The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

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	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

博士学位論文

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

新川 翔也

2022 年 1 月

大阪大学大学院工学研究科

目次

用語集 1

1. 緒論 2

1.1. メタボローム分析とは 2

1.2. 臨床検体のメタボローム分析と適切なサンプル前処理の重要性 3

1.3. 微量臨床検体のメタボローム分析 4

1.4. 本研究の目的 5

2. 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 7

2.1. 緒言 7

2.2. 実験材料および実験方法 8

2.2.1. 試薬 8

2.2.2. 分析サンプルおよび実験器具 8

2.2.3. サンプル前処理 9

2.2.4. GC-MS 分析 9

2.2.5. データ解析 9

2.3. 結果と考察 10

2.3.1. スケールダウンによるサンプル量削減アプローチの検討 10

2.3.2. 抽出液の濃縮および GC カラムへの注入量増加による影響 14

2.3.3. 誘導体化時に使用する容器およびマイクロピペットチップの検討 16

2.3.4. ヒト血漿への適用 20

2.4. 小括 22

3. 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 ... 23

3.1. 緒言 23

3.2. 実験材料および実験方法 24

3.2.1. 試薬 24

3.2.2. 実験器具 24

3.2.3. GCF の採取 24

3.2.4. サンプル前処理 25

3.2.5. GC-MS 分析 25

3.2.6. データ解析 26

3.3. 結果と考察 26

3.3.1. サンプル採取方法の違いによるブランクマトリックスの比較 26

3.3.2. サンプル採取方法の違いによるサンプル由来ピークの比較 28

3.3.3. 歯周病患者から採取した GCF のメタボローム分析 31

3.4. 小括 35

4. 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 36

4.1. 緒言 36

4.2. 実験材料および実験方法 36

4.2.1.　試薬 36

4.2.2.　血液採取用キャピラリーチューブの作成 36

4.2.3.　マウスからの血漿採取 37

4.2.4.　サンプル前処理 37

4.2.5.　GC-MS 分析 38

4.2.6.　データ解析 38

4.3.　結果と考察 39

4.3.1.　微量血液採取の再現性 39

4.3.2.　マウス血漿のメタボロームプロファイル比較 40

4.4.　小括 44

5.　総括と展望 45

5.1.　本研究の総括 45

5.2.　今後の展望 46

引用文献 47

発表論文 51

学会発表 53

謝辞 54

用語集

GC-MS: Gas chromatograph-mass spectrometer, ガスクロマトグラフ質量分析計

GC/MS: Gas chromatography-mass spectrometry, ガスクロマトグラフィー質量分析法

アナライト: Analyte, サンプル溶液中に含まれる分析対象化合物

マトリックス: Matrix, サンプル溶液中に含まれる分析対象でない化合物

サンプルマトリックス: sample matrix, サンプル由来のマトリックス

ブランクマトリックス: Blank matrix, サンプル由来でないマトリックス

カバレッジ: 代謝物の網羅性, 1 分析あたりに検出可能な代謝物数

PCA: Principal component analysis, 主成分分析

RSD: Relative standard deviation, 相対標準偏差

TMS: Trimethylsilyl-, トリメチルシリル基, 誘導体化によって付加される官能基

PLS-DA: Partial least square-discriminant analysis, 部分的最小二乗-判別分析

GCF: Gingival crevicular fluid, 歯肉溝滲出液

LOWESS: Locally weighted scatter plot smoothing, 局所的重み付け散布図平滑化

1. 緒論

1.1. メタボローム分析とは

メタボローム（Metabolome）とは，”代謝物”（Metabolites）と”総体”を意味する-ome を組み合わせた造語であり，さらに“学問”を意味する-ics を合成したメタボロミクスは代謝物を網羅的に研究する学問領域を指す．セントラルドグマに従いDNAからRNA，タンパク質を経て代謝物に至るまでのそれぞれに対してゲノミクス，トランスクリプトミクス，プロテオミクス，メタボロミクスと区別される．この遺伝情報から形質発現に至るまでの一連の流れにおいて，メタボロームは最下流に位置するために最も表現型を反映すると理解されている．その特徴から，食品の品質評価(Pongsuwan et al. 2008)および真贋判別(Jumhawan et al. 2013)，フレーバーを構成する成分の探索(Ochi et al. 2012; Shiga et al. 2014)，疾患の分子マーカー探索(Omori et al. 2020)や疾患・毒性メカニズムの仮説立案(Shima et al. 2011; Hasokawa et al. 2012)などに用いられるアプローチである．

