



Title	液体クロマトグラフィー質量分析法を用いたノンターゲットメタボロミクスに資する化合物推定方法の開発
Author(s)	小倉, 泰郎
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.18910/54002">https://doi.org/10.18910/54002</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

液体クロマトグラフィー質量分析を用いた  
ノンターゲットメタボロミクスに資する  
化合物推定方法の開発

小倉 泰郎

2015 年 4 月

大阪大学大学院 工学研究科

## 目次

第 1 章	緒論.....	1
1.1.	緒言.....	1
1.2.	ノンターゲットメタボロミクスにおける化合物推定.....	2
1.2.1.	メタボロミクスに用いられる分析方法.....	2
1.2.2.	スペクトルライブラリを用いた化合物推定.....	3
1.2.3.	化合物データベースを用いた化合物推定.....	5
1.3.	データベースに収載されていない代謝物の化合物推定.....	6
1.3.1.	ノンターゲットメタボロミクスにおいて検出される外因性代謝物.....	6
1.3.2.	化合物データベースにおける抱合体の収載数.....	6
1.4.	研究の目的.....	7
第 2 章	化合物データベースを用いた化合物推定方法の開発.....	8
2.1.	緒言.....	8
2.2.	実験方法.....	10
2.2.1.	ACD/MSmanager を用いた自動帰属による化合物推定方法の開発.....	10
2.2.1.1.	試料および試薬.....	10
2.2.1.2.	緑茶前処理.....	10
2.2.1.3.	分析装置および分析条件.....	11
2.2.1.4.	ピーク検出および多変量解析.....	11
2.2.1.5.	化合物推定方法.....	11
2.2.2.	部分構造の探索による自動帰属方法を用いた化合物推定方法の開発.....	14
2.2.2.1.	ベンチマークデータ.....	14
2.2.2.2.	化合物データベースを用いた候補化合物の検索.....	14
2.2.2.3.	スペクトルの自動帰属, スコアリング, およびランキング.....	14
2.3.	結果と考察.....	16
2.3.1.	ACD/MSmanager を用いた自動帰属による化合物推定方法の開発.....	16
2.3.1.1.	分析データの採取.....	16
2.3.1.2.	多変量解析による品質に寄与する化合物の探索.....	17
2.3.1.3.	品質に寄与する成分の化合物推定.....	18

2.3.2.	部分構造の探索による自動帰属方法を用いた化合物推定方法の開発.....	27
2.3.2.1.	部分構造探索による自動帰属と開裂した結合様式に基づくスコアリング.....	27
2.3.2.2.	ベンチマークデータセットに対する化合物推定.....	29
2.4.	小括.....	36
第3章	データベースに含まれない化合物を対象とした化合物推定方法の開発.....	37
3.1.	緒言.....	37
3.2.	実験方法.....	39
3.2.1.	試料および試薬.....	39
3.2.2.	マウス尿試料の入手及び試料前処理.....	40
3.2.3.	分析装置および分析条件.....	40
3.2.4.	ピーク検出および多変量解析.....	41
3.2.5.	化合物推定方法.....	42
3.2.6.	<i>in silico</i> での抱合体生成.....	42
3.3.	結果と考察.....	42
3.2.7.	化合物データベースに含まれない抱合体を対象とした化合物推定方法の開発.....	42
3.2.8.	Quercetin 3-glucuronideの標準試料を用いた抱合体の同定.....	44
3.2.9.	緑茶を投与したマウス尿に含まれる抱合体の探索および化合物推定.....	47
3.4.	小括.....	55
第4章	総括と展望.....	56
4.1.	総括.....	56
4.2.	展望.....	58
謝辞	.....	60
付録	.....	61
引用文献	.....	78

# 第 1 章 緒論

## 1.1. 緒言

代謝物は生体内に存在する物質であり，体内において合成もしくは分解などの反応に関与する化合物である．なかでも脂質やアミノ酸および核酸などの代謝物は，エネルギーの媒体，構造の形成，および情報の伝達など生命活動に重要な様々な役割を担っている．また，食品中の成分や医薬品などの外因性化合物も代謝を受けて体内に存在し，やがては体外に排出される．メタボロミクスは代謝物を網羅的に解析する学術分野であり，代謝物の測定結果によって生物の表現型を詳細に解析することが可能であることが知られている<sup>1-3)</sup>．これまで，疾病に特有のマーカー探索や病因解析<sup>4-9)</sup>，毒性を示す機序の研究<sup>6-10)</sup>などのほか，微生物を用いた工業的物質生産の最適化<sup>11)</sup>や，食品分野における品質管理や品質予測<sup>12-15)</sup>など幅広い分野への応用例が報告されている．これらのように医学的および工学的な知見を得るために代謝物を対象とした分析を行う必要性は高い．

既知の代謝物のなかから選択された対象物のみを測定する手法はターゲット分析と呼ばれ，事前に用意された標準試料の保持時間やマススペクトルとの比較により同定を行い，測定対象化合物の定量情報をもとに解析を行う<sup>16,17)</sup>．一方で，測定対象物を絞り込まずに分析する手法はノンターゲット分析と呼ばれている．ノンターゲットメタボロミクスは対象化合物を限定せずに検出されたデータ全体を用いて解析する方法であり，幅広い化合物を測定対象にできるため特に探索的な研究において用いられている手法である<sup>18,19)</sup>．事前に対象化合物を特定せずに測定するノンターゲットメタボロミクスでは，得られた測定結果を解析し，どのような化合物が検出されたのか識別する必要がある．このような分析結果の評価基準として Metabolomics Standards Initiative は 2007 年にメタボロミクスにおける化学分析に関するガイドラインを発表し，化合物の定性分析結果を 4 段階 (Identified compound, Putatively annotated compound, Putatively characterized compound, Unknown compound)

に分けている<sup>20)</sup>。このなかで最も確度が高い Identified compound は標準試料を用いた確認分析を行って 2 種類以上の分析結果を用いて同定された化合物である。これに次ぐ Putatively annotated compound は、スペクトルライブラリや文献値などとの比較により推定された化合物の候補である。ノンターゲットメタボロミクスの様に対象化合物が不明な場合は、標準試料を用いずに化合物の推定を行う必要がある。

## 1.2. ノンターゲットメタボロミクスにおける化合物推定

### 1.2.1. メタボロミクスに用いられる分析方法

メタボロミクスにおいては様々な分析手法が運用されているが、なかでもガスクロマトグラフィー (gas chromatography, GC) や液体クロマトグラフィー (liquid chromatography, LC) などの分離分析と質量分析 (mass spectrometry, MS) を組み合わせた手法が頻用されている。ガスクロマトグラフィー質量分析 (GC/MS) や液体クロマトグラフィー質量分析 (LC/MS) は、それぞれの成分に対して保持時間やマススペクトルおよび各イオンの信号強度などの測定値を与えるが、その測定原理によってそれぞれの特徴がある。GC/MS は、GC の持つ高い分離能力や良好な保持時間再現性と、GC/MS に用いられる電子イオン化法 (electron ionization, EI) により得られるフラグメントイオンスペクトルの高い再現性という特徴を併せ持つ。なお、フラグメントイオンとは化合物が開裂した部分構造を示すイオンである。そのため GC/MS では標準試料の保持時間やフラグメントイオンスペクトルを収載したライブラリ (以下、スペクトルライブラリとする) を用いた化合物推定が実用的に運用可能でされており、ノンターゲットメタボロミクスでも頻用されている<sup>4,12)</sup>。その一方で、GC/MS は気相での分離を行うため、その原理によって分析対象化合物は揮発性成分に限定される。LC/MS は液相での分離を行うため、不揮発性化合物やイオン性化合物などの幅広い化合物を測定することが可能であり、この点において LC/MS はノンターゲットメタボロミクスに適した分離方法である。また、LC/MS が用いられるも

うひとつの理由として、GC/MS に比較して分子量を推定することが容易であることが挙げられる。GC/MS における EI 法ではイオン化に伴って分子が開裂するために分子量を示すイオンが検出困難な場合があるが、その一方で LC/MS で主に使用されるエレクトロスプレーイオン化法 (electrospray ionization, ESI) は一般的に分子を開裂させることなくイオン化するため、 $m/z$  から分子量を推定することが可能である。さらに高分解能質量分析計により得られる精密質量情報を用いることで分子量推定の精度を向上することが可能であり、EI の代わりに衝突誘起解離 (CID) を用いることによりプロダクトイオンスペクトルとして部分構造情報を得ることも可能である。そのため、ノンターゲットメタボロミクスにおいて、LC/MS を用いる必要性は高い。

### 1.2.2. スペクトルライブラリを用いた化合物推定

このように幅広い化合物を測定可能な LC/MS はノンターゲットメタボロミクスに適した測定手法であるが、GC/MS に比較すると化合物の推定は困難である。これは LC/MS を用いたノンターゲットメタボロミクスを行う上での障壁となる。GC/MS における化合物推定は、一般にライブラリと測定データにおけるフラグメントイオンスペクトルと保持指標の組み合わせを比較することによって実施される。ここで、保持指標とは n-アルカンなどの基準となる標準試料の保持時間との比較によって対象化合物の保持時間を指標化したものである。

化合物推定に用いられるスペクトルライブラリについて Table 1-1 にまとめた。代表的なスペクトルライブラリである The NIST 14 Mass Spectral Library (以下、NIST14) は GC/MS 向けに 242,477 化合物を対象とした 276,259 のフラグメントイオンスペクトルを収載している。上述の通り、フラグメントイオンスペクトルの代わりに LC/MS ではタンデム質量分析 (tandem mass spectrometry) を用いることにより CID によるプロダクトイオンスペクトルを得ることができるが、フラグメントイオンスペクトルとは  $m/z$  値やその強度が異なるためスペクトルライブラリを用いた化合物推定を行うことはできない。タンデム質量分析には主に四重極型質量分析計を

複数備えた tandem-in-space とイオントラップを用いた tandem-in-time があり，これらは CID の原理が異なるために得られるスペクトルパターンは異なる<sup>21)</sup> .NIST14 には，LC/MS 向けにイオントラップを対象とした 8,171 化合物から生じる 42,126 イオンを対象とした 51,216 のプロダクトイオンスペクトルが収録され，7,692 化合物から生じる 14,835 イオンを対象とした 183,068 のプロダクトイオンスペクトルが収録されている．この例が示すように，スペクトルライブラリにおいて LC/MS 分析結果が収録されている化合物の数は GC/MS の 3%程度であり，現状における化合物数の不足は明らかである．またプロダクトイオンスペクトルは，コリジョンエネルギーと呼ばれる分析条件によってスペクトルパターンが変化するため，ひとつの化合物に対して複数のスペクトルが収録されている必要がある．また同じ原理であっても異なる形式の質量分析計から得られるプロダクトイオンスペクトルが異なることが知られている<sup>22-24)</sup>．そのため，同型の質量分析計を用いてスペクトルライブラリを構築することが理想的であり，これもスペクトルライブラリの実用性を低下させている要因であると考えられる．また，当然ながらスペクトルライブラリを作成するには標準試料が必要である．GC/MS は揮発性をもつ低分子化合物の分析に適しているという性質からメタボロミクスでは有機酸，糖，アミノ酸などの誘導体化化合物および農薬や医薬品などがスペクトルライブラリに含まれている．これらの標準試料は比較的入手性が高いが，LC/MS が測定対象とする化合物は膨大であるうえにコストの高さや入手性の悪さから分析可能な化合物全ての標準試料を網羅することは現実的ではない．これらの理由から，LC/MS におけるスペクトルライブラリを用いた化合物推定は，現状では困難である．

Table 1-1 主要ライブラリにおける LC/MS データ収載数

	Compounds with MS/MS Spectrum	Spectra	Reference
NIST14	8,171 (ion trap) 7,692 (collision cell)	51,216 (ion trap) 183,068 (collision cell)	25)
METLIN	12,107	62,112	26)
Wiley Registry MSMS	1,208	12,122	27)
HMDB*1	1579	2741 (ion trap) 1218 (collision cell)	28)
MassBank*2	-	21,971	29,30)

\*1: Human metabolome database の略 . Web ページに公開されている情報を改変 .

\*2: 公開データページより ESI で取得されたスペクトル数を算出 .

### 1.2.3. 化合物データベースを用いた化合物推定

スペクトルライブラリを用いずに化合物を推定するために , 多くの化合物を収載する化合物データベースから推定分子量などを用いて化合物候補を得ることができる . PubChem は米国の National Institutes of Health (NIH) の U.S. National Library of Medicine (NLM) の一部門である National Center for Biotechnology Information (NCBI) によって運営されている化合物データベースであり , 2015 年 1 月時点では 5100 万化合物に関する情報 (分子量 , 組成式 , 化合物構造など) を収載している <sup>31)</sup> . また , ChemSpider は英国の Royal Society of Chemistry (RSC) が管理運営する化合物データベースであり , 3200 万化合物を収載している <sup>32)</sup> . これらのデータベースは Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)<sup>33)</sup> や Human Metabolome Database (HMDB) などの他のデータベースの内容も含んでいる . これらの化合物データベースは LC/MS や GC/MS を対象としたスペクトルライブラリと比較して明らかに膨大な数の化合物を収載しているため化合物候補の探索には有用である .

その一方で , 候補化合物の数も膨大になり候補数は数百から数千に及ぶ . そのため質量分析結果を解析し , これらの候補化合物から合理性の高い化合物に絞り込む必要がある . ただし , 質量分析結果を手作業で解析することは煩雑であり , 対象の化合物や質量分析におけるフラグメント化など特別な知識を必要とするため研究者の違いによって解析結果が変わる可能性があり , 感覚的な解釈では評価結果を数値化するこ

とが難しいという問題がある。コンピューターを用いたアプローチは質量分析結果の自動的な解釈を可能にし、これら手作業での問題を克服することが可能になる。これらの理由により、化合物データベースから得られる膨大な候補化合物に対して自動的な解釈を行うことにより化合物推定を行う方法が必要とされている。

### 1.3. データベースに収載されていない代謝物の化合物推定

#### 1.3.1. ノンターゲットメタボロミクスにおいて検出される外因性代謝物

化合物推定に用いられる化合物データベースは数千万におよぶ膨大な化合物を収載していることについては既に述べたが、その一方でこのような化合物データベースであっても化合物同定において想定される化合物を網羅するには至っていない。

化合物データベースにおける情報が限られている代表的な化合物として抱合体が挙げられる。抱合体は特に薬物代謝において第 Ⅰ 相反応として知られる抱合反応により生成される。抱合反応は、対象となる化合物にグルクロン酸や硫酸などの低分子化合物を共有結合させる反応であり、その極性を高めることにより無毒化や体外への排出を促していると考えられている<sup>34)</sup>。特に体内に取り込まれた生理活性物質などの化合物は一般に抱合反応などの代謝を受けて体外へ排出されることが知られており、抱合体の主な排出先である尿試料のメタボローム解析においてはアミノ酸や有機酸などの代謝物のほか、摂取した食品などの影響による抱合体も検出されている<sup>35,36)</sup>。特に、測定対象を限定せずに解析を行うノンターゲットメタボロミクスにおいてはこれらの化合物を含めた解析が必要になる。

#### 1.3.2. 化合物データベースにおける抱合体の収載数

グルクロン酸抱合体を形成する官能基はヒドロキシ基やカルボキシ基およびアミノ基が知られており<sup>34)</sup>、化合物データベースにおいてグルクロン酸抱合体を網羅するにはこれらの官能基の数だけ抱合体が収載される必要がある。さらにひとつの分子に

複数の抱合反応が生じる可能性もあり，組み合わせを考えるとその数は膨大になる．その一方で，PubChem および ChemSpider はそれぞれ 5100 万および 3200 万を超える化合物を収載しているものの，グルクロン酸を部分構造に含む化合物を検索した結果はそれぞれ 23719 件 (PubChem) および 9556 件 (ChemSpider) でありこれはそれぞれ全体の 0.047% および 0.030% に過ぎない (2015 年 1 月現在)．この例が示すように，化合物データベースに収載されている抱合体の情報は不足している．また，同様に化合物データベースから類推される化合物としては配糖体が挙げられる．配糖体はアグリコンと呼ばれる糖以外の化合物と 1 分子以上の糖がグリコシド結合した化合物である．これらは糖のヘミアセタールまたはヘミケタール性ヒドロキシ基とアグリコンのアルコール，フェノール，カルボン酸などの反応基との脱水縮合で生成したものであり糖が直接結合する原子の種類により，酸素原子に結合した *O*-グリコシド，硫黄原子に結合した *S*-グリコシド，窒素原子に結合した *N*-グリコシド，炭素原子に結合した *C*-グリコシドに分類される．アグリコンとしては各種のテルペノイドや，ステロイド，キノン，リグナンなどが知られている．配糖体も抱合体と同様にひとつのアグリコンに対して結合する糖の種類や数の違いにより複数の配糖体が考えられるが，化合物データベースに含まれる情報量は同様に限られている．このように，ノンターゲットメタボロミクスでは化合物データベースに収載されていない化合物を対象とした化合物推定を行うことも必要となる．

## 1.4. 研究の目的

これらの背景を踏まえ，本研究では LC/MS を用いたノンターゲットメタボロミクスの実用性を高めるために，化合物データベースを用いた化合物推定手法の開発を第一の目的とした．さらに，化合物データベースに収載されていない化合物の代表として抱合体に注目し，化合物データベースに収載されていない抱合体の化合物推定手法の開発を第二の目的として研究を行った．

## 第2章 化合物データベースを用いた化合物推定方法の開発

### 2.1. 緒言

質量分析における定性能力を高めることを目的として、高分解能質量分析計が用いられている。高分解能質量分析計の例として飛行時間型 (time-of-flight, TOF) 質量分析計、オービトラップ、およびフーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴型質量分析計が知られており、それぞれ LC と接続した製品が市販されている。GC/MS や LC/MS の定量用途で一般に用いられている四重極型質量分析計の分解能は一般的に整数質量を識別する程度であるが、高分解能質量分析計は概ね 1-5 ppm の質量精度を示し、例えば理論値が  $m/z$  500 のイオンであれば  $\pm 0.0005$ - $0.0025$  程度の質量誤差で測定可能である。このように高分解能質量分析計は定性能力において優れているが、質量分析装置により得られる情報は分子内の原子配置を直接的に観測するものではない。そのため、高分解能質量分析を用いたとしても化合物の構造式を一義的に決定することはできない。さらに、分子量を精密に測定しても精密質量だけで組成式を一義的に決定することは難しいことが知られている<sup>37,38)</sup>。Böcker らは十分な濃度の標準試料を測定し、精密質量と同位体比による組成式推定の有用性を示した<sup>39)</sup>。その一方、同一の質量分析装置を用いて Bristow らが様々な濃度の試料を対象に測定したところ、組成式を一義的に決定することはできなかった<sup>40)</sup>。実際のメタボロミクスにおいても測定対象の濃度範囲は様々であることから、組成推定の結果として複数の候補が得られると考えられる。また、異性体が全て同じ分子量を示すことから明らかであるが、組成式を決定しても構造を一義的に決定することにはならないため、質量分析結果だけで構造を決定することは困難である。

化合物データベースを用いた化合物推定では、その候補化合物数が膨大になるためそのランク付けが必要であることは第一章で述べた。各候補化合物の構造に対してプロダクトイオンスペクトルを帰属することにより部分構造の合理性を評価すること

が可能である。近年、コンピューターを用いて計算されたプロダクトイオンスペクトルと実際に得られたプロダクトイオンスペクトルの比較による自動帰属を用いた化合物推定方法の例が複数報告されている。HillらはPubChemからダウンロードして編集した独自のデータベースを作成し、得られた各候補化合物に対してMass Frontier ver.4を用いて計算されたプロダクトイオンスペクトルと実際に得られたプロダクトイオンスペクトルを比較し、その帰属されたイオンの数をもとにスコアリングを行う方法を開発した<sup>41)</sup>。102化合物の標準試料の分析結果に対して化合物推定を行った結果、平均272.2の候補数を得て、これらをランキングしたところ、正解の化合物のランクは44.2 (+/- 14.1)であった。またWolfらは、MetFragと名付けられた化合物推定方法を開発し計算上のプロダクトイオンスペクトルを作成するために分子内結合を複数切断して部分構造を作成する方法を用いた。そのスコアリングには $m/z$ やイオン強度、さらに切断された結合が解離するのに必要なエネルギーbond dissociation energyを加味したスコアリングを開発した<sup>42)</sup>。Ridderらは、MAGMaと名付けた化合物推定方法を開発し、同様の計算により得られたプロダクトイオンスペクトルを用いた自動帰属と切断された結合の構成元素に基づいてスコアリングし、イオントラップ型質量分析計により得られる多段階CID ( $MS^n$ 分析)に応用した<sup>43)</sup>。

本研究では、 $MS^n$ 分析が可能な精密質量分析計と化合物データベースおよび質量分析結果の自動帰属を用いた化合物推定システムの開発を試みた。本研究で用いたLCMS-IT-TOFは精密質量分析および $MS^n$ 分析が可能なイオントラップ型-飛行時間型質量分析計である。TOF型質量分析計は正確な同位体パターン得られるという特徴をもつことが知られている<sup>44)</sup>。そこで、同位体パターンをスコアリングに加味することで複数得られる組成式の評価が可能になると考えた。本章では自動帰属方法の検討およびスコアリング方法の検討を行い、化合物推定システムの開発を行いChemProphetと名付けた。本章では開発された手法を用いて、モデル実験およびベンチマークデータを用いた妥当性確認を行った。モデル実験としては二次代謝物を多く含むことが知られている緑茶の抽出液から品評会における順位との相関が示され

た成分に注目して化合物推定を行った。また ChemProphet の化合物推定能力を評価するためにベンチマークデータセットを用い、これまでに報告されたランキング結果との比較を行った。

## 2.2. 実験方法

### 2.2.1. ACD/MSmanager を用いた自動帰属による化合物推定方法の開発

#### 2.2.1.1. 試料および試薬

2006 年に関西地方で行われた茶品評会に出品された一番茶を分析に用いた。この品評会では熟練した試験管により、外観、水色、香気、および滋味に対して官能検査が行われ、これらのスコアによって茶葉の順位が決定される。ここでは、5 位から 45 位の 9 点の茶葉 (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45) について解析を行った。LCMS 用のギ酸、メタノール、およびそのほかの試薬は和光純薬工業より購入した。また、超純水は Milli-Q Gradient ultrapure water system (Millipore 製) を用いた。

#### 2.2.1.2. 緑茶前処理

乾燥茶葉 (10 mg) を 2 mL 容量のエッペンドルフチューブに移し、液体窒素にて冷却した後にボールミル (Retsch 製) を用いて粉末状に破碎した。粉末状の茶葉に 1 mL のメタノール/水/クロロホルム (2.5/1/1 (v/v/v)) を添加し、37°C にて 30 分間振とうして抽出したのちに、1,6000 g にて 10 分間の遠心分離を行った。200  $\mu$ L の上清を 150  $\mu$ L 容量のエッペンドルフチューブに移し、凍結乾燥を行い分析まで -80°C にて保存した。200  $\mu$ L のメタノール/水/ギ酸 (80/20/0.1 (v/v/v)) にて再溶解し、0.2  $\mu$ m PTFE フィルタにより粒子を除去し 2  $\mu$ L を分析装置に注入した。また各試料の 20  $\mu$ L をプールした試料を調製し、バッチ分析の最初および各試料の後に分析を行った。

### 2.2.1.3. 分析装置および分析条件

精密質量 MS<sup>n</sup> 分析には、イオントラップ-飛行時間型質量分析計である LCMS-IT-TOF (島津製作所製) および超高速液体クロマトグラフ Prominence UFLC (島津製作所製) を用いた。分離カラムには Shim-Pack XR-ODS (50 mmL. x 2 mmID., 2.2 μm, 島津製作所製) を用いた。カラムオープン温度は 40°C とした。移動相は 0.1 %ギ酸水溶液 (A) およびメタノール (B) を用い、流速は 0.4 mL/min とした。グラジエントプログラムは 2%B (0.00 min), 60%B (10.00 min), 98%B (10.01-14.00 min), 2%B (14.01 min), STOP (19.00 min) とした。質量分析計の設定は以下の通りとした。イオン化には正負極性切り替えによる ESI 法を用いた。ネブライズガス (N<sub>2</sub>) 流量は 1.5 L/min, 乾燥ガス圧力は 0.1 MPa, 印可電圧は +4.5 / -3.5 kV, CDL 温度は 200°C, ブロックヒータ温度は 200°C とした。また、測定範囲は *m/z* 100-1000 とした。イオン蓄積時間は 10 msec (MS<sup>1</sup>) および 30 msec (MS<sup>2-3</sup>) とした。MS<sup>2-3</sup> のプリカーサイオンは強度順に自動的に選択された。また、スペクトルの飽和を防ぐために Automatic sensitivity control 機能を用いた。

### 2.2.1.4. ピーク検出および多変量解析

ピーク検出、ピークテーブルの作成、および同位体ピークの削除には Profiling Solution (島津製作所製) を用いた。また、茶葉の順位を従属変数とし分析により得られたピークテーブルを独立変数とした回帰分析を行った。この際、Projection to latent structures by means of partial least squares (PLS) 回帰分析を用い、計算ソフトは SIMCA-P+ ver.12.0 (Umetrics 製) を用いた。データの正規化には pareto scaling を用いた。

### 2.2.1.5. 化合物推定方法

ACD/MS manager (ACD Labs 製) を用いた化合物推定は 5 段階のプロセスを経て行われる。概要を Fig. 1 に示した。まず最初に MS<sup>n</sup> データが取得される。ここでは

MS<sup>3</sup>分析までを行った。第2ステップは組成推定である。組成の推定はMS<sup>n</sup>分析結果から Formula Predictor を用いて行われる。Formula Predictor は実測された  $m/z$  値と各組成式から求められた理論値の誤差，同位体ピークの強度比が反映されたスコアを計算する機能を有している<sup>45)</sup>。このスコアを formula score として用いた。第3ステップはデータベース検索である。ここでは ChemSpider を用い，推定組成式によって候補化合物を検索した。検索インターフェースは ChemSpider が提供する Application Programming Interface (API) および Visual Basic を用いて作成した。第4ステップは各候補に対するマススペクトルの自動帰属である ACD/MS manager のマススペクトル自動帰属機能を複数の化合物の処理に用いるため，マクロプログラムを用いた。帰属されたイオン量を示す Assignment Score は Eq.2-1 によって計算された。最後のステップでは，各候補のスコアを Formula Score と Assignment Score の相乗平均により計算した。

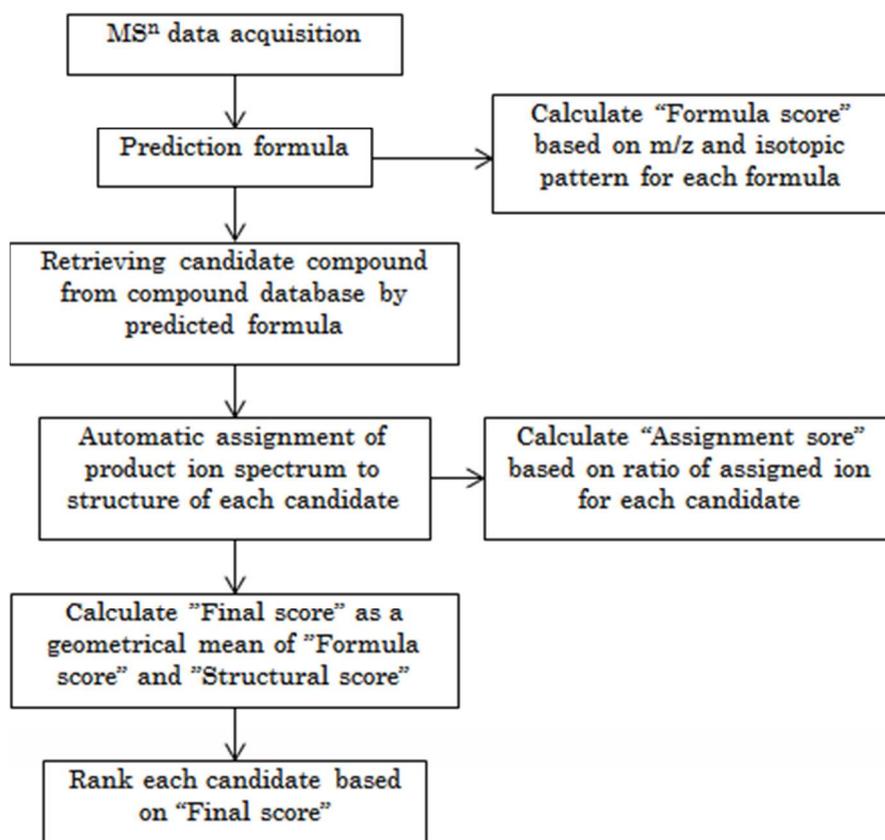


Fig. 2-1 ACD/MSmanager を用いた化合物推定方法の概要

$$\text{Assignment Score} = \frac{\sum_{ai} \text{Intensity}_{ai}}{\sum_{oi} \text{Intensity}_{oi}} \quad (\text{Eq. 2-1})$$

