾固し冷凍庫で保管した。測定直前に CE-MS の移動時間補正用の 3-Aminopyrrolidine 及び Trimesate を各 200 μM 添加した水溶液 50 μL で溶解し、CE-TOF-MS で測定した。

サンプルの前処理、測定（血清）

Methionine sulfone, MES および CSA を各 20 μM となるように調製したメタノール溶液 450 μL と血清 50 μL を撹拌し、クロロホルム 500 μL 及び水 200 μL を添加した。4 ℃、4600 x g で 8 分間遠心分離し後、水-メタノールを限外ろ過フィルター（分画分子量 5000 Da）にとり 4 ℃、9100 ×g で 3 時間遠心分離した。ろ液を遠心エバポレーターで蒸発・乾固させサンプルとした。測定直前に、CE-MS の移動時間補正用に 3-Aminopyrrolidine 及び Trimesate を各 200 μM 添加した水溶液 25 μL で溶解し、CE-TOF-MS で測定した。

測定機器

すべての CE-TOF-MS 測定はアジレント社の Agilent CE capillary electrophoresis system (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany), Agilent G3250AA LC/MSD TOFMS system (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA), Agilent1100 isocratic HPLC pump, Agilent G1603A CE-MS adapter kit 及び Agilent G1607A CE-Electro Spray Ionization (ESI)-MS sprayer kit を用いた。 システムコントロール及びデータ収集は Agilent G2201AA ChemStation software for CE 及び Analyst QS for TOF-MS を用いた。

陽イオン代謝物の測定

全ての測定は既報 [47] を参考に同条件で実施した。すなわち陽イオン性代謝物の測定はフューズドシリカキャピラリー(内径 50 μm、全長 1 m)を用いて行った。キャピラリー内を泳動液である 1 M ギ酸溶液で満たした後に、およそ 3 nL のサンプル溶液を 50 mbar で 3 秒間アプライし、その後キャピラリーの出口が陰極になるように両端に 30 kV の電圧を印加した。その他の試験条件は Table 12 に示した。

陰イオン代謝物の測定

全ての測定は既報 [23] を参考に同条件で実施した。すなわち COSMO(+)キャピラリー[48] (内径 50 μm、全長 1 m、ナカライテスク株式会社)に泳動液として pH8.5 の 50 mM 酢酸アンモニウム溶液で満たした。これにおよそ 30 nL のサンプル溶液を 50 mbar で 30 秒間加圧してアプライした。その後キャピラリーの出口が陽極になるように 30 kV の電圧を印加した。その他の試験条件は Table 12 に示した。

Table 12: 本研究で用いた測定条件

陽イオン性代謝物質測定		陰イオン性代謝物質測定	
・CE		**・CE**	
Capillary	: Fused-silica, i.d. 50μm×100 cm	Capillary	: COSMO(+), i.d.50μm×100cm
Buffer	: 1 M Formate	Buffer	: 50 mM Ammonium acetate, pH 8.5
Voltage	: Positive, 30 kV	Voltage	: Negative, 30 kV
Temperature	: 20 ℃	Temperature	: 20 ℃
Injection	: Pressure injection 50 mbar, 5 sec (approximately 5 nL)	Injection	: Pressure injection 50 mbar, 30 sec (approximately 30 nL)
Preconditioning	: 4 min at run buffer	Preconditioning	: 2 min at 50 mM Ammonium acetate, pH 3.4 and 5 min at run buffer
・TOFMS		**・TOFMS**	
Polarity	: Positive	Polarity	: Negative
Capillary voltage	: 4000 V	Capillary voltage	: 3500 V
Fragmentor	: 75 V	Fragmentor	: 100 V
Skimmer	: 50 V	Skimmer	: 50 V
OCT RFV	: 500 V	OCT RFV	: 200 V
Drying gas	: N_2, 10 L/min	Drying gas	: N2, 10 L/min
Drying gas temp.	: 300 ℃	Drying gas temp.	: 300 ℃
Nebulizer gas press.	: 7 psig	Nebulizer gas press.	: 10psig
Sheath liquid	: 50 % MeOH / Water containing 0.1μM Hexakis (2,2-difluoroethoxy) phosphazene	Sheath liquid	: 5 mM Ammonium acetate in 50 % MeOH / Water containing 0.1 M Hexakis(2,2-difluoroethoxy) phosphazene
Flow rate	: 10 μL / min	Flow rate	: 10 μL / min
Lock mass	:2MeOH^{13}Cisotope (*m/z* :66.063061), Hexakis(2,2-difluoroethoxy)phosphazene (*m/z* :622.028963)	Lock mass	:2CH3COOH13Cisotope (*m/z* :120.038339), Hexakis(2,2-difluoroethoxy)phosphazene+CH3COOH (*m/z* :680.035541)
		ESI needle	: Platinum

代謝物濃度の同定

各 20 μM の代謝物の標品が入った代謝物質標準液を作成し、各サンプルにおける内部標準物質と各代謝物ピークの面積比と代謝物質標準液のそれとの比を求めることでサンプル中の濃度を測定した。測定の最初に対応する代謝物質標準液を測定し、その後サンプルを測定した.

CE-TOFMS で検出されたピークは、自動積分ソフトウェアの MasterHands（慶應義塾大学開発）を用いて自動抽出し、ピーク情報として質量電荷比 (m/z)、泳動時間 (Migration time: MT)とピーク面積値を得た。

検出されたピークに対して m/z と MT の値をもとに代謝物質ライブラリに登録された全物質との照合、検索を行い、ピークの由来となった代謝物を同定した。検索のための許容誤差は MT については ± 0.5 min、m/z については ± 10ppm とした。血清中及び臓器中の濃度は内部標準検量法に従い、式(1)を用いて算出した。さらに臓器内濃度についてはサンプル用液 1 mL 中の mol 数を各サンプルの組織重量で割り、組織 1 g 当りの mol 数として算出した。（式(2)）.

$$懸濁液中の濃度 = \frac{サンプルのArea}{サンプルのISArea} \div \frac{STDのArea}{STDのISArea} \times STD濃度 \times \frac{サンプル中のIS濃度}{STDのIS濃度} \quad 式(1)$$

$$組織1g当りのmol数(nmol/g) = \left(懸濁液中の濃度(\mu M) \times \frac{1}{1000} L \right) \div 組織の重さ(g) \times 1000 \quad 式(2)$$

STD：代謝物質標準液、IS：内部標準物質

データの解析

第 1 章　NSAIDs 誘発胃潰瘍モデル

全てのデータを屠殺ポイントに分け、各々の屠殺ポイントについてすべての動物の臓器内及び血中代謝物濃度データについて PCA を行った。その後各々の屠殺ポイントについて O-PLS-DA を行いその S-plot で中心から離れた内因性代謝物について Dunnett の多重比較検定を行い、胃潰瘍が確認された動物群で有意に変化している代謝物を抽出した。尚、PCA 及び O-PLS-DA は各々の屠殺ポイント、代謝物毎に下記の式(3)を用いて標準化した後に行った。

$$標準化された濃度 = \frac{(臓器内もしくは血中濃度) - (各測定時点での平均)}{\sqrt{標準偏差}} \quad 式(3)$$

さらに同一代謝物の臓器内濃度と血中濃度が有意性を持って相関している事を確認するため、それぞれのマーカー候補についての各動物における臓器内濃度と血中濃度のPearson の積率相関係数を算出し、その有意性を確認してすべてを満たした化合物についてバイオマーカー候補とした。さらにマーカー候補の血中濃度はDunnettの多重比較検定を行い、胃潰瘍が確認された動物群で有意に変化している事を確認した。PCA 及びO-PLS-DA は SIMCA-P+ version 12.0 (Umetrics, AB, Umea, Sweden)を用いて行い、Dunnett の多重比較検定,Pearson の積率相関係数の算出及び優位性の確認は GraphPad Prism version 5.03 (GraphPad Software, SanDiego, CA, U.S.A)を用いて実施した。