狭義のメタボロミクスでは，エネルギー産生や生体構成成分産生に関連する一次代謝物が分析対象化合物（アナライト）となる．しかし，それらの化合物は化学構造的に多種多様かつ存在量も幅広い．具体的には，アミノ酸，有機酸，糖質，脂質，核酸（塩基含む），補酵素，ビタミン，ホルモンなどが挙げられるが，これらを1分析で検出可能な一斉分析法は存在しない．従って，実際には 1 つの分析機器が持つ限られた範囲で分析を行うか，複数の分析法を組み合わせることで代謝物の網羅性（カバレッジ）を向上させるアプローチが取られる．近年ではそれぞれの化合物種に特化した分析法の開発も進んでおり，糖質であればグライコミクス(Shriver et al. 2004; Chen et al. 2021)，脂質であればリピドミクス(Züllig et al. 2020; Sun et al. 2020)のように細分化されている．

メタボローム分析に用いられる分析機器には，ガスクロマトグラフ質量分析計（GC-MS），液体クロマトグラフ質量分析計（LC-MS），超臨界流体クロマトグラフ質量分析計（SFC-MS），キャピラリー電気泳動質量分析計（CE-MS），核磁気共鳴装置（NMR）が挙げられる．これらの中でも，GC-MS および LC-MS は頻用される機器である．GC-MS は分析対象化合物を

気化させる必要があるために，沸点の高い親水性代謝物の場合には沸点を低下させる誘導体化が必須であるが，分離能や保持時間の再現性が高いこと，電子イオン化法（EI）によるフラグメンテーションの再現性が良くマススペクトルライブラリが整備されていることから，対象を指定しないノンターゲットメタボローム分析の標準的な分析手法として認知・頻用されている．また，機器の運用・保守についても比較的容易である（注入口で一度気化させるため不揮発性物質がカラムに移行せず汚染しにくい，イオン源の洗浄が容易）．一方，LC-MS は液体に溶解したものであれば分析可能であり誘導体化が必須でないこと，GC-MS では測定することの難しい熱に弱い代謝物や分子量の大きい化合物についても測定可能である．また，様々な分離モード（逆相，順相，親水性相互採用，サイズ排除，イオン交換等）を使用することができ，対象化合物に対して最適な分離方法を選択できる．エレクトロスプレーイオン化法（ESI）の採用によって分子イオンを得ることが可能であり，多重反応モニタリング（Multiple Reaction Monitoring: MRM）を設定することで高い選択性と感度が得られる．但し，分析対象外の化合物（マトリックス）の影響を受けやすくイオン化効率が変化しやすいこと，また，GC-MS と比較して分離能が低いことが難点である．その性質から，対象を絞ったターゲットメタボローム分析に用いられることが多い．

1.2. 臨床検体のメタボローム分析と適切なサンプル前処理の重要性

臨床検体とは，ヒトに由来する組織，細胞，体液を指す(Edwards et al. 2014)．臨床検体の採取は医療行為の一部であるため，医療機関でのみ実施が可能である．臨床検体を用いた研究では，注目する表現型に対して個人差（環境因子も含む）が大きいことから，明確な差を見出すためにはサンプル数を十分に確保すること，および測定誤差の小さい分析方法が求められる．必然的に，臨床検体の分析は分析再現性や堅牢性を担保された分析方法によって行われる．