Where

$ai \in$  assigned product ion

$oi \in$  observed product ion

## 2.2.2. 部分構造の探索による自動帰属方法を用いた化合物推定方法の開発

### 2.2.2.1. ベンチマークデータ

2008年に Hill らにより公開されたデータをベンチマークとして用い、開発した化合物推定方法の妥当性を確認した<sup>41)</sup>。このデータセットには、農薬、医薬品、化成品、ペプチドなど 102 化合物のプロダクトイオンスペクトルによって構成されている。このデータセットはそれぞれの化合物に対して、10, 20, 30, 40, 50 eV のコリジョンエネルギーにて取得されたプロダクトイオンスペクトルが含まれている。異なるエネルギーで得られたプロダクトイオンスペクトルを Wolf らと同じ方法<sup>42)</sup>で統合し、JCAMP-DX 形式に保存したものを妥当性評価に用いた。

### 2.2.2.2. 化合物データベースを用いた候補化合物の検索

以前の報告との比較を行うために同様の候補化合物が得られるように検索を行った。候補化合物のリストは PubChem から検索した。mono-isotopic mass +/- 10 ppm および登録日が 2006 年 2 月以前の候補を対象とした。また、一部の化合物においては正解の化合物が削除されていたため 検索範囲を 2011 年 12 月以前までに拡張した。さらに候補化合物の中で重複している構造や立体異性体を削除した。

### 2.2.2.3. スペクトルの自動帰属、スコアリング、およびランキング

新たに開発した帰属方法では、検出されたプロダクトイオンの  $m/z$  値から推定される組成式に該当する部分構造を探索した。以下の計算処理は全て自動で進行する。組成推定では候補となる元素の構成と各元素の最大数は候補化合物の組成によって決定された。各プロダクトイオンに対して組成推定を行い、推定組成のリストを生成した。これに続き、推定組成式のリストのそれぞれに対して、MDL molfile の結合リストをたどることにより推定組成に該当する部分構造が探索された。ひとつの結合が開裂する場合、ひとつのプロトンの移動を考慮した。また、分子内で新たな結合が生じ

ることによる分子内の再構築は考慮しなかった。自動帰属に引き続きスコアリングを実施した。最終的なスコアは formula score, spectrum score, および penalty score という 3 つのスコアから計算した。ACD/MS manager を用いた化合物推定では, formula score と assignment score のみを用いた。spectrum score と assignment score はどちらも Eq. 2-1 によって計算される同じスコアであり, 後述する penalty score とあわせて帰属結果を示すため名前を改めた。penalty score は penalty value に基づいて計算された。penalty value は Hill and Mortishire Smith ら<sup>46)</sup>によって提唱され, 変更を加えたものが Ridder らによって使用された<sup>43)</sup>。本研究では ketone bond に修正を加えた penalty score を用いた (Eq. 2-3)。penalty score は 0 から 100 点の範囲において, この penalty score の低さを示すスコアとなるように計算した。また penalty score を与えたイオンの相対強度および候補化合物全体から計算される penalty score の最大値が反映される。候補化合物全体の penalty score を加味することで, penalty score が低くなりやすい構造を持つ候補が常に上位に示されることを防ぐ目的がある。最終的なスコアは formula score, spectrum score, および penalty score の相乗平均によって計算された。この最終的なスコアを用いて各候補化合物のランク付けを行った。ランクの計算において複数の化合物が同じスコアを示した場合は, より良いスコアを示した化合物数と同じスコアを示した化合物数の和から計算されるランク "lowest lank" を用いた。また本研究では, 相対強度比が 5%以上となるイオンのみを対象に処理を行った。

$$penalty\ score = \left(1 - \frac{\sum_i PV_i \times RI_i}{n \times PV_{max} \times 100}\right) \times 100 \quad (Eq. 2-2)$$

Where

$i \in product\ ion$

PVi: minimum penalty value for each product ion

RIi: relative intensity (%) of each product ion

n: the number of product ion

$$penalty\ value = \sum_{bond \in dissccon.} h_b p_b \quad (Eq. 2-3)$$

Where

single bond:  $p=1$                       bond including non-carbon:  $h=1$

double bond:  $p=2$                       carbon-carbon bond:  $h=2$

triple bond:  $p=3$                       keton bond:  $h=3$

## 2.3. 結果と考察

### 2.3.1. ACD/MSmanager を用いた自動帰属による化合物推定方法の開発

#### 2.3.1.1. 分析データの採取

データの採取には LCMS-IT-TOF に超高压液体クロマトグラフィー (UHPLC) を接続したシステムを用いた。UHPLC は分析を高速化することが可能な HPLC であり、スループットが向上するだけでなく、分析バッチ全体の所要時間を短くすることでサンプルの安定性を向上し結果的に分析結果の再現性を向上させる効果も期待できる。また、UHPLC に用いるカラムは粒子径が小さく高い分離能が得られるため、UHPLC は二次代謝物のように複雑な成分からより多くのピークを検出するために適したシステムである。その一方で、ピーク幅がシャープになるため検出器の高速化が必要となる。LCMS-IT-TOF は最大 10 Hz でのデータ採取が可能であり、データ採取時の正負極性切り替えを 10 Hz で行うことが可能であるため UHPLC へ対応できる質量分析計である。

Fig. 2-2 にポジティブおよびネガティブの TIC クロマトグラムを示した。8.8 min 付近に最後のピークが溶出されたため、10 分までを分析時間とした。また、ノンターゲットメタボロミクスではピーク同定を保持時間および  $m/z$  値で行うことから保持時間の再現性は重要であり、試料の差異を正確に表現するためには強度の再現性も同じく重要である。そこで、バッチ分析の最初に分析した試料を QC サンプルとして一定の間隔で挟み込み、それらの分析結果を用いて保持時間および強度の再現性確認を行った。ピーク 1 から 5 における保持時間と強度の相対標準偏差を確認したところ、面積値および保持時間再現性はそれぞれ 0.82-3.18% および 0.13-0.22% と高い再現性を示した。これらの結果から連続分析において良好な再現性が得られていることが確認できた。

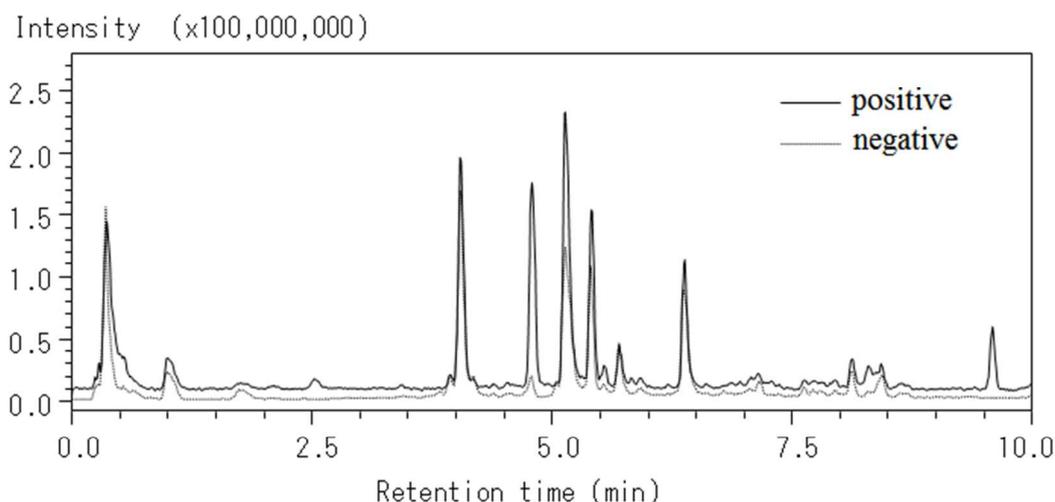


Fig. 2-2 正負イオンにおける代表的な緑茶抽出液の TIC クロマトグラム .  
 図中には品評会での順位との相関が高い順番にピークの番号が示されている .

### 2.3.1.2. 品評会での順位に相関する成分の探索

得られたクロマトグラムから Profiling solution を用いてピークを検出した . 正イオン分析の結果では 3742 ピークが検出され , 負イオン分析の結果ではそれより少ない 1846 ピークが検出されたため , 多変量解析には正イオン分析の結果を用いた . また , 同位体の削除や one-way factorial ANOVA ( $p < 0.05$ ) によって 462 ピークまで絞り込んだ . ここで , 462 ピークを独立変数とし品評会でのランキングを従属変数として PLS 回帰分析を行った . PLS 回帰分析によってモデルを構築することで , 各ピークとへの寄与が明らかになり , 重要なピークを探索することが可能となる . 10, 20, 30 位を Testing Set とし 残りを Training Set としてモデルの構築を行った (Fig. 2-3) . Fig.2-3a に示した Observed vs Predicted Plot からモデルを構築できたことが示された . Fig.2-3b には Variable Importance Plot (VIP) を示した . VIP はモデルを構成する各変数の重みを計算した値であり , 今回の試料においては品評会での順位と各成分の関連性を示す重要な指標である . 今回の報告ではこの VIP の上位 20 番までの化合物について推定を行った .

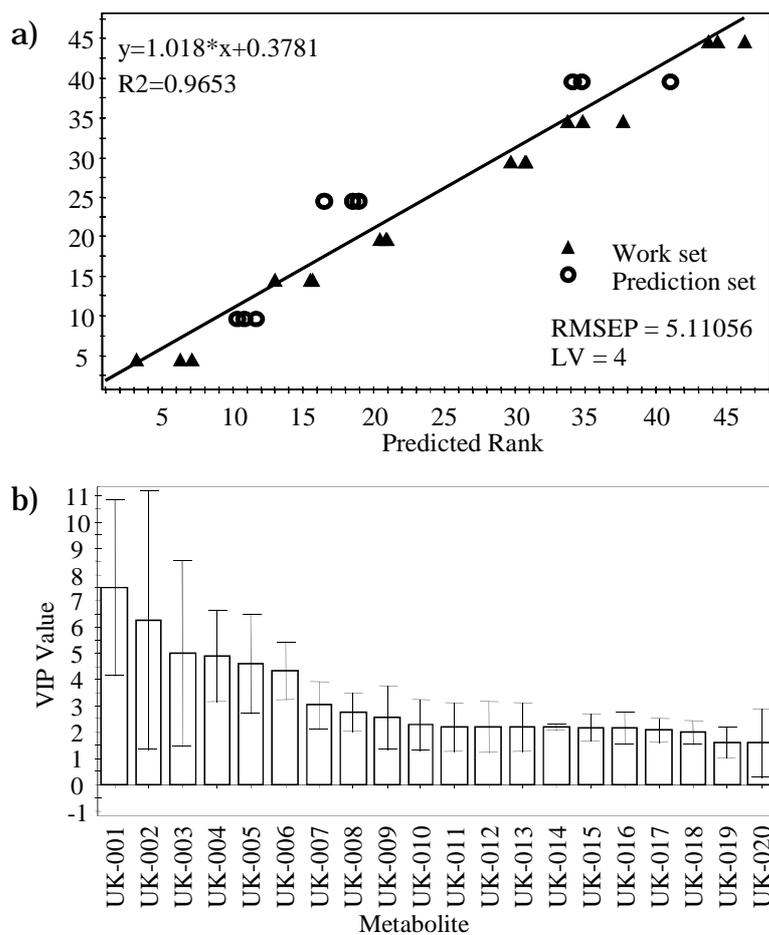


Fig. 2-3 品評会における順位との相関を示すピークの探索

a) 緑茶試料の品評会での順位と予測された順位のプロットおよび b) 品評会における順位との相関が示された上位 20 成分の VIP を示した。

### 2.3.1.3. 緑茶成分の化合物推定

候補化合物を検索するためのデータベースとして ChemSpider を用いた。また、ChemSpider には API が用意されているため簡便に検索インターフェースを開発でき、数十におよぶ組成式をクエリに用いて検索を行うなど手間のかかる作業を自動化するのに適している。

正負イオン極性切り替え分析の結果をもとにイオン種を確認した。UK-017 のマススペクトルを例に挙げると、ポジティブイオンのマススペクトルにおいて  $m/z 471$  がベースピークである。一方、ネガティブモードのベースピーク  $m/z 447$  との差は 24 Da であり、これらはナトリウム付加および脱プロトン分子に相当することがわかる。またプロトン化分子の  $m/z 449$  に相当するイオンも検出されたことから、分子量が 448

であることが分かった。他のピークについてもポジティブおよびネガティブイオンのマススペクトルを比較し、イオン種を決定した。

化合物データベースから化合物候補を探索するために組成式を用いた。そこで、組成推定による候補化合物の絞り込みについて検討を行った。VIP で最も高い寄与を示した化合物 UK-001 の MS<sup>n</sup> 分析結果を Fig.2-4 に示した。これらのマススペクトルから Formula Predictor を用いて組成推定を行った。精密質量のみでは7つの候補組成式が示されたが、MS<sup>2</sup> 分析の結果を加味した場合は候補組成式を1つに絞り込むことができた (Table 2-1)。そこで化合物データベースから得られる候補数を比較するために、精密質量および各候補組成式をクエリに用いた場合の候補化合物を検索した。 $m/z$  195.0872  $\pm$  0.005 をクエリに用いて化合物データベースから候補を推定したところ 1168 の候補が示された。また、MS<sup>1</sup> 分析により得られた7つの推定組成からは合わせて408の候補が示され、MS<sup>2</sup> 分析結果より得られた組成式 C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> では214の候補が示された。これらの結果から、精密質量の代わりに組成推定結果をクエリに用いて化合物を検索することで候補をある程度絞り込むことが可能であることが示された。また、UK-004 においては MS<sup>1</sup> 分析の結果からは70種類の推定組成式が示され、MS<sup>3</sup> 分析の結果から45種類の推定組成式が示された。 $m/z$  値と MS<sup>1</sup> 分析および MS<sup>n</sup> 分析により得られた推定組成式をクエリとして化合物候補を検索した場合の候補数はそれぞれ2104、213、および79であったことから、推定組成式が一つに絞り込めない場合でも MS<sup>n</sup> 分析による組成推定が候補化合物の絞り込みには効果的であることが分かった。これらのように、組成を絞り込むことで候補化合物を絞り込むことが可能であるものの、UK-001 のように唯一の組成に絞り込むことができた場合でも様々な異性体が含まれており、各候補化合物の構造式に関する評価が必要である。

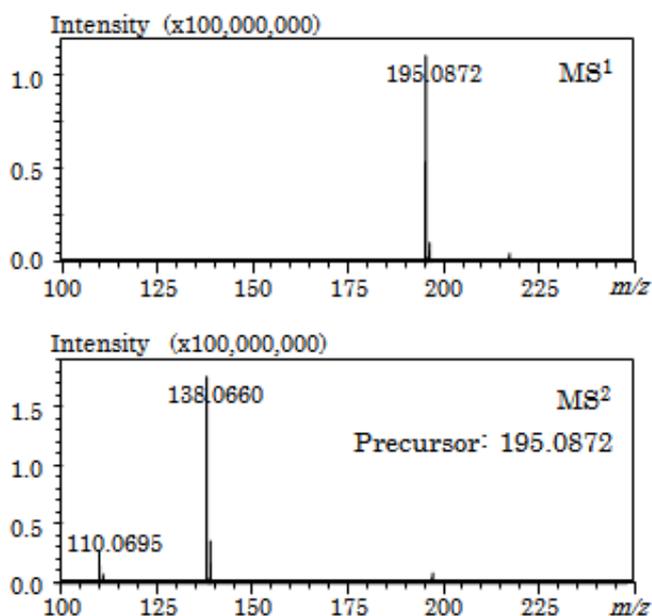


Fig. 2-4 UK-001 の正イオン MS<sup>n</sup> 分析におけるマススペクトル

Table 2-1 Formula Predictor を用いた UK-001 の組成推定結果

MS <sup>1</sup> 分析	MS <sup>2</sup> 分析
C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>
C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	
C <sub>2</sub> H <sub>11</sub> N <sub>8</sub> OP	
CH <sub>10</sub> H <sub>10</sub> S	
C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> OS <sub>2</sub>	
C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> N <sub>10</sub>	

これらの候補化合物を構造式の視点から絞り込むために、各化合物候補の構造式と MS<sup>n</sup> プロダクトイオンスペクトルの自動帰属を行った。ACD MS/Manager は JCAMP-DX 形式などのマススペクトルと MDL molfile 形式などの構造式ファイルを読み込ませることでマススペクトルの自動帰属を行う機能を有している。また、マクロ機能による処理の自動化も可能なことから、大量のファイルを自動的に処理することに適しているため、大量の構造式ファイルを全て自動で帰属することが可能である。Fig. 2-5 に ACD MS/manager の自動帰属結果を示した。ここでは UK-001 の候補化合物のなかで帰属率の異なる例を示した。Fig. 2-5a に示した構造ではすべてのイオンが帰属されているのに対し、Fig. 2-5b ではこれらのイオンが帰属されていないことがわかる。そこでこれらの違いを数値化するために、帰属できたイオンの割合を assignment score とした (Eq. 2-1)。このスコアが高いほど主要なプロダクトイオンが帰属されていることを示し、候補化合物の構造式とプロダクトイオンとの矛盾が少ないことを示している。ここで、例に示した各構造式の assignment score はそれぞれ 100 と 0 であった。これにより、各候補化合物の部分構造とプロダクトイオンスペクトルの合理性についてスコアリングすることができた。全 214 候補の帰属を行った

ところ、214 候補のうち 15 候補のみが assignment score 100 を示した (付録 Fig. S-2a)。これらの 15 候補はカフェインおよびその構造類縁体であったため、UK-001 はカフェインおよびその類縁体であると推定することができた。

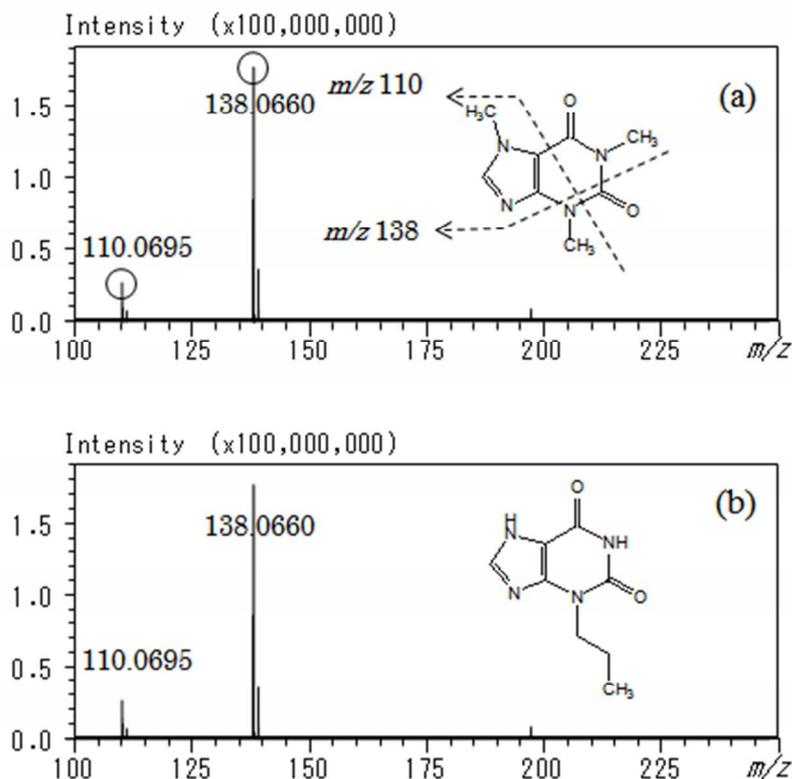


Fig. 2-5 UK-001 の異なる候補における ACD MS/manager を用いた帰属結果。丸が付けられたイオンは帰属されたイオンを示す。a) ChemSpider ID 2424, b) ChemSpider ID 1613。

次に組成推定結果をスコアリングに加味した化合物候補の合理性評価について述べる。UK-004 の組成推定を行った結果、上述の通り複数の組成式が推定された。これらにより検索された各候補化合物の構造式と MS<sup>n</sup> プロダクトイオンスペクトルの自動帰属を行った結果、最も高い assignment score 85.6 を示す候補が 8 つ示された (Table 2-2)。assignment score によるとこれら 8 つの候補の部分構造の合理性は同様に高いが、これらの候補の組成式に注目したところ、3 種類の組成式を含んでいることがわかった。これら 3 つの組成式から計算されるモノアイソトピック質量や同位体パターンの理論値はそれぞれ異なり、Formula Predictor から示されたスコアにも違いが見受けられた (Fig. 2-6)。このスコアを formula score とした。そこで、各候

補化合物の formula score と assignment score を併せて評価するために、2つのスコアの相乗平均により得られるスコアを final score とした。その結果、6つの候補化合物が最も高い final score を示した。Fig. 2-7 に示した各候補の構造式より、UK-004 はカテキンガレートやエピカテキンガレートおよびその類縁体であると推測された。またこれら6候補中5候補はカテキンガレートおよび同一の平面構造を示していることがわかる。化合物データベースには立体構造が異なるレコードはもちろん、平面構造のみが登録されているレコードなども別のレコードとして存在する。今回の報告では立体構造に関する評価は行っていない。今回の方法で絞り込みが可能な平面構造においてはガロカテキンガレートとヒドロキシ基の位置が異なる2つの候補に絞り込むことができた。

Table 2-2 最も高い assignment score を示した UK-004 の候補化合物

ChemSpider ID	assignment score	formula	compound name
58567	85.6	C <sub>22</sub> H <sub>18</sub> O <sub>10</sub>	Catechingallate
97034	85.6	C <sub>22</sub> H <sub>18</sub> O <sub>10</sub>	(2R, 3R)-2-(3, 4-Dihydroxyphenyl)-5, 7- dihydroxy-3, 4-dihydro-2H-chromen-3-yl 3, 4, 5-trihydroxybenzoate
325907	85.6	C <sub>22</sub> H <sub>18</sub> O <sub>10</sub>	(-) – Epicatechingallate
4440417	85.6	C <sub>22</sub> H <sub>18</sub> O <sub>10</sub>	Benzoic acid, 3, 4, 5-trihydroxy-, (2R, 3S)-2-(3, 4-dihydroxyphenyl)-3, 4-dihydro-5, 7-dihydroxy-2H-1-benzopyran-3-yl ester
4925466	85.6	C <sub>22</sub> H <sub>18</sub> O <sub>10</sub>	(2S, 3R)-2-(3, 4-dihydroxyphenyl)-5, 7- dihydroxy-3, 4-dihydro-2H-chromen-3-yl 3, 4, 5- trihydroxybenzoate
9434303	85.6	C <sub>22</sub> H <sub>18</sub> O <sub>10</sub>	(2R, 3R)-2-(3, 5-dihydroxyphenyl)-5, 7- dihydroxy-3, 4-dihydro-2H-chromen-3-yl 3, 4, 5- trihydroxybenzoate
338663	85.6	C <sub>16</sub> H <sub>19</sub> N <sub>4</sub> O <sub>9</sub> P	methyl (1-amino-2-phenylethyl) methylphosphinate-2, 4, 6-trinitrophenol (1:1)
4958048	85.6	C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub> S <sub>2</sub>	2, 5-diethoxy-4-[ (4-methylphenyl) sulfanyl] benzenediazonium hydrogen sulfate-formaldehyde (1:1)

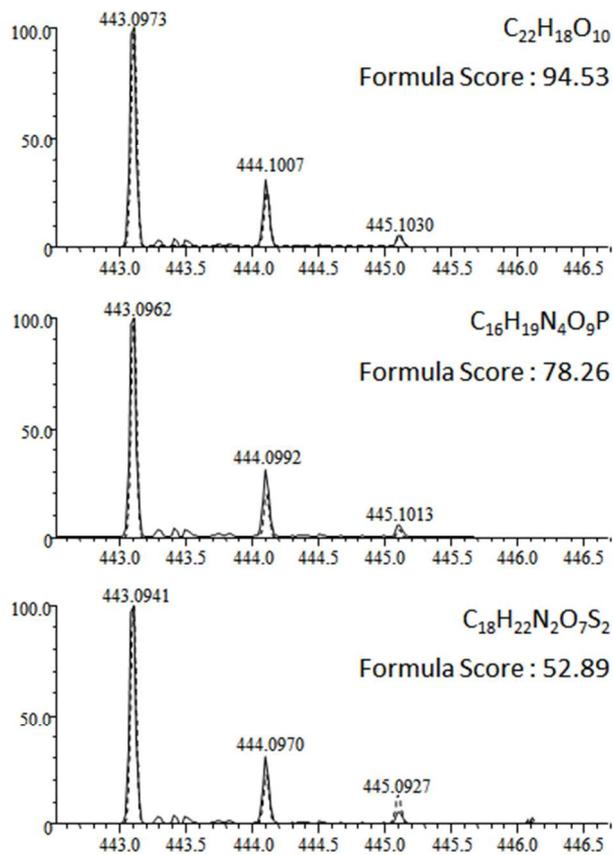


Fig. 2-6 UK-004 のマスペクトルと異なる組成における同位体パターンの差異  
 実線：実際の測定結果，破線：各測定における理論値

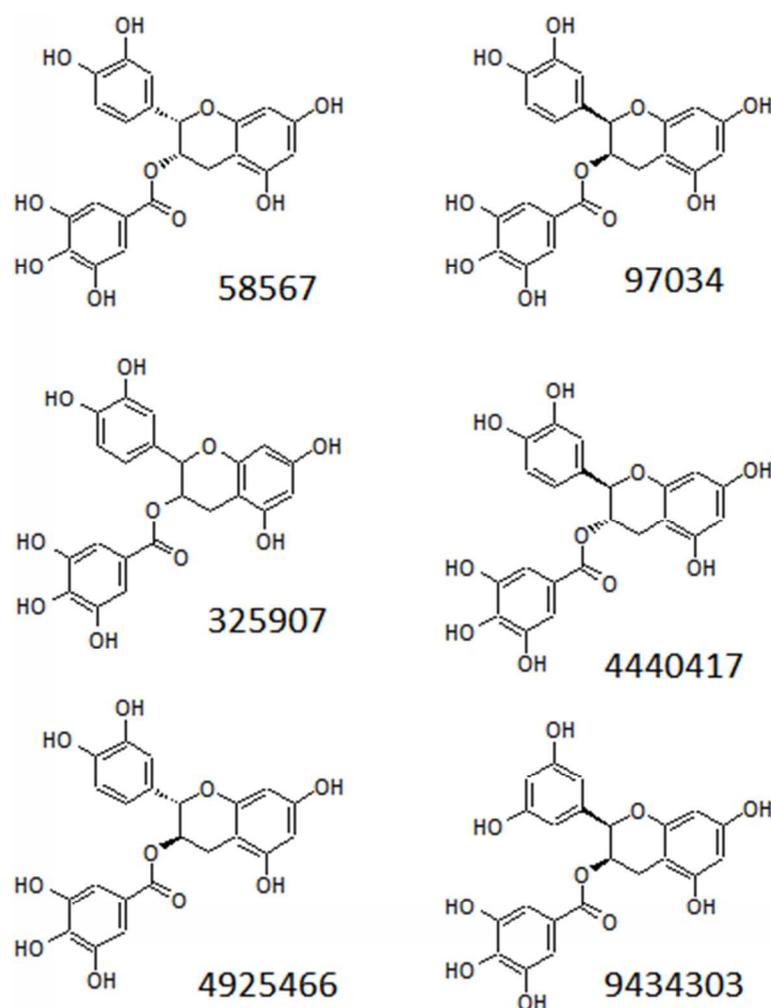


Fig. 2-7 UK-004 の候補化合物の構造式および ChemSpiderID

VIP において示された上位 20 成分における他の成分についても同様に化合物推定を行った。ここで UK-011 は保持時間および MS<sup>n</sup> 分析の結果から UK-004 から生成したイオンであることが確認された。また、UK-008 と UK-010 はそれぞれ UK-001 と UK-007 のナトリウムイオン付加体であった。そこで、これらを除く 17 成分の化合物推定結果を Table 2-3 に示した。これらにおいて示された化合物候補の一覧を付録に記載した (Fig. S-2)。Caffeine や Catechin 類など緑茶成分として広く知られているものが示されたほか、UK-006 の候補化合物として示された Theogallin は Quinic acid と Gallic acid のエステル化合物であり、緑茶成分としての報告がある<sup>47-49</sup>。また、UK-019 は Gallocatechin もしくは Epigallocatechin が縮合した化合物で、この

ような化合物は総じて Proanthocyanidin として知られており、緑茶に含まれることが知られている<sup>49)</sup>。また、UK-001 の候補化合物の final score は 94.24 と非常に高かったが、UK-018 における final score は 53.25 と UK-001 と比較して低い値を示した。これらを比較すると UK-001 に比べて UK-018 の化合物推定結果の合理性が比較的低いことが示された。

Table 2-3 で示された化合物のうち、Caffeine および Catechin 類であることが示された候補について標準試料による化合物の確認を行い、その結果を Table 2-4 に示した。その結果、正しい化合物を候補化合物として示していることが確認された。また、Pongsuwan et al.らは同様の試料を対象として LC/MS を用いた解析を行っている。Table 2-3 および Table 2-4 に示された化合物のうち caffeine, epigallocatechin gallate, epicatechin gallate, epigallocatechin は共通して検出された化合物である。また各クエリを用いた検索とプロダクトイオンスペクトルの帰属を用いた絞り込みによって示された候補化合物数を併せて Table 2-4 に示した。これらの結果から、組成推定結果と帰属結果を合わせた評価を行うことで、精密質量で検索して得られた 1168-2905 におよぶ膨大な候補化合物から最終的には 7-30 の化合物が候補として示された。