第 2 章 オメプラゾール及びファモチジンがアスピリン誘発胃潰瘍モデルの代謝プロファイルに与える影響

全ての動物の臓器内及び血中代謝物濃度データについて第 1 章と同様に標準化した後PCA を行った。しかしながら PCA では病態に由来する差は見いだせなかったため、胃潰瘍の有無を教育セットとして標準化した値を用いてPLS-DAを行った。臓器内及び血中代謝物について PLS-DA を実施した結果得られたローディングプロットにおいて両社で共通して中心から離れたところにプロットされた内因性代謝物が無いかを確認した。これに加え、第 1 章で変化が確認された内因性代謝物についてその臓器内及び血中濃度を Dunnett の多重比較検定を行って胃潰瘍が確認された動物群で有意に変化しているか否かを確認した。PCA及び PLS-DA は SIMCA-P+ version 12.0(Umetrics)を用いて行い、Dunnett の多重比較検定は GraphPad Prism version 5.03 (GraphPad Software) を用いて実施した。

第 3 章 各種胃潰瘍モデルにおける代謝プロファイルの比較

全ての動物の臓器内及び血中代謝物濃度データについて第 1 章と同様に標準化した後PCA を行った。さらに、全ての臓器内代謝物について、各胃潰瘍モデルと対照群間でAspin-Welch の t-検定を行って 0.05%以上の有意性をもって変動した内因性代謝物を抽出した。抽出された内因性代謝物及び第1章で変化が確認された内因性代謝物についてその臓器内及び血中濃度を Dunnett の多重比較検定を行って胃潰瘍が確認された動物群で有意に変化しているか否かを確認した。PCA は SIMCA-P+ version 12.0(Umetrics)、Dunnettの多重比較検定は GraphPad Prism version 5.03 (GraphPad Software)、t-検定は Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, U.S.A) を用いて実施した。

参考文献

1. Devi DP, Sushma M, Guido S. Drug-induced upper gastrointestinal disorders requiring hospitalization: a five-year study in a South Indian hospital. Pharmacoepidemiol Drug Saf 2004;13:859-62.
2. Gabriel SE, Jaakkimainen L, Bombardier C. Risk for serious gastrointestinal complications related to use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. A meta-analysis. Ann Intern Med 1991;115:787-96.
3. Gabriel SE, Fehring RA. Trends in the utilization of non-steroidal anti-inflammatory drugs in the United States, 1986-1990. J Clin Epidemiol 1992;45:1041-4.
4. Steinmeyer J. Pharmacological basis for the therapy of pain and inflammation with nonsteroidal anti-inflammatory drugs. Arthritis Res 2000;2:379-85.
5. Ishihara T, Tanaka K, Tashiro S, Yoshida K, Mizushima T. Protective effect of rebamipide against celecoxib-induced gastric mucosal cell apoptosis. Biochem Pharmacol 2010;79:1622-33.
6. Hawkey CJ. Nonsteroidal anti-inflammatory drug gastropathy. Gastroenterology 2000;119:521-35.
7. Singh G. Recent considerations in nonsteroidal anti-inflammatory drug gastropathy. Am J Med 1998;105:31S-38S.
8. Takeda M, Takagi T, Yashima Y, Maeno H. Effect of a new potent H2-blocker, 3-[[[2-(diaminomethylene)amino]-4-thiazolyl]methyl]thio]-N2-sulfamoyl propionamidine (YM-11170), on gastric secretion, ulcer formation and weight of male accessory sex organs in rats. Arzneimittelforschung 1982;32:734-7.
9. Richardson P, Hawkey CJ, Stack WA. Proton pump inhibitors. Pharmacology and rationale for use in gastrointestinal disorders. Drugs 1998;56:307-35.
10. Yeomans ND, Tulassay Z, Juhasz L, Racz I, Howard JM, van Rensburg CJ, Swannell AJ, Hawkey CJ. A comparison of omeprazole with ranitidine for ulcers associated with nonsteroidal antiinflammatory drugs. Acid Suppression Trial: Ranitidine versus Omeprazole for NSAID-associated Ulcer Treatment (ASTRONAUT) Study Group. N Engl J Med 1998;338:719-26.
11. Mizokami Y. Efficacy and safety of rabeprazole in non-steroidal anti-inflammatory drug-induced ulcer in Japan. World J Gastroenterol 2009;15:5097-102.
12. Hirayama A, Kami K, Sugimoto M, Sugawara M, Toki N, Onozuka H, Kinoshita T,

Saito N, Ochiai A, Tomita M, Esumi H, Soga T. Quantitative metabolome profiling of colon and stomach cancer microenvironment by capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry. Cancer Res 2009;69:4918-25.

13. Soga T, Baran R, Suematsu M, Ueno Y, Ikeda S, Sakurakawa T, Kakazu Y, Ishikawa T, Robert M, Nishioka T, Tomita M. Differential metabolomics reveals ophthalmic acid as an oxidative stress biomarker indicating hepatic glutathione consumption. J Biol Chem 2006;281:16768-76.
14. Soga T, Sugimoto M, Honma M, Mori M, Igarashi K, Kashikura K, Ikeda S, Hirayama A, Yamamoto T, Yoshida H, Otsuka M, Tsuji S, Yatomi Y, Sakuragawa T, Watanabe H, Nihei K, Saito T, Kawata S, Suzuki H, Tomita M, Suematsu M. Serum metabolomics reveals gamma-glutamyl dipeptides as biomarkers for discrimination among different forms of liver disease. J Hepatol 2011;55:896-905.
15. Hirayama A, Nakashima E, Sugimoto M, Akiyama S, Sato W, Maruyama S, Matsuo S, Tomita M, Yuzawa Y, Soga T. Metabolic profiling reveals new serum biomarkers for differentiating diabetic nephropathy. Anal Bioanal Chem 2012;404:3101-9.
16. Fiehn O, Kopka J, Dormann P, Altmann T, Trethewey RN, Willmitzer L. Metabolite profiling for plant functional genomics. Nat Biotechnol 2000;18:1157-61.
17. Schauer N, Semel Y, Roessner U, Gur A, Balbo I, Carrari F, Pleban T, Perez-Melis A, Bruedigam C, Kopka J, Willmitzer L, Zamir D, Fernie AR. Comprehensive metabolic profiling and phenotyping of interspecific introgression lines for tomato improvement. Nat Biotechnol 2006;24:447-54.
18. Plumb R, Granger J, Stumpf C, Wilson ID, Evans JA, Lenz EM. Metabonomic analysis of mouse urine by liquid-chromatography-time of flight mass spectrometry (LC-TOFMS): detection of strain, diurnal and gender differences. Analyst 2003;128:819-23.
19. Soga T, Ohashi Y, Ueno Y, Naraoka H, Tomita M, Nishioka T. Quantitative metabolome analysis using capillary electrophoresis mass spectrometry. J Proteome Res 2003;2:488-94.
20. Monton MR, Soga T. Metabolome analysis by capillary electrophoresis-mass spectrometry. J Chromatogr A 2007;1168:237-46; discussion 236.
21. Nicholson JK, Connelly J, Lindon JC, Holmes E. Metabonomics: a platform for studying drug toxicity and gene function. Nat Rev Drug Discov 2002;1:153-61.
22. Ohashi Y, Hirayama A, Ishikawa T, Nakamura S, Shimizu K, Ueno Y, Tomita M, Soga T. Depiction of metabolome changes in histidine-starved Escherichia coli by

CE-TOFMS. Mol Biosyst 2008;4:135-47.