分析再現性および堅牢性を確保するために，重要な要素がサンプル前処理である．サンプル採取により単に分析試料を得るだけでなく，代謝反応を停止させ，分析に適した状態に

仕立てることを意味する．具体的には，分析対象でない化合物（マトリックス）の除去，すなわちアナライトのみが安定して存在する状態を作り上げることを指す．場合によってはアナライトの化学的性質を変化させ検出を容易にするための誘導体化も含まれる．サンプル前処理が不適切な状態では，マトリックスがアナライトの検出を阻害し正確な測定値が得られない可能性がある．

サンプル溶液に含まれる分析対象でない化合物の総称であるマトリックスは，サンプル由来のものとサンプル由来でないもの（すなわち空試験であっても存在する化合物）に分類できる．本論文ではそれぞれを区別するためにサンプルマトリックスおよびブランクマトリックスと明記する．

それぞれのオミクス解析において，DNA および RNA はヌクレオチドの組み合わせ，プロテオミクスはアミノ酸の組み合わせによるポリマーであり，分子量が比較的大きく特異性も高いことからマトリックスの除去が容易である（電気泳動，カラム精製）．一方で，代謝物は低分子化合物のモノマーを主としており，一度混入したマトリックスを完全に除去することは困難である．加えて，それらのマトリックスは代謝物と同一である場合もあり，両者が混合した状態で何割がサンプルに由来する化合物かを推定することは不可能である．メタボローム分析において最も懸念するべきは，前処理が不十分な状態でも分析機器はそれらしい数値を出力する点であり，データの品質が考慮されないまま多変量解析に供され偽陽性のマーカー代謝物等が見いだされることである．従って，臨床検体のメタボローム分析には適切なサンプル前処理に関する知見が重要であるといえる．

1.3. 微量臨床検体のメタボローム分析

一般に臨床検体の採取は侵襲性を伴うことから，被験者への負荷を最小限に留める必要がある．血液を例に挙げると，採取は静脈穿刺によって行われる．血漿サンプルの GC/MS メタボローム分析に必要なサンプル量は 50 μL（血液では>100 μL）である(Dunn et al. 2011)．臨床検体でのメタボローム分析を実施するにあたっては血液の生化学検査による診断マー

カーの測定値を参照する場合がほとんどであるため，メタボローム分析用のサンプルも十二分に用意される（実際の採取では血液検査項目数によるが 5 mL 程度である）．しかしながら，静脈穿刺は人によっては迷走神経反射を起こすおそれがあり，通常考慮はされないが採取時のストレスによるメタボロームへの影響も考えられる．また，乳幼児など静脈穿刺による採取が難しい被験者の場合もある．一方で，サンプル量を確保できなければ分析自体が困難となる．第 3 章で示す歯肉溝滲出液（GCF）の採取量は健康部位で数 μL であり，現在標準的に用いられている分析手順では多変量解析に足る十分なカバレッジが確保できない．

少ないサンプル量で分析を達成しようとする試みは，メタボロミクスの重要なテーマの一つでもある．シングルセルメタボロミクスに代表されるように細胞生物学領域では盛んに行われている(Nakatani et al. 2020; Kawai et al. 2019)．分析に必要な細胞数が少なくなるほど，フローサイトメーターでの分画に必要な時間が短くなりスループットが向上するとともに細胞の不均一性についても議論することが可能となる．これらの分析手法は基本的に当該論文の著者らが製作したオリジナルの機器であり，一般ユーザーがその構成を再現し運用することは非常に困難である．より多くの研究者への普及を想定すると，一般的に流通している分析機器の構成でサンプル量の低減を達成することが望ましい．しかしながら，汎用機器を用いた微量臨床検体のメタボロミクスにおいてサンプル採取方法や前処理方法，分析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．

1.4. 本研究の目的と流れ

これらの研究背景から，本研究では運用・保守が容易かつ代謝物カバレッジが広く再現性の高いガスクロマトグラフとシングル四重極型質量分析計を用い，サンプル採取方法および前処理方法の最適化による微量臨床検体に適したノンターゲットメタボローム分析方法を構築することを目的とした．