Table 2-3 VIP において品評会における順位との相関が示された 20 ピークの化合物推定結果

ID	<i>m/z</i>	R.T. (min)	VIP value	Candidate	Formula	Ion	Final score
UK-001	195.087	4.807	7.448	caffeine and 11 analogue	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	94.24
UK-002	307.080	4.063	6.230	gallic catechin and 10 analogue	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	87.86
UK-003	459.092	5.156	5.023	gallic catechin gallate and seven analogue	C <sub>22</sub> H <sub>18</sub> O <sub>11</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	93.07
UK-004	443.097	6.392	4.902	catechin gallate and five analogue	C <sub>22</sub> H <sub>18</sub> O <sub>10</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	89.95
UK-005	261.169	5.429	4.627	1-(4-amino-6,7,8,9-tetrahydro-1 <i>h</i> -imidazo[4,5- <i>c</i> ]quinolin-1-yl)-2-methylpropan-2-ol	C <sub>14</sub> H <sub>20</sub> N <sub>4</sub> O	[M+H] <sup>+</sup>	73.06
UK-006	345.080	1.003	4.321	theogalline and three analogue	C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> O <sub>10</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	93.84
UK-007	339.106	5.719	3.029	coumaroyl quinic acid and six analogue	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	82.14
UK-008	217.068	4.805	2.746	(Sodium ion adduct of UK-001)		(not calculated)	
UK-009	261.169	4.034	2.547	1-(4-amino-6,7,8,9-tetrahydro-1 <i>h</i> -imidazo[4,5- <i>c</i> ]quinolin-1-yl)-2-methylpropan-2-ol	C <sub>14</sub> H <sub>20</sub> N <sub>4</sub> O	[M+H] <sup>+</sup>	75.44
UK-010	361.088	5.717	2.298	(Sodium ion adduct of UK-007)		(not calculated)	
UK-011	273.074	6.393	2.205	(Fragment of UK-004)		(not calculated)	
UK-012	365.159	4.4	2.187	ethyl-5-(acetylamino)-2,3,4,5-tetra-deoxy-2-methylidene-4-nitro-d-glycero-d-galacto-nononate	C <sub>14</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>9</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	58.90
UK-013	291.086	3.958	2.184	catechin / epicatechin	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	93.65
UK-014	417.172	6.971	2.181	3-[[4-(2,4-dimethylphenyl)-5-(1-naphthylmethyl)-1,2,4-triazol-3-yl]sulfanyl]propanamide	C <sub>24</sub> H <sub>24</sub> N <sub>4</sub> OS	[M+H] <sup>+</sup>	59.30
UK-015	275.185	5.841	2.178	[4-amino-1-(2-methylpropyl)-6,7,8,9-tetrahydro-1 <i>h</i> -imidazo[4,5- <i>c</i> ]quinolin-2-yl]methanol	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> N <sub>4</sub> O	[M+H] <sup>+</sup>	76.53
UK-016	181.072	2.541	2.158	4-hydroxy-6-methyl-3,4-dihydropteridin-2(1 <i>H</i> )-one	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	86.80
UK-017	471.090	8.433	2.073	2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-8-methyl-4-oxo-4 <i>H</i> -chromen-3-yl- $\alpha$ -L-arabinopyranoside	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	[M+Na] <sup>+</sup>	84.23
UK-018	565.157	7.027	1.988	3,4-dihydroxy-9,10-dioxo-9,10-dihydroanthracen-2-yl-6-O-(6-deoxy- $\alpha$ -L-mannopyranosyl)- $\beta$ -D-glucopyranoside	C <sub>26</sub> H <sub>28</sub> O <sub>14</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	53.25
UK-019	579.150	4.123	1.607	(2 <i>r</i> ,3 <i>s</i> )-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-8-{2,3-dihydroxy-5-[(2 <i>r</i> ,3 <i>s</i> )-3,5,7-trihydroxy-3,4-dihydro-2 <i>h</i> -chromen-2-yl]phenyl}-3,4-dihydro-2 <i>h</i> -chromene-3,5,7-triol	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	64.55
UK-020	307.083	1.834	1.597	gallic catechin / epigallocatechin	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	87.86

Table 2-4 標準試料を用いた化合物同定結果および各種検索クエリによる化合物推定結果

ID	Identified compound	# of queried candidates			# of final candidates*
		<i>m/z</i> value +/- 5 mDa	Formula (MS <sup>1</sup> )	Formula (MS <sup>n</sup> )	
UK-001	caffeine	1168	408	214	15
UK-002	gallic catechin	2191	177	177	18
UK-003	epigallocatechin gallate	1657	140	140	10
UK-004	epicatechin gallate	2104	213	79	7
UK-013	catechin	2905	394	322	30
UK-020	epigallocatechin	2191	177	177	18

\*同定された化合物と同様に示された化合物候補の数

## 2.3.2. 部分構造の探索による自動帰属方法を用いた化合物推定方法の開発

### 2.3.2.1. 部分構造探索による自動帰属と開裂した結合様式に基づくスコアリング

2.3.1 にて開発した化合物推定方法では，自動帰属のために ACD/MS manager を使用した．ACD/MS manager を用いた帰属率は十分に高く，正イオンを対象とした自動帰属は化合物を推定するのに有効であった．そこで，負イオンの自動帰属について検討を行った (Fig. 2-8)．Fig. 2-8a は自動で帰属した結果を示し，Fig. 2-8b はプロダクトイオンから推定された組成式に合致する部分構造を手動で探索して帰属した結果である．この結果が示すように，負イオンのプロダクトイオンスペクトルに対する自動帰属による結果は十分ではないことが示された．

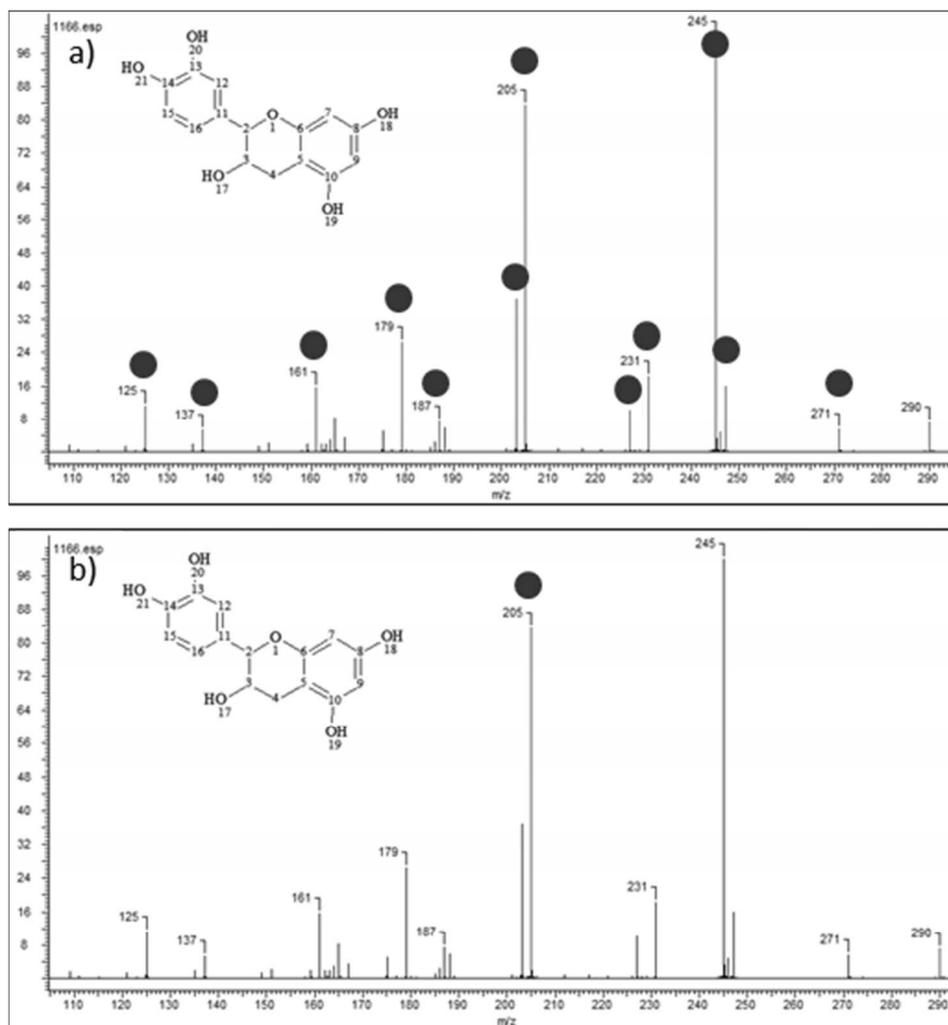


Fig. 2-8 負イオンのプロダクトイオンにおける自動帰属結果と手動での帰属結果  
帰属できたイオンには丸を付記した．

そこで、負イオンにおいても帰属が可能な自動帰属方法の開発を行った。プロダクトイオンの自動帰属は、Fig. 2-9 に示したステップによって行われる。まずプロダクトイオンを選択し、次にそのプロダクトイオンの組成推定を行う。そして、推定組成に合致する部分構造を探索することにより帰属を行う。ここで開発した自動帰属方法を用いて Fig. 2-8 のプロダクトイオンを帰属したところ、手動で帰属できたものは全て帰属することができた。これにより帰属率低下の問題を解決することができた。ChemProphet においてはこの帰属方法を用いた。

これまで、コンピューターを用いた自動帰属に基づく同様のアノテーション方法は複数報告されている。Wolfらおよび Ridderらは *in silico* で生成したプロダクトイオンスペクトルと実際のプロダクトイオンスペクトルの比較を用いて自動帰属を行った。分子内結合を網羅的に開裂させることで部分構造を得て、プロダクトイオンのリストを作成する。既報では時間短縮のためにその開裂数を4箇所制限していた<sup>42,43</sup>。ChemProphet に用いた帰属方法ではそのような制限を設けていないため、4箇所以上の開裂が生じる場合にも帰属が可能である。また、結合の開裂によるプロダクトイオン予測の所要時間は検出されたプロダクトイオンの数によって影響されず、ChemProphet の帰属方法における所要時間はプロダクトイオンの数に影響されることが予想される。これらについては 2.3.2.2 ベンチマークデータセットに対する化合物推定において検討した。

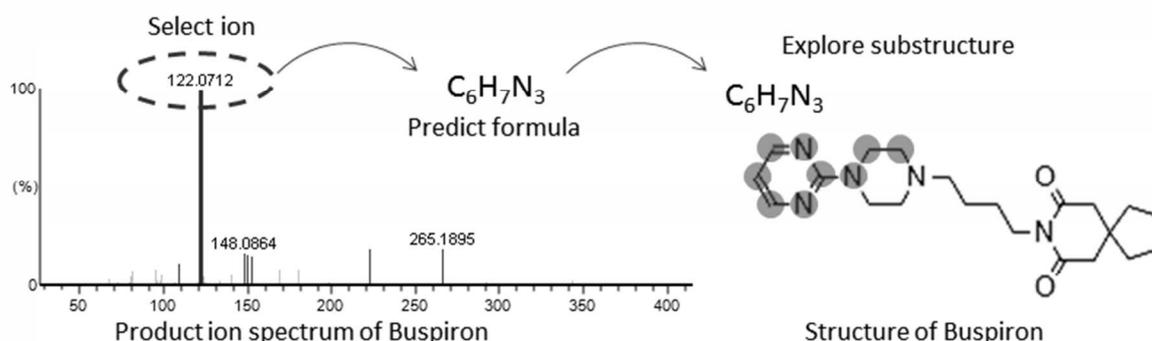


Fig. 2-9 ChemProphet におけるプロダクトイオンの自動帰属方法

新たな自動帰属方法の開発に伴い、大幅に帰属率を向上させることができた。その一方で新たな問題が生じた。それは、多くの候補化合物において帰属率が高まるため、帰属率だけでは部分構造の合理性評価が困難になったことである。これまでに開発した ACD/MSmanager を用いた化合物推定方法では、組成推定によるスコアリングとプロダクトイオンの帰属率によってスコアリングを行ったが、今回はこれに加えて切断された結合の構成元素を加味したスコアリングを行った (Eq. 2-2, Eq. 2-3)。penalty value は候補化合物の構造によって最大値が異なるため、penalty value をランキングに用いると penalty value の最大値が小さい化合物のランクが優先的に高くなる可能性がある。そのため、Eq. 2-2 に示した式を用いて penalty score とした。ChemProphet でのスコアリングを端的に述べると、同位体イオンを含む組成推定の結果 (formula score) と、帰属されたイオンの割合 (spectrum score)、切断された結合の様式 (penalty score) がそれぞれのスコアに反映される。これらのスコアは全て最低点の 0 から最高点の 100 までの範囲で示される。それらの 3 種類のスコアの相乗平均を最終的なスコアとした。各候補化合物のランクは最終的なスコアの高さによって求めた。

#### 2.3.2.2. ベンチマークデータセットに対する化合物推定

新たに開発した自動帰属やスコアリングを含む ChemProphet のプロトコルを評価するため、Hill らにより報告されているデータセットをベンチマークに用いて行った化合物推定の結果を既報と比較した。候補化合物については Hill らの報告<sup>41)</sup>に合わせて PubChem から入手した (付録 Table S-1)。これらの結果、平均 372.5 +/- 11.1 個の候補化合物を得た。

これらの候補化合物を対象とした化合物推定の結果、30%以上を超える化合物において、正しい候補が 1 位にランクされた。また中央値と平均値はそれぞれ 3 位と 14.6 位であった。各化合物における推定結果の詳細について Table 2-5 に示した。また、正しい候補のランキング結果と過去の報告との比較については Table 2-6 にまとめた。

それぞれの化合物候補数が若干異なるため完全な比較はできないが、Table 2-6 に示したように本法により得られた正しい候補のランクの平均、中央値、および第三四分位点は以前の報告に比べて良好な値を示した。また、各化合物において既存の方法と今回の方法によるランクを比較すると大まかには相関があるものの、異なる結果を示すものも見受けられた (付録 Table S-2, S-3)。例えば、4-Aminoantipyrine は既存方法では 16 位から 76 位にランクされているのに対し、本法では 3 位にランクされた。その一方で、Bumetanide は既存方法では 1 位から 10 位にランクされているものの、本法では 36 位であった。これらの結果の違いは、スコアリング方法の違いや、CID における分子内結合の再構築や窒素ルールなどの帰属に関するプロトコルの違いによると考えられる。窒素ルールとは特に質量分析に用いる用語であるが、一般的に整数分子量が奇数の分子は奇数個の窒素原子を含み、偶数の分子は偶数個の窒素原子を含むということを示している。これは、原子価が奇数でありかつ最も安定な同位体の質量数が偶数である原子は全原子中で窒素だけであるという窒素の特殊性によるものである。Bumetanide について MAGMa<sup>50)</sup> を用いて帰属した結果、再構築を考慮したプロダクトイオンの帰属がなされていたが、ChemProphet では再構築を考慮しないためこのイオンは帰属されてなかった。その結果として ChemProphet では Bumetanide の帰属率が低下し、ランクが下がったと考えられる。一方で、このような再構築を考慮することは 4-Aminoantipyrine においては不正解の候補のスコアを上げる原因にもなっていた。このように再構築を考慮することはメリットとデメリットがあるが、総じて MetFrag や MAGMa よりも化合物推定結果は良好であったため再構築を考慮するメリットは小さいことが示された。

所要時間の比較を行ったところ、ChemProphet では過去の報告よりも化合物による所要時間の違いが大きいことが示された (Table 2-7)。第一四分位点では ChemProphet が最も早いですが、中央値では MAGMa より早いものの MetFrag より遅い。また第三四分位点では ChemProphet が明らかに遅い結果を示した。この差異を与えた一因は帰属アルゴリズムの違いである。ChemProphet および既報における

プロダクトイオンの数に対する処理速度および分子量に対する処理速度を Fig. 2-10 に示した。既存の方法では、候補化合物から考慮される全ての部分構造の計算により予測されるプロダクトイオンのリストを作成し、これらのリストと実測されたイオンの比較によって帰属を行う。帰属に必要な時間はプロダクトイオンの予測が支配的であるため、Fig. 2-10a が示すように帰属に要する時間は検出されたプロダクトイオンの数に依存せずほぼ一定である。ChemProphet では検出されたプロダクトイオンに対して部分構造の探索を行うため、検出されたプロダクトイオンが少ない場合は比較的高速に処理を行うことが可能になる。その一方で、ChemProphet ではプロダクトイオンが多い場合では処理速度が低下するという予想に反してそのほかの手法に比べて大きな差は示されなかった。また、MetFrag や MAGMa では切断を考慮する結合数に上限を設けているため大きな分子量の場合も所要時間がそれほど増加しないものと考えられる。プロダクトイオンの数以外に処理速度に影響を与える要因として考えられる候補化合物の分子量に対する処理速度の比較を Fig. 2-10b に示した。その結果として、分子量の違いが処理時間に与える影響は他の手法よりも大きいことが示された。ChemProphet において処理速度が低下する要因はプロダクトイオンを選択して部分構造を探索する過程において、複数のプロダクトイオンを処理する過程において探索する部分構造が重複するためであると考えられる。

Table 2-5 標準試料を用いた化合物同定結果および各種検索クエリによる化合物推定結果

Compound	PubChem comp. ID	MIMW	# of tested product ion	# of candidate	Rank of compound
4-Aminoantipyrine	2151	203.1059	13	221	3
6a-Methylprednisolone	4159	374.2093	8	176	7
Acepromazine	6077	326.1453	4	271	2
Acetophenazine	441185	411.198	7	408	2
Adenosine_Diphosphate	197	427.0294	3	31	2
Adiphenine	2031	311.1885	6	577	8
Albuterol	2083	239.1521	4	213	12
Alfentanil	51263	416.2536	8	158	1
Amfenac	2136	255.0895	9	279	2
Aminophylline	2153	180.0647	3	61	5
Ampicillin	2174	349.1096	11	560	2
Anileridine	8944	352.2151	2	514	2
Antipyrine	2206	188.095	28	282	233
Apomorphine	2215	267.1259	5	411	5
Apramycin	71428	539.2803	8	50	1
Betaxolol	2369	307.2147	15	175	1
Boldenone_Undecylenate	25702	452.329	12	20	8
Bumetanide	2471	364.1093	14	569	41
Buprenorphine	2476	467.3036	22	32	1
Buspirone	2477	385.2478	7	20	1
Cholesterol	304	386.3549	3	41	26
Cromolyn	2882	468.0693	4	30	3
Cymarine	539061	548.2985	12	43	1
Daunorubicin	2958	527.1791	6	95	7
Dextromethorphan	3008	271.1936	13	137	19
Dihydroergotamine	3066	583.2795	11	31	4
Dimeflin	3078	323.1521	6	534	5
Diphenoxylate	13505	452.2464	25	292	44
Dobutamine	36811	301.1678	7	385	8
Doxorubicin	1691	543.1741	6	55	7
Drofenine	3166	317.2355	6	104	1
Enalapril	3222	376.1998	6	177	1
Enalaprilat	5362033	348.1685	6	312	2
Ephedrine	5032	165.1154	6	243	47
Ergoloid_Mesyate	592735	591.3421	9	7	2

Table 2-5 標準試料を用いた化合物同定結果および各種検索クエリによる化合物推定結果 (続き)

Compound	PubChem comp. ID	MIMW	# of tested product ion	# of candidate	Rank of compound
Etamiphylline	28329	279.1695	13	43	1
Etodolac	3308	287.1521	12	366	1
Fenbendazole	3334	299.0728	3	378	88
Fenoterol	3343	303.1471	4	308	3
Folic_Acid	3405	441.1397	4	568	1
Gallamine	3450	510.4635	4	7	1
Gingerol	3473	294.1831	7	131	1
Hematoporphyrin_I	11103	598.2791	15	39	4
Hydrocortisone	3640	362.2093	46	209	9
Hydroxybutorphanol	3064246	343.2147	8	34	19
Hydroxyphenethylamine	5610	137.0841	6	166	6
Isoxsuprine	3783	301.1678	10	37.5	2
Ketorolac	3826	255.0895	4	279	73
Leucine_Enkephalin	3903	555.2693	19	51	2
Mebeverine	4031	429.2515	3	78	2
Mefenamic_Acid	4044	241.1103	6	512	18
Meprobamate	4064	218.1267	3	76	6
Methionine_Enkephalin	42785	573.2257	11	55	1
Methotrexate	4112	454.1713	3	585	7
Methylergonovine	4140	339.1947	14	468	9
Morphine-3-glucuronide	4318740	461.1686	2	102	3
Naltrexone	4428	341.1627	5	878	48
Nandrolone	9904	274.1933	48	84	21
Nimesulide	4495	308.0467	14	122	70
Norpropoxyphene	18804	325.2042	3	352	11
Noscapine	4544	413.1475	12	222	1
Ormetoprim	23418	274.143	5	238	4
Oxaprozin	4614	293.1052	7	426	6
Oxybutynin	4634	357.2304	28	80	1
Oxycodone	4635	315.1471	4	695	84
Oxytetracycline	5280972	460.1482	10	1511	5
Perindopril	107807	368.2311	4	55	1
Piperacetazine	19675	410.2028	4	434	1
Poldine	11018	340.1913	-	-	-

-: not assigned

Table 2-5 標準試料を用いた化合物同定結果および各種検索クエリによる化合物推定結果 (続き)

Compound	PubChem comp. ID	MIMW	# of tested product ion	# of candidate	Rank of compound
Prazosin	4893	383.1594	11	141	2
Prednisolone	4894	360.1937	11	211	16
Prednisolone_Tebutate	4898	458.2668	13	130	1
Prednisone	4900	358.178	27	296	21
Prolintane	14592	217.183	4	96	3
Pyrilamine	4992	285.1841	3	247	1
Remifentanil	60815	376.1998	12	177	1
Reserpine	5052	608.2734	8	23	2
Rolitetraacycline	54682938	527.2268	3	454	3
Salmeterol	5152	415.2723	6	22	1
Spectinomycin	2021	332.1584	56	274	1
Streptomycin	19649	581.2657	15	30	1
Strychnine	5304	334.1681	42	589	245
Strychnine_N-oxide	73393	350.163	21	1088	2
Sufentanil	41693	386.2028	6	403	1
Sulfadimethoxine	5323	310.0736	10	86	5
Sulfasalazine	5384001	398.0685	11	95	8
Taurocholate	8959	515.2917	7	47	4
Tenoxicam	5282194	337.0191	8	109	6
Terbutaline	5403	225.1365	5	162	11
Terfenadine	5405	471.3137	3	29	2
Testosterone_Propionate	5995	344.2351	10	89	3
Tetracaine	5411	264.1838	5	291	1
Tetracycline	54675776	444.1533	11	1570	17
Tetramisole	3913	204.0721	16	105	57
Theobromine	5429	180.0647	16	82	21
Thiethylperazine	5440	399.1803	8	473	7
Thioridazine	5452	370.1537	8	760	1
Thiothixene	941651	443.1701	28	630	1
Thonizide	5456	511.4376	4	4	1
Tripelennamine	5587	255.1735	4	92	1
Vecuronium	39765	557.4318	13	1	1

Table 2-6 ベンチマークデータセットの化合物推定における正解候補の順位比較

	ChemProphet	Hill <i>et al.</i> <sup>a)</sup>	Wolf <i>et al.</i> <sup>a)</sup>	Ridder <i>et al.</i> <sup>b)</sup>
Product ion	merged	selected	merged	merged
Average rank	14.7 (+/- 3.6)	44.2 (+/- 14.1)	24 (+/- 7.9)	30.8 (+/- 9.8)
Std. deviation	36.6	142.5	80.2	98.9
Median rank	3	4	4.5	3
3rd quartile rank	8	17.5	11.75	9

a) Rank for each candidate were supplied as additional file published by Wolf *et al.*

b) Rank for each candidate were supplied as supporting information published by Ridder *et al.*

Table 2-7 ベンチマークデータセットの化合物推定における候補当たりの処理時間

	ChemProphet	Wolf <i>et al.</i>	Ridder <i>et al.</i>
Product ion	merged	merged	merged
Average	24106.5 (+/- 14328.3)	486.9 (+/- 98.3)	1260.6 (+/- 175.3)
Std. Deviation	144708.8	992.5	1770.0
25% Quartile	29.9	133.3	229.4
Median	281.5	206.5	526.7
75% Quartile	2792.2	457.0	1200.8

(単位：milli second/candidate)

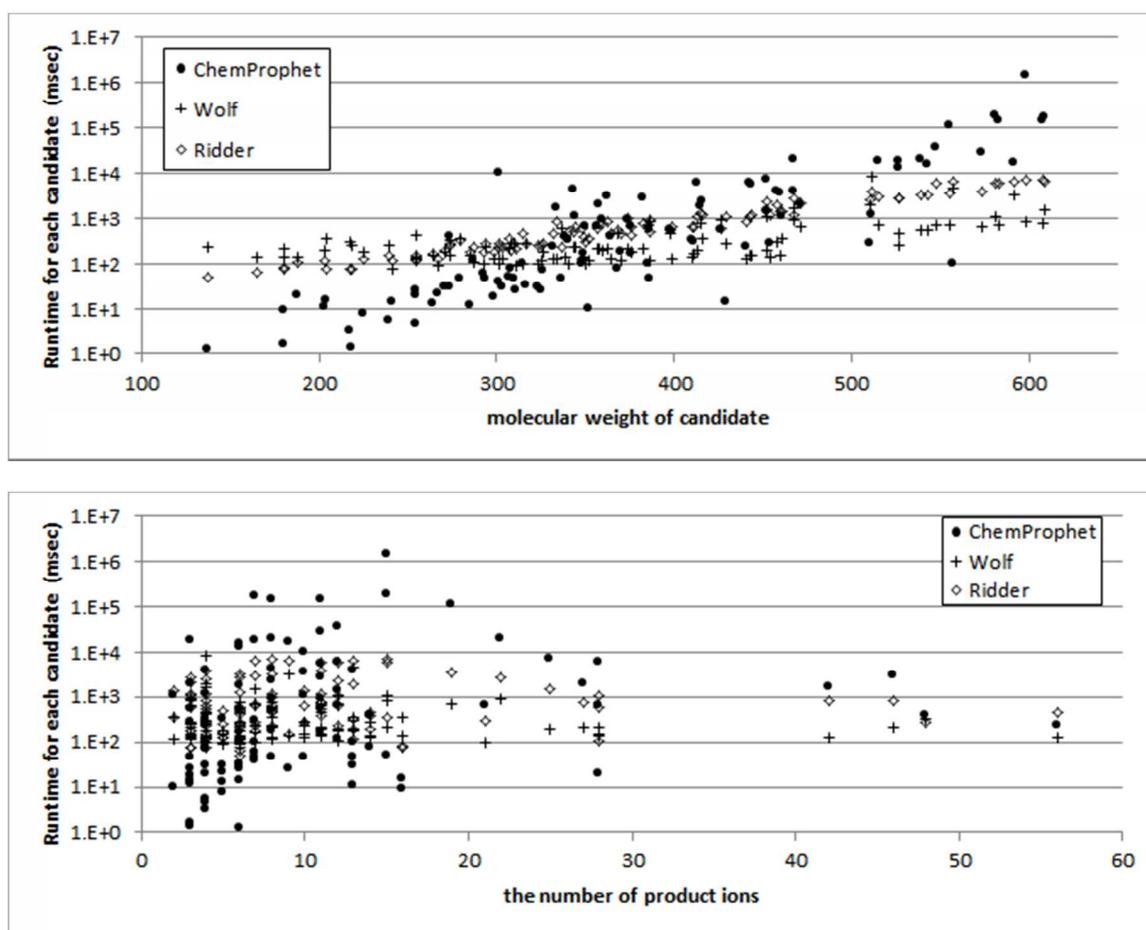


Fig. 2-10 化合物候補の m/z 値 (a) および処理されたプロダクトイオン数 (b) に対する処理時間

## 2.4. 小括

上述の通り，ACD/MS manager を用いた自動帰属による化合物推定方法の構築について検討し，茶葉品評会における順位との相関が示された 20 成分を同定することができた．さらに負イオンに対して帰属を行うため新たな自動帰属方法を開発し，網羅的に部分構造を探索することにより帰属率を向上させることができた．さらにスコアリング方法を改変し，同位体パターン，帰属されたプロダクトイオンの割合，および開裂した結合の元素組成を加味したスコアリング方法を開発した．新たに開発した方法を用いて，既報をベンチマークとした化合物推定結果の比較を行った．これまでに報告されている方法<sup>41-43)</sup>よりも良好な結果を示したことから，本章で開発した化合物推定方法の妥当性が示された．LC/MS に用いるスペクトルライブラリが十分に構築されていない現状において化合物同定が可能な実用的なシステムを構築することが出来たことは，ノンターゲットメタボロミクスにおける LC/MS 分析の実用性を高めるために重要な成果を示すことができた．