23. Soga T, Igarashi K, Ito C, Mizobuchi K, Zimmermann HP, Tomita M. Metabolomic profiling of anionic metabolites by capillary electrophoresis mass spectrometry. Anal Chem 2009;81:6165-74.
24. Takeuchi K, Ohishi M, Ota S, Suzumura K, Naraoka H, Ohata T, Seki J, Miyamae Y, Honma M, Soga T. Metabolic profiling to identify potential serum biomarkers for gastric ulceration induced by nonsteroid anti-inflammatory drugs. J Proteome Res 2013;12:1399-407.
25. Szewczyk A, Wojtczak L. Mitochondria as a pharmacological target. Pharmacol Rev 2002;54:101-27.
26. Petrescu I, Tarba C. Uncoupling effects of diclofenac and aspirin in the perfused liver and isolated hepatic mitochondria of rat. Biochim Biophys Acta 1997;1318:385-94.
27. Moreno-Sanchez R, Bravo C, Vasquez C, Ayala G, Silveira LH, Martinez-Lavin M. Inhibition and uncoupling of oxidative phosphorylation by nonsteroidal anti-inflammatory drugs: study in mitochondria, submitochondrial particles, cells, and whole heart. Biochem Pharmacol 1999;57:743-52.
28. Mingatto FE, Santos AC, Uyemura SA, Jordani MC, Curti C. In vitro interaction of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on oxidative phosphorylation of rat kidney mitochondria: respiration and ATP synthesis. Arch Biochem Biophys 1996;334:303-8.
29. Masubuchi Y, Yamada S, Horie T. Diphenylamine as an important structure of nonsteroidal anti-inflammatory drugs to uncouple mitochondrial oxidative phosphorylation. Biochem Pharmacol 1999;58:861-5.
30. Mahmud T, Rafi SS, Scott DL, Wrigglesworth JM, Bjarnason I. Nonsteroidal antiinflammatory drugs and uncoupling of mitochondrial oxidative phosphorylation. Arthritis Rheum 1996;39:1998-2003.
31. Tomoda T, Kurashige T, Hayashi Y, Enzan H. Primary changes in liver damage by aspirin in rats. Acta Paediatr Jpn 1998;40:593-6.
32. Somasundaram S, Rafi S, Hayllar J, Sigthorsson G, Jacob M, Price AB, Macpherson A, Mahmod T, Scott D, Wrigglesworth JM, Bjarnason I. Mitochondrial damage: a possible mechanism of the "topical" phase of NSAID induced injury to the rat intestine. Gut 1997;41:344-53.
33. Hasebe T, Harasawa S, Miwa T, Shibata T, Inayama S. Collagen and collagenase in ulcer tissue--1. The healing process of acetic acid ulcers in rats. Tokai J Exp Clin Med 1987;12:147-58.

34. Takeuchi K, Ohishi M, Endo K, Suzumura K, Naraoka H, Ohata T, Seki J, Miyamae Y, Honma M, Soga T. Metabolomic Analysis of the Effects of Omeprazole and Famotidine on Aspirin-induced Gastric Injury. Metabolomics 2014;10:995-1004.
35. Um SY, Park JH, Chung MW, Kim KB, Kim SH, Choi KH, Lee HJ. Nuclear magnetic resonance-based metabolomics for prediction of gastric damage induced by indomethacin in rats. Anal Chim Acta 2012;722:87-94.
36. Glavin GB, Szabo S. Experimental gastric mucosal injury: laboratory models reveal mechanisms of pathogenesis and new therapeutic strategies. FASEB J 1992;6:825-31.
37. Amaral GP, de Carvalho NR, Barcelos RP, Dobrachinski F, Portella RdL, da Silva MH, Lugokenski TH, Dias GRM, da Luz SCA, Boligon AA, Athayde ML, Villetti MA, Antunes Soares FA, Fachinetto R. Protective action of ethanolic extract of Rosmarinus officinalis L. in gastric ulcer prevention induced by ethanol in rats. Food and Chemical Toxicology 2013;55:48-55.
38. Chandranath SI, Bastaki SM, D'Souza A, Adem A, Singh J. Attenuation of stress-induced gastric lesions by lansoprazole, PD-136450 and ranitidine in rats. Mol Cell Biochem 2011;349:205-12.
39. Takeuchi K, Ohishi M, Endo K, Suzumura K, Naraoka H, Ohata T, Seki J, Miyamae Y, Honma M, Soga T. Hydroxyproline, a Serum Biomarker Candidate for Gastric Ulcer in Rats: A Comparison Study of Metabolic Analysis of Gastric Ulcer Models Induced by Ethanol, Stress, and Aspirin. Biomarker Insights 2014;9:61-66.
40. Hasebe T. Collagen and collagenase in ulcer tissue--2. Restraint and water immersion induced gastric lesions and effects of cimetidine and misoprostol. Tokai J Exp Clin Med 1987;12:181-90.
41. Swarnakar S, Mishra A, Ganguly K, Sharma AV. Matrix metalloproteinase-9 activity and expression is reduced by melatonin during prevention of ethanol-induced gastric ulcer in mice. J Pineal Res 2007;43:56-64.
42. Pradeepkumar Singh L, Vivek Sharma A, Swarnakar S. Upregulation of collagenase-1 and -3 in indomethacin-induced gastric ulcer in diabetic rats: role of melatonin. J Pineal Res 2011;51:61-74.
43. Hasegawa C, Ihara T, Sugamata M. Ultrastructural evaluation of apoptosis induced by Helicobacter pylori infection in human gastric mucosa: novel remarks on lamina propria mucosae. Med Electron Microsc 2000;33:82-8.
44. Raza M, Al-Shabanah OA. Simultaneous determination of different polyamines and their mono-acetylated derivatives in gastric tissue by HPLC with post-column

derivatization. Sci Pharm 2010;78:249-58.

45. Motawi TK, Abd Elgawad HM, Shahin NN. Modulation of indomethacin-induced gastric injury by spermine and taurine in rats. J Biochem Mol Toxicol 2007;21:280-8.

46. Weiss TS, Herfarth H, Obermeier F, Ouart J, Vogl D, Scholmerich J, Jauch KW, Rogler G. Intracellular polyamine levels of intestinal epithelial cells in inflammatory bowel disease. Inflamm Bowel Dis 2004;10:529-35.

47. Soga T, Heiger DN. Amino acid analysis by capillary electrophoresis electrospray ionization mass spectrometry. Anal Chem 2000;72:1236-41.

48. Katayama H, Ishihama Y, Asakawa N. Stable cationic capillary coating with successive multiple ionic polymer layers for capillary electrophoresis. Anal Chem 1998;70:5272-7.

Supplemental Table

Supplemental Table 1: 各検討においてその濃度を決定した代謝物

Metabolites	Chapter 1		Chapter 2		Chapter 3	
	Serum	Stomach	Serum	Stomach	Serum	Stomach
Number of metabolites observed in this study	**581**	**580**	**515**	**577**	**577**	**576**
(Methylthio)acetate	○	○	○	○	○	○
1,3-Diaminopropane	○	○	○	○	○	○
1,3-Phenylenediamine	○	○		○	○	○
10-Hydroxydecanoate	○	○	○	○	○	○
1-Amino-1-cyclopentanecarboxylate	○	○	○	○	○	○
1-Aminocyclopropane-1-carboxylate	○	○	○	○	○	○
1-Aminoethylphosphonate	○	○	○	○	○	○
1-Methyl-2-pyrrolidinone	○	○	○	○	○	○
1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine	○	○		○	○	○
1-Methyladenosine	○	○	○	○	○	○
1-Methylhistamine	○	○	○	○	○	○
1-Methylnicotinamide	○	○	○	○	○	○
2',3'-cCMP (cyclic cytidine monophosphate)	○	○	○	○	○	○
2,3-Diaminopropionate	○	○	○	○	○	○
2,3-DPG (Disphospho glycerate)	○	○	○	○	○	○
2,3-Pyridinedicarboxylate	○	○	○	○	○	○
2,4-Diaminobutyrate	○	○	○	○	○	○
2,4-Dichlorophenoxyacetate	○	○		○	○	○
2,4-Dihydroxypyrimidine-5-carboxylate	○	○	○	○	○	○
2,4-Dimethylaniline	○	○	○	○	○	○
2,5-Dihydroxybenzoate	○	○	○	○	○	○
2,6-Diethylaniline	○	○		○	○	○
2-Aminobutyrate	○	○	○	○	○	○
2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol	○	○		○	○	○
2-Amino-2-methyl-1,3-propanediol	○	○		○	○	○
2-Amino-3-phosphonopropionate	○	○	○	○	○	○