本研究の流れとしては，まず第 2 章において，通常のメタボローム分析の前処理では微量臨床検体の分析が難しく，その原因として検体中のアナライトの抽出・誘導体化に用いる

実験器具由来のブランクマトリックスを見出した．次に第 3 章において，検体の採取器具由来のブランクマトリックスが微量臨床検体のメタボローム分析に与える影響を明らかにした．第 4 章ではその知見を元に構築した微量臨床検体用メタボローム分析方法についてマウス血漿を用いて評価した．

図 1:本研究の流れ

2. 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

2.1. 緒言

血液は臨床研究の現場において重要な検体である．血液検査は生体内の健康状態を反映する種々の生化学パラメータを定量するために実施される．メタボローム分析においても同様に，全身を循環する血液代謝物を説明変数に，疾病の進行度合い等を応答変数とすることで表現型解析およびメカニズム解明の一助となる．現状では，ヒト血漿メタボローム分析に 50 μL（血液 100 μL 以上）のサンプルが必要とされている．通常の臨床研究では生化学項目についても同時に分析することが多いことから実施可能であるが，被験者が乳幼児の場合や，同一被験者から短時間に複数回のサンプル採取を実施するには，現状の必要量では問題がある．被験者への負担を低減する意味でも，侵襲の少ない方法でのサンプル採取とそれに適した分析系の構築が求められている．

一部結果を先に述べるが，従来法の性能を維持しつつ分析方法を小型化することは思ったほど簡単ではない．原理的には，抽出液の濃縮や溶媒量を減少させることによってそれは達成できると予想されたが，実際のところはブランクマトリックスが混入することによって安定した結果が得られない．従来法での分析においては使用容器の選別はそれほど徹底的にはされてこなかったことが原因として挙げられる．作業に使用するプラスチック容器や包装材に含まれる可塑剤や離型剤，印刷ラベルのインク溶媒や接着剤に含まれる添加剤などがブランクマトリックスの候補として挙げられるが，スケールダウン（抽出溶媒や誘導体化試薬の比はそのままにサンプル量を減少させるアプローチ）によってブランクマトリックスの相対比が増加し，分析対象化合物の検出を遮蔽してしまう．また，誘導体化時にブランクマトリックスが試薬を消費することによって競合阻害を起こす可能性も考えられた．

感度を稼ぐために GC カラムへの導入量増加（注入量の増加，スプリット比の減少）を試みた場合では，バックグラウンド信号が増加することに加え，導入時間が増加することによる前

半ピークのリーディングと，溶媒の導入量が増加することによる後半ピークのテーリングやピーク幅増加が問題となる．

本章では，指先穿刺によって得られる 20 µL の血液からメタボローム分析を可能にするために，5 µL の血漿で再現性良く分析可能な分析方法の構築を試みた．そのために，誘導体化反応のスケールダウン検討をはじめとして抽出条件の改善やブランクマトリックスを可能な限り低減するために使用する容器などを選別した．

2.2. 実験材料および実験方法

2.2.1. 試薬

抽出には，GenPure UV-TOC xCAD plus (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)で製造された超純水，およびアセトニトリル（LC-MS グレード，関東化学，東京，日本）を使用した．誘導体化には，メトキシアミン塩酸塩（MeOX）（Sigma-aldrich, St. Louis, USA），ピリジン（インフィニティピュアグレード，富士フイルム和光純薬，大阪，日本），*N*-メチル-*N*-トリメチルシリルトリフルオロアセトアミド（MSTFA）（ジーエルサイエンス，東京，日本）を用いた．保持指標の計算には，炭化水素混合試料（C9-C40，ジーエルサイエンス）を用いた．

