

Title	微量臨床検体のGC/MSメタボローム分析に資する基盤的研究
Author(s)	新川, 翔也
Citation	大阪大学, 2022, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/88006
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

論文内容の要旨

氏 名 (新川 翔也)

論文題名

微量臨床検体のGC/MSメタボローム分析に資する基盤的研究

論文内容の要旨

第1章 緒論

メタボローム分析は生体内代謝物を網羅的に分析するアプローチである。メタボローム分析の重要な応用先の一つに、ヒトを対象とした臨床研究がある。一般的に臨床検体の採取には侵襲性を伴うことから、被験者への負担を最小限に留めるために採取量が制限される。しかしながら、微量の臨床検体のメタボローム分析において採取方法や前処理方法についてその妥当性を議論している文献はほとんどない。この背景から、微量臨床検体（数 μ L）に適したGC/MSメタボローム分析法の構築を目的とした。採取方法および前処理方法の最適化を行い、通常メタボローム分析と比較して考慮すべき点を議論したのち、実検体を用いてその影響を評価した。

第2章 実験器具に由来するブランクマトリックスがGC/MSメタボローム分析に与える影響

はじめに、従来の分析法を基準としてスケールダウンを検討した。しかしながら、当該アプローチでは本来の代謝物プロファイルを正常に取得できない可能性が示唆された。データを精査すると、スケールダウンに伴ったサンプル由来でない夾雑物質（ブランクマトリックス）の濃縮が確認され、これを示すように1 μ Lあたりの接触表面積（計算値）に対する相関係数は0.9以上であった。この結果からブランクマトリックスがデータ品質に影響を与えることが示唆されたため、ブランクマトリックスの除去が必要だと考えた。実験器具に由来するブランクマトリックスの混入を低減するため実験器具を選定し、以後の実験に使用した。市販ヒト血漿をサンプルとして適用性を検証したところ、従来法と比較してより多くのピークを検出可能であり、分析再現性についても従来法と同等だった。この結果から、分析再現性の改善にブランクマトリックスの除去（特に誘導体化時の容器由来）が重要であることが明らかとなった。

第3章 採取器具に由来するブランクマトリックスがGC/MSメタボローム分析に与える影響

前章の結果を受けて、前処理のさらに上流に位置するサンプル採取においても同様の現象が起きうると考え、これを検証した。本章では、メタボローム分析法の標準化がなされていない臨床検体として、歯肉溝滲出液（GCF）を対象とした。頻用されるGCF採取法であるペリオペーパーを対照とし、ブランクマトリックスの混入を回避する採取法としてピペットチップ採取を提案し、GCFメタボローム分析に求められる要件を満たしているか検証を行った。その結果、ピペットチップ採取はブランクマトリックスの混入がほとんどなく広範囲の代謝物カバレッジが得られたことから、GCFのメタボローム分析に適していることが示された。ピペットチップ採取による歯周病患者由来GCFのメタボローム分析結果は歯周ポケットの深さやプラークの付着状況を反映しており、以前に唾液メタボローム分析で報告されたものと同種の代謝物が特徴的なものとして挙げられた。この結果から当該採取法および分析法がGCF分析に適したものであるとともに、サンプル採取でもブランクマトリックスを排除することの重要性が示された。

第4章 マウス血漿を用いた微量臨床検体のメタボローム分析系の検証

微量臨床検体から通常量の臨床検体と同様の代謝物プロファイルが得られるかどうか検証するため、マウスの異なる部位から血漿を採取し、従来法および微量臨床検体用に構築した方法（微量法）で分析した。検出代謝物を比較すると、従来法で検出されたピークのほとんどは微量法でも検出されたものであり、微量法ではより多くの代謝物を検出可能であった。また、共通して検出された代謝物においても微量法で高い強度が得られた。このことから、微量臨床検体におけるメタボローム分析系が構築できたと結論付けた。

第5章 総括

微量臨床検体によるメタボローム分析はこれまでの適用範囲を拡大するものであり、従来では実施困難または高い侵襲性による倫理障壁の高い実験計画を容易にするものである。本研究は、微量臨床検体の分析で顕著に問題となるブランクマトリックスの影響を明らかにし、ブランクマトリックスを低減させることで高感度・広範囲での代謝物検出が可能となることを示した。メタボローム分析において、ブランクマトリックスが与える負の影響を論じた報告はこれが初めてである。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (新川 翔 也)			
論文審査担当者	主 査	教授	福崎 英一郎
	副 査	教授	内山 進
	副 査	教授	本田 孝祐

論文審査の結果の要旨

生体内代謝物を網羅的に分析するメタボローム分析の応用先の一つに、臨床研究がある。臨床検体の採取には侵襲性を伴うことから、その採取量は最小限に制限される。しかしながら、微量臨床検体のメタボローム分析において採取方法や前処理方法について妥当性を議論している文献はほとんどない。本論文では、ガスクロマトグラフィー質量分析計を用い微量臨床検体（数 μL ）に適したメタボローム分析法の構築を目的として、採取方法および前処理方法の最適化を行い、通常メタボローム分析と比較して考慮すべき点を議論したのち、実検体を用いてその影響を評価している。

第 2 章において、従来の分析法を基準としたスケールダウンでは本来の代謝物プロファイルを正常に取得できない可能性に言及し、比表面積の増加によるスケールダウンに伴ったサンプル由来でない夾雑物質（ブランクマトリックス）の濃縮と、分析再現性の改善にブランクマトリックスの除去（特に誘導体化時の容器由来）が重要であることを明らかにした。第 3 章では検証範囲を拡張し、サンプル採取時に混入するブランクマトリックスの影響について評価している。本章では、メタボローム分析法の標準化がなされていない臨床検体として歯肉溝滲出液（GCF）を対象とし、頻用される GCF 採取法としてペリオペーパーを対照、ブランクマトリックスの混入を回避する採取法としてピペットチップ採取を提案し、GCF メタボローム分析に求められる要件を満たしているか検証が行われた。その結果、ピペットチップ採取はブランクマトリックスの混入がほとんどなく広範囲の代謝物カバレッジが得られたことから、GCF のメタボローム分析に適していることが示された。さらに同手法を用いた歯周病患者由来 GCF のメタボローム分析結果は歯周ポケットの深さやプラークの付着状況を反映しており、以前に報告されたものと同種の代謝物が特徴的なものとして挙げられた。ことから当該採取法および分析法が GCF 分析に適したものであるとともに、サンプル採取でもブランクマトリックスを排除することの重要性が示された。これらの結果を受けて、第 4 章では微量臨床検体から通常量の臨床検体と同様の代謝物プロファイルが得られるかどうか検証するため、マウスの異なる部位から血漿を採取し従来法および微量臨床検体用に構築した方法（微量法）での分析が行われた。微量法は従来法より多くの代謝物を検出可能であった。また、共通して検出された代謝物においても微量法で高い強度が得られた。このことから、微量臨床検体におけるメタボローム分析系が構築できたと結論付けている。

微量臨床検体によるメタボローム分析はこれまでの適用範囲を拡大するものであり、従来では実施困難または高い侵襲性による倫理障壁の高い実験計画を容易にするものである。本論文は、微量臨床検体の分析で顕著に問題となるブランクマトリックスの影響を明らかにし、ブランクマトリックスを低減させることで高感度・広範囲での代謝物検出が可能となることを示した。メタボローム分析において、ブランクマトリックスが与える負の影響を論じた報告はこれが初めてである。よって、本論文は博士論文として価値あるものと認める。