2-Aminobenzimidazole	○	○	○	○	○	○
2-Aminoethylphosphonate	○	○	○	○	○	○
2-Aminophenol	○	○	○	○	○	○
2-Carboxybenzaldehyde	○	○		○	○	○
2-Cyanopyridine	○	○		○	○	○
2'-Deoxycytidine	○	○	○	○	○	○
2-Deoxyglucose 6-phosphate	○	○	○	○	○	○
2'-Deoxyguanosine	○	○	○	○	○	○
2'-Deoxyinosine			○			
2-Deoxyribose 1-phosphate	○	○	○	○	○	○
2-Deoxystreptamine	○	○	○	○	○	○
2-Fluorobenzoate	○	○		○	○	○
2-Furoate	○	○	○	○	○	○
2-Guanidinobenzimidazole	○	○	○	○	○	○
2-Hydroxy-4-methylpentanoate		○	○	○	○	○
2-Hydroxybutyrate		○	○	○	○	○
2-Hydroxyglutarate			○	○	○	○
2-Hydroxyisobutyrate	○	○	○	○	○	○
2-Hydroxyoctanoate	○	○	○	○	○	○
2-Hydroxypentanoate	○	○	○	○	○	○
2-Hydroxyphenylacetate			○			
2-Hydroxypyridine	○	○		○	○	○
2-Isopropylmalate	○	○	○	○	○	○
2-Oxoadipate	○	○	○	○	○	○
2-Oxobutyrate	○	○	○	○	○	○
2-Oxoglutarate	○	○	○	○	○	○
2-Oxoisopentanoate	○	○	○	○	○	○
2-Oxooctanoate	○	○	○	○	○	○
2PG (2-phosphoglycerate)			○	○	○	○
2-Quinolinecarboxylate	○	○	○	○	○	○
2-Thiopheneacetate	○	○	○	○	○	○
3-(2-Hydroxyphenyl)propionate	○	○	○	○	○	○
3-(4-Hydroxyphenyl)propionate	○	○	○	○	○	○
3,3',5-Triiodothyronine	○	○				
3,3',5-Triiodothyronine			○	○	○	○
3',5'-Cyclic dAMP	○	○	○	○	○	○
3,5-Diiodo-tyrosine	○	○				
3,5-Diiodo-tyrosine			○	○	○	○

3-Acetylacrylate	○	○	○	○	○	○
3-Amino-1,2,4-triazole	○	○		○	○	○
3-Aminoisobutyrate			○			
3-Aminopropane-1,2-diol	○	○	○	○	○	○
3-Aminopropionitrile	○	○	○	○	○	○
3'-AMP (Adenosine monophosphate)	○	○	○	○	○	○
3-Chloroalanine	○	○	○	○	○	○
3-Hydroxy-3-methylglutarate	○	○	○	○	○	○
3-Hydroxyanthranilate	○	○	○	○	○	○
3-Hydroxybutyrate	○	○	○	○	○	○
3-Hydroxykynurenine	○	○	○	○	○	○
3-Hydroxypropionate	○	○	○	○	○	○
3-Indolebutyrate	○	○	○	○	○	○
3-Indoxyl sulfate	○	○	○	○	○	○
3-Iodotyrosine	○	○	○	○	○	○
3-Methoxytyramine			○			
3-Methyladenine	○	○	○	○	○	○
3-Methylbutanoate			○		○	
3-Methylguanine	○	○	○	○	○	○
3-Methylhistidine	○	○	○	○	○	○
3PG (3-phosphoglycerate)	○	○	○	○	○	○
3-Phenyllactate	○	○	○	○	○	○
3-Phenylpropionate	○	○	○	○	○	○
3-Ureidopropionate	○	○	○	○	○	○
4-(beta-Acetylaminoethyl)imidazole	○	○	○	○	○	○
4,4'-Methylene bis(o-chloroaniline)	○	○		○	○	○
4-Acetylbutyrate	○	○	○	○	○	○
4-Amino-3-hydroxybutyrate	○	○	○	○	○	○
4-Aminoindole	○	○		○	○	○
4-Aminophenylsulfone	○	○		○	○	○
4-Aminosalicylate	○	○	○	○	○	○
4-Hydroxy-3-methoxybenzoate	○	○	○			
4-Hydroxy-3-methoxymandelate	○	○	○	○	○	○
4-Hydroxymandelate	○	○	○	○	○	○
4-Hydroxymethylimidazole	○	○	○	○	○	○
4-Methyl-2-oxopentanoate	○	○	○	○	○	○
4-Methyl-5-thiazoleethanol	○	○	○	○	○	○
4-Methylbenzoate	○	○		○	○	○

4-Methylpyrazole	○	○		○	○	○
4-Methylthio-2-oxobutyrate	○	○	○	○	○	○
4-Nitrophenyl phosphate	○	○		○	○	○
4-Oxohexanoate	○	○	○	○	○	○
4-Oxopentanoate	○	○	○	○	○	○
4-Pyridoxate	○	○	○	○	○	○
4-Sulfobenzoate	○	○		○	○	○
5,6-Dimethylbenzimidazole	○	○	○	○	○	○
5-Aminoimidazole- 4-carboxamide ribotide	○	○	○	○	○	○
5-Aminoindole	○	○		○	○	○
5-Aminolevulinate	○	○	○	○	○	○
5-Aminovalerate	○	○	○	○	○	○
5'-Deoxyadenosine	○	○	○	○	○	○
5-Hydroxy-3-indoleacetate	○	○	○	○	○	○
5-Hydroxylysine	○	○	○	○	○	○
5-Hydroxytryptophan	○	○	○	○	○	○
5-Methoxy-3-indoleaceate	○	○				
5-Methoxy-N,N-dimethyltryptamine	○	○	○	○	○	○
5-Methoxytryptamine	○	○	○	○	○	○
5-Methyl-2'-deoxycytidine	○	○	○	○	○	○
5-Methylcytosine	○	○	○	○	○	○
5-Methyltetrahydrofolate	○	○	○	○	○	○
5-Methylthioadenosine	○	○	○	○	○	○
5-Oxoproline	○	○	○	○	○	○
6,8-Thioctate	○	○		○	○	○
6-Aminohexanoate	○	○	○	○	○	○
6-Aminopenicillanate	○	○		○	○	○
6-Hydroxyhexanoate	○	○	○	○	○	○
6-Hydroxynicotinate	○	○	○	○	○	○
6-Mercaptopurine	○	○		○	○	○
6-Methylaminopurine	○	○	○	○	○	○
6-Phosphogluconate	○	○	○	○	○	○
7,8-Dihydrobiopterin	○	○	○	○	○	○
7,8-Dihydroneopterin	○	○	○	○	○	○
7-Methylguanine	○	○	○	○	○	○
8-Anilino-1-naphthalene sulfonate	○	○		○	○	○
Acetanilide	○	○		○	○	○