2.2.2. 分析サンプルおよび実験器具

分析サンプルとして，正常ヒト血漿（ヘパリン処理，コスモ・バイオ，東京，日本）を用いた．4℃で解凍後 1.5 mL チューブに 50 µL ずつ分注し，使用時まで-30℃保存した．

比較に用いた実験器具は以下の通りである．誘導体化時の容器： 1.5 mL, 0.5 mL セーフロックチューブ（Eppendorf, Hamburg, Germany），0.3 mL 不活性化処理済みガラスインサート（Thermo Fisher Scientific）．GC バイアル： La-Pha-Pack 0.2 mL ガラスインサート付きオートサンプラーバイアル（ジーエルサイエンス）．ピペットチップ： Sapphire ピペットチップ （Greiner Bio-One, Vilvoorde, Belguim）， PIPETMAN® ダイアモンドチップ （Gilson,

Middleton, USA).

2.2.3. サンプル前処理

サンプル前処理の詳細な条件については各項に表として記載した．手順については以下の通りである．振盪には ThermoMixer C (Eppendorf)を用いた．融解した血漿に超純水を加え希釈・抽出を行った(4℃, 1200 rpm, 10 分)．続いて，同チューブにアセトニトリルを加え除タンパク処理(4℃, 1200 rpm, 10 分)を行った後，遠心(4℃, 16000×*g*, 3 分)にて得られた上清をサンプル溶液とした．サンプル溶液は遠心濃縮および凍結乾燥処理後，20 mg/mL MeOX/ピリジン溶液でオキシム化(30℃, 1200 rpm, 90 分)，MSTFA でトリメチルシリル化(37℃, 1200 rpm, 30 分)処理後，反応液を GC/MS に供した．

2.2.4. GC-MS 分析

分析には GCMS-TQ8040(島津製作所，京都，日本)を用いた．分析カラムには InertCap 5MS/NP(30 m × 0.25 mm ID, df=0.25 µm, ジーエルサイエンス)を用いた．キャリアーガスにはヘリウムを使用し，流量は 1.12mL/min，注入温度は 270℃に設定した．オーブン温度は 80℃で 2 分保持後 15℃/min で昇温し 330℃で 6 分保持した．トランスファーライン温度は 310℃，イオン源温度は 280℃とし，マスレンジは 85-500 *m/z* かつスキャン速度を 3333 *m/z* sec^{-1} に設定した．

2.2.5. データ解析

すべてのデータ解析(ピーク検出，アノテーション，アライメント)は MS-DIAL ver 4.24 で行った．データ行列作成後，R 言語を用いて主成分分析(PCA)を行った．

2.3. 結果と考察

2.3.1.スケールダウンによるサンプル量削減アプローチの検討

はじめに，スケールダウンによるサンプル量削減アプローチについて検討を行った．前処理条件は表 1 の通りである．

表 1:スケールダウン検討試験の前処理条件および検出ピーク数等

サンプル名称	P50	P25	P10	P05	P02
血漿（μL）	50	25	10	5	2
超純水（μL）	150	75	30	15	6
アセトニトリル（μL）	800	400	160	80	30
遠心上清（μL）	200	200	180	90	30
誘導体化時の容器	1.5 mL チューブ	1.5 mL チューブ	1.5 mL チューブ	1.5 mL チューブ	1.5 mL チューブ
MeOX/ピリジン（μL）	50	50	45	22.5	7.5
MSTFA (μL)	50	50	45	22.5	7.5
オートサンプラーでの容器	GC バイアル	GC バイアル	GC バイアル	GC バイアル	GC バイアル
検出強度総和の平均 (全ピーク [a])	4269898	4048477	4370735	3979662	4298441
検出強度総和の平均 (ブランクピーク [b])	410465	438584	479790	621875	1545159
ピーク数 [c] (サンプル/ブランク>3)	57	59	61	61	70
ピーク数 [d] (RSD<30%, n = 4)	57	58	59	58	64
ブランク強度/全強度の割合(%)	9.6	10.8	11.0	15.6	35.9
誘導体化処理時の比接触面積（$mm^2\ \mu L^{-1}$）	0.89	0.94	1.48	2.09	4.02

[a] 検出強度≥2000，検出強度補正なし，n=4.