# 第3章 データベースに含まれない化合物を 対象とした化合物推定方法の開発

## 3.1. 緒言

生体内に取り込まれた外因性化合物は抱合反応などの代謝を受けて化学構造が変化することにより一般的には無毒化され、体外へ排出されることが知られている。抱合反応は薬物などの外因性化合物にグルクロン酸や硫酸およびグリシンなどの内因性代謝物が付加する反応であり、親水性が高まることにより腎臓や肝臓を経て尿や胆汁へと排出される<sup>34)</sup>。特に抱合反応は外因性化合物に対する防衛手段として考えられており、抱合体は生体に影響を与える化合物のスクリーニングなどにおいても着目すべき代謝物である。過去に報告された尿試料のメタボローム解析においては、アミノ酸や有機酸などの代謝物のほか、摂取した食品などの影響による抱合体が検出されている<sup>36)</sup>。これらが示すように生体試料の分析においては抱合体が検出されることが考えられるため、測定対象を限定せずに解析を行うノンターゲットメタボロミクスにおいてはこれらの化合物を含めた幅広い化合物を対処とした解析が必要になる。

従来より、抱合体の分析には LC/MS や核磁気共鳴 (NMR) が用いられている。LC/MS は親水性の高い化合物を誘導体化することなく分析することが可能であり、質量分析計の構造決定能力は NMR に及ばないものの比較的高感度な分析手法であることから、抱合体の検出や構造解析に広く用いられている<sup>51,52)</sup>。なかでも高分解能質量分析計におけるプロダクトイオンスペクトルは測定対象化合物の部分構造に関する情報を与え、生体試料に含まれる複雑な成分の検出や構造解析を可能にする。既知化合物の抱合体を分析する方法は、医薬品の代謝物構造解析の目的で一般的に用いられている<sup>52)</sup>。この手法では、投与された医薬品などの既知の化合物を起点として、第 相および第 相反応と呼ばれる薬物代謝によって生じる抱合体を予測し、これらの構造式に対して質量分析結果を帰属することで構造解析を行う。医薬品分析では一般に単一の化合物が投与されるが、Ridder らはこの手法を複雑な成分に適応させた。

事前に緑茶に含まれる 75 成分を NMR や標準試料を用いた LC/MS などによって同定し、またカテキンの C 環の開裂などの代謝反応を考慮したうえで、これらの成分から理論上派生しうる抱合体を含む 27425 成分の代謝物リストを作成した。これらに該当する化合物を探索し、PubChem に含まれない 75 成分を含む 97 成分を化合物推定の結果として示した<sup>53)</sup>。しかし、この手法をノンターゲットメタボロミクスで運用するためには投与されるマトリクスの構成成分を事前に明らかにする必要があり、また代謝経路も事前に明らかにする必要があるので、適応可能な試料や投与対象に限られる。抱合体の化合物を推定するほかの手法としては、酵素的もしくは化学的に合成した標準試料との比較分析も従来より報告されており、対象化合物が既知である場合には運用可能である。このように既知化合物を対象とした分析では抱合体の同定を行うことが可能であるが、対象化合物を限定せずに幅広い化合物を探索するノンターゲット分析においては既存の方法を適応することは依然として困難な状態である。そのため、質量分析を用いたノンターゲット分析における抱合体の推定方法では、酸やグルクロニダーゼおよびスルファターゼといった化学的もしくは酵素処理による脱抱合を行った後に推定する方法も運用されている<sup>54)</sup>。ただし、これらのような脱抱合を用いた方法では間接的な同定しかできないため、誤同定のリスクがあるために脱抱合を行わない方法が好まれている<sup>55)</sup>。

第 2 章で示した通り化合物データベースは化合物推定に有用な情報源であるが、抱合体のように情報が不足している化合物も存在する。そこで本章では、化合物データベースに収載されていないグルクロン酸抱合体および硫酸抱合体を対象とした化合物推定システムの開発について報告する。一般に、抱合体は CID によって特徴的なニュートラルロスを生じ、プロダクトイオンとして脱抱合体を生成することが報告されている<sup>52)</sup>。さらにこの脱抱合体の CID を行うことにより脱抱合体の部分構造情報を含むプロダクトイオンスペクトルを得ることが可能であると考えた。このような多段階の CID は MS<sup>n</sup> 分析によって実施することができる。そこで、ChemProphet においてこれらの MS<sup>n</sup> 分析結果の解釈を行うことにより、抱合反応の判別および脱

抱合体の組成推定と、化合物データベースを用いた脱抱合体の化合物推定、推定された脱抱合体から *in silico* で抱合体の候補化合物を生成し、これらの自動帰属によって抱合体の化合物推定を実施するシステムを構築した。

本章では、抱合体標準試料を用いた分析を行い化合物データベースを用いた抱合体のアノテーションが可能であることを確認した。それに引き続き、モデル実験として緑茶由来の抱合体を対象としたアノテーションを試み、構築したシステムの検証を行った。緑茶に含まれるフラボノイドなどの抗酸化物質を含む複雑な成分の生体における挙動を理解するために過去に NMR や化学的に合成された標準試料を用いた代謝物に関して多くの知見が得られており、緑茶の代表的な成分であるカテキンや第 I 相代謝物であるメチル化カテキン、およびその C 環が崩壊した化合物である di-hydroxyphenyl- $\gamma$ -valerolactone や tri-hydroxyphenyl- $\gamma$ -valerolactone などの複数の抱合体の存在が報告されている<sup>56-60</sup>。そこで本研究では緑茶をマウスに投与し、尿中に放出される成分の化合物推定結果からこれらの抱合体が示されるか試みた。

## 3.2. 実験方法

### 3.2.1. 試料および試薬

LCMS 用のギ酸、アセトニトリル、メタノール、そのほかの試薬は和光純薬工業より購入した。また、超純水は Milli-Q Gradient ultrapure water system (Millipore 製) を用いた。ケルセチンのグルクロン酸抱合体 (quercetin 3-glucuronide) は Sigma-Aldrich より購入した。quercetin 3-glucuronide を 1mg/mL となるようにメタノールに溶解して保存溶液を作成し、使用するまで -20°C にて保管した。分析を行う前に保存溶液を希釈溶液にて 1  $\mu$ g/mL に希釈した測定試料を分析装置に注入した。希釈溶液は水/アセトニトリル/ギ酸 (100/100/0.1 (v/v/v)) の混合溶液を用いた。市販されている凍結乾燥緑茶(新茶人 特濃カテキン茶)を味の素ゼネラルフーズより入手した。凍結乾燥緑茶はマウスへの投与に用いた。凍結乾燥緑茶 4 g を水 100 mL に溶

解して作成した緑茶試料をマウスに投与した。

### 3.2.2. マウス尿試料の入手及び試料前処理

7 週齢の Jcl:ICR マウス 8 頭および飼料 (CE-2) をそれぞれ日本クレア株式会社より購入し、緑茶投与群 4 頭およびコントロール群 4 頭の 2 群に分割した。体重は 28.6 – 32.5 g であった。水と飼料を自由摂取とし代謝ケージにて一週間の馴化飼育を行った。その後、水のみを自由摂取とし 18 時間の絶食を行った。緑茶投与群およびコントロール群に対して体重 10 g あたり 50  $\mu$ L の緑茶試料および水を経口投与した。尿の回収は採尿瓶を用い、投与後 24 時間経過した時点で尿を回収した。回収した尿試料は遠心分離を行い、前処理を行うまで -80°C にて保存した。本動物実験は県立広島大学の動物実験委員会の承認を得て県立広島大学生命環境学部生命科学科田井研究室にて行われた。

凍結されたマウス尿を溶解し、尿 300  $\mu$ L にジクロロメタン 300  $\mu$ L を追加し、ボルテックスミキサーおよび超音波処理を行って撹拌した。14,000 g for 5 min にて遠心分離をした後、親水性の上清 200  $\mu$ L を前処理済み試料として回収し、-80°C で分析するまで保管した。

### 3.2.3. 分析装置および分析条件

精密質量 MS<sup>n</sup> 分析には、イオントラップ-飛行時間型質量分析計である LCMS-IT-TOF (島津製作所製) および超高速液体クロマトグラフ Nexera X2 (島津製作所製) を用いた。

ケルセチン-3 グルクロニドの MS<sup>n</sup> プロダクトイオンスペクトルの採取においては、フローインジェクション分析を行った。移動相には水/アセトニトリル/ギ酸 (100/100/0.1 (v/v/v)) を用い、流速は 0.2 mL/min とした。オートサンプラの設定温度は 4°C に設定し、注入量は 5  $\mu$ L とした。質量分析計の設定は以下の通りとした。イオン化には負イオン ESI 法を用いた。ネブライズガス (N<sub>2</sub>) 流量は 1.5 L/min、乾

燥ガス圧力は 0.1MPa , 印可電圧は -3.5 kV , CDL 温度は 200°C , ブロックヒータ温度は 200°C とした . また , 測定範囲は  $m/z$  100-1000 とした . イオン蓄積時間は MS<sup>1</sup> 分析および MS<sup>n</sup> 分析 ( $n \geq 2$ ) においてそれぞれ 10 msec および 30 msec とした . MS<sup>n</sup> 分析のプリカーサーイオンは Data dependent analysis 機能 (DDA) を使用し , 自動的に選択した MS<sup>1</sup> 分析においてもっとも高いイオン強度を示したイオンを MS<sup>2</sup> 分析のプリカーサーイオンとして選択した . MS<sup>n-1</sup> ( $n \geq 2$ ) 分析において , 硫酸抱合の脱離を示すニュートラルロス 80 u もしくはグルクロン酸抱合体の脱離を示すニュートラルロス 176u が検出された場合 , このプロダクトイオンを MS<sup>n</sup> ( $n \geq 2$ ) 分析のプリカーサーイオンとして自動的に選択した . また , スペクトルの飽和を防ぐために Automatic sensitivity control 機能を用いた .

マウス尿試料の分析においては以下の分析条件を用いた . 分析カラムには Shim-pack XR-ODSII (75 mm L  $\times$  2.0 mm I.D., 2.2  $\mu$ m, 島津製作所製) を用いた . カラムオープン温度は 40°C とした . 移動相には 10 mmol/L ギ酸アンモニウム水溶液 (A) および , メタノール (B) を用い , 流速は 0.25 mL/min とした . グラジエントプログラムは 0%B (0.0-3.0 min) , 30 %B (15.0 min) , 98%B (23.0-25.0 min) , 0%B (25.1 min) , STOP (30.00 min) とした . 質量分析における条件は上述の通りとした . 凍結保存された前処理済みマウス尿試料を実験の直前に融解し , 0.2  $\mu$ m PTFE 製フィルターにてろ過し , 2  $\mu$ L を分析装置に注入した .

#### 3.2.4. ピーク検出および多変量解析

ピーク検出 , ピークテーブルの作成 , および同位体ピークの削除には Profiling Solution (島津製作所製) を用いた . 多変量解析には PLS 回帰分析および OPLS 回帰分析を用い , 計算ソフトには SIMCA-P+ ver.12.0 (Umetrics 製) を用いた . データの正規化には pareto scaling を用いた .

### 3.2.5. 化合物推定方法

化合物検索に用いるインターフェースは第 2 章で開発したものに、脱抱合体を検索する機能を追加した。検索クエリには組成式を用いた。検索インターフェースでは、抱合体の推定組成式と MS<sup>n</sup> (n ≥ 2) 分析の結果によって識別された抱合体の種類や数から脱抱合体の組成式を計算し、これを検索クエリに用いて ChemSpider から候補化合物を検索した。検索結果は MDL molfile 形式にて保存された。自動帰属方法、スコアリング、およびランキングについては 2.2.2.3. のスペクトルの自動帰属、スコアリング、およびランキングにて記載した方法を用いた。

### 3.2.6. *in silico* での抱合体生成

脱抱合体の化合物推定結果において示された候補化合物に対して脱抱合体を生成した。ここでは順位による絞込みを用い、10 位までの候補化合物を選択した。抱合体は特定の官能基に対して生じることが知られている<sup>34)</sup>。硫酸抱合体を形成する官能基はヒドロキシ基およびアミノ基を考慮し、グルクロン酸抱合体についてはヒドロキシ基、カルボキシ基、アミノ基、およびチオール基を考慮した。抱合体生成において、候補化合物にこれらの官能基が見つかった場合には硫酸およびグルクロン酸を追加した MDM molfile を生成し、抱合体の化合物推定に用いた。

## 3.3. 結果と考察

### 3.2.7. 化合物データベースに含まれない抱合体を対象とした化合物推定方法の開発

本研究では抱合体のアノテーションを行うために CID による脱抱合を活用した。これまでに、抱合体をプリカーサーとした CID によって脱抱合体が検出され、グルクロン酸抱合や硫酸抱合のほか、グルタチオンやグリシン抱合など、様々な抱合体に特徴的なニュートラルロスが検出されることが知られている<sup>52)</sup>。MS<sup>2</sup> 分析によって得られるこれらのニュートラルロスをトリガーとして自動的にプリカーサイオンを

選択しプロダクトイオンスペクトルを取得する機能 (Data dependent analysis, DDA) を用いた MS<sup>3</sup> 分析によって脱抱合体の部分構造情報自動的に得ることができ  
る .LCMS-IT-TOF は  $n \leq 10$  の MS<sup>n</sup> 分析に対応可能であり ,CID を繰り返すことで複  
数の抱合反応による抱合体にも対応可能である .このようにして脱抱合体の組成式や  
部分構造情報を得ることにより ,化合物データベースを用いた化合物推定が可能にな  
ると考えた .

抱合体を対象とした化合物推定方法の概要を Fig. 3-1 に示した .化合物推定の方法  
は大きく 3 段階に分けられる .第 1 段階は脱抱合体の組成推定 ,第 2 段階は脱抱合体  
の化合物推定 ,そして第 3 段階は抱合体構造の生成とそれを用いた化合物推定である .  
第 1 段階では ,MS<sup>n</sup> 分析結果を用いて抱合体の組成式を推定する .また DDA の結果  
から抱合反応の種類や数といった抱合反応に関する情報を推定する .そして ,抱合体  
の組成式と抱合体情報から脱抱合体の推定組成式を得る .次に第 2 段階の脱抱合体の  
化合物推定を行う .得られた脱抱合体の組成式を用いて化合物データベースを用いて  
化合物候補を検索し ,脱抱合体のプロダクトイオンの自動帰属を行うことにより脱抱  
合体の化合物候補を推定する .そして ,第 3 段階の抱合体に関する化合物推定を行う .  
抱合体は特定の官能基に対して反応することが知られているので ,脱抱合体の候補化  
合物の構造式から抱合体構造を計算しこれを抱合体の候補化合物とする .その抱合体  
に対して MS<sup>2</sup> 分析結果の自動帰属を行い ,抱合体のスコアリングおよびランキング  
を行う .この結果 ,化合物データベースに掲載されていない抱合体の化合物候補を得  
ることが可能になる .

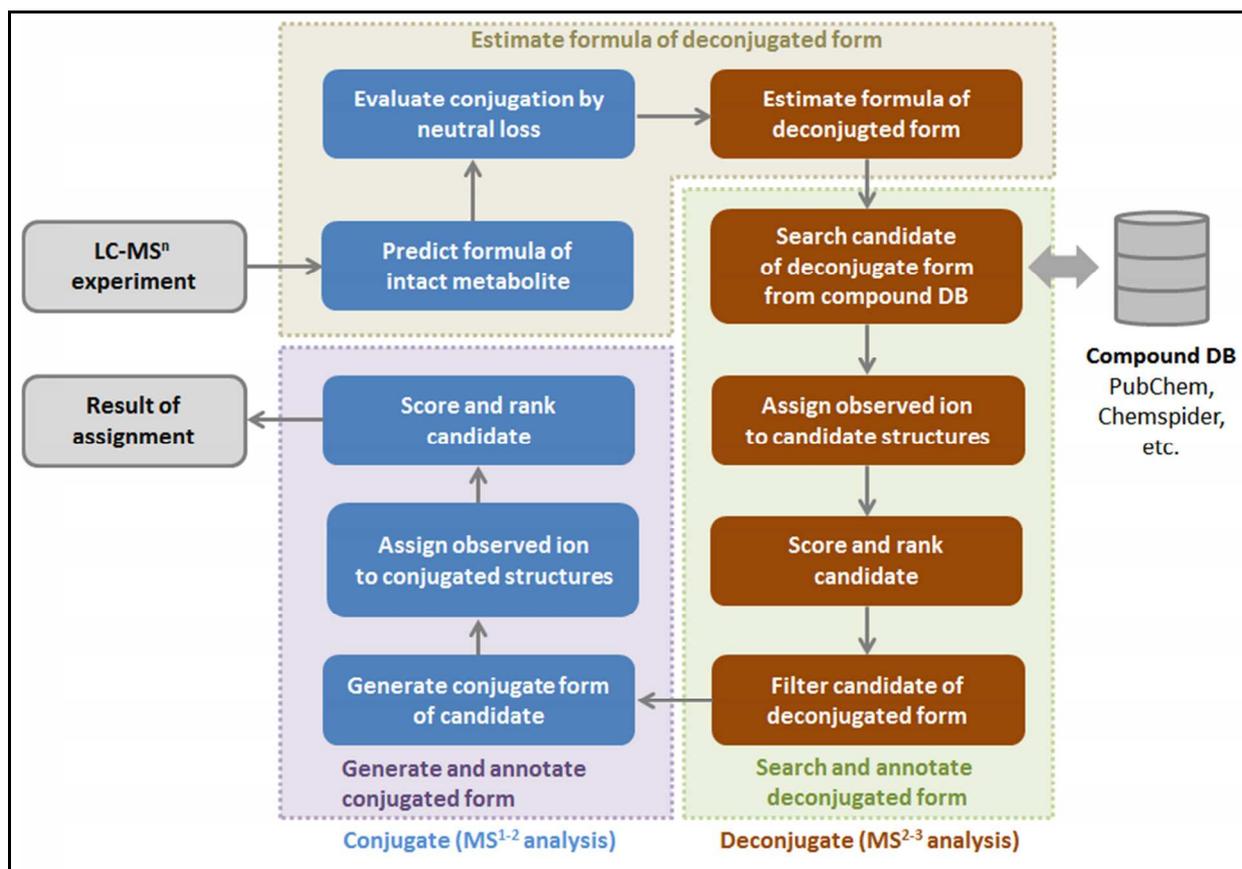


Fig. 3-1 化合物データベースに掲載されていない抱合体を対象とした化合物推定方法の概要

### 3.2.8. Quercetin 3-glucuronide の標準試料を用いた抱合体の同定

新たに開発した手法によって抱合体の化合物推定結果が得られることを確認するために、ケルセチン-3 グルクロニド (quercetin 3-glucuronide) の標準試料を用いて化合物推定を行った。MS<sup>1</sup> 分析の結果において脱プロトン分子に相当する  $m/z$  477.0680 が検出された。この抱合体の脱プロトン分子をプリカーサーイオンに用いた MS<sup>2</sup> 分析の結果、 $m/z$  301.0354 が検出された。このイオンのニュートラルロス 176 u はグルクロン酸の脱離を示している。このイオンは脱抱合体であるケルセチンの脱プロトン分子に相当し、理論値との質量誤差は 0.1 mDa および 0.2 ppm であった。予め設定された DDA によりこの脱抱合体イオンをプリカーサーとした MS<sup>3</sup> 分析が自動的に実施され、脱抱合体の部分構造情報を含むスペクトルを得た。この MS<sup>1-3</sup> 分析の結果から組成推定を行った結果、正解の組成 C<sub>21</sub>H<sub>18</sub>O<sub>13</sub> が第 1 位にランクされた。正解を含むこれらの組成から脱抱合体の組成を計算し ChemSpider で検索した結果、

59 個の候補化合物を得た．これらの候補化合物に対してランキングを行った結果，quercetin が 15 位にランクされた．このうち 14 の候補化合物は quercetin と同じスコアを示した．この結果から，DDA を用いた MS<sup>n</sup> 分析結果と化合物データベースを用いて脱抱合体の候補化合物を推定可能であることが示された．

また，候補化合物の抱合体構造を *in silico* で作成した結果，125 個の候補化合物が作成された．これらを用いて自動帰属を行ったところ quercetin 3-glucuronide は 10 位に示され，9 つの抱合体の構造式が同じスコアを示した．これらの候補化合物の構造式を Fig. 3-2 に示した．いずれも類似の骨格を持つ化合物であり，同じ位置にグルクロン酸が抱合した構造を有することが示された．quercetin にはグルクロン酸抱合体を形成しうるヒドロキシ基を全部で 5 つ有するが Fig. 3-3 に示したように *m/z* 107 および 151 の帰属結果において差異があり，3 位に結合した抱合体が最も penalty value が低く良好な帰属結果を示した．これにより 3 位に抱合していることが推測された．

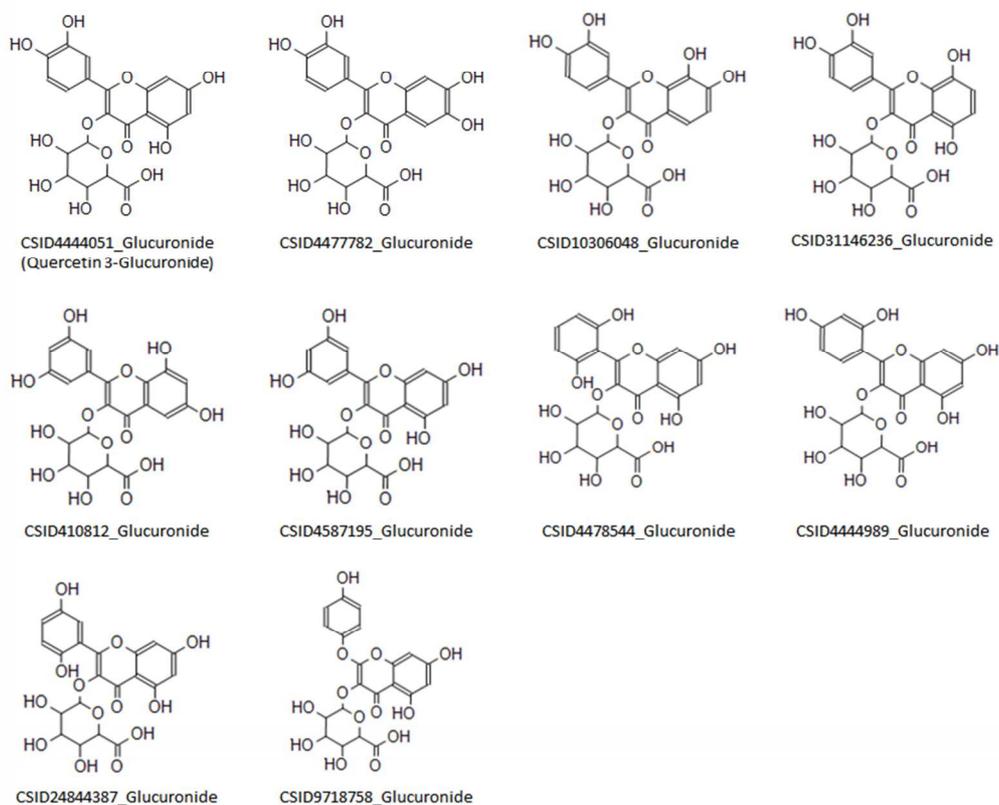


Fig. 3-2 化合物推定の結果示された quercetin 3-glucuronide およびその他の候補化合物

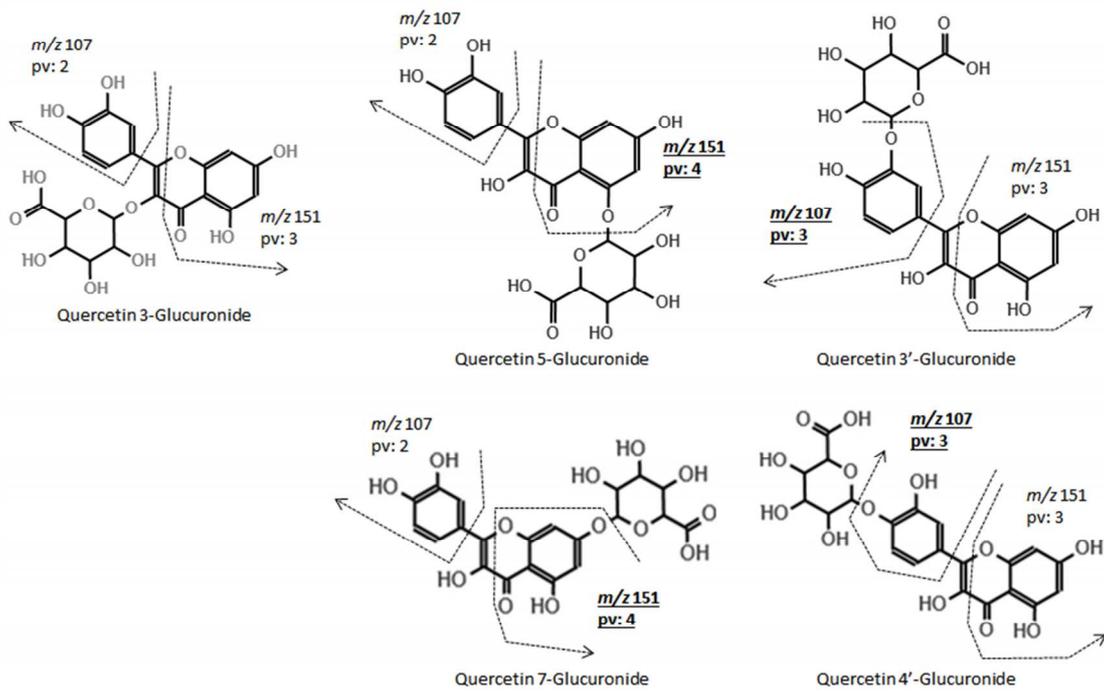


Fig. 3-3 quercetin glucuronide における 5 種類の異性体構造式の帰属結果 .  
 プロダクトイオンの  $m/z$  値と penalty value (pv) を併記した .