Acetohydroxamate	○	○		○	○	○
Acetyl coenzyme A	○	○	○	○	○	○
Acetylcholine	○	○	○	○	○	○
acetylsalicylic acid	○	○				
Adenine	○	○	○	○	○	○
Adenosine	○	○	○	○	○	○
Adenosine 3',5'-diphosphate	○	○	○	○	○	○
Adenosine 5'-phosphosulfate	○	○	○	○	○	○
Adenylosuccinate	○	○	○	○	○	○
Adipate	○	○	○	○	○	○
ADMA (N,N-Dimethylarginine)			○			
ADP (Adenosine diphosphate)	○	○	○	○	○	○
ADP-glucose	○	○	○	○	○	○
ADP-ribose	○	○	○	○	○	○
Agmatine	○	○	○	○	○	○
Alanine	○	○	○	○	○	○
Ala-Ala	○	○	○	○	○	○
Albendazole	○	○		○	○	○
a-Lipoamide	○	○				
Allantoate	○	○	○	○	○	○
Allantoin	○	○	○	○	○	○
Alliin	○	○	○	○	○	○
Allocryptopine	○	○		○	○	○
alpha-Aminoadipate	○	○	○	○	○	○
alpha-Lipoamide, 5-Methoxyindoleacetate			○	○	○	○
alpha-Methylbenzylamine	○	○	○	○	○	○
Alpha-Methylserine	○	○	○	○	○	○
Amantadine	○	○	○	○	○	○
AMP (Adenosine monophosphate)	○	○	○	○	○	○
Aniline	○	○	○	○	○	○
Anserine	○	○	○	○	○	○
Anthranilate	○	○	○	○	○	○
Arginine	○	○	○	○	○	○
Arginine ethyl ester	○	○	○	○	○	○
Argininosuccinate	○	○	○	○	○	○
Asparagine	○	○	○	○	○	○
Aspartate	○	○	○	○	○	○

ATP (Adenosine triphosphate)	○	○	○	○	○	○
Atropine	○	○		○	○	○
Azelate	○	○	○	○	○	○
Azetidine-2-carboxylate	○	○		○	○	○
Barbiturate	○	○	○	○	○	○
Benzamide	○	○	○	○	○	○
Benzamidine	○	○	○	○	○	○
Benzimidazole	○	○	○	○	○	○
Benzoate	○	○	○	○	○	○
Benzoylformate	○	○	○	○	○	○
Benzylsuccinate	○	○	○	○	○	○
beta- Alanine	○	○	○	○	○	○
beta-Ala-Lys	○	○	○	○	○	○
beta-Cyanoalanine	○	○	○	○	○	○
beta-Imidazolelactate	○	○	○	○	○	○
Betaine	○	○	○	○	○	○
Betaine aldehyde			○			
beta-Leucine	○	○	○	○	○	○
Betonicine	○	○	○	○	○	○
Biotin	○	○	○	○	○	○
Bis(3-aminopropyl)amine	○	○	○	○	○	○
Bis(p-nitrophenyl)phosphate	○	○		○	○	○
Butanoate	○	○	○	○	○	○
Cadaverine	○	○	○	○	○	○
cAMP	○	○	○	○	○	○
Canavanine	○	○	○	○	○	○
Carbachol	○	○		○	○	○
Carbamoylaspartate	○	○	○	○	○	○
Carbamoylphosphate	○	○	○	○	○	○
Carnitine	○	○	○	○	○	○
Carnosine	○	○	○	○	○	○
Castanospermine	○	○	○	○	○	○
CDP (Cytidine diphosphate)	○	○	○	○	○	○
CDP-choline	○	○	○	○	○	○
cGMP (cyclic guanosine monophosphate)	○	○	○	○	○	○
Chelidonate	○	○		○	○	○
Chloramphenicol	○	○		○	○	○

Cholate	○	○	○	○	○	○
Choline	○	○	○	○	○	○
cIMP (cyclic inosine monophosphate)	○	○	○	○	○	○
cis,cis-Muconate	○	○		○	○	○
cis-Aconitate	○	○	○	○	○	○
Citraconate	○	○	○	○	○	○
Citramalate	○	○	○	○	○	○
Citrate	○	○	○	○	○	○
Citrulline	○	○	○	○	○	○
CMP (Cytidine monophosphate)	○	○	○	○	○	○
CMP-N-acetylneuraminate	○	○	○	○	○	○
CoA (Coenzyme A)	○	○	○	○	○	○
Creatine	○	○	○	○	○	○
Creatinine	○	○	○	○	○	○
Crotonate	○	○	○	○	○	○
CTP (Cytidine triphosphate)	○	○	○	○	○	○
Cumate	○	○		○	○	○
Cyclohexanecarboxylate	○	○		○	○	○
Cyclohexylamine	○	○	○	○	○	○
Cysteine	○	○	○	○	○	○
Cys-Gly	○	○	○	○	○	○
Cystathionine	○	○	○	○	○	○
Cysteamine	○	○	○	○	○	○
Cysteate	○	○	○	○	○	○
Cysteine S-sulfate	○	○	○	○	○	○
Cysteine sulfinate	○	○	○	○	○	○
Cysteine-glutathione disulphide	○	○	○	○	○	○
Cystine	○	○	○	○	○	○
Cytidine	○	○	○	○	○	○
Cytosine	○	○	○	○	○	○
dADP (Deoxyadenosine diphosphate)	○	○	○	○	○	○
dAMP (Deoxyadenosine monophosphate)	○	○	○	○	○	○
dATP (Deoxyadenosine triphosphate)	○	○	○	○	○	○
Daunorubicin	○	○		○	○	○
dCDP (Deoxycytidine diphosphate)	○	○	○	○	○	○

dCMP (Deoxycytidine monophosphate)	○	○	○	○	○	○
dCTP (Deoxycytidine triphosphate)	○	○	○	○	○	○
Deamido-NAD+	○	○	○	○	○	○
Decanoate	○	○	○	○	○	○
Deisopropylatrazine	○	○		○	○	○
Desethylatrazine	○	○		○	○	○
Desthiobiotin	○	○	○	○	○	○
dGTP (Deoxyguanosine triphosphate)	○	○	○	○	○	○
DHAP (Dihydroxyacetone phosphate)	○	○	○	○	○	○
Diclofenac	○	○		○	○	○
Diethanolamine	○	○	○	○	○	○
Digalacturonate	○	○	○	○	○	○
Dihydroorotate	○	○	○	○	○	○
Dihydrouracil	○	○	○	○	○	○
Diphenylamine	○	○	○	○	○	○
Disulfiram	○	○		○	○	○
dITP (Deoxyinosine triphosphate)	○	○	○	○	○	○
Dodecanedioate	○	○	○	○	○	○
Dodecanoate	○	○	○	○	○	○
DOPA (Dihydroxy-L-phenylalanine)	○	○	○	○	○	○
Dopamine	○	○	○	○	○	○
dTDP (Deoxythymidine diphosphate)	○	○	○	○	○	○
dTMP (Deoxythymidine monophosphate)	○	○	○	○	○	○
dTTP (Deoxythymidine triphosphate)	○	○	○	○	○	○
dUDP (Deoxyuridine diphosphate)	○	○	○	○	○	○
dUMP (Deoxyuridine monophosphate)	○	○	○	○	○	○
dUTP (Deoxyuridine triphosphate)	○	○	○	○	○	○
E4P (Erythrose 4-phosphate)	○	○	○	○	○	○
Ectoine	○	○	○	○	○	○
Eflornithine	○	○		○	○	○
Epinephrine	○	○	○	○	○	○
Ethanolamine phosphate	○	○	○	○	○	○
Etidronate	○	○		○	○	○
F1,6P (Fructose 1,6-diphosphate)	○	○	○	○	○	○
F6P (Fructose 6-monophosphate)	○		○	○	○	○
FAD (Flavin adenine dinucleotide)	○	○	○	○	○	○