[b] サンプル/ブランクの平均<3，検出強度補正なし，n=4.

[c] 検出強度≥2000，サンプル/ブランクの平均>3，検出強度補正なし.

[d] 検出強度≥2000，サンプル/ブランクの平均>3，相対標準偏差（RSD）<30%，検出強度補正なし.

スケールダウンによって検出ピーク数は増加する傾向が見られた．しかし，データ構造の違いを見出すために主成分分析を行った結果（図 2），スコアプロットの第一主成分軸上でスケールダウン比率に則したトポロジーが確認された．ローディングプロットは第一主成分軸の両端に代謝物がプロットされていることから，スケールの大きさに依存して増減する特徴的なピークの存在を示した．すなわち，従来法をスケールダウンする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．各代謝物の検出強度（図 3）を精査していくと，検出強度の変動は概ね以下の 3 つに分類された．(1)サンプルでの検出強度変化とブランクでの検出強度変化が同等であるもの（e.g. Lactic acid, Myristic acid），(2)トリメチルシリル（TMS）化効率がスケールダウンに伴って減少するもの（e.g. Phenylalanine_2TMS→1TMS, Serine_3TMS→2TMS, Threonine_3TMS→2TMS）．(3)検出強度が変化しないもの（e.g. Glucose, Fructose, Mannose, Inositol）．

(1)については，スケールダウンに伴うブランクマトリックスの濃縮が起きていると考えられる．同型のチューブを使用した場合，チューブ内溶液量が減少するにつれて 1 μL 当たりの接触表面積は大きくなる．これを示すように，検出強度の上昇を示す化合物の検出強度と 1 μL 当たりの接触表面積（計算値）に対する相関係数は 0.958 であった．(2)については前に述べたブランクマトリックスの濃縮によって誘導体化試薬が消費されたために，分析対象化合物の中でも比較的誘導体化が入りにくいアミン，カルボン酸を多く持つアミノ酸などの誘導体化効率が下がっていると推察された．一方で，誘導体化されやすい水酸基を多く持つ糖類などは(3)の傾向を示していた．

結果として，ブランクマトリックスの減少には誘導体化に用いる容器に対する比接触面積を減らすことが重要であること，このアプローチによるスケールダウン下限はスコアプロットのトポロジーから血漿 10 μL が限界であり，目標としている 5 μL は非現実的であることが明らかとなった．