### 3.2.9. 緑茶を投与したマウス尿に含まれる抱合体の探索および化合物推定

緑茶を投与したマウスの尿に含まれる抱合体をモデルとして化合物推定を行った。本研究では尿中に放出される代表的な抱合体であるグルクロン酸抱合体および硫酸抱合体を対象とした。これらは酸性化合物であることからイオン化法として負イオン ESI を選択した。DDA はグルクロン酸抱合体のニュートラルロス 176 u および硫酸抱合体のニュートラルロス 80 u を対象として 3 つまでの抱合反応に対応できるように MS<sup>5</sup> まで設定した。

緑茶投与群およびコントロール群のマウス各 4 匹ずつの 24 時間尿を分析に用いた。尿抽出液の繰り返し分析 (n=3) を行い、各群 12 データを取得した。Fig. 3-4 には各群の代表的な TIC クロマトグラムを示した。全 12 データの分析結果から Profiling Solution を用いて 3105 ピークを検出した。これらのピークから緑茶代謝物を探索するために、OPLS-DA による解析を行った (Fig. 3-5)。Fig. 3-5b の S-plot に示された緑茶代謝物のなかで、*m/z* 287, 369, 399, 481 の 4 成分が抱合体に特徴的なニュートラルロスを示した。

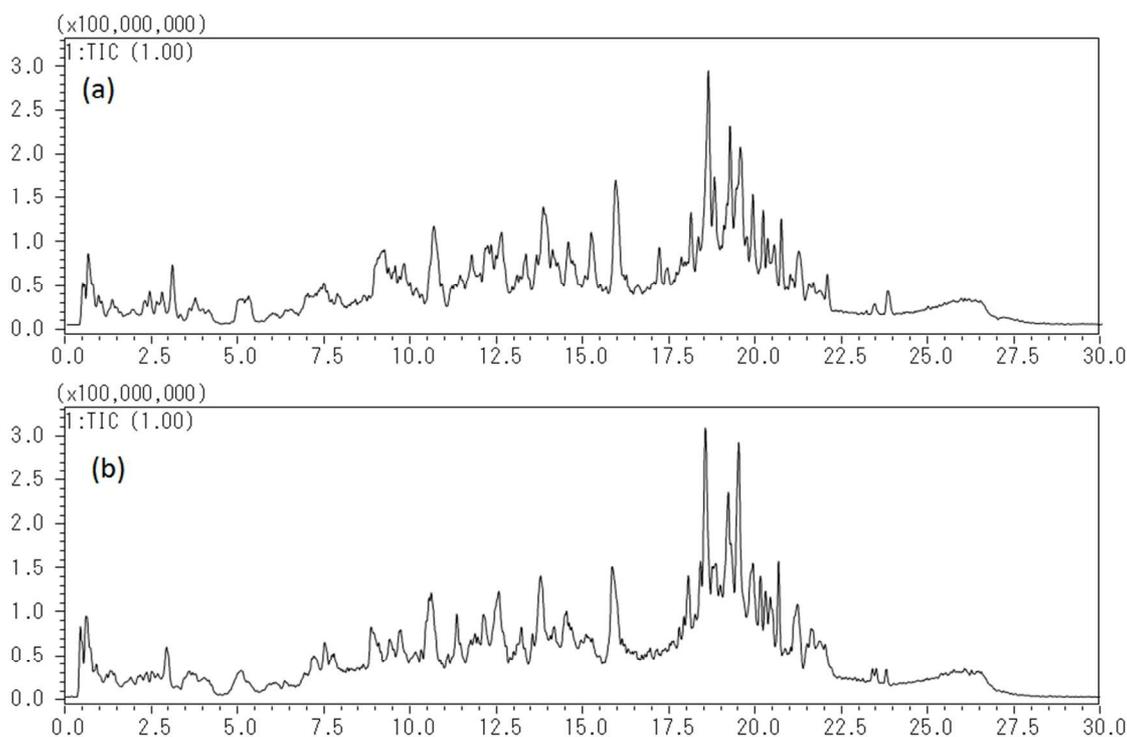


Fig. 3-4 マウス尿抽出試料の TIC クロマトグラム  
a) 緑茶投与群, b) 水投与群 (コントロール)

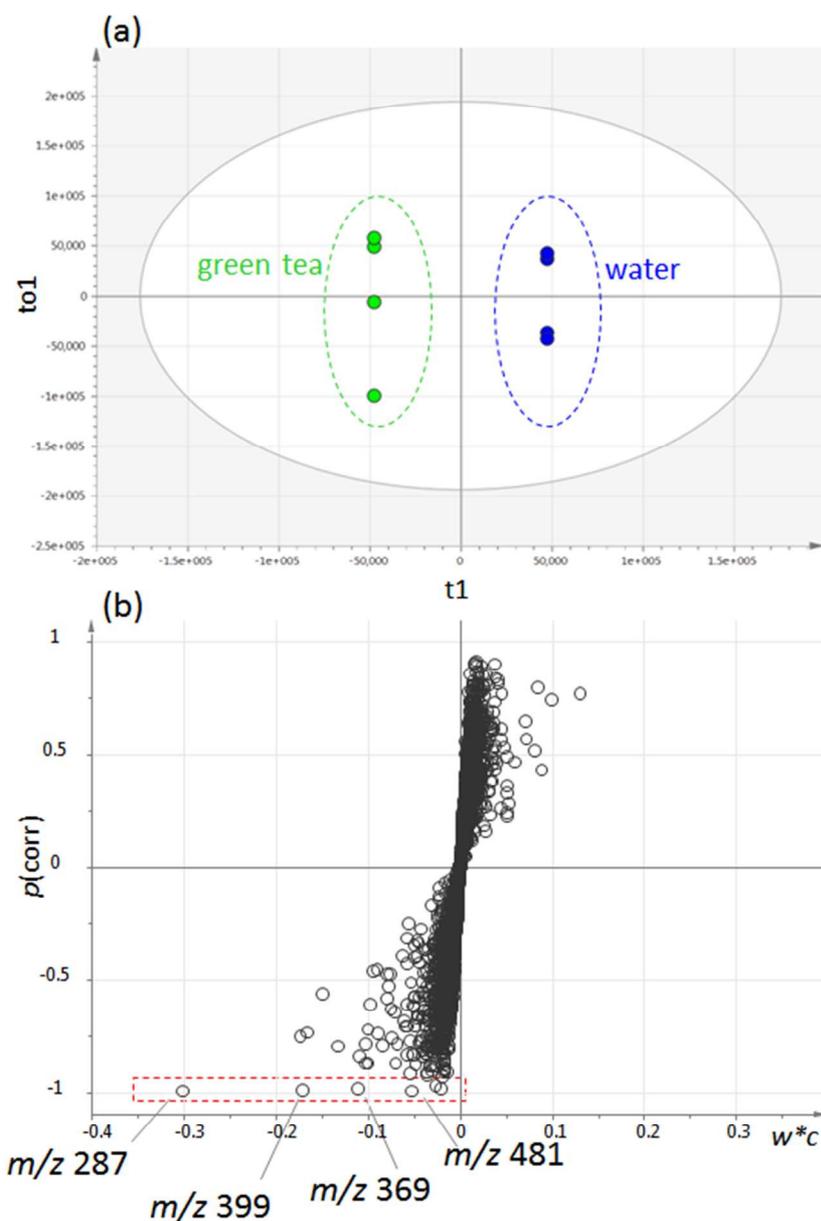


Fig. 3-5 緑茶投与マウス尿抽出試料の OPLS 回帰分析結果  
a) score plot , b) S-plot .

抱合体であると推測される 4 成分の化合物推定を行った . 各ピークの MS<sup>n</sup> 分析結果を確認したところ ,マウス尿抽出試料の DDA では MS<sup>3</sup> 分析までが実施されていたことから ,それぞれ 1 分子のグルクロン酸もしくは硫酸が付加した抱合体であることが分かった .m/z 287 の化合物推定を行った結果 ,di-hydroxyphenyl - $\gamma$ -valerolactone の硫酸抱合体が示された . MS<sup>2-3</sup> 分析における構造解析の結果を Fig. 3-6 に示した .

ここでは 3'位の酸素原子に硫酸が抱合した例を示している .MS<sup>2</sup> 分析では抱合体からの硫酸の脱離に相当するニュートラルロス 80 u を示すプロダクトイオンや , 硫酸抱合体を含む部分構造を示すプロダクトイオンが検出された . 脱抱合体をプリカーサーイオンとした MS<sup>3</sup> 分析結果では , 脱抱合体の部分構造を示す複数のイオンが検出された . MS<sup>3</sup> 分析結果を用いた脱抱合体の帰属における di-hydroxyphenyl- $\gamma$ -valerolactone のランキングは 6 位であったが ,MS<sup>2</sup> 分析結果を併用した結果において脱抱合体のランクとしては di-hydroxyphenyl- $\gamma$ -valerolactone が 1 位に示された . この抱合体において , 3' 位の酸素原子および 4' 位の酸素原子に硫酸が抱合した 2 種類の硫酸抱合体が考えられるが , これらは識別されずどちらも 2 位となった . この di-hydroxyphenyl- $\gamma$ -valerolactone はカテキンの C 環が崩壊することで生成される代謝物であることが報告されている . Li らはカテキンを投与したヒト , マウス , ラットの尿から検出された代謝物の NMR<sup>57)</sup> や標準試料を用いた質量分析<sup>58)</sup> を行い , マウス尿から di-hydroxyphenyl- $\gamma$ -valerolactone-*O*-sulfate を同定した . これらの報告は , *m/z* 287 の化合物が di-hydroxyphenyl-  $\gamma$ -valerolactone-*O*-sulfate であることを裏付けている .

*m/z* 369 , 399 , 481 の候補化合物としてそれぞれ catechin-*O*-sulfate , *O*-methyl-gallocatechin-*O*-sulfate , gallocatechin-*O*-glucuronide およびその類縁体 が示された (Table 3-1) . これらの候補化合物も , NMR 分析や合成された試料を用いた LC-MS 分析によって , 緑茶に含まれる catechin に由来する尿中代謝物であることがこれまでに報告されている<sup>56-58)</sup> .

*m/z* 369 の catechin-*O*-sulfate は抱合する位置によってわずかに異なる帰属結果が示された . Fig. 3-7 に示した catechin の構造から , catechin-*O*-sulfate には 5 種類の異性体が考えられるが , 自動帰属の結果では構造によって異なるスコアが得られ , B 環の 3' 位もしくは 4' 位に硫酸が抱合した構造がわずかに高いスコアを示した (Fig. 3-8) . マウス尿における catechin の硫酸抱合体の詳細な構造解析は報告されていないが , Romanov-Michailidis らは epicatechin の B 環に硫酸が結合した抱合体を化学合

成し、これらがヒトの生体試料から検出されたことを示した<sup>61)</sup>。また、Dueñas らが示した液体クロマトグラフ-イオントラップ型質量分析計を用いて測定した合成品の分析結果は、3'および4'-*O*-sulfate のプロダクトイオンでは  $m/z$  231 が特徴的に検出され、5 および 7-*O*-sulfate からは  $m/z$  247 が特徴的に検出された<sup>62)</sup>。今回得られたプロダクトイオンを比較すると、 $m/z$  231 の強度が高く、 $m/z$  247 はほとんど検出されていないことから今回の成分も 3'もしくは4'-*O*-sulfate であると考えられる。 $m/z$  399 の *O*-methyl-gallocatechin の帰属結果を Fig. 3-9 に示した。 $m/z$  217 の帰属結果は B 環への硫酸抱合を示唆しており、3'位の酸素原子に硫酸が抱合しているという結果が示された。 $m/z$  481 については構造を示すプロダクトイオンが得られず、5 種の抱合体が同じスコアを示した。

ここで、化合物推定の結果として示された抱合体が ChemSpider に収載されているか確認を行った。具体的には各組成式で検索を行い、今回検討した抱合体が検索結果に含まれているかを確認した。その結果、 $C_{11}H_{12}O_7S$  および  $C_{16}H_{16}O_{10}S$  の組成式を用いた検索結果からは、di-hydroxyphenyl- $\gamma$ -valerolactone-*O*-sulfate および *O*-methyl-gallocatechin-*O*-sulfate は示されず、ChemSpider には収載されていないことが判明した。また、 $C_{15}H_{14}O_9S$  の検索結果では、catechin-*O*-sulfate の異性体である *C*-sulfate が収載されているものの、今回示された *O*-sulfate は収載されていなかった。また、gallocatechin-*O*-glucuronide については 5 種類の異性体が考えられるが、 $C_{21}H_{22}O_{13}$  の検索結果では 4 種類だけが収載されていた。

以上の結果から、精密質量  $MS^n$  分析および化合物データベースを用いた脱抱合体の候補化合物探索を行うことにより、化合物データベースには掲載されていない抱合体を対象としたアノテーションが可能であることが示された。

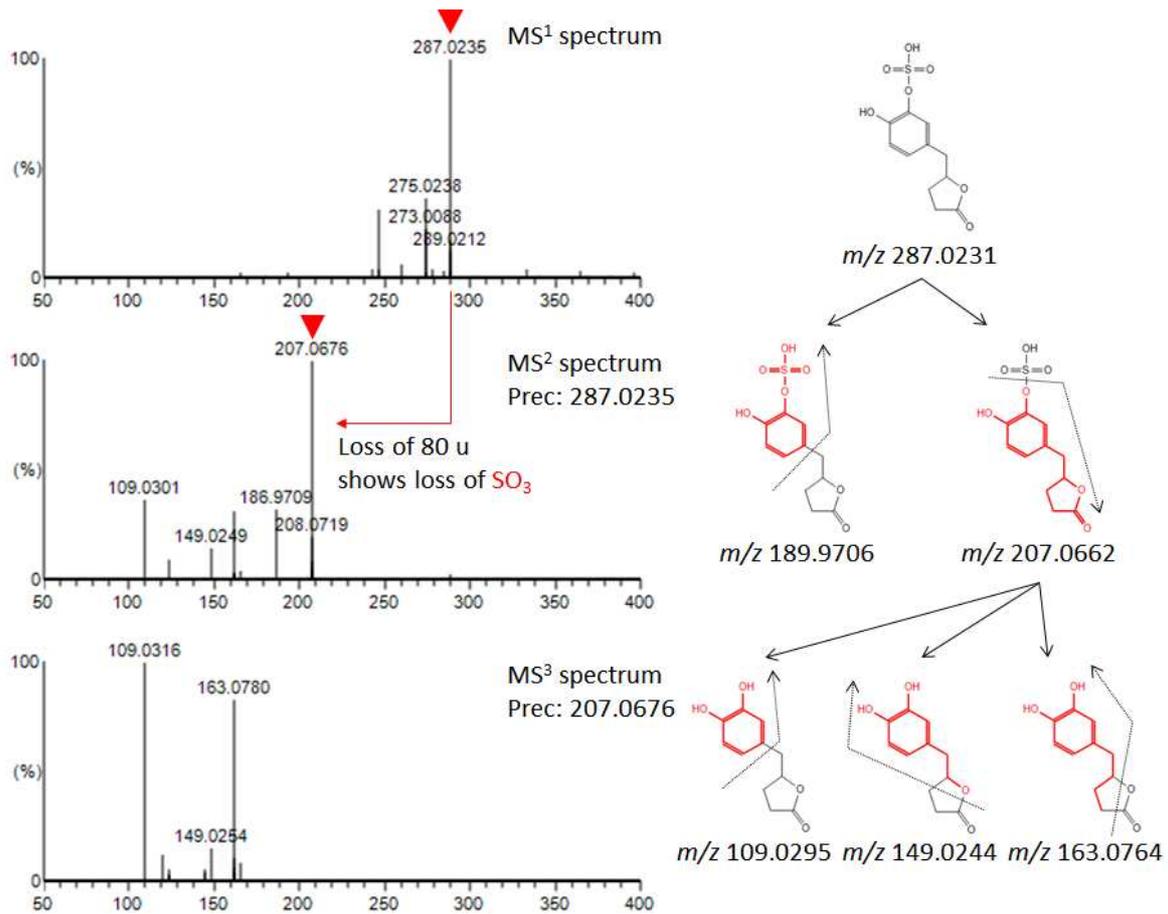
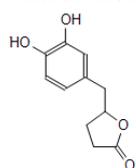
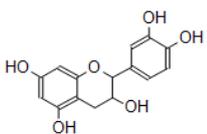
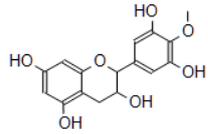
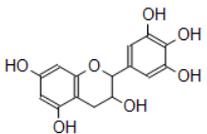


Fig. 3-6  $m/z$  287 の MS<sup>1-3</sup> 分析結果と、自動帰属により示された部分構造．  
 部分構造の下には理論値の  $m/z$  値を示した．

Table. 3-1 緑茶代謝物の化合物推定結果

	<i>m/z</i> 287	<i>m/z</i> 369	<i>m/z</i> 399	<i>m/z</i> 481
Conjugation	sulfate	sulfate	sulfate	glucuronide
Formula (conjugate)	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub> S	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>9</sub> S	C <sub>16</sub> H <sub>16</sub> O <sub>10</sub> S	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>13</sub>
Formula (deconjugate)	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	C <sub>16</sub> H <sub>16</sub> O <sub>7</sub>	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>
Compound name and structure (deconjugate)	di-hydroxyphenyl-γ-valerolactone 	catechin 	O-methyl-gallocatechin 	Gallocatechin 
Rank of deconjugated compound	1	7	5	4
# of Candidate	1015	412	514	203
Existence of conjugated form in ChemSpider	Not listed	two isomers other than candidate	Not listed	four isomers including candidate
Predicted site of conjugation	3'-O or 4'-O	3'-O or 4'-O	3'-O	Not specified

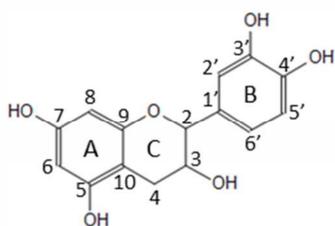


Fig. 3-7 catechin の構造式 .

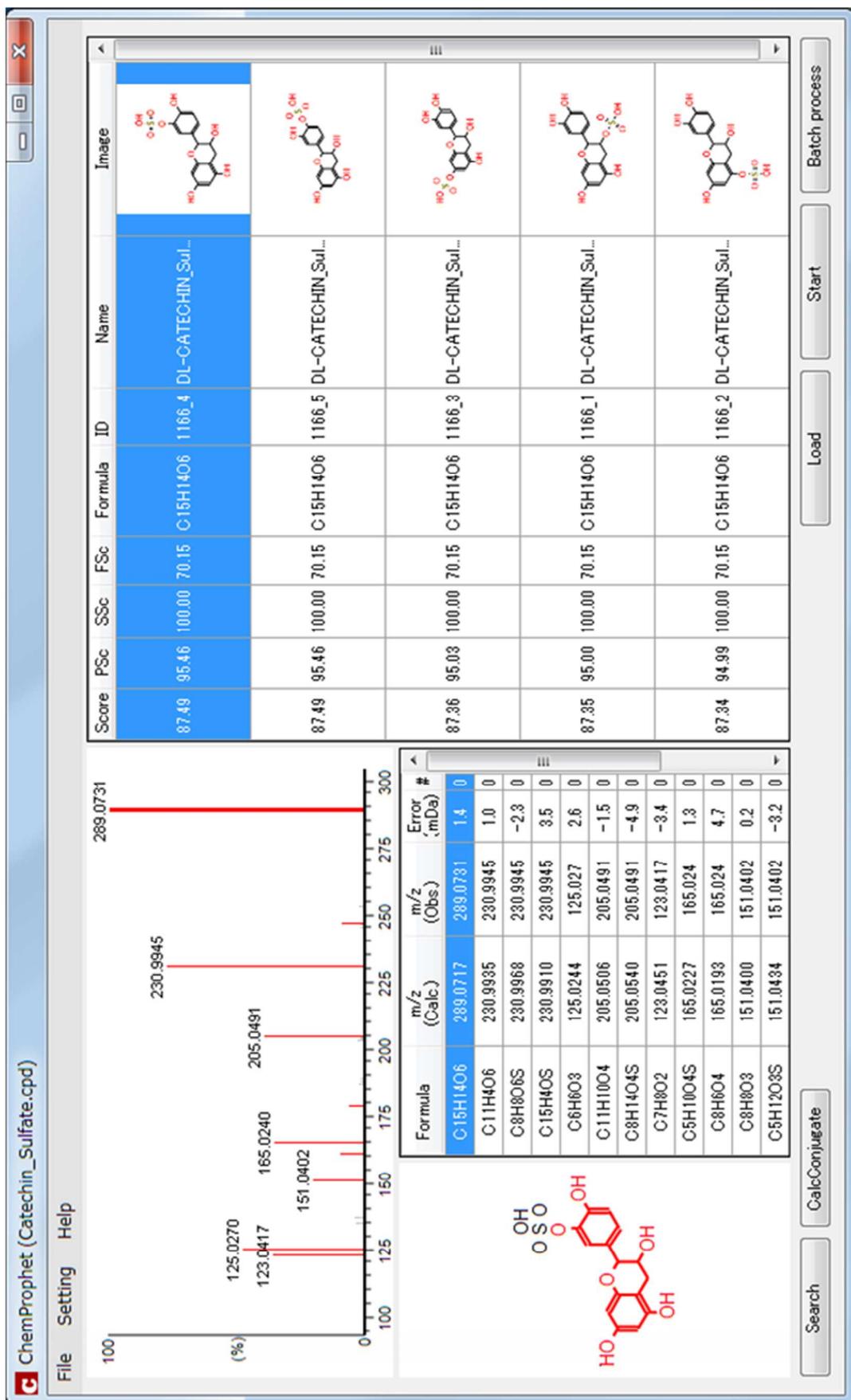


Fig. 3-8 Catechin-*O*-sulfate の 5 種類の異性体における帰属結果

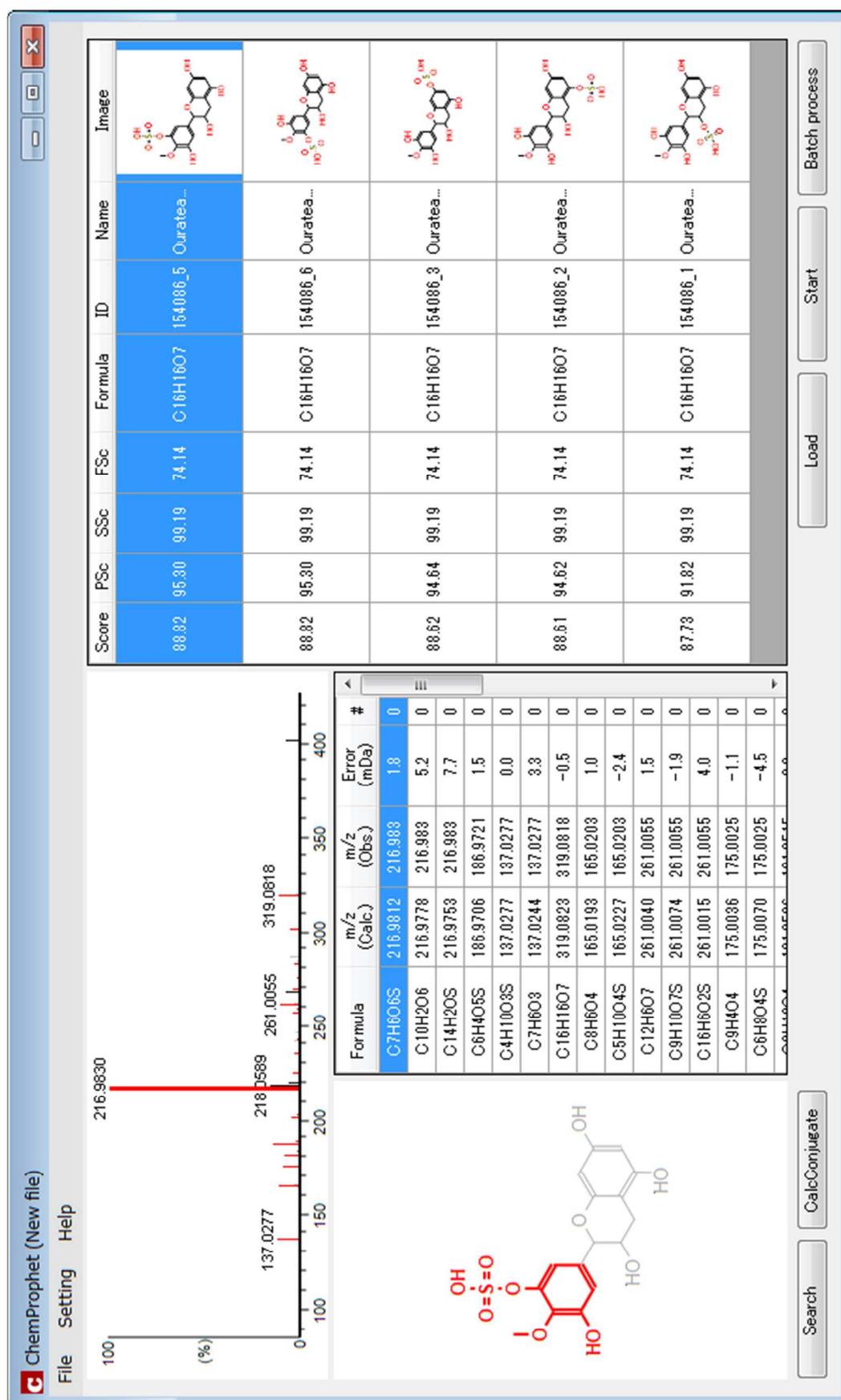


Fig. 3-9 Catechin-*O*-sulfate の 5 種類の異性体における帰属結果

### 3.4. 小括

LC-MS データのアノテーションにおいて化合物データベースは有効な情報源である。化合物データベースは日々追うごとに進化しているが、抱合体に関してはいまだレコードの数は不足している。その結果として、LC-MS はイオン化や感度の点で抱合体の分析に優れた方法であるが抱合体の同定は困難であった。そこで本章では、化合物データベースに掲載されていない抱合体のアノテーション方法開発の開発を目的として、新たなシステムを構築した。抱合体の探索例としてケルセチン-3 グルクロニドの標準試料を用い化合物推定を行った。さらに、ここではモデル実験として緑茶を投与したマウス尿に含まれる代謝物を分析し、4 種類の抱合体を探索することができた。本研究では尿中抱合体として重要なグルクロン酸および硫酸抱合体をターゲットとして分析を行ったが、抱合反応はこれらのほかにグルタチオン、グリシンなどのアミノ酸や、メチル化、アセチル化などが知られている。これらの抱合反応は特異的なニュートラルロスを示すことが知られており<sup>52)</sup>、ChemProphet のアプローチを応用することが可能であると考えられる。

## 第4章 総括と展望

### 4.1. 総括

本論文では「液体クロマトグラフィー質量分析を用いたノンターゲットメタボロミクスに資する化合物推定方法の開発」と題し、プロダクトイオンスペクトルの解析に基づく化合物推定方法の開発と、化合物データベースに掲載されていない化合物を対象とした化合物推定方法の開発について述べた。

LCMS を用いたノンターゲットメタボロミクスは幅広い性質の化合物を対象とした解析手法であるが、その一方で化合物を推定することは困難である。GC/MS における化合物の推定方法はスペクトルライブラリを用いた方法が一般的であるが、GC/MS との比較においては LC/MS に用いるスペクトルライブラリに掲載されている化合物数が不足していることがその理由の一つである。また、化合物データベースは膨大な化合物に関する情報を含むが、その結果として得られる候補化合物が膨大になるためこれらの合理性を評価する必要がある。また、膨大な化合物を収載する化合物データベースであっても、全ての化合物を網羅するにはいたっておらず、化合物データベースに含まれない化合物の推定は困難である。

第2章では、候補化合物の合理性評価方法について検討を行った。化合物データベースを用いた化合物推定は以下のステップに基づいている。(1) 精密質量もしくは推定組成式をクエリとして化合物データベースから候補化合物を得て、(2) プロダクトイオンスペクトルの自動帰属を行い、(3) 合理性を評価するためのスコアリングにより各候補の評価を行う。本研究では新たな評価方法と自動帰属方法を含む化合物推定方法について検討した。組成式の妥当性を示す新たな評価方法と市販ソフトウェアである ACD/MS manager との組み合わせによる手法を開発し、緑茶に含まれる成分の化合物推定を実施した。その結果として示された化合物のうち標準試料が入手可能であったカフェインやカテキン類について標準試料を用いた分析を行い、正解が示されていることが確認できた。さらに、負イオンを対象とした帰属率を向上させることを目

的として網羅的な部分構造の探索による新たな帰属方法を開発した。既存の網羅的な方法は候補化合物の構造から予測プロダクトイオンを得て実測プロダクトイオンと比較する方法であるが、新たに開発した方法はプロダクトイオンに対して部分構造を推定する方法である。これに伴い、網羅的な帰属結果に適した評価方法として、開裂した結合を評価するスコアリングについて検討を行った。これらをまとめて新たな帰属ソフトウェアを開発し、ChemProphet と名付けた。ChemProphet を用いてベンチマークデータセットの化合物推定を行ったところ、既報の方法よりも良好な化合物推定結果を得ることができた。

化合物データベースの収載数は非常に膨大であり日々進歩しているため化合物推定には有効なリソースであるが、これまでの化合物推定は化合物データに収載される化合物に限られており、予測される全ての化合物を網羅するには至っていない。そこで、第3章では、化合物データベースに含まれていない化合物の推定を目的としてシステムの構築について検討を行った。尿中代謝物として重要なグルクロン酸および硫酸抱合体は化合物データベースに含まれていない代表的な化合物であるため、本研究ではこれらについて検討を行った。抱合体の化合物推定方法を開発する上で、CIDによって各抱合体に特有の脱抱合反応が起こることに着目した。さらに生じた脱抱合体をプリカーサーとした  $MS^n$  分析によって、脱抱合体の部分構造情報を得ることができる。これらの情報を統合することにより、化合物データベースから脱抱合体を検索し化合物推定を行う。さらにコンピューターによる計算によって抱合体構造を推定し、これらを候補として化合物推定を行うことで最終的に抱合体の化合物推定が可能になると考えた。そこで、これらの考えに基づく機能を実装し、抱合体の化合物推定方法を開発した。抱合体の標準試料および緑茶投与マウスの尿中抱合体を対象としたモデル分析を行い、開発したシステムの妥当性を確認することができた。化合物データベースの検索方法を改変することにより、化合物に含まれない抱合体の化合物推定が可能であることが示された。また、抱合体の結合位置についても全ての位置異性体を区別することはできないが、ある程度は推測できることが示された。

本研究で新たに採用した精密質量および同位体パターンを用いた組成式に関するスコアリングや新たな計算式を用いた部分構造のスコアリングは化合物の評価に有効であることが示された。また、新たな化合物検索方法を考慮することにより、データベースに含まれない化合物を対象とした推定方法を提案することができた。

## 4.2. 展望

メタボロミクスでの対象は内因性代謝物だけにとどまらない。本研究で用いた化合物データベースにはアミノ酸や有機酸およびカテキン類などの代謝物のほかにも、医薬品類や化成品などの様々な化合物が収載されている。そのため、内因性代謝物以外にも様々な化合物に応用可能である。例えば、Al-Salhi らは環境水に含まれる汚染物質の生体への影響を調査するなかで様々な手作業によって化合物推定を実施しており、下水放流水に暴露された魚の生体試料から多くの外因性化合物を推定した。<sup>63)</sup> 化合物推定結果として界面活性剤、殺菌剤、医薬品などの化成品が示された。なかにはグルクロン酸抱合体や硫酸抱合体を酵素によって脱抱合し、GC/MS などを用いて推定された化合物も含まれていた。これらは全て ChemSpider に収載されているため、本研究で開発した手法を用いることでこれらの化合物を推定することが可能である。

また、今回開発した手法はグルクロン酸や硫酸抱合体の脱抱合を示す特徴的なニュートラルロスに焦点をおいたものであるが、同様の手法がほかの化合物に対しても応用が可能である。例えば植物の二次代謝物に多く見られる配糖体も同様に推測が可能である。Table 4-1 に示すようにこれらの化合物は  $C_6H_{10}O_5$  に相当する 162 u のニュートラルロスを共通して示すことが知られている<sup>64)</sup>。ただし、アグリコンに対して二糖や三糖などが付加した化合物からは単糖ではなく二糖や三糖が脱離したニュートラルロスが生じる可能性もある。このような化合物に対しては 342 Da や 522 Daなどをニュートラルロスとしてモニターすることにより、化合物を推定することが可能になると考えられる。

Table 4-1 配糖体に特徴的なニュートラルロス . 文献 63 より table 1 を引用 . X, Y, Z は配糖体の開裂位置を示しており , Y がアグリコンを示す .