Folate	○	○	○	○	○	○
Fumarate	○	○	○	○	○	○
G1P (Glucose 1-phosphate)	○	○	○	○	○	○
G3P (Glucose 3-phosphate)			○	○	○	○
G6P (Glucose 6-phosphate)	○	○	○	○	○	○
GABA (gamma-aminobutyric acid)	○	○	○	○	○	○
Galacturonate 1-phosphate	○	○	○	○	○	○
gamma-Butyrobetaine	○	○	○	○	○	○
gamma-Glu-2-aminobutyrate	○	○	○	○	○	○
gamma-Glu-cys	○	○	○	○	○	○
gamma-Guanidinobutyrate	○	○	○	○	○	○
GDP (Guanosine diphosphate)	○	○	○	○	○	○
GDP-mannose	○	○	○	○	○	○
Gibberellate	○	○		○	○	○
Glutamine	○	○	○	○	○	○
Glutamate	○	○	○	○	○	○
Gluconate	○	○	○	○	○	○
Glucosaminate	○	○	○	○	○	○
Glucosamine	○	○	○	○	○	○
Glucosamine 6-phosphate	○	○	○	○	○	○
Glucuronate	○	○	○	○	○	○
Glu-Glu	○	○	○	○	○	○
Glutarate	○	○	○	○	○	○
Glutaryl CoA	○	○				
Glutathione(ox)	○	○	○	○	○	○
Glutathione(red)	○	○	○	○	○	○
Glycine	○	○	○	○	○	○
Glycerate	○	○	○	○	○	○
Glycerophosphate	○	○	○	○	○	○
Glycerophosphorylcholine	○	○	○	○	○	○
Glycocholate	○	○	○	○	○	○
Glycolate	○	○	○	○	○	○
Gly-Gly	○	○	○	○	○	○
Gly-Leu	○	○	○	○	○	○
Glyoxylate	○	○	○	○	○	○
GMP (Guanosine monophosphate)	○	○	○	○	○	○
Gramine	○	○	○	○	○	○
GTP (Guanosine triphosphate)	○	○	○	○	○	○

Guanidinoacetate	○	○	○	○	○	○
Guanidinosuccinate	○	○	○	○	○	○
Guanine	○	○	○	○	○	○
Guanosine	○	○	○	○	○	○
Harman	○	○	○	○	○	○
Heptanoate	○	○	○	○	○	○
Hexamine	○	○		○	○	○
Hexanoate	○	○	○	○	○	○
Hexylamine	○	○	○	○	○	○
Hippurate	○	○	○	○	○	○
Histidine	○	○	○	○	○	○
Histamine	○	○	○	○	○	○
Histidinol	○	○	○	○	○	○
Homocarnosine	○	○	○	○	○	○
Homocysteine	○	○	○	○	○	○
Homocystine	○	○	○	○	○	○
Homoserine	○	○	○	○	○	○
Homovanillate	○	○	○	○	○	○
Hydroxyatrazine	○	○		○	○	○
hydroxyproline	○	○	○	○	○	○
Hydroxyurea	○	○	○	○	○	○
Hypotaurine	○	○	○	○	○	○
Hypoxanthine	○	○	○	○	○	○
Ibotenate	○	○	○	○	○	○
Ibuprofen	○	○		○	○	○
IDP (Inosine diphosphate)	○	○	○	○	○	○
Isoleucine	○	○	○	○	○	○
Imidazole-4-acetate	○	○	○	○	○	○
IMP (Inosine monophosphate)	○	○	○	○	○	○
Indole-3-acetaldehyde	○	○	○	○	○	○
Indole-3-acetamide	○	○	○	○	○	○
Indole-3-acetate	○	○	○	○	○	○
Indole-3-ethanol	○	○	○	○	○	○
Inosine	○	○	○	○	○	○
Isatin	○	○		○	○	○
Isethionate	○	○	○	○	○	○
Isoamylamine	○	○	○	○	○	○
Isobutylamine	○	○	○	○	○	○

Isobutyryl CoA	○	○	○	○	○	○
Isocitrate	○	○	○	○	○	○
Isoniazid	○	○		○	○	○
Isonicotinamide	○	○	○	○	○	○
Isopropanolamine	○	○	○	○	○	○
Isoquinoline	○	○		○	○	○
Itaconate	○	○	○	○	○	○
ITP (Inosine triphosphate)	○	○	○	○	○	○
Ketoprofen	○	○		○	○	○
Kynurenine	○	○	○	○	○	○
Lactate	○	○	○	○	○	○
Lauroyl CoA	○	○				
Leucine	○		○	○	○	○
Leu-Leu-Tyr	○	○	○	○	○	○
Leupeptin	○	○		○	○	○
Lysine	○	○	○	○	○	○
Lysinamide	○	○	○	○	○	○
Malate	○	○	○	○	○	○
Malonate	○	○	○	○	○	○
Malonyl CoA	○	○	○	○	○	○
Mandelate	○	○		○	○	○
Mannosamine	○	○	○	○	○	○
Melamine	○	○	○	○	○	○
Melatonin	○	○	○	○	○	○
Methionine	○	○	○	○	○	○
Metformin	○	○	○	○	○	○
Methanesulfonate	○	○	○	○	○	○
Methionine sulfoxide	○	○	○	○	○	○
Methionine sulfoximine	○	○	○	○	○	○
Methyl sulfate	○	○	○	○	○	○
Methylguanidine	○		○	○	○	○
Methylmalonyl CoA	○	○	○	○	○	○
m-Hydroxybenzoate	○	○	○	○	○	○
Mucate	○	○	○	○	○	○
Muramate	○	○	○	○	○	○
Muscimol	○	○	○	○	○	○
N,N-Dimethylglycine	○	○	○	○	○	○
N1-Acetylspermidine			○			

N1-Acetylspermine	○	○	○	○	○	○
N6,N6,N6-Trimethyllysine	○	○	○	○	○	○
N6-Methyl-2'-deoxyadenosine	○	○	○	○	○	○
N8-Acetylspermidine	○	○	○	○	○	○
N-Acetylaspartate	○	○	○	○	○	○
N-Acetyl-beta-alanine	○	○	○	○	○	○
N-Acetylglucosamine	○	○	○	○	○	○
N-Acetylglucosamine 1-phosphate	○	○	○	○	○	○
N-Acetylglucosamine 6-phosphate	○	○	○	○	○	○
N-Acetylglucosylamine	○	○	○	○	○	○
N-Acetylglutamate	○	○	○	○	○	○
N-Acetylhistidine	○	○	○	○	○	○
N-Acetylleucine	○	○	○	○	○	○
N-Acetylmethionine	○	○	○	○	○	○
N-Acetylmuramate	○	○	○	○	○	○
N-Acetylneuraminate	○	○	○	○	○	○
N-Acetylornithine	○	○	○	○	○	○
N-Acetylphenylalanine	○	○	○	○	○	○
N-Acetylputrescine	○	○	○	○	○	○
N-Acetylvaline	○	○	○	○	○	○
NAD (Nicotinamide adenine dinucleotide)	○	○	○	○	○	○
NADH (Reduced nicotinamide adenine dinucleotide)	○	○	○	○	○	○
NADP (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)	○	○	○	○	○	○
NADPH (Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)	○	○	○	○	○	○
N-alpha,N-alpha-Dimethylhistidine	○	○	○	○	○	○
N-alpha-Benzenolarginine ethylester	○	○	○	○	○	○
N-alpha-t-Boc-asparagine	○	○		○	○	○
N-Benzyloxycarbonylglycine	○	○		○	○	○
n-Butyl a-Picolinate	○	○	○	○	○	○
N-Carbamylglutamate	○	○	○	○	○	○
N-epsilon-Acetyllysine	○	○	○	○	○	○
N-Formylaspartate	○	○	○	○	○	○
N-Formylmethionine	○	○	○	○	○	○
N-gamma-Ethylglutamine	○	○	○	○	○	○