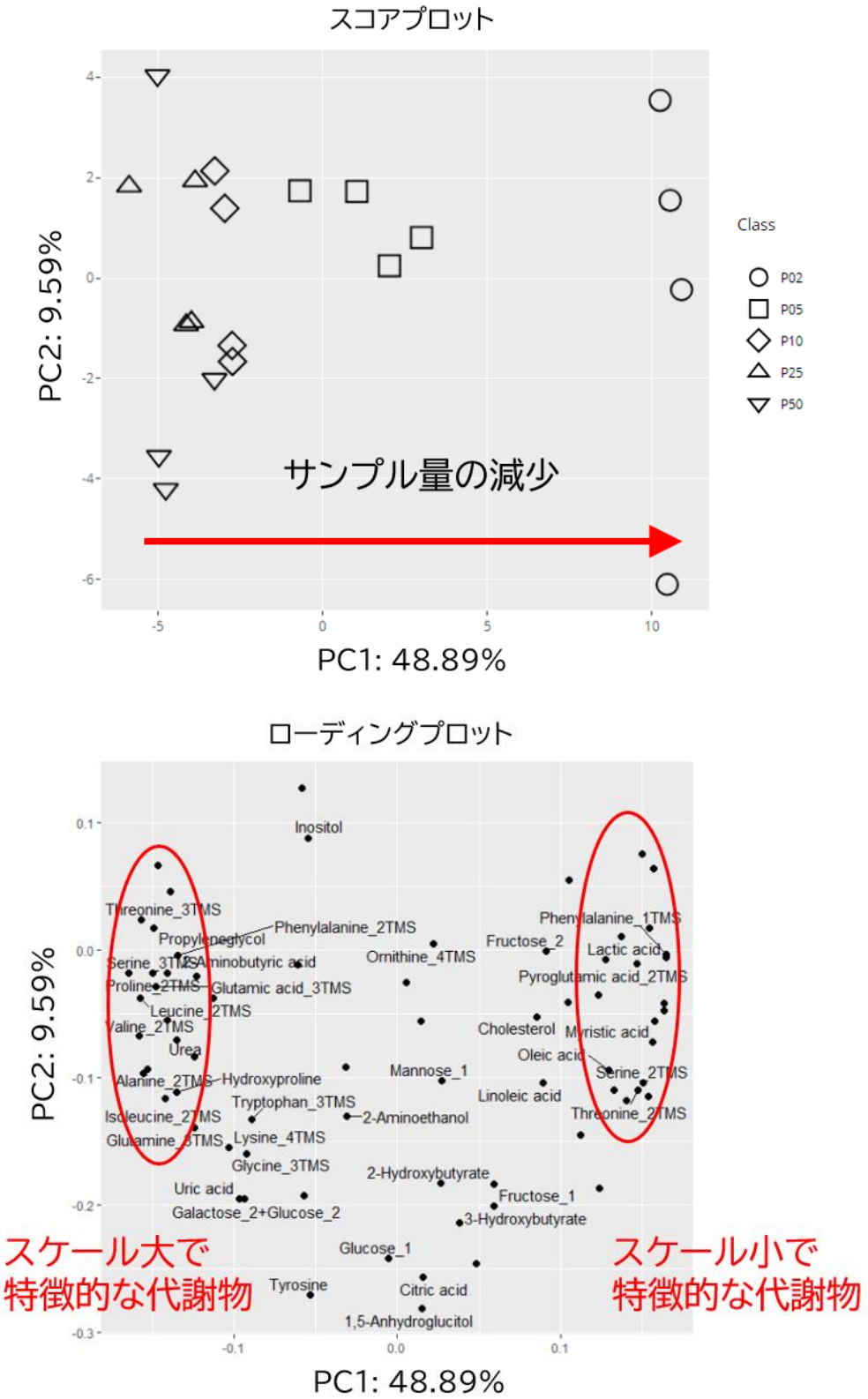


図 2:スケールダウン検討試験の主成分分析結果. すべての群で以下の評価基準を満たした 73 ピーク（検出強度≥2000, サンプル/ブランクの平均>3, RSD<30%). 検出強度補正なし, オートスケーリング.