Fragments	Hexoses	Deoxyhexoses	Pentoses
	Masses (Da)		
$-^{0,1}X$	150 <sup>b,c</sup>	134 <sup>b</sup>	120 <sup>b</sup>
$-^{0,2}X$	120 <sup>a,b</sup>	104 <sup>b</sup>	90 <sup>a,b</sup>
$-^{0,3}X$	90 <sup>a,c</sup>	74 <sup>d</sup>	60 <sup>a</sup>
$-^{1,5}X$	134 <sup>b</sup>	120 <sup>b</sup>	104 <sup>b</sup>
$-^{2,3}X-2H_2O$	66 <sup>c</sup>	66 <sup>d</sup>	
$-^{0,4}X-2H_2O$	96 <sup>b,c</sup>	80 <sup>b</sup>	66 <sup>b</sup>
$-^{0,2}X-H_2O$	138 <sup>a,b</sup>	122 <sup>b</sup>	108 <sup>b</sup>
$-^{0,2}X-2H_2O$	156 <sup>b</sup>	140 <sup>b</sup>	126 <sup>b</sup>
$-^{2,3}X-3H_2O$	84 <sup>d</sup>	84 <sup>d</sup>	
$-Y_i$	162 <sup>a</sup>	146 <sup>b</sup>	132 <sup>b</sup>
$-Z_i$	180 <sup>a</sup>	164 <sup>a</sup>	150 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>Ref. Ferreres et al., 2007.

<sup>b</sup>Ref. Li & Claeys, 1994.

<sup>c</sup>Ref. Waridel et al., 2001.

<sup>d</sup>Ref. Vukics et al., 2008.

化合物推定はノンターゲットメタボロミクスに限らず , ノンターゲット分析に共通する課題である . 本研究で開発された手法は幅広い化合物に対する推定を可能にする重要な基盤技術であり , 様々な分析対象への応用が期待される .

# 謝辞

本論文は著者が大阪大学大学院工学研究科博士後期課程在学中に福崎英一郎 教授の指導の下において行った研究をまとめたものです。本研究を遂行するにあたり、大阪大学大学院工学研究科福崎教授には日頃から多くなるご指導とご鞭撻を賜りました。厚く御礼申し上げます。

本論文の作成にあたり大阪大学大学院工学研究科 村中俊哉 教授ならびに大阪大学大学院工学研究科 藤山和仁 教授には多くのご指導とご助言を賜りました。ここに厚く御礼申し上げます。

大阪大学大学院工学研究科 馬場健史 特任教授には、研究テーマの選択や結果の考察、および論文作成など、研究全般にわたり日頃から格別のご指導と温かい激励のお言葉を賜りました。厚く御礼申し上げます。

県立広島大学生命環境学部生命科学科田井章博教授には本研究に用いたマウス尿試料の作成など、多大なるご指導とご協力を賜りました。厚く御礼申し上げます。

大阪大学大学院工学研究科 小野比佐好 助教には本研究を進めるにあたり様々なご協力を頂きました。厚く御礼申し上げます。

また、大阪大学大学院工学研究科福崎研究室の諸先輩方、学生の皆さん、研究員の方々、および事務担当の皆様には、研究に関するディスカッションや情報共有および研究生生活を行うに際しての相談など様々なご協力を賜りました。厚く御礼申し上げます。

また、株式会社島津製作所のアプリケーション開発メンバーには、時間の限られているなかで実験に関してご協力を頂きました。厚く御礼申し上げます。

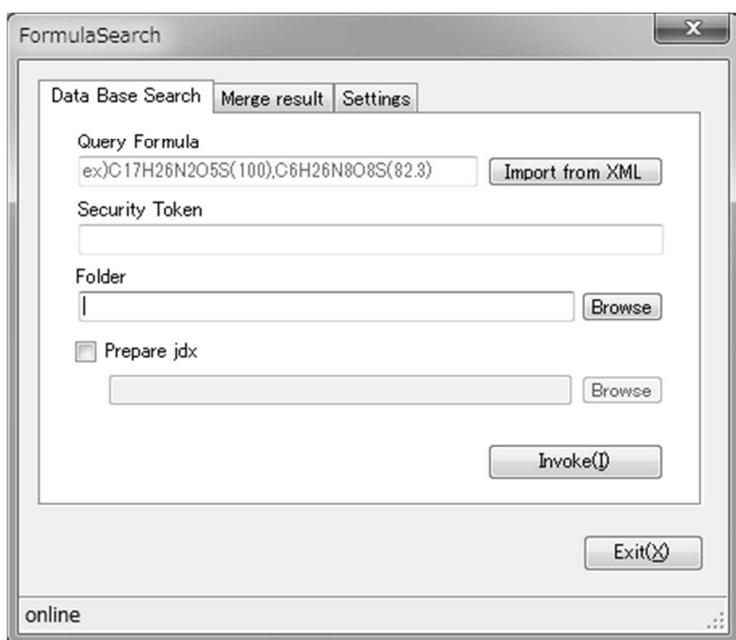
最後に、いつも応援して頂いた多くの友人や、辛抱強く支え環境を整え続けてくれた家族に対し、深い感謝の意を表して謝辞といたします。

# 付録

## ACD/MS manager を用いたユーザーインターフェース

ChemSpider を用いて化合物検索を行うユーザーインターフェース (a) を用いて化合物検索の結果 (b) を得た後に, ACD/MS manager を用いた帰属 (c) を実施する. 帰属結果をユーザーインターフェースに取り込むことにより final score が計算され最終的な結果が HTML 形式にて出力される (d).

a) 化合物検索および推定結果を出力するためのインターフェース



b) 化合物候補の検索結果.

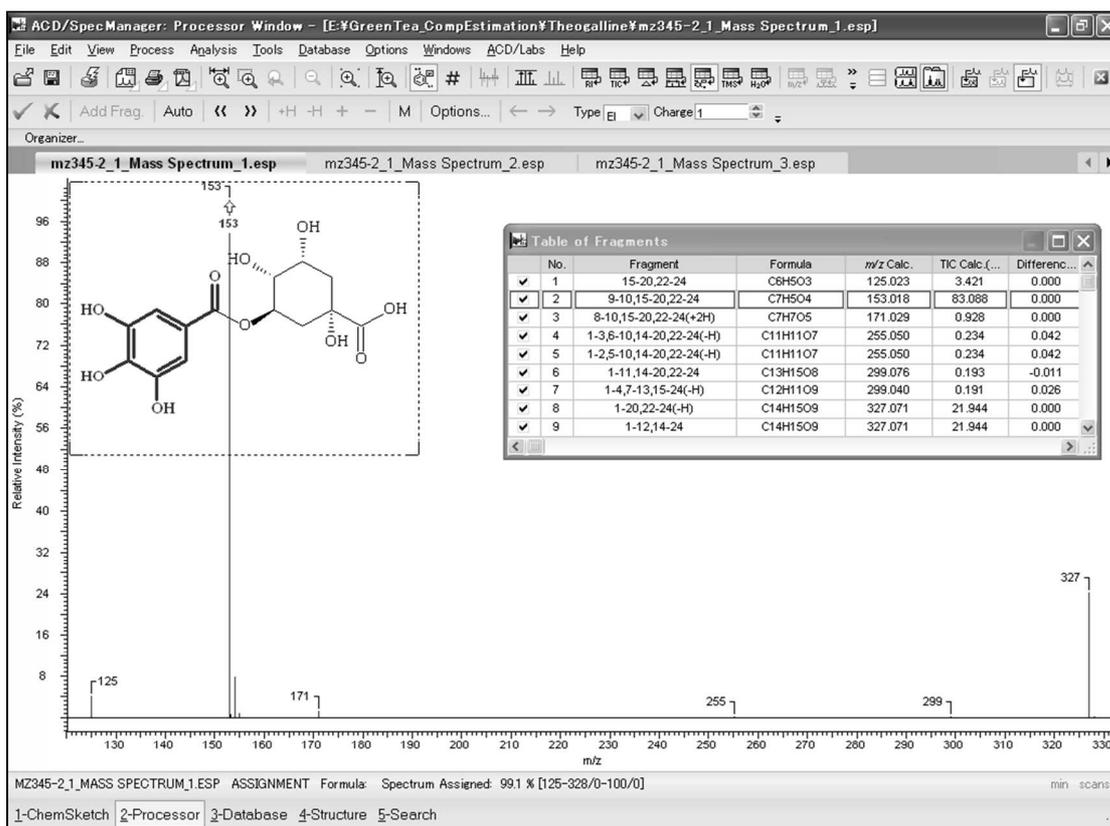
マススペクトル (JCAMP 形式) 構造式 (MDLmolfile 形式) 構造式サムネイル (png 形式) が自動作成される. 各ファイル名は ChemSpiderID に該当する拡張子が付与したものである.

1286.jdx	1286.mol	1286.png
1613.jdx	1613.mol	1613.png
2424.jdx	2424.mol	2424.png
14333.jdx	14333.mol	14333.png
28953.jdx	28953.mol	28953.png
60626.jdx	60626.mol	60626.png
65545.jdx	65545.mol	65545.png

(次ページに続く)

Fig. S-1 ACD/MS manager を用いて開発した化合物推定システム

c) ACD/MSManager を用いた自動帰属結果の例



d) HTML にて出力された最終的な化合物候補の例 .

#	Rank	Final Score	Common Name	ChemSpiderID	Formula	Assignment score	Formula Score	Structure
1	1	94.24	Isocaffeine (8Cl)	<a href="#">1286</a>	C8H10N4O2	100	88.81	
2	1	94.24	Caffeine	<a href="#">2424</a>	C8H10N4O2	100	88.81	
3	1	94.24	"1,3,8-trimethyl-3,9-dihydro-1H-purine-2,6-dione"	<a href="#">85748</a>	C8H10N4O2	100	88.81	
4	1	94.24	"1,5,7-Trimethyl-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidine-4,6(5H,7H)-dione"	<a href="#">197308</a>	C8H10N4O2	100	88.81	
5	1	94.24	"1,4-dimethyl-1,4,6,7-tetrahydroimidazo[4,5-e][1,4]diazepine-5,8-dione"	<a href="#">527291</a>	C8H10N4O2	100	88.81	

Fig. S-1 ACD/MS manager を用いて開発した化合物推定システム (続き)

**ACD/MS manager を用いた化合物推定により示された候補の一覧**

a) UK-001 Caffeine and 12 isomers.

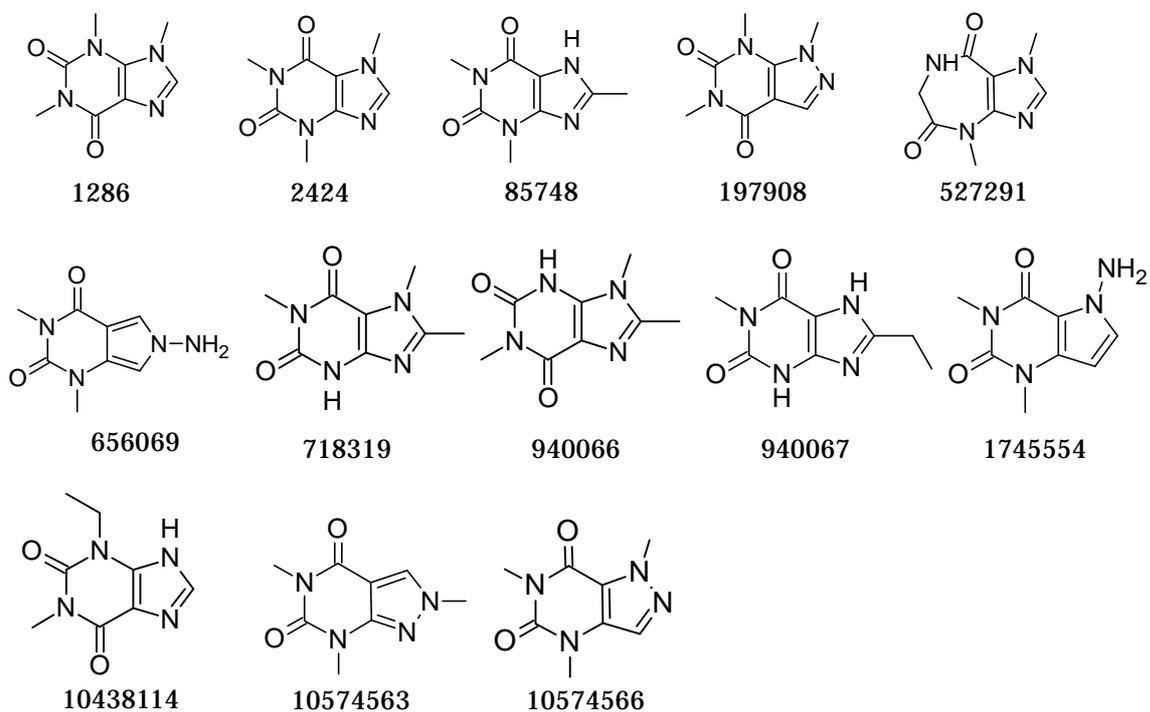


Fig. S-2 各ピークにおける候補化合物

a) UK-001, b) UK-002, c) UK-003, d) UK-004, e) UK-005, f) UK-006, g) UK-007, h) UK-008, i) UK-009, j) UK-010, k) UK-011, l) UK-012, m) UK-013, n) UK-014, o) UK-015, p) UK-016, q) UK-017, r) UK-018, s) UK-019, and t) UK-020.

b) UK-002 gallocatechin and 11 isomers.

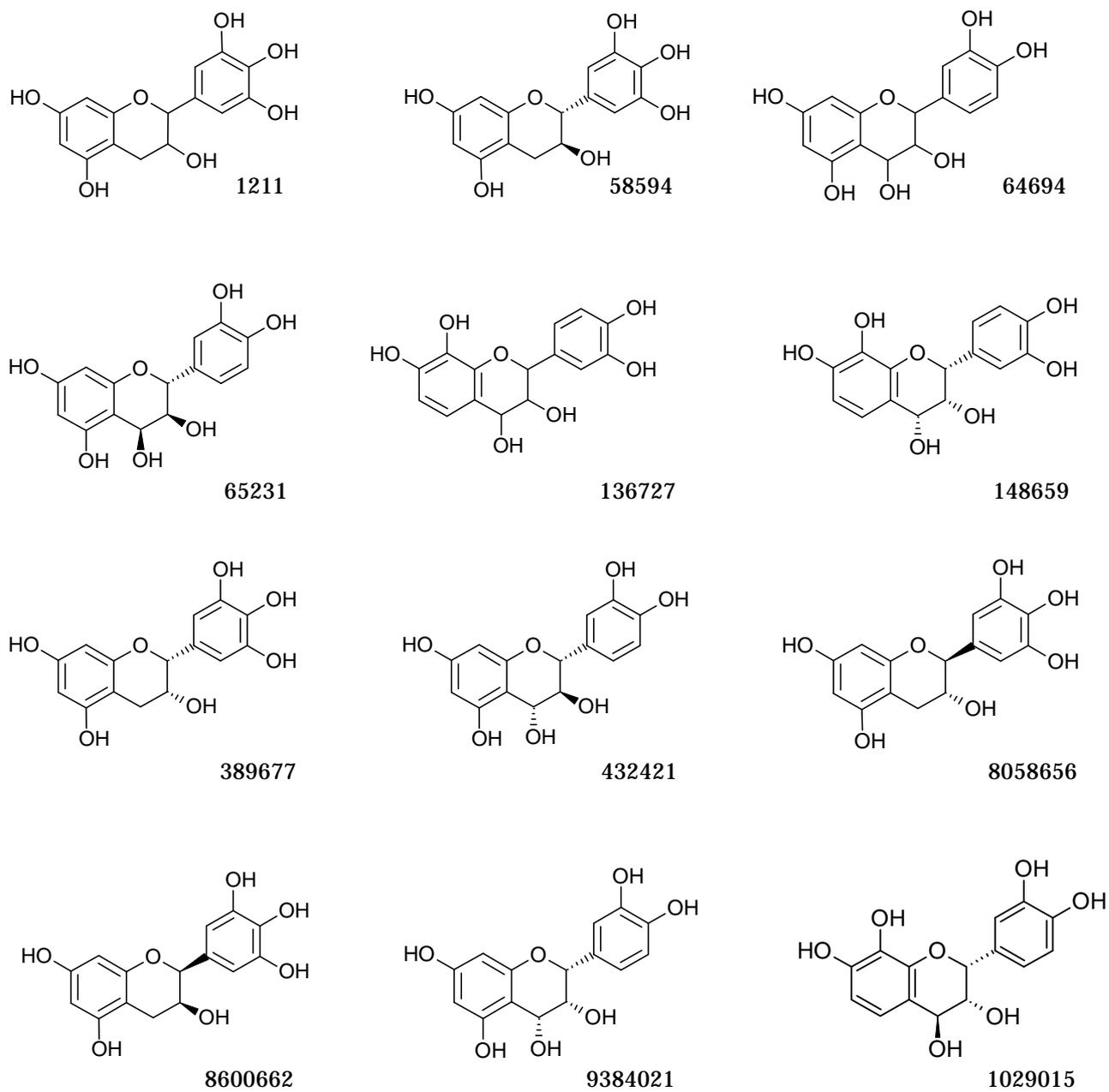
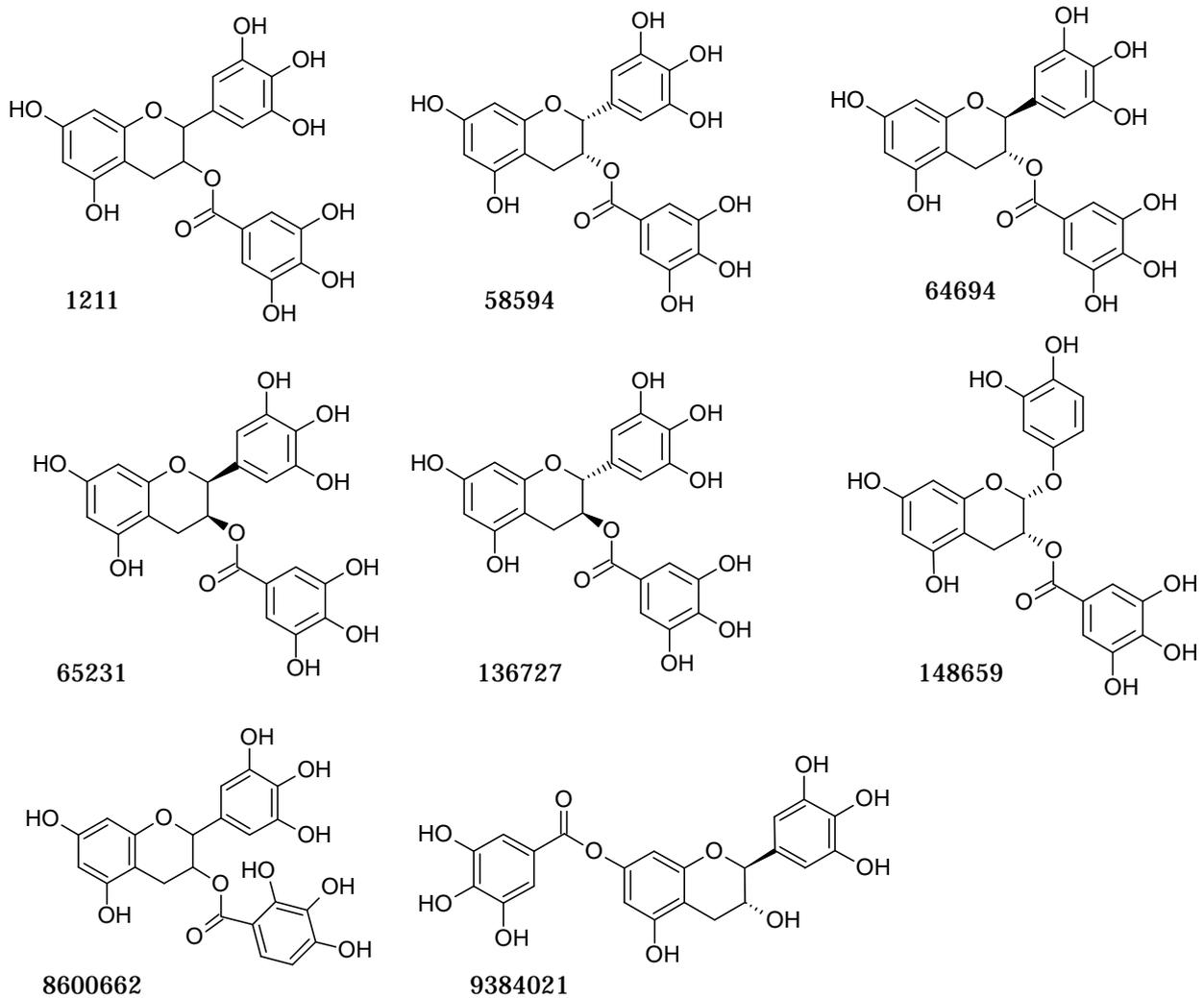


Fig. S-2 各ピークにおける候補化合物 (続き)

c) UK-003 gallocatechin gallate and seven isomers



d) UK-004 catechin gallate and five isomers.

Fig. 2-7 に記載.

e) UK-005 1-(4-amino-6,7,8,9-tetrahydro-1h-imidazo[4,5-c]quinolin-1-yl)-2-methylpropan-2-ol

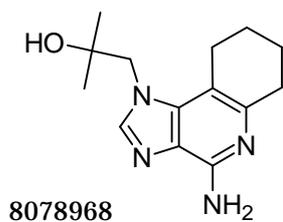
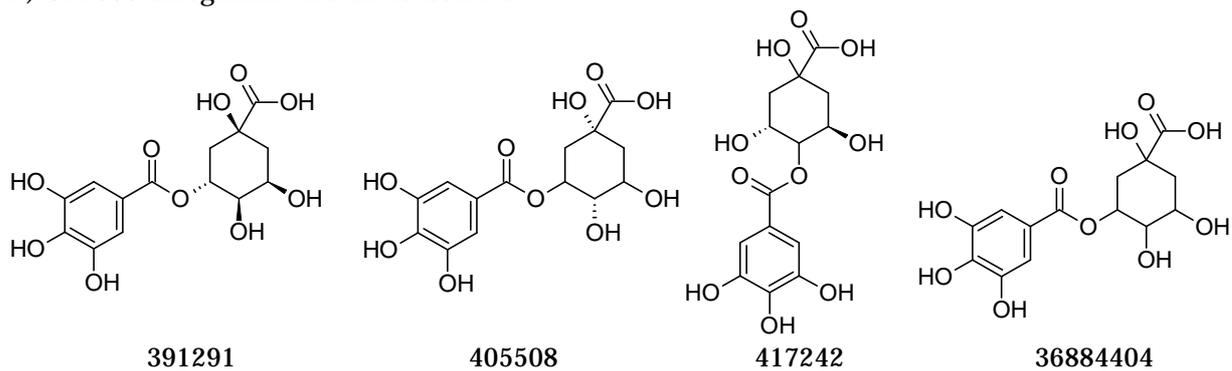


Fig. S-2 各ピークにおける候補化合物 (続き)

f) UK-006 theogalline and three isomers



g) UK-007 coumaroyl quinic acid and 10 isomers

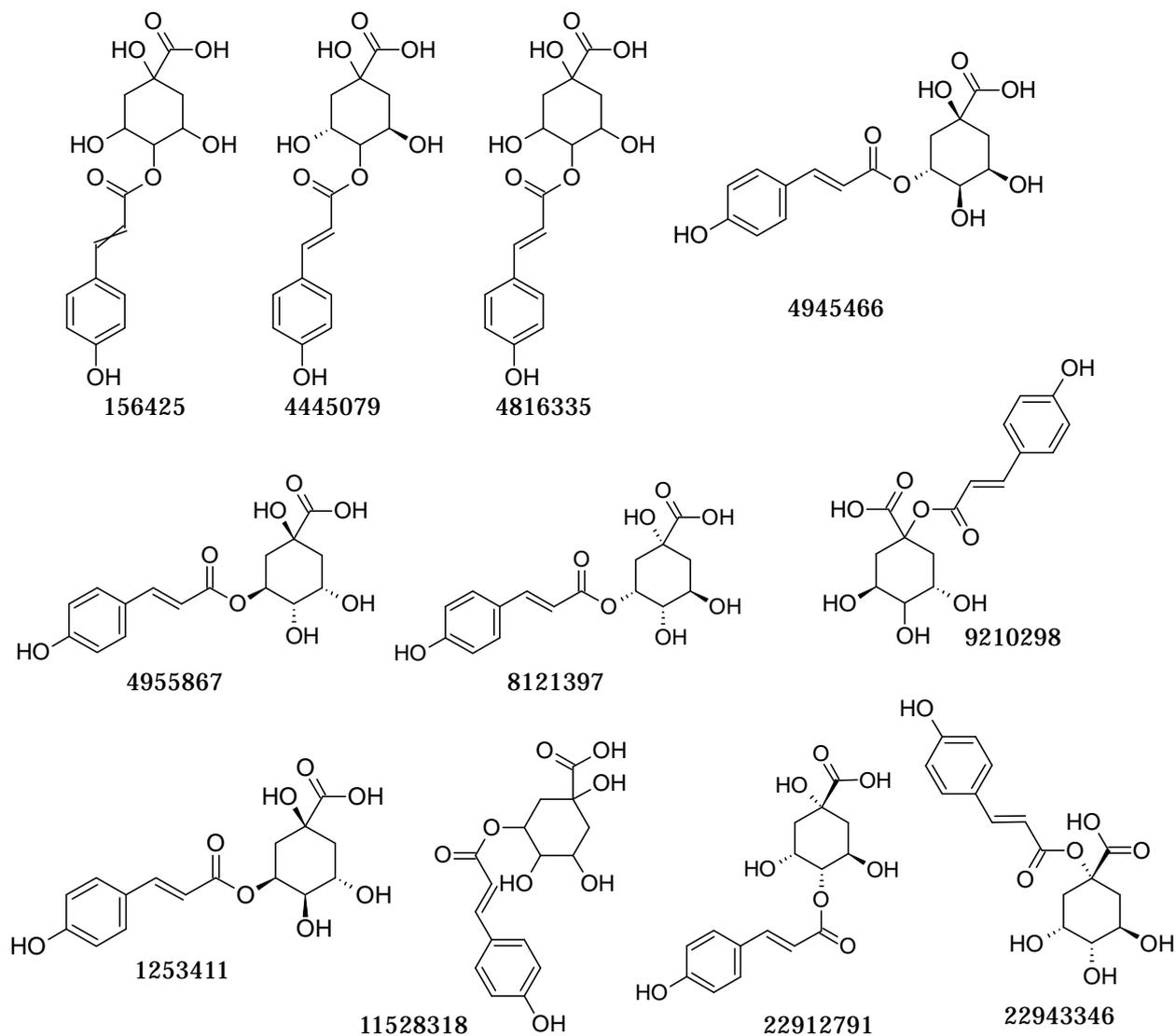
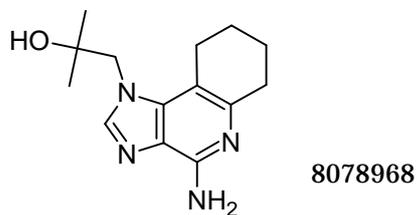


Fig. S-2 各ピークにおける候補化合物 (続き)

h) UK-008 (Sodium ion adduct of UK-001)

i) UK-009 1- (4-amino-6,7,8,9-tetrahydro-1h-imidazo[4,5-c]quinolin-1-yl) -2-methylpropan-2-ol



j) UK-010 (Sodium ion adduct of UK-007)

k) UK-011 (Fragment of UK-004)

l) UK-012 ethyl-5- (acetylamino) -2,3,4,5-tetrahydroxy-2-methylidene-4-nitro-d-glycero-d-galacto-nononate