Nicotinamide	○	○	○	○	○	○
Nicotinamide hypoxanthine dinucleotide+	○	○		○	○	○
Nicotinate	○	○	○	○	○	○
Nicotine	○	○	○	○	○	○
N-Methylalanine	○	○	○	○	○	○
N-Methylaniline	○	○	○	○	○	○
N-Methylanthranilate	○	○		○	○	○
N-Methylglutamate	○	○	○	○	○	○
N-omega-Methyltryptamine	○	○	○	○	○	○
Noradrenaline	○	○	○	○	○	○
Nornicotine	○	○	○	○	○	○
n-Propionyl CoA	○	○				
o-Acetylcarnitine	○	○	○	○	○	○
O-Acetylserine	○	○	○	○	○	○
o-Coumarate			○	○	○	○
Octanoate	○	○	○	○	○	○
Octopine	○	○	○	○	○	○
Octylamine	○	○	○	○	○	○
o-Hydroxybenzoate			○	○	○	○
o-Hydroxyhippurate	○	○	○	○	○	○
o-Phenanthroline	○	○		○	○	○
O-Phosphoserine	○	○	○	○	○	○
Ophthalmate	○	○	○	○	○	○
Ornithine	○	○	○	○	○	○
Orotate	○	○	○	○	○	○
Orotidine 5'-monophosphate	○	○	○	○	○	○
o-Succinylhomoserine	○	○	○	○	○	○
Oxamate	○	○		○	○	○
P1, P4 - Di(adenosine-5') tetraphosphate	○	○	○	○	○	○
p-Aminobenzoate	○	○	○	○	○	○
Pantothenate	○	○	○	○	○	○
Pargyline	○	○		○	○	○
p-Coumarate	○	○	○	○	○	○
Pelargonate	○	○	○	○	○	○
Pentanoate, 3-Methylbutanoate	○	○	○	○	○	○
PEP (Phosphoenolpyruvate)	○	○	○	○	○	○

Phenylalanine	○	○	○	○	○	○
Phenaceturate	○	○	○	○	○	○
Phenethylamine	○	○	○	○	○	○
Phenoxyacetate	○	○		○		
Phenyl phosphate	○	○	○	○	○	○
Phenylethanolamine	○	○	○	○	○	○
Phenylhydrazine	○	○		○	○	○
Phenylpyruvate	○	○	○	○	○	○
Phe-Phe			○			
Phosphonoacetate	○	○	○	○	○	○
Phosphoramidon	○	○		○	○	○
Phosphorylcholine	○	○	○	○	○	○
Phthalate	○	○	○	○	○	○
p-hydroxybenzoate			○	○	○	○
p-Hydroxyphenylacetate	○	○	○	○	○	○
p-Hydroxyphenylpyruvate	○	○				
Phytate	○	○	○	○	○	○
Picolinamide	○	○	○	○	○	○
Pimelate	○	○	○	○	○	○
Pipecolate	○	○	○	○	○	○
Piperazine	○	○		○	○	○
Piperidine	○	○		○	○	○
Piroxicam	○	○		○	○	○
Porphobilinogen	○	○	○	○	○	○
ppGpp (Guanosine pentaphosphate)	○	○				
Proline	○	○	○	○	○	○
Propionate	○	○	○	○	○	○
Prostaglandin E2	○	○	○	○	○	○
Prostaglandin F2alpha	○	○	○	○	○	○
PRPP	○	○	○	○	○	○
Pseudopelletierine	○	○	○	○	○	○
Pterin	○	○	○	○	○	○
Purine	○	○	○	○	○	○
Purine riboside	○	○	○	○	○	○
Putrescine(1,4-Butanediamine)	○	○	○	○	○	○
Pyrazinamide	○	○		○	○	○
Pyrazole	○	○	○	○	○	○
Pyridine	○	○		○	○	○

Pyridoxal	○	○	○	○	○	○
Pyridoxamine	○	○	○	○	○	○
Pyridoxamine 5'-phosphate	○	○	○	○	○	○
Pyridoxine	○	○	○	○	○	○
Pyrrole-2-carboxylate	○	○	○	○	○	○
Pyruvate	○	○	○	○	○	○
Quinate	○	○	○	○	○	○
Quinoline	○	○		○	○	○
Quisqualate	○	○		○	○	○
R5P (Ribose 5-phosphate**)**	○	○	○	○	○	○
Riboflavin	○	○	○	○	○	○
Ribulose 1,5-diphosphate	○	○	○	○	○	○
Ru5P (Ribulose-5-phosphate)	○	○	○	○	○	○
S7P (Sedoheptulose 7-phosphate)	○	○	○	○	○	○
Saccharate	○	○	○	○	○	○
Saccharopine			○			
S-Adenosylhomocysteine	○	○	○	○	○	○
S-Adenosylmethionine	○	○	○	○	○	○
Salicylic acid	○	○				
Sarcosine	○	○	○	○	○	○
S-Carboxymethylcysteine	○	○		○	○	○
Scopolamine	○	○		○	○	○
SDMA			○			
Sebacate	○	○	○	○	○	○
Semicarbazide	○	○		○	○	○
Sepiapterin	○	○	○	○	○	○
Ser	○	○	○	○	○	○
Serine O-sulfate	○	○	○	○	○	○
Serotonin	○	○	○	○	○	○
Shikimate	○	○	○	○	○	○
Sinapate	○	○	○	○	○	○
S-Lactoylglutathione	○	○	○	○	○	○
S-Methylmethionine	○	○	○	○	○	○
Sorbitol 6-phosphate	○	○	○	○	○	○
Spermidine	○	○	○	○	○	○
Spermine	○	○	○	○	○	○
Succinate	○	○	○	○	○	○
Succinyl CoA	○	○	○	○	○	○

Sulfanilate	○	○		○	○	○
Synephrine	○	○	○	○	○	○
Syringate	○	○	○	○	○	○
Tacrine	○	○		○	○	○
Tartrate	○	○	○	○	○	○
Taurine	○	○	○	○	○	○
Taurocholate	○	○	○	○	○	○
Taurocyamine			○			
TDP-glucose	○	○	○	○	○	○
Terephthalate	○	○	○	○	○	○
Tetrahydropalmatine	○	○	○	○	○	○
Thiamine	○	○	○	○	○	○
Thiamine monophosphate	○	○	○	○	○	○
Thr	○	○	○	○	○	○
threo-beta-methylaspartate			○	○	○	○
Threonate			○			
threo-β-methylaspartate	○	○				
Thymidine	○	○	○	○	○	○
Thymine	○	○	○	○	○	○
Tiglate	○	○	○	○	○	○
Tolazoline	○	○		○	○	○
trans-4-Hydroxy-3-methoxycinnamate	○	○	○	○	○	○
trans-Aconitate	○	○	○	○	○	○
trans-Cinnamate	○	○	○	○	○	○
trans-Zeatin	○	○	○	○	○	○
Trehalose 6-phosphate	○	○	○	○	○	○
TRH (Thyrotropin-releasing hormone)	○	○	○	○	○	○
Trientine	○	○	○	○	○	○
Triethanolamine	○	○		○	○	○
Trigonelline	○	○	○	○	○	○
Trimethylamine N-oxide	○	○	○	○	○	○
Trimethylsulfonium	○	○	○	○	○	○
Tropine	○	○	○	○	○	○
Tropinone	○	○	○	○	○	○
Tryptophan	○	○	○	○	○	○
Tryptamine	○	○	○	○	○	○
Tyrosine	○	○	○	○	○	○

Tyramine	○	○	○	○	○	○
Tyrosine methyl ester	○		○	○	○	○
UDP (Uridine diphosphate)	○	○	○	○	○	○
UDP-glucose	○	○	○	○	○	○
UDP-glucuronate	○	○	○	○	○	○
UDP-N-acetylglucosamine	○	○	○	○	○	○
UMP (Uridine monophosphate)	○	○	○	○	○	○
Undecanoate	○	○	○	○	○	○
Uracil	○	○	○	○	○	○
Urate	○	○	○	○	○	○
Urea	○	○	○	○	○	○
Uridine	○	○	○	○	○	○
Urocanate	○	○	○	○	○	○
UTP (Uridine triphosphate)	○	○	○	○	○	○
Valine	○	○	○	○	○	○
Xanthine	○	○	○	○	○	○
Xanthopterin	○	○	○	○	○	○
Xanthosine	○	○	○	○	○	○
Xanthurenate	○	○	○	○	○	○
XMP (Xanthosine phosphate)	○	○	○	○	○	○
XTP (Xanthosine triphosphate)	○	○	○	○	○	○
Z-Gly-Pro	○	○		○	○	○