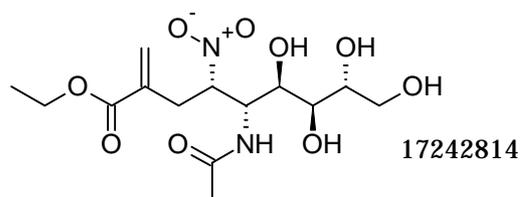


Fig. S-2 各ピークにおける候補化合物 (続き)

m) UK-013 catechin and 12 isomers

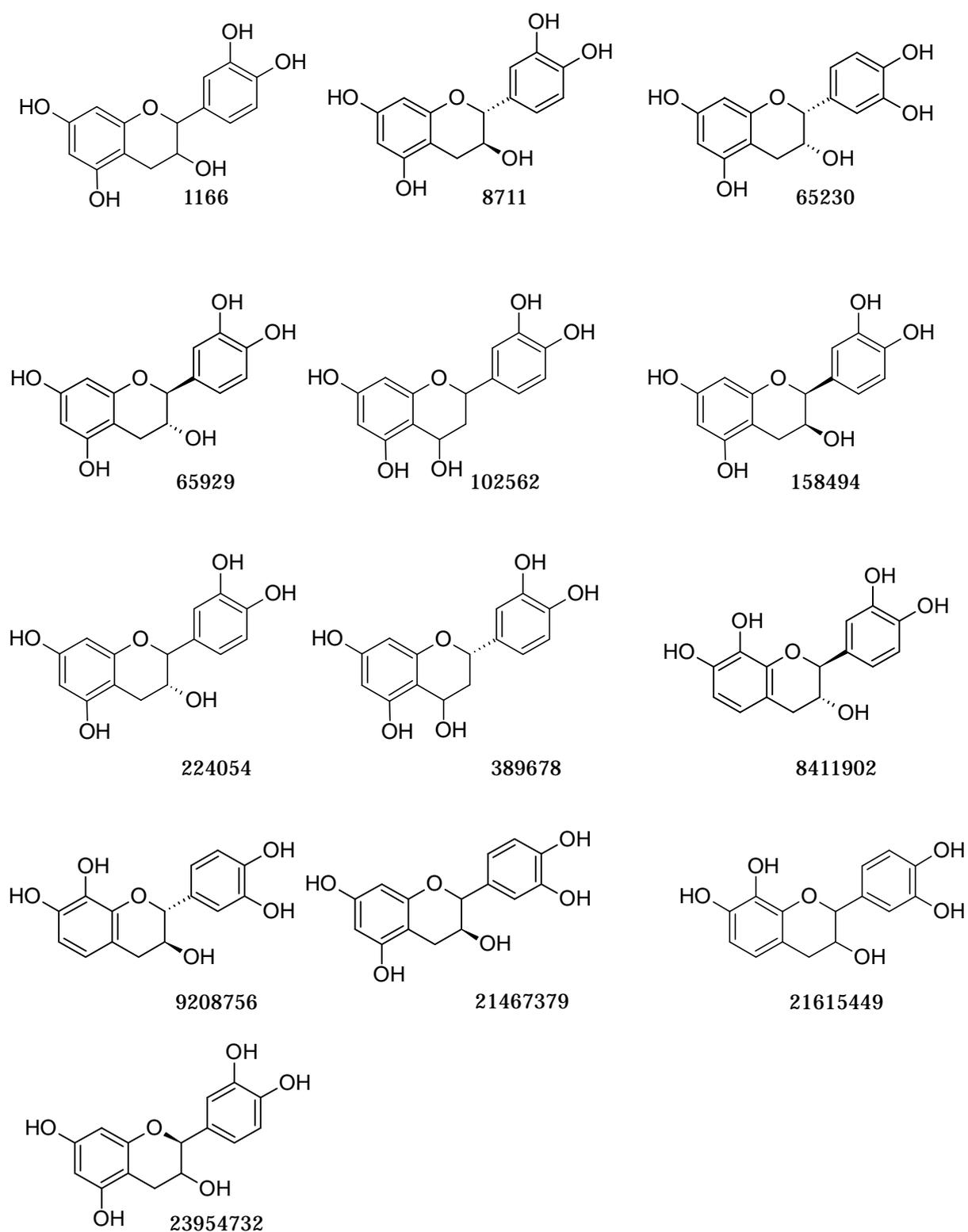
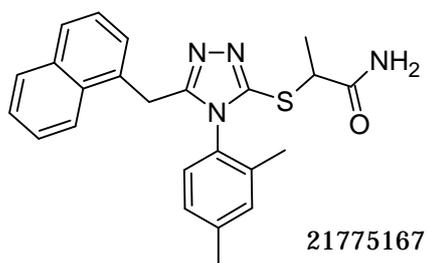
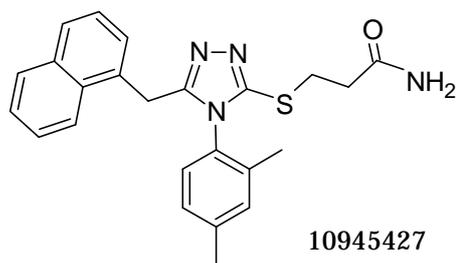
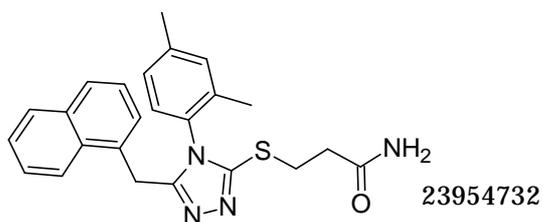


Fig. S-2 各ピークにおける候補化合物 (続き)

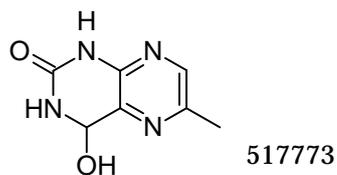
n) UK-014 2-([4-(2,4-dimethylphenyl)-5-(naphthalen-1-ylmethyl)-4H-1,2,4-triazol-3-yl]sulfanyl)propanamide and an isomer



o) UK-015 [4-amino-1-(2-methylpropyl)-6,7,8,9-tetrahydro-1h-imidazo[4,5-c]quinolin-2-yl]methanol



p) UK-016 [4-amino-1-(2-methylpropyl)-6,7,8,9-tetrahydro-1h-imidazo[4,5-c]quinolin-2-yl]methanol



q) UK-017 Luteolin 7-b-D-Glucopyranoside and four isomers

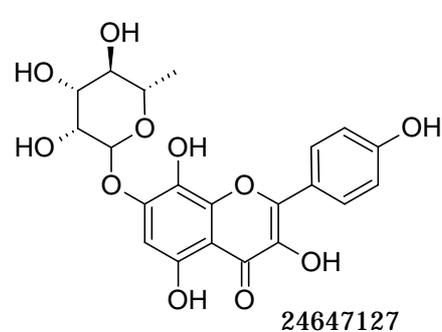
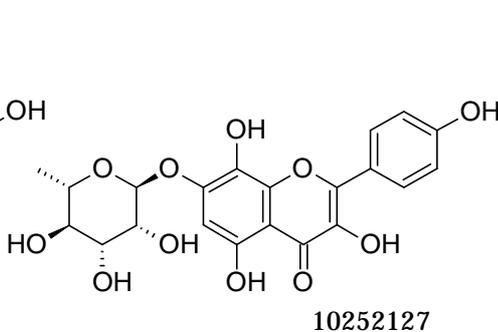
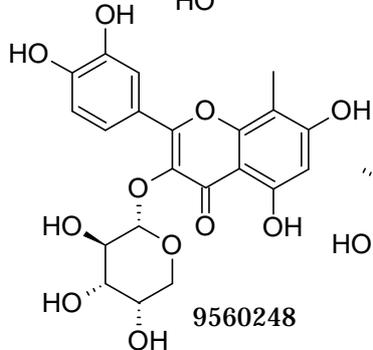
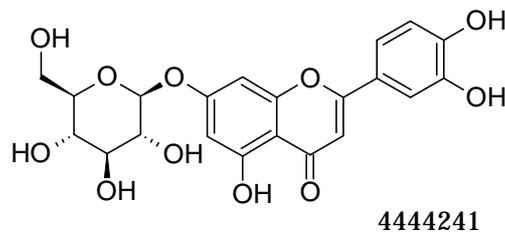
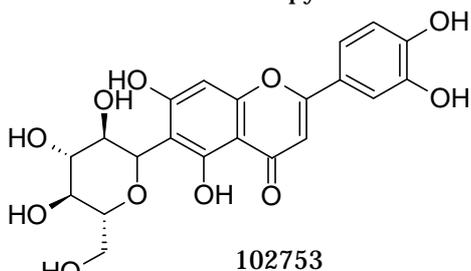
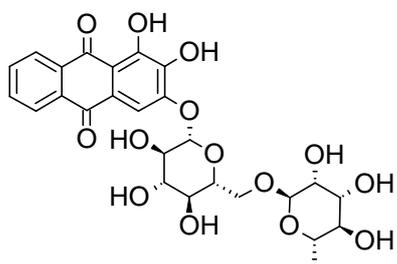


Fig. S-2 各ピークにおける候補化合物 (続き)

r) UK-018

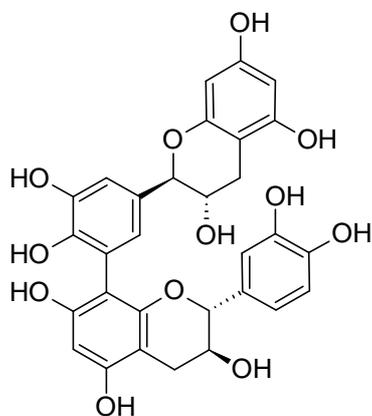
3,4-dihydroxy-9,10-dioxo-9,10-dihydroanthracen-2-yl 6-O- (6-deoxy-alpha-L-mannopyranosyl) -beta- D-glucopyranoside



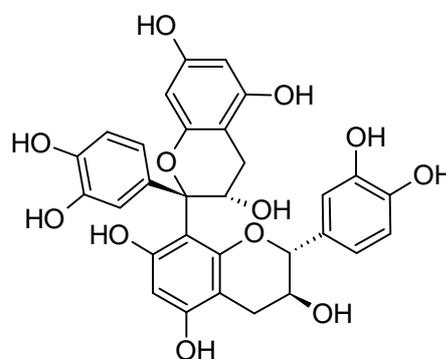
8968357

s) UK-019

(2r,3s) -2- (3,4-dihydroxyphenyl) -8-{2,3-dihydroxy-5-[ (2r,3s) -3,5,7-trihydroxy-3,4-dihydro-2h-chromen-2-yl]phenyl}-3,4-dihydro-2h-chromene-3,5,7-triol and an isomer



9072414



9909260

Fig. S-2 各ピークにおける候補化合物 (続き)

t) UK-020 gallocatechin and 11 isomers

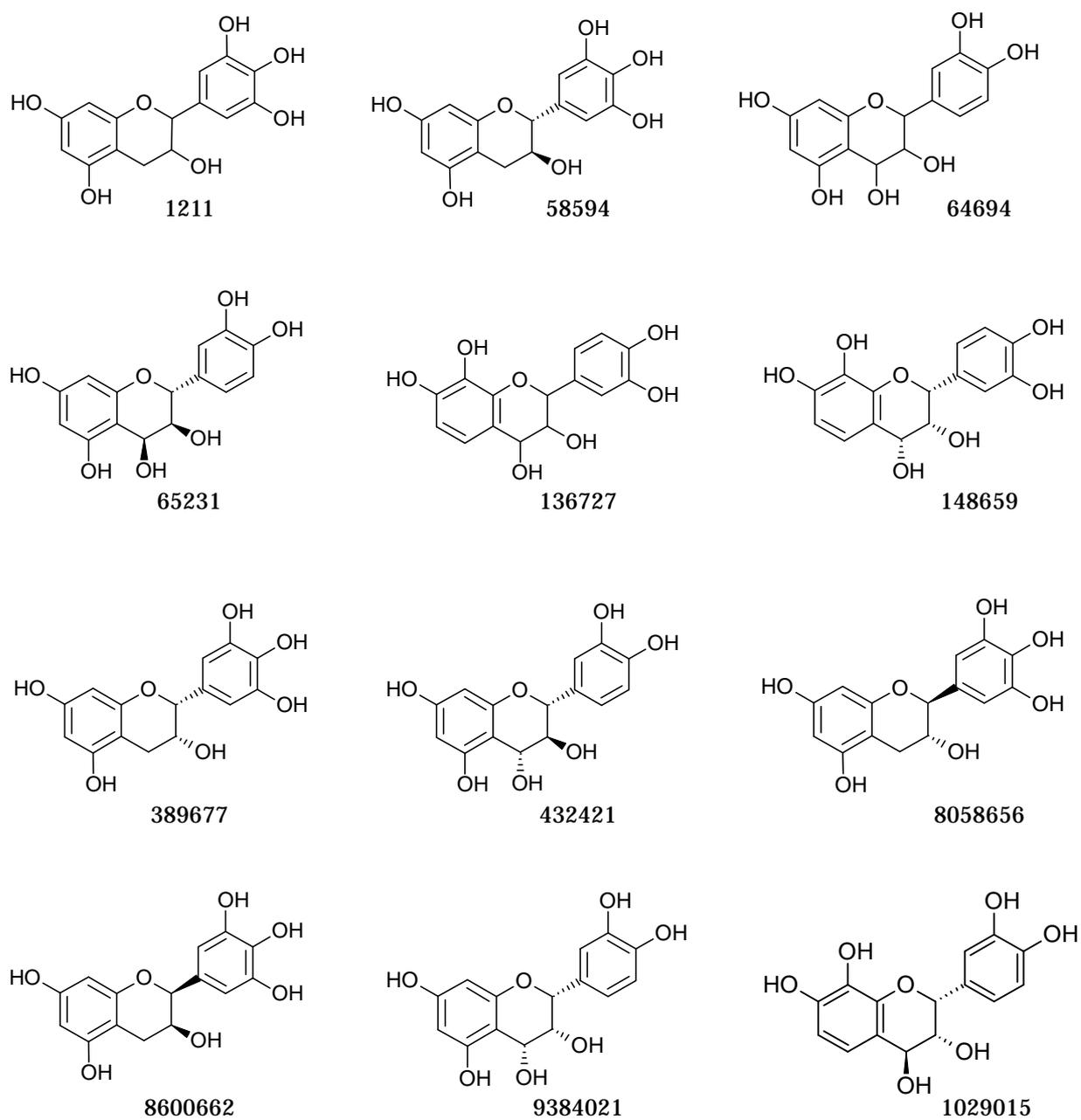


Fig. S-2 各ピークにおける候補化合物 (続き)

Table S-1 各化合物と検索クエリ一覧

Compound	PubChem Query
4-Aminoantipyrine	(0000 : 2006/02[CreateDate]) AND (203.103830996379[MonoisotopicMass] : 203.107893113621[MonoisotopicMass])
6a-Methylprednisolone	(0000 : 2006/02[CreateDate]) AND (374.205581979759[MonoisotopicMass] : 374.213066166241[MonoisotopicMass])
Acepromazine	(0000 : 2006/02[CreateDate]) AND (326.14202257616[MonoisotopicMass] : 326.14854548184[MonoisotopicMass])
Acetophenazine	(0000 : 2006/02[CreateDate]) AND (411.193935900521[MonoisotopicMass] : 411.202159861479[MonoisotopicMass])
Adenosine_Diphosphate	(0000 : 2006/02[CreateDate]) AND (427.025144453853[MonoisotopicMass] : 427.033685042148[MonoisotopicMass])
Adiphenine	(0000 : 2006/02[CreateDate]) AND (311.185417166709[MonoisotopicMass] : 311.191640937291[MonoisotopicMass])
Albuterol	(0000 : 2006/02[CreateDate]) AND (239.149752024565[MonoisotopicMass] : 239.154535067435[MonoisotopicMass])
Alfentanil	(0000 : 2006/02[CreateDate]) AND (416.249426389111[MonoisotopicMass] : 416.257751460889[MonoisotopicMass])
Amfenac	(0000 : 2006/02[CreateDate]) AND (255.086992393567[MonoisotopicMass] : 255.092094184433[MonoisotopicMass])
Aminophylline	(0000 : 2006/02[CreateDate]) AND (180.062924874745[MonoisotopicMass] : 180.066526169255[MonoisotopicMass])
Ampicillin	(0000 : 2006/02[CreateDate]) AND (349.106135707732[MonoisotopicMass] : 349.113117900268[MonoisotopicMass])
Anileridine	(0000 : 2006/02[CreateDate]) AND (352.211556002218[MonoisotopicMass] : 352.218600303782[MonoisotopicMass])
Antipyrine	(0000 : 2006/02[CreateDate]) AND (188.09308206837[MonoisotopicMass] : 188.09684396763[MonoisotopicMass])
Apomorphine	(0000 : 2006/02[CreateDate]) AND (267.123257535712[MonoisotopicMass] : 267.128600054288[MonoisotopicMass])
Apramycin	(0000 : 2006/02[CreateDate]) AND (539.274864382428[MonoisotopicMass] : 539.285649987572[MonoisotopicMass])
Betaxolol	(0000 : 2006/02[CreateDate]) AND (307.211671654562[MonoisotopicMass] : 307.217815949438[MonoisotopicMass])
Boldenone_Undecylenate	(0000 : 2006/02[CreateDate]) AND (452.324521988547[MonoisotopicMass] : 452.333568569453[MonoisotopicMass])
Bumetanide	(0000 : 2006/02[CreateDate]) AND (364.105651360076[MonoisotopicMass] : 364.112933545925[MonoisotopicMass])
Buprenorphine	(0000 : 2006/02[CreateDate]) AND (467.298885774412[MonoisotopicMass] : 467.308231845588[MonoisotopicMass])
Buspirone	(0000 : 2006/02[CreateDate]) AND (385.243922787247[MonoisotopicMass] : 385.251627742753[MonoisotopicMass])
Cholesterol	(0000 : 2006/02[CreateDate]) AND (386.351002550339[MonoisotopicMass] : 386.358729647661[MonoisotopicMass])
Cromolyn	(0000 : 2006/02[CreateDate]) AND (468.064580664386[MonoisotopicMass] : 468.073942049614[MonoisotopicMass])
Cymarin	(0000 : 2006/02[CreateDate]) AND (548.29305002567[MonoisotopicMass] : 548.30401599633[MonoisotopicMass])
Daunorubicin	(0000 : 2006/02[CreateDate]) AND (527.173874365538[MonoisotopicMass] : 527.184417948462[MonoisotopicMass])
Dextromethorphan	(0000 : 2006/02[CreateDate]) AND (271.190902493856[MonoisotopicMass] : 271.196326366144[MonoisotopicMass])
Dihydroergotamine	(0000 : 2006/02[CreateDate]) AND (583.273636529307[MonoisotopicMass] : 583.285302118693[MonoisotopicMass])
Dimeflin	(0000 : 2006/02[CreateDate]) AND (323.148912024565[MonoisotopicMass] : 323.155375067436[MonoisotopicMass])
Diphenoxylate	(0000 : 2006/02[CreateDate]) AND (452.241855818217[MonoisotopicMass] : 452.250900745783[MonoisotopicMass])
Dobutamine	(0000 : 2006/02[CreateDate]) AND (301.164781932064[MonoisotopicMass] : 301.170805287936[MonoisotopicMass])
Doxorubicin	(0000 : 2006/02[CreateDate]) AND (543.168629038392[MonoisotopicMass] : 543.179492519608[MonoisotopicMass])
Drofenine	(0000 : 2006/02[CreateDate]) AND (317.232306890208[MonoisotopicMass] : 317.238651599792[MonoisotopicMass])
Enalapril	(0000 : 2006/02[CreateDate]) AND (376.19606002178[MonoisotopicMass] : 376.20358401822[MonoisotopicMass])
Enalaprilat	(0000 : 2006/02[CreateDate]) AND (348.165040205781[MonoisotopicMass] : 348.172003576219[MonoisotopicMass])
Ephedrine	(0000 : 2006/02[CreateDate]) AND (165.113712955359[MonoisotopicMass] : 165.117015262641[MonoisotopicMass])
Ergocristine	(0000 : 2006/02[CreateDate]) AND (609.289026436806[MonoisotopicMass] : 609.301212339194[MonoisotopicMass])
Ergoloid_Mesylate	(0000 : 2006/02[CreateDate]) AND (591.336156160304[MonoisotopicMass] : 591.347983001696[MonoisotopicMass])
Etamiphylline	(0000 : 2006/02[CreateDate]) AND (279.166733248751[MonoisotopicMass] : 279.172316639249[MonoisotopicMass])
Etodolac	(0000 : 2006/02[CreateDate]) AND (287.149272024565[MonoisotopicMass] : 287.155015067435[MonoisotopicMass])
Fenbendazole	(0000 : 2006/02[CreateDate]) AND (299.069856638526[MonoisotopicMass] : 299.075838095474[MonoisotopicMass])
Fenoterol	(0000 : 2006/02[CreateDate]) AND (303.144026697418[MonoisotopicMass] : 303.150089638582[MonoisotopicMass])
Folic_Acid	(0000 : 2006/02[CreateDate]) AND (441.135269982186[MonoisotopicMass] : 441.144092775814[MonoisotopicMass])
Gallamine	(0000 : 2006/02[CreateDate]) AND (510.458363173322[MonoisotopicMass] : 510.468572442678[MonoisotopicMass])
Gingerol	(0000 : 2006/02[CreateDate]) AND (294.180167491907[MonoisotopicMass] : 294.186051154093[MonoisotopicMass])
Hematoporphyrin_l	(0000 : 2006/02[CreateDate]) AND (598.27315218165[MonoisotopicMass] : 598.28511776435[MonoisotopicMass])
Hydrocortisone	(0000 : 2006/02[CreateDate]) AND (362.205701979759[MonoisotopicMass] : 362.212946166241[MonoisotopicMass])
Hydroxybutorphanol	(0000 : 2006/02[CreateDate]) AND (343.211311654562[MonoisotopicMass] : 343.218175949438[MonoisotopicMass])
Hydroxyphenethylamine	(0000 : 2006/02[CreateDate]) AND (137.08269313936[MonoisotopicMass] : 137.08543482064[MonoisotopicMass])
Isoxsuprine	(0000 : 2006/02[CreateDate]) AND (301.164781932064[MonoisotopicMass] : 301.170805287936[MonoisotopicMass])
Ketorolac	(0000 : 2006/02[CreateDate]) AND (255.086992393567[MonoisotopicMass] : 255.092094184433[MonoisotopicMass])
Leucine_Enkephalin	(0000 : 2006/02[CreateDate]) AND (555.263745875014[MonoisotopicMass] : 555.274851260986[MonoisotopicMass])
Mebeverine	(0000 : 2006/02[CreateDate]) AND (429.247230723768[MonoisotopicMass] : 429.255815754232[MonoisotopicMass])
Mefenamic_Acid	(0000 : 2006/02[CreateDate]) AND (241.107867628213[MonoisotopicMass] : 241.112689833787[MonoisotopicMass])

Table S-1 各化合物と検索クエリ一覧 (続き)

Compound	PubChem Query
Meprobamate	(0000 : 2006/02[CreateDate]) AND (218.124475810429[MonoisotopicMass] : 218.128838343571[MonoisotopicMass])
Methionine_Enkephalin	(0000 : 2006/02[CreateDate]) AND (573.219986936808[MonoisotopicMass] : 573.231451451192[MonoisotopicMass])
Methotrexate	(0000 : 2006/02[CreateDate]) AND (454.166774144841[MonoisotopicMass] : 454.175857571159[MonoisotopicMass])
Methylergonovine	(0000 : 2006/02[CreateDate]) AND (339.191285115229[MonoisotopicMass] : 339.198069008771[MonoisotopicMass])
Morphine-3-Glucuronide	(0000 : 2006/02[CreateDate]) AND (461.163969785185[MonoisotopicMass] : 461.173193156815[MonoisotopicMass])
Naltrexone	(0000 : 2006/02[CreateDate]) AND (341.159296604918[MonoisotopicMass] : 341.166119859082[MonoisotopicMass])
Nandrolone	(0000 : 2006/02[CreateDate]) AND (274.190538146199[MonoisotopicMass] : 274.196022011801[MonoisotopicMass])
Nimesulide	(0000 : 2006/02[CreateDate]) AND (308.043611729078[MonoisotopicMass] : 308.049772662922[MonoisotopicMass])
Norpropoxyphene	(0000 : 2006/02[CreateDate]) AND (325.200927074209[MonoisotopicMass] : 325.207431157791[MonoisotopicMass])
Noscapine	(0000 : 2006/02[CreateDate]) AND (413.143320623479[MonoisotopicMass] : 413.151583572521[MonoisotopicMass])
Ormetoprim	(0000 : 2006/02[CreateDate]) AND (274.140234413242[MonoisotopicMass] : 274.145717272758[MonoisotopicMass])
Oxaprozin	(0000 : 2006/02[CreateDate]) AND (293.102262301067[MonoisotopicMass] : 293.108124404934[MonoisotopicMass])
Oxybutynin	(0000 : 2006/02[CreateDate]) AND (357.226821563061[MonoisotopicMass] : 357.233966170939[MonoisotopicMass])
Oxycodone	(0000 : 2006/02[CreateDate]) AND (315.143906697418[MonoisotopicMass] : 315.150209638582[MonoisotopicMass])
Oxytetracycline	(0000 : 2011/12[CreateDate]) AND (460.143578898196[MonoisotopicMass] : 460.152781861804[MonoisotopicMass])
Perindopril	(0000 : 2006/02[CreateDate]) AND (368.227439836779[MonoisotopicMass] : 368.234804459221[MonoisotopicMass])
Piperacetazine	(0000 : 2006/02[CreateDate]) AND (410.198696880011[MonoisotopicMass] : 410.206900935989[MonoisotopicMass])
Poldine	(0000 : 2006/02[CreateDate]) AND (340.187866793313[MonoisotopicMass] : 340.194670618687[MonoisotopicMass])
Prazosin	(0000 : 2006/02[CreateDate]) AND (383.155522595458[MonoisotopicMass] : 383.163185782542[MonoisotopicMass])
Prednisolone	(0000 : 2006/02[CreateDate]) AND (360.19007207226[MonoisotopicMass] : 360.19727594574[MonoisotopicMass])
Prednisolone_Tebutate	(0000 : 2006/02[CreateDate]) AND (458.26225628361[MonoisotopicMass] : 458.27142162039[MonoisotopicMass])
Prednisone	(0000 : 2006/02[CreateDate]) AND (358.174442164761[MonoisotopicMass] : 358.181605725239[MonoisotopicMass])
Prolintane	(0000 : 2006/02[CreateDate]) AND (217.180877912503[MonoisotopicMass] : 217.185221573497[MonoisotopicMass])
Pyrilamine	(0000 : 2006/02[CreateDate]) AND (285.181260534876[MonoisotopicMass] : 285.186964217124[MonoisotopicMass])
Remifentanyl	(0000 : 2006/02[CreateDate]) AND (376.19606002178[MonoisotopicMass] : 376.20358401822[MonoisotopicMass])
Reserpine	(0000 : 2006/02[CreateDate]) AND (608.267298159191[MonoisotopicMass] : 608.279463626809[MonoisotopicMass])
Rolitetracline	(0000 : 2011/12[CreateDate]) AND (527.221492784349[MonoisotopicMass] : 527.232037319651[MonoisotopicMass])
Salmeterol	(0000 : 2006/02[CreateDate]) AND (415.268105958413[MonoisotopicMass] : 415.276411403587[MonoisotopicMass])
Spectinomycin	(0000 : 2006/02[CreateDate]) AND (332.155029551489[MonoisotopicMass] : 332.161672718511[MonoisotopicMass])
Streptomycin	(0000 : 2006/02[CreateDate]) AND (581.259857097303[MonoisotopicMass] : 581.271482410698[MonoisotopicMass])
Strychnine	(0000 : 2006/02[CreateDate]) AND (334.16478627972[MonoisotopicMass] : 334.17146964228[MonoisotopicMass])
Strychnine_N-oxide	(0000 : 2006/02[CreateDate]) AND (350.159540952574[MonoisotopicMass] : 350.166544213426[MonoisotopicMass])
Sufentanyl	(0000 : 2006/02[CreateDate]) AND (386.198936880011[MonoisotopicMass] : 386.206660935989[MonoisotopicMass])
Sulfadimethoxine	(0000 : 2006/02[CreateDate]) AND (310.070474913244[MonoisotopicMass] : 310.076676384757[MonoisotopicMass])
Sulfasalazine	(0000 : 2006/02[CreateDate]) AND (398.064509586097[MonoisotopicMass] : 398.072470955903[MonoisotopicMass])
Taurocholate	(0000 : 2006/02[CreateDate]) AND (515.286520577265[MonoisotopicMass] : 515.296826410735[MonoisotopicMass])
Tenoxicam	(0000 : 2011/12[CreateDate]) AND (337.015727046028[MonoisotopicMass] : 337.022467427972[MonoisotopicMass])
Terbutaline	(0000 : 2006/02[CreateDate]) AND (225.134242116065[MonoisotopicMass] : 225.138744845935[MonoisotopicMass])
Terfenadine	(0000 : 2006/02[CreateDate]) AND (471.309016428704[MonoisotopicMass] : 471.318442703296[MonoisotopicMass])
Testosterone_Propionate	(0000 : 2006/02[CreateDate]) AND (344.231702541551[MonoisotopicMass] : 344.238587244449[MonoisotopicMass])
Tetracaine	(0000 : 2006/02[CreateDate]) AND (264.18113618722[MonoisotopicMass] : 264.18641986278[MonoisotopicMass])
Tetracycline	(0000 : 2011/12[CreateDate]) AND (444.148824225342[MonoisotopicMass] : 444.157707290658[MonoisotopicMass])
Tetramisole	(0000 : 2006/02[CreateDate]) AND (204.070078364809[MonoisotopicMass] : 204.074159807191[MonoisotopicMass])
Theobromine	(0000 : 2006/02[CreateDate]) AND (180.062924874745[MonoisotopicMass] : 180.066526169255[MonoisotopicMass])
Thiethylperazine	(0000 : 2006/02[CreateDate]) AND (399.176297523107[MonoisotopicMass] : 399.184281128893[MonoisotopicMass])
Thioridazine	(0000 : 2006/02[CreateDate]) AND (370.150038687598[MonoisotopicMass] : 370.157441762402[MonoisotopicMass])
Thiothixene	(0000 : 2006/02[CreateDate]) AND (443.165686869814[MonoisotopicMass] : 443.174550272186[MonoisotopicMass])
Thonizide	(0000 : 2006/02[CreateDate]) AND (511.432473032126[MonoisotopicMass] : 511.442701783874[MonoisotopicMass])
Tripelennamine	(0000 : 2006/02[CreateDate]) AND (255.170995954523[MonoisotopicMass] : 255.176099425477[MonoisotopicMass])
Vecuronium	(0000 : 2006/02[CreateDate]) AND (557.426259009667[MonoisotopicMass] : 557.437407646333[MonoisotopicMass])

Table S-2 各化合物の化合物推定結果の既報との比較

Author	Hill et al. <sup>41)</sup>	Wolf et al. <sup>42)</sup> (MetFrag)	Ridder et al. <sup>43)</sup> (MAGMa)	Ogura (ChemProphet)
Product Ion Spectrum	Selected	Merged	Merged	Merged
4-Aminoantipyrine	16	18	76	3
6a-Methylprednisolone	11	4	8	7
Acepromazine	4	7	2	2
Acetophenazine	1	2	2	2
Adenosine_Diphosphate	3	3	2	2
Adiphenine	6	4	5	8
Albuterol	15	35	13	12
Alfentanil	1	1	1	1
Amfenac	11	25	10	2
Aminophylline	21	3	29	5
Ampicillin	1	11	3	2
Anileridine	251	3	9	2
Antipyrine	97	104	172	233
Apomorphine	12	11	6	5
Apramycin	1	1	1	1
Betaxolol	5	2	5	1
Boldenone_Undecylenate	2	2	1	8
Bumetanide	10	1	1	41
Buprenorphine	2	9	3	1
Buspirone	1	2	1	1
Cholesterol	52	42	20	26
Cromolyn	2	4	4	3
Cymarin	8	8	8	1
Daunorubicin	12	5	7	7
Dextromethorphan	23	22	60	19
Dihydroergotamine	1	1	1	4
Dimeflin	644	195	156	5
Diphenoxylate	4	1	1	44
Dobutamine	44	7	3	8
Doxorubicin	3	7	5	7
Drofenine	4	6	3	1
Enalapril	1	5	2	1
Enalaprilat	2	12	1	2
Ephedrine	5	8	5	47
Ergocristine	1	10	2	7
Ergoloid_Mesylate	1	1	1	2
Etamiphylline	3	1	11	1
Etodolac	1	1	5	1
Fenbendazole	92	9	1	88
Fenoterol	5	2	3	3
Folic_Acid	13	4	3	1
Gallamine	1	1	1	1
Gingerol	2	2	2	1
Hematoporphyrin_I	33	11	24	4
Hydrocortisone	4	7	7	9
Hydroxybutorphanol	2	1	31	19
Hydroxyphenethylamine	166	32	3	6
Isoxsuprine	5	15	2	2
Ketorolac	37	13	132	73
Leucine_Enkephalin	2	1	1	2
Mebeverine	2	2	2	2
Mefenamic_Acid	328	125	99	18
Meprobamate	19	8	8	6
Methionine_Enkephalin	1	1	1	1
Methotrexate	116	5	5	7

Table S-2 各化合物の化合物推定結果の既報との比較 (続き)

Author	Hill et al. <sup>41)</sup>	Wolf et al. <sup>42)</sup> (MetFrag)	Ridder et al. <sup>43)</sup> (MAGMa)	Ogura (ChemProphet)
Methylergonovine	1	1	1	9
Morphine-3-Glucuronide	2	38	13	3
Naltrexone	34	18	333	48
Nandrolone	18	14	36	21
Nimesulide	136	6	1	70
Norpropoxyphene	15	5	1	11
Noscapine	3	55	37	1
Ormetoprim	124	197	36	4
Oxaprozin	101	98	189	6
Oxybutynin	6	1	1	1
Oxycodone	102	26	179	84
Oxytetracycline	4	1	2	5
Perindopril	2	3	2	1
Piperacetazine	1	1	1	1
Poldine	19	6	-	not assigned
Prazosin	4	17	2	2
Prednisolone	13	3	8	16
Prednisolone_Tebutate	4	3	6	1
Prednisone	6	8	14	21
Prolintane	9	18	4	3
Pyrilamine	1	6	1	1
Remifentanil	1	1	1	1
Reserpine	3	11	3	2
Rolitetracline	1	1	1	3
Salmeterol	1	2	1	1
Spectinomycin	1	1	2	1
Streptomycin	1	5	3	1
Strychnine	575	188	344	245
Strychnine_N-oxide	1098	734	816	2
Sufentanil	1	1	1	1
Sulfadimethoxine	18	3	3	5
Sulfasalazine	5	3	4	8
Taurocholate	4	3	4	4
Tenoxicam	1	1	1	6
Terbutaline	31	24	8	11
Terfenadine	1	2	1	2
Testosterone_Propionate	3	7	9	3
Tetracaine	22	1	1	1
Tetracycline	5	1	5	17
Tetramisole	1	79	2	57
Theobromine	14	20	32	21
Thiethylperazine	2	2	1	7
Thioridazine	1	1	1	1
Thiothixene	1	1	1	1
Thonizide	1	1	-	1
Tripelennamine	3	4	1	1
Vecuronium	1	1	1	1
Average:	44.2 (+/- 14.1)	24 (+/- 7.9)	30.8 (+/- 9.8)	14.7 (+/- 3.6)
Std. Deviation	142.5	80.2	98.9	36.6
25% Quartile	1	1	1	1
Median	4	4.5	3	3
75% Quartile	17.5	11.75	9	8

Table S-3 各化合物の化合物推定における候補数の比較

Author	Hill et al. <sup>41)</sup>	Wolf et al. <sup>42)</sup> (MetFrag)	Ridder et al. <sup>43)</sup> (MAGMa)	Ogura (ChemProphet)
Product Ion Spectrum	Selected	Merged	Merged	Merged
4-Aminoantipyrine	226	271	227	221
6a-Methylprednisolone	226	296	183	176
Acepromazine	281	338	271	271
Acetophenazine	435	546	402	408
Adenosine_Diphosphate	32	46	32	31
Adiphenine	623	796	594	577
Albuterol	143	205	131	213
Alfentanil	134	162	82	158
Amfenac	344	380	292	279
Aminophylline	94	176	81	61
Ampicillin	615	780	581	560
Anileridine	563	668	507	514
Antipyrine	306	341	289	282
Apomorphine	453	613	428	411
Apramycin	54	60	52	50
Betaxolol	190	259	177	175
Boldenone_Undecylenate	21	32	21	20
Bumetanide	619	768	583	569
Buprenorphine	40	49	36	32
Buspirone	36	31	15	20
Cholesterol	52	79	51	41
Cromolyn	33	37	33	30
Cymarin	61	84	56	43
Daunorubicin	110	129	99	95
Dextromethorphan	166	238	144	137
Dihydroergotamine	35	38	34	31
Dimeflin	644	876	566	534
Diphenoxylate	333	369	314	292
Dobutamine	447	643	395	385
Doxorubicin	60	81	56	55
Drofenine	117	148	104	104
Enalapril	246	286	325	177
Enalaprilat	370	454	180	312
Ephedrine	246	307	241	243
Ergocristine	16	26	14	15
Ergoloid_Mesyate	7	10	7	7
Etamiphylline	100	104	47	43
Etodolac	420	580	372	366
Fenbendazole	403	480	383	378
Fenoterol	370	521	317	308
Folic_Acid	602	824	542	568
Gallamine	10	8	2	7
Gingerol	182	195	141	131
Hematoporphyrin_I	42	47	40	39
Hydrocortisone	260	301	208	209
Hydroxybutorphanol	180	201	138	34
Hydroxyphenethylamine	166	173	165	166
Isoxsuprine	447	643	395	37.5
Ketorolac	344	380	292	279
Leucine_Enkephalin	53	60	49	51
Mebeverine	96	112	84	78
Mefenamic_Acid	579	633	519	512
Meprobamate	85	84	75	76
Methionine_Enkephalin	66	68	56	55
Methotrexate	644	763	592	585

Table S-3 各化合物の化合物推定における候補数の比較 (続き)

Author	Hill et al. <sup>41)</sup>	Wolf et al. <sup>42)</sup> (MetFrag)	Ridder et al. <sup>43)</sup> (MAGMa)	Ogura (ChemProphet)
Methylergonovine	515	629	442	468
Morphine-3-Glucuronide	179	171	119	102
Naltrexone	1035	1418	905	878
Nandrolone	124	129	87	84
Nimesulide	136	148	131	122
Norpropoxyphene	392	476	373	352
Noscapine	275	364	241	222
Ormetoprim	270	317	252	238
Oxaprozin	461	607	437	426
Oxybutynin	114	156	81	80
Oxycodone	776	993	726	695
Oxytetracycline	483	614	446	1511
Perindopril	102	119	52	55
Piperacetazine	494	626	382	434
Poldine	682	495	321	not assigned
Prazosin	185	204	138	141
Prednisolone	269	363	215	211
Prednisolone_Tebutate	143	165	141	130
Prednisone	344	418	308	296
Prolintane	105	118	105	96
Pyrilamine	268	294	255	247
Remifentanil	246	286	180	177
Reserpine	28	31	25	23
Rolitetracline	105	151	93	454
Salmeterol	32	37	24	22
Spectinomycin	310	361	280	274
Streptomycin	37	43	29	30
Strychnine	664	882	641	589
Strychnine_N-oxide	1185	1672	932	1088
Sufentanil	445	512	397	403
Sulfadimethoxine	94	145	111	86
Sulfasalazine	106	116	106	95
Taurocholate	59	65	54	47
Tenoxicam	28	34	26	109
Terbutaline	175	225	168	162
Terfenadine	34	35	31	29
Testosterone_Propionate	134	183	103	89
Tetracaine	308	362	301	291
Tetracycline	529	673	394	1570
Tetramisole	120	123	113	105
Theobromine	94	176	81	82
Thiethylperazine	569	671	503	473
Thioridazine	849	1091	736	760
Thiothixene	726	909	686	630
Thonizide	4	4	2	4
Tripeleennamine	97	102	93	92
Vecuronium	3	4	1	1
Average:	272.2 (+/- 24.2)	338.4 (+/- 31.5)	238.1 (+/- 21.2)	256.7 (+/- 28.1)
Std. Error	24.2	31.5	21.2	28.1
Std. Deviation	244.2	318.2	214.6	283.9
25% Quartile	94	102.5	60.75	55
Median	183.5	231.5	166.5	166
75% Quartile	431.25	518.75	379.75	378

## 引用文献

- 1) O. Fiehn. Metabolomics--the link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol. Biol.* 48: 155–171, 2002.
- 2) J. K. Nicholson, J. C. Lindon, E. Holmes. “Metabonomics”: understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica.* 29: 1181–1189, 1999.
- 3) O. Fiehn, S. Kloska, T. Altmann. Integrated studies on plant biology using multiparallel techniques. *Curr. Opin. Biotechnol.* 12: 82–86, 2001.
- 4) S. Nishiumi, M. Shinohara, A. Ikeda, T. Yoshie, N. Hatano, S. Kakuyama, S. Mizuno, T. Sanuki, H. Kutsumi, E. Fukusaki, T. Azuma, T. Takenawa, M. Yoshida. Serum metabolomics as a novel diagnostic approach for pancreatic cancer. *Metabolomics* 6: 518–528, 2010.
- 5) E. C. Y. Chan, P. K. Koh, M. Mal, P. Y. Cheah, K. W. Eu, A. Backshall, R. Cavill, J. K. Nicholson, H. C. Keun. Metabolic profiling of human colorectal cancer using high-resolution magic angle spinning nuclear magnetic resonance (HR-MAS NMR) spectroscopy and gas chromatography mass spectrometry (GC/MS). *J. Proteome Res.* 8: 352–361, 2009.
- 6) A. Roux, D. Lison, C. Junot, J.-F. Heilier. Applications of liquid chromatography coupled to mass spectrometry-based metabolomics in clinical chemistry and toxicology: A review. *Clin. Biochem.* 44: 119–135, 2011.
- 7) T. Soga, R. Baran, M. Suematsu, Y. Ueno, S. Ikeda, T. Sakurakawa, Y. Kakazu, T. Ishikawa, M. Robert, T. Nishioka, M. Tomita. Differential metabolomics reveals ophthalmic acid as an oxidative stress biomarker indicating hepatic glutathione consumption. *J. Biol. Chem.* 281: 16768–16776, 2006.
- 8) S. Ullsten, R. Danielsson, D. Bäckström, P. Sjöberg, J. Bergquist. Urine profiling using capillary electrophoresis-mass spectrometry and multivariate data analysis. *J. Chromatogr. A* 1117: 87–93, 2006.

- 9) A. Hirayama, K. Kami, M. Sugimoto, M. Sugawara, N. Toki, H. Onozuka, T. Kinoshita, N. Saito, A. Ochiai, M. Tomita, H. Esumi, T. Soga. Quantitative metabolome profiling of colon and stomach cancer microenvironment by capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry. *Cancer Res.* 69: 4918–4925, 2009.
- 10) W. Chan, K. Lee, N. Liu, R. N. S. Wong, H. Liu, Z. Cai. Liquid chromatography/mass spectrometry for metabonomics investigation of the biochemical effects induced by aristolochic acid in rats: the use of information-dependent acquisition for biomarker identification. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 22: 873–880, 2008.
- 11) T. Hasunuma, T. Sanda, R. Yamada, K. Yoshimura, J. Ishii, A. Kondo. Metabolic pathway engineering based on metabolomics confers acetic and formic acid tolerance to a recombinant xylose-fermenting strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb. Cell Fact.* 10: 2, 2011.
- 12) W. Pongsuwan, E. Fukusaki, T. Bamba, T. Yonetani, T. Yamahara, A. Kobayashi. Prediction of Japanese green tea ranking by gas chromatography/mass spectrometry-based hydrophilic metabolite fingerprinting. *J. Agric. Food Chem.* 55: 231–236, 2007.
- 13) W. Pongsuwan, T. Bamba, K. Harada, T. Yonetani, A. Kobayashi, E. Fukusaki. High-throughput technique for comprehensive analysis of Japanese green tea quality assessment using ultra-performance liquid chromatography with time-of-flight mass spectrometry (UPLC/TOF MS). *J. Agric. Food Chem.* 56: 10705–10708, 2008.
- 14) W. Pongsuwan, T. Bamba, T. Yonetani, A. Kobayashi, E. Fukusaki. Quality prediction of Japanese green tea using pyrolyzer coupled GC/MS based metabolic fingerprinting. *J. Agric. Food Chem.* 56: 744–750, 2008.
- 15) J. P. Antignac, F. Courant, G. Pinel, E. Bichon, F. Monteau, C. Elliott, B. Le Bizec. Mass spectrometry-based metabolomics applied to the chemical safety of food. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 30: 292–301, 2011.
- 16) W. Römisch-Margl, C. Prehn, R. Bogumil, C. Röhring, K. Suhre, J. Adamski. Procedure for tissue sample preparation and metabolite extraction for high-throughput targeted metabolomics. *Metabolomics* 8: 133–142, 2011.

- 17) H. Kato, Y. Izumi, T. Hasunuma, F. Matsuda, A. Kondo. Widely targeted metabolic profiling analysis of yeast central metabolites. *J. Biosci. Bioeng.* 113: 665–673, 2012.
- 18) K. Hanhineva, I. Rogachev, A.-M. Aura, A. Aharoni, K. Poutanen, H. Mykkänen. Identification of novel lignans in the whole grain rye bran by non-targeted LC–MS metabolite profiling. *Metabolomics* 8: 399–409, 2011.
- 19) R. R. L. Atkinson, M. M. Burrell, C. P. Osborne, K. E. Rose, M. Rees. A non-targeted metabolomics approach to quantifying differences in root storage between fast- and slow-growing plants. *New Phytol.* 196: 200–211, 2012.
- 20) L. W. Sumner, A. Amberg, D. Barrett, M. H. Beale, R. Beger, C. a. Daykin, T. W.-M. Fan, O. Fiehn, R. Goodacre, J. L. Griffin, T. Hankemeier, N. Hardy, J. Harnly, R. Higashi, J. Kopka, A. N. Lane, J. C. Lindon, P. Marriott, A. W. Nicholls, M. D. Reily, J. J. Thaden, M. R. Viant. Proposed minimum reporting standards for chemical analysis. *Metabolomics* 3: 211–221, 2007.
- 21) J. V. Johnson, R. A. Yost, P. E. Kelley, D. C. Bradford. Tandem-in-space and tandem-in-time mass spectrometry: triple quadrupoles and quadrupole ion traps. *Anal. Chem.* 62: 2162–2172, 1990.
- 22) M. Gergov, W. Weinmann, J. Meriluoto, J. Uusitalo, I. Ojanperä. Comparison of product ion spectra obtained by liquid chromatography/triple-quadrupole mass spectrometry for library search. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18: 1039–1046, 2004.
- 23) Y.-Q. Xia, J. D. Miller, R. Bakhtiar, R. B. Franklin, D. Q. Liu. Use of a quadrupole linear ion trap mass spectrometer in metabolite identification and bioanalysis. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 17: 1137–1145, 2003.
- 24) A. W. T. Bristow, K. S. Webb, A. T. Lubben, J. Halket. Reproducible product-ion tandem mass spectra on various liquid chromatography/mass spectrometry instruments for the development of spectral libraries. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18: 1447–1454, 2004.
- 25) NIST Standard Reference Database 1A v14  
<http://www.nist.gov/srd/nist1a.cfm> (Last accessed on 30th March 2015)

- 26) Scripps Center For Metabolomics and Mass Spectrometry - METLIN  
<http://metlin.scripps.edu/index.php> (Last accessed on 30th March 2015)
- 27) Wiley: Wiley Registry of Tandem Mass Spectral Data, MS for ID - Herbert Oberacher  
<http://as.wiley.com/WileyCDA/WileyTitle/productCd-1118037448.html> (Last accessed on 30th March 2015)
- 28) Human Metabolome Database <http://www.hmdb.ca/> (Last accessed on 30th March 2015)
- 29) MassBank | High Quality Mass Spectral Database  
<http://www.massbank.jp/> (Last accessed on 30th March 2015)
- 30) H. Horai, M. Arita, S. Kanaya, Y. Nihei, T. Ikeda, K. Suwa, Y. Ojima, K. Tanaka, S. Tanaka, K. Aoshima, Y. Oda, Y. Kakazu, M. Kusano, T. Tohge, F. Matsuda, Y. Sawada, M. Y. Hirai, H. Nakanishi, K. Ikeda, N. Akimoto, T. Maoka, H. Takahashi, T. Ara, N. Sakurai, H. Suzuki, D. Shibata, S. Neumann, T. Iida, K. Tanaka, K. Funatsu, F. Matsuura, T. Soga, R. Taguchi, K. Saito, T. Nishioka. MassBank: a public repository for sharing mass spectral data for life sciences. *J. Mass Spectrom.* 45: 703–714, 2010.
- 31) PubChem <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> (Last accessed on 30th March 2015)
- 32) ChemSpider <http://www.chemspider.com/> (Last accessed on 30th March 2015)
- 33) KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes  
<http://www.genome.jp/kegg/> (Last accessed on 30th March 2015)
- 34) Casarett & Doull's Toxicology: The basic science of poisons, 7th ed. (Ed.: K. Curtis), McGraw-Hill, New York.
- 35) S. Bouatra, F. Aziat, R. Mandal, A. C. Guo, M. R. Wilson, C. Knox, T. C. Bjorn Dahl, R. Krishnamurthy, F. Saleem, P. Liu, Z. T. Dame, J. Poelzer, J. Huynh, F. S. Yallou, N. Psychogios, E. Dong, R. Bogumil, C. Roehring, D. S. Wishart. The human urine metabolome. *PLoS One* 8: e73076, 2013.

- 36) R. Llorach, M. Urpi-Sarda, O. Jauregui, M. Monagas, C. Andres-Lacueva. An LC-MS-based metabolomics approach for exploring urinary metabolome modifications after cocoa consumption. *J. Proteome Res.* 8: 5060–5068, 2009.
- 37) T. Kind, O. Fiehn. Metabolomic database annotations via query of elemental compositions: mass accuracy is insufficient even at less than 1 ppm. *BMC Bioinformatics* 7: 234, 2006.
- 38) T. Kind, O. Fiehn. Seven Golden Rules for heuristic filtering of molecular formulas obtained by accurate mass spectrometry. *BMC Bioinformatics* 8: 105, 2007.
- 39) S. Böcker, M. C. Letzel, Z. Lipták, A. Pervukhin. SIRIUS: Decomposing isotope patterns for metabolite identification. *Bioinformatics* 2009.
- 40) T. Bristow, J. Constantine, M. Harrison, F. Cavoit. Performance optimisation of a new-generation orthogonal-acceleration quadrupole-time-of-flight mass spectrometer. 1213–1222, 2008.
- 41) D. W. Hill, T. M. Kertesz, D. Fontaine, R. Friedman, D. F. Grant. Mass spectral metabonomics beyond elemental formula: chemical database querying by matching experimental with computational fragmentation spectra. *Anal. Chem.* 80: 5574–5582, 2008.
- 42) S. Wolf, S. Schmidt, M. Müller-Hannemann, S. Neumann. In silico fragmentation for computer assisted identification of metabolite mass spectra. *BMC Bioinformatics* 11: 148, 2010.
- 43) L. Ridder, J. J. J. van der Hooft, S. Verhoeven, R. C. H. de Vos, R. van Schaik, J. Vervoort. Substructure-based annotation of high-resolution multistage MS(n) spectral trees. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 26: 2461–2471, 2012.
- 44) Y. Xu, J.-F. Heilier, G. Madalinski, E. Genin, E. Ezan, J.-C. Tabet, C. Junot. Evaluation of accurate mass and relative isotopic abundance measurements in the LTQ-orbitrap mass spectrometer for further metabolomics database building. *Anal. Chem.* 82: 5490–5501, 2010.
- 45) N. Loftus, K. Miseki, J. Iida, H. G. Gika, G. Theodoridis, I. D. Wilson. Profiling and biomarker identification in plasma from different Zucker rat

- strains via high mass accuracy multistage mass spectrometric analysis using liquid chromatography / mass spectrometry with a quadrupole ion trap-time of flight mass spectrometer. 2547–2554, 2008.
- 46) A. W. Hill, R. J. Mortishire-Smith. Automated assignment of high-resolution collisionally activated dissociation mass spectra using a systematic bond disconnection approach. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19: 3111–3118, 2005.
  - 47) R. a. Cartwright, E. a. H. Roberts. Theogallin, a polyphenol occurring in tea. *J. Sci. Food Agric.* 5: 593–597, 1954.
  - 48) S. Kaneko, K. Kumazawa, H. Masuda, A. Henze, T. Hofmann. Molecular and sensory studies on the umami taste of Japanese green tea. *J. Agric. Food Chem.* 54: 2688–2694, 2006.
  - 49) H. N. Graham. Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry. *Prev. Med. (Baltim).* 21: 334–350, 1992.
  - 50) MAGMa <http://www.emetabolomics.org/magma> (Last accessed on 30th March 2015)
  - 51) *Mass Spectrometry in Drug Metabolism and Pharmacokinetics* (Ed.: R. Ramanathan), Wiley, 2008.
  - 52) K. Levsen, H.-M. Schiebel, B. Behnke, R. Dötzer, W. Dreher, M. Elend, H. Thiele. Structure elucidation of phase II metabolites by tandem mass spectrometry: an overview. *J. Chromatogr. A* 1067: 55–72, 2005.
  - 53) L. Ridder, J. J. J. van der Hooft, S. Verhoeven, R. C. H. de Vos, J. Vervoort, R. J. Bino. In silico prediction and automatic LC-MS(n) annotation of green tea metabolites in urine. *Anal. Chem.* 86: 4767–4774, 2014.
  - 54) *Current Practice of Gas Chromatography-Mass Spectrometry* (Chromatographic Science Series) (Ed.: W. M. A. Niessen), Marcel Dekker, Inc., 2001p. 519.
  - 55) R. L. Gomes, W. Meredith, C. E. Snape, M. A. Sephton. Conjugated steroids: analytical approaches and applications. *Anal. Bioanal. Chem.* 393: 453–458, 2009.

- 56) C. Li, X. Meng, B. Winnik, M. J. Lee, H. Lu, S. Sheng, B. Buckley, C. S. Yang. Analysis of urinary metabolites of tea catechins by liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Chem. Res. Toxicol.* 14: 702–707, 2001.
- 57) C. Li, M. J. Lee, S. Sheng, X. Meng, S. Prabhu, B. Winnik, B. Huang, J. Y. Chung, S. Yan, C. T. Ho, C. S. Yang. Structural identification of two metabolites of catechins and their kinetics in human urine and blood after tea ingestion. *Chem. Res. Toxicol.* 13: 177–184, 2000.
- 58) X. Meng, M. J. Lee, C. Li, S. Sheng, N. Zhu, S. Sang, C. T. Ho, C. S. Yang. Formation and identification of 4'-O-methyl-(-)-epigallocatechin in humans. *Drug Metab. Dispos.* 29: 789–793, 2001.
- 59) R. C. Pimpão, T. Dew, M. E. Figueira, G. J. McDougall, D. Stewart, R. B. Ferreira, C. N. Santos, G. Williamson. Urinary metabolite profiling identifies novel colonic metabolites and conjugates of phenolics in healthy volunteers. *Mol. Nutr. Food Res.* 58: 1414–1425, 2014.
- 60) M. Harada, Y. Kan, H. Naoki, Y. Fukui, N. Kageyama, M. Nakai, W. Miki, Y. Kiso. Identification of the major antioxidative metabolites in biological fluids of the rat with ingested (+)-catechin and (-)-epicatechin. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63: 973–977, 1999.
- 61) F. Romanov-Michailidis, F. Viton, R. Fumeaux, A. Lévèques, L. Actis-Goretta, M. Rein, G. Williamson, D. Barron. Epicatechin B-ring conjugates: first enantioselective synthesis and evidence for their occurrence in human biological fluids. *Org. Lett.* 14: 3902–3905, 2012.
- 62) M. Dueñas, S. González-Manzano, F. Surco-Laos, A. González-Paramas, C. Santos-Buelga. Characterization of sulfated quercetin and epicatechin metabolites. *J. Agric. Food Chem.* 60: 3592–3598, 2012.
- 63) R. Al-Salhi, A. Abdul-Sada, A. Lange, C. R. Tyler, E. M. Hill. The xenometabolome and novel contaminant markers in fish exposed to a wastewater treatment works effluent. *Environ. Sci. Technol.* 46: 9080–9088, 2012.
- 64) V. Vukics, A. Guttman. Structural characterization of flavonoid glycosides by multi-stage mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* 29: 1–16.

## 発表論文

Tairo Ogura, Takeshi Bamba, Eiichiro Fukusaki

“Development of a practical metabolite identification technique for non-targeted metabolomics.” J. Chromatogr. A, 1301, 73-79, 2013.

Tairo Ogura, Takeshi Bamba, Akihiro Tai, Eiichiro Fukusaki

“Method for the Compound Annotation of Conjugates in Nontargeted Metabolomics Using Accurate Mass Spectrometry, Multistage Product Ion Spectra and Compound Database Searching” Mass spectrometry (Accepted)

## 学会発表

小倉 泰郎, 馬場 健史, 福崎 英一郎

“LC/MS を用いた non-targeted metabolomics における精密質量 MS<sup>n</sup> 分析および化合物データベースを用いた化合物同定システムの開発”

第 6 回メタボロームシンポジウム, 大阪, 2011 年 10 月

小倉 泰郎, 馬場 健史, 福崎 英一郎

“精密質量 MS<sup>n</sup> 分析と化合物データベースを用いた代謝物同定方法の検討”

第 64 回日本生物工学会大会, 兵庫, 2012 年 10 月

Tairo Ogura, Faith Hays, Takeshi Bamba, Eiichiro Fukusaki

“Automated compound identification using product ion scanning with accurate mass measurement and compound database searching for non-targeted metabolomics.”

61st ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, 2013 年 6 月

小倉 泰郎, 馬場 健史, 福崎 英一郎

“イオントラップ-飛行時間型質量分析計を用いた抱合体の同定方法の開発”

第 65 回日本生物工学会大会, 広島, 2013 年 9 月

小倉 泰郎, 馬場 健史, 福崎 英一郎

“抱合体を対象とした化合物同定方法の開発”

第 8 回 メタボロームシンポジウム, 福岡, 2013 年 10 月

Tairo Ogura, Akihiro Tai, Takeshi Bamba, Eiichiro Fukusaki

“Development of compound identification technique for conjugated unknown compounds using ion trap time-of-flight mass spectrometry”

Metabolomics 2014, 山形, 2014 年 6 月