Supplemental Table 2: 第 3 章の検討において対照群と各モデル間で t-検定を行った結果、臓器内濃度の有意な変化が観察された代謝物

Metabolites	Model		
	Ethanol	Stress	Asprin
Number of metabolites changed in this model	57	39	80
hydroxyproline	Decrease (p<0.01)	Decrease (p<0.05)	Decrease (p<0.01)
N8-Acetylspermidine	Increase (p<0.05)	Increase (p<0.05)	Increase (p<0.01)
Putrescine	Increase (p<0.01)	Increase (p<0.01)	Increase (p<0.01)
Creatinine	Decrease (p<0.05)	Decrease (p<0.05)	Increase (p<0.01)
Xanthine	Decrease (p<0.05)	Increase (p<0.01)	Decrease (p<0.01)
1-Methylhistamine	Increase (p<0.05)		Increase (p<0.01)
2'-Deoxycytidine	Increase (p<0.05)		Increase (p<0.05)
3-Hydroxybutyrate	Increase (p<0.05)		Decrease (p<0.05)
4-Methyl-2-oxopentanoate	Increase (p<0.05)	Decrease (p<0.05)	
5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribotide	Increase (p<0.05)		Decrease (p<0.01)
5-Methyl-2'-deoxycytidine	Decrease (p<0.05)	Decrease (p<0.01)	
6-Phosphogluconate	Decrease (p<0.05)		Decrease (p<0.01)
ADP		Decrease (p<0.01)	Decrease (p<0.05)
ADP-glucose	Decrease (p<0.05)	Decrease (p<0.05)	
ADP-ribose		Increase (p<0.01)	Increase (p<0.05)
Allantoin	Increase (p<0.01)		Increase (p<0.05)
Asp	Decrease (p<0.05)		Increase (p<0.05)
ATP		Decrease (p<0.05)	Decrease (p<0.05)
CoA	Decrease (p<0.01)		Decrease (p<0.05)
Cytidine		Increase (p<0.01)	Increase (p<0.01)
F6P	Decrease (p<0.01)		Decrease (p<0.01)
FAD	Decrease (p<0.05)		Decrease (p<0.01)
GABA		Increase (p<0.05)	Increase (p<0.05)
GDP		Decrease (p<0.01)	Decrease (p<0.01)
GDP-mannose	Decrease (p<0.05)	Decrease (p<0.05)	
Gly		Increase (p<0.05)	Decrease (p<0.05)
Gly-Gly		Increase (p<0.05)	Increase (p<0.05)
GTP		Decrease (p<0.05)	Decrease (p<0.05)
Hypotaurine	Decrease (p<0.01)	Decrease (p<0.01)	
Hypoxanthine	Decrease (p<0.01)	Increase (p<0.01)	
Isethionate		Decrease (p<0.01)	Decrease (p<0.05)

N-Acetyl-beta-alanine	Increase (p<0.01)		Increase (p<0.01)
N-Acetylglucosamine 6-phosphate		Increase (p<0.05)	Decrease (p<0.01)
N-Acetylglutamate	Increase (p<0.05)		Increase (p<0.01)
NADP+	Decrease (p<0.01)		Decrease (p<0.01)
N-epsilon-Acetyllysine	Increase (p<0.05)		Increase (p<0.05)
Ru5P	Decrease (p<0.05)		Increase (p<0.01)
S7P	Decrease (p<0.01)	Increase (p<0.05)	
Ser		Increase (p<0.05)	Decrease (p<0.05)
Thymidine	Increase (p<0.05)	Increase (p<0.05)	
trans-Aconitate	Decrease (p<0.05)	Decrease (p<0.05)	
UDP-glucuronate	Decrease (p<0.01)		Decrease (p<0.01)
1-Methylnicotinamide			Increase (p<0.05)
2、3-Pyridinedicarboxylate			Increase (p<0.01)
2AB	Increase (p<0.01)		
2-Hydroxybutyrate	Increase (p<0.01)		
2-Hydroxyglutarate			Decrease (p<0.01)
2-Hydroxyisobutyrate			Decrease (p<0.05)
3'-AMP	Decrease (p<0.05)		
3-Methylhistidine		Decrease (p<0.01)	
4-(beta-Acetylaminoethyl)imidazole			Increase (p<0.01)
5-Methyltetrahydrofolate	Increase (p<0.05)		
Acetylcholine	Decrease (p<0.05)		
Adenine	Decrease (p<0.01)		
Adipate			Decrease (p<0.05)
Ala-Ala			Increase (p<0.05)
AMP	Decrease (p<0.01)		
Arg			Increase (p<0.05)
Argininosuccinate	Decrease (p<0.05)		
Azelate			Decrease (p<0.05)
beta-Ala		Increase (p<0.05)	
Betaine			Decrease (p<0.05)
Carnitine	Decrease (p<0.01)		
CDP		Decrease (p<0.01)	
Choline			Decrease (p<0.01)
cis-Aconitate			Decrease (p<0.01)
Citrate			Decrease (p<0.01)

Creatine			Decrease (p<0.01)
Cystathionine			Decrease (p<0.05)
DOPA	Decrease (p<0.05)		
F1, 6P			Decrease (p<0.01)
G1P	Decrease (p<0.05)		
G6P	Decrease (p<0.05)		
gamma-Butyrobetaine			Decrease (p<0.01)
Gln		Increase (p<0.01)	
Glu-Glu			Increase (p<0.01)
Glutarate			Decrease (p<0.05)
Glutathione(red)	Decrease (p<0.01)		
Glycerophosphorylcholine	Decrease (p<0.05)		
Glycolate	Decrease (p<0.05)		
Gly-Leu			Increase (p<0.01)
GMP	Decrease (p<0.05)		
Guanidinoacetate	Decrease (p<0.05)		
Histamine		Decrease (p<0.05)	
Inosine			Increase (p<0.01)
Isobutyryl CoA	Decrease (p<0.05)		
Kynurenine			Increase (p<0.01)
Lactate	Decrease (p<0.05)		
Leu			Increase (p<0.05)
Malate	Decrease (p<0.05)		
Malonate			Increase (p<0.05)
Methionine sulfoxide		Increase (p<0.05)	
N-Acetylglucosamine	Decrease (p<0.05)		
N-Acetylhistidine			Increase (p<0.01)
N-Acetylmethionine			Increase (p<0.05)
N-Acetylneuraminate	Decrease (p<0.01)		
N-Acetylornithine			Increase (p<0.01)
N-Acetylputrescine			Increase (p<0.01)
N-Acetylvaline			Increase (p<0.01)
NAD+		Decrease (p<0.01)	
NADH			Decrease (p<0.01)
Nicotinamide		Increase (p<0.01)	
o-Acetylcarnitine			Decrease (p<0.01)
Octopine			Increase (p<0.05)

Ornithine	Increase ($p<0.05$)		
Phe			Increase ($p<0.01$)
Phenaceturate			Increase ($p<0.05$)
Phosphorylcholine			Decrease ($p<0.01$)
Pipecolate		Decrease ($p<0.01$)	
Pro			Decrease ($p<0.05$)
Pyridoxamine 5'-phosphate	Decrease ($p<0.05$)		
Spermidine			Increase ($p<0.05$)
Succinate			Increase ($p<0.05$)
Taurine			Decrease ($p<0.01$)
Terephthalate			Decrease ($p<0.05$)
Thiamine		Increase ($p<0.05$)	
Thiamine monophosphate		Increase ($p<0.01$)	
threo-beta-methylaspartate + Glu			Increase ($p<0.01$)
Trehalose 6-phosphate			Decrease ($p<0.01$)
Triethanolamine			Decrease ($p<0.05$)
Trp			Increase ($p<0.01$)
Tyr			Increase ($p<0.05$)
UDP		Decrease ($p<0.05$)	
UDP-N-acetylglucosamine	Decrease ($p<0.05$)		
Uracil	Decrease ($p<0.05$)		
Urate			Decrease ($p<0.01$)
Urea			Increase ($p<0.05$)
Uridine	Decrease ($p<0.01$)		
UTP		Decrease ($p<0.05$)	