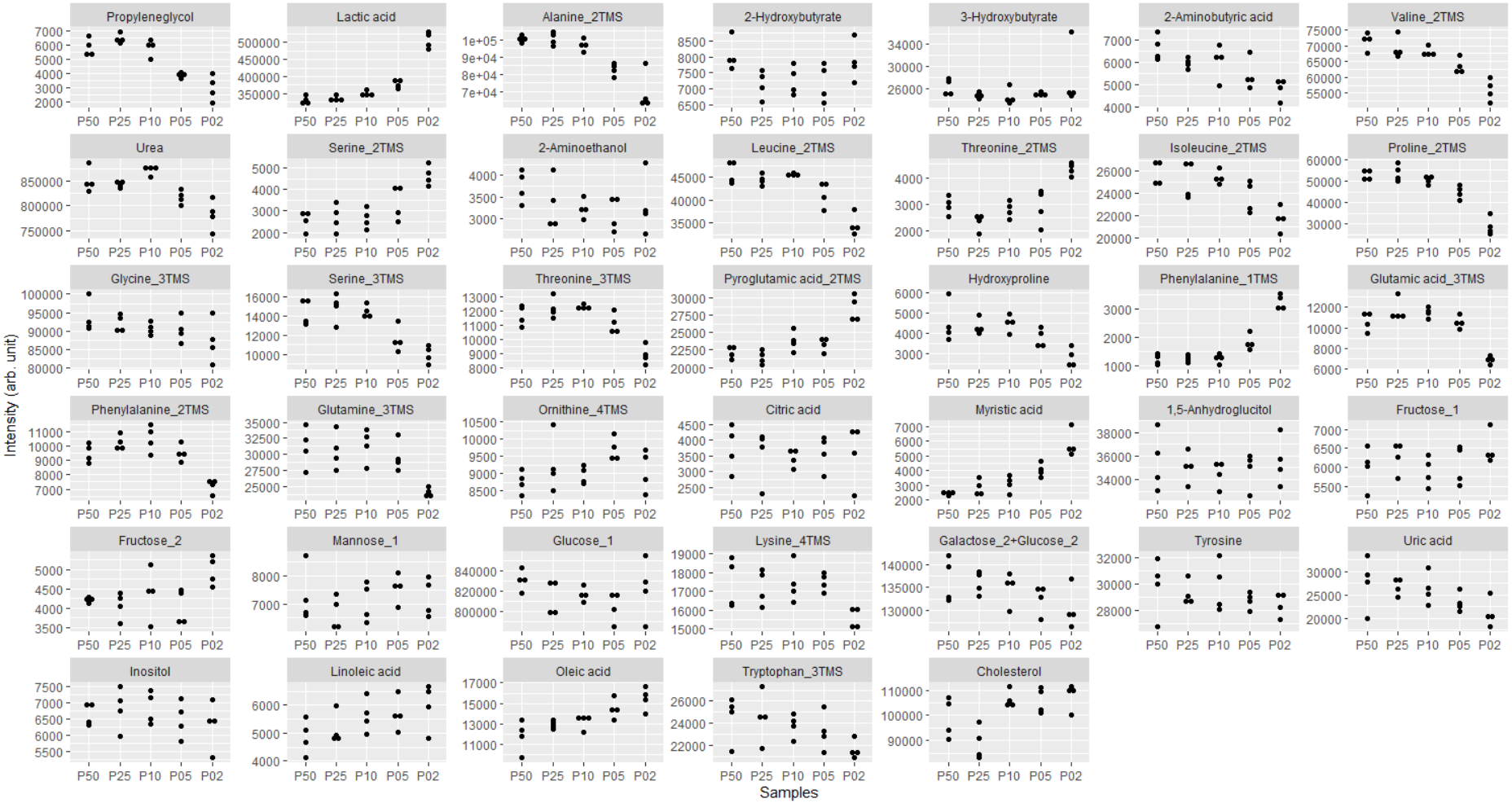


図 3:スケールダウン検討試験で検出された代謝物の検出強度.

2.3.2. 抽出液の濃縮および GC カラムへの注入量増加による影響

前述のスケールダウンによるアプローチでは限界があることが明らかとなったため，別のアプローチとしてカラムに導入する試料量の増加（注入口での濃縮），抽出のみのスケールダウンおよび抽出液の濃縮を検討した．カラムに導入するサンプル量については，導入量の増加に伴う溶媒効果の影響とピーク形状を評価するため，ピリジンと MSTFA で希釈したアルカンミックスを異なる条件で分析し，シンメトリー係数の偏差が最も小さくなった条件（補表 1）を採用した（注入量 2 μL，スプリット比 10）． 前処理条件などは図 4 および表 2 に示す通りである．

図 4：抽出液の濃縮および GC カラムへの注入量増加における実際の分析手順とサンプル負荷量の変動

表 2:抽出液の濃縮とGC カラムへの注入条件およびピーク数の比較

サンプル名称	P50_200	P50_040	P05_040	P05_400
血漿(μL)	50	50	5	5
超純水(μL)	150	150	15	195
アセトニトリル(μL)	800	800	80	800
遠心上清(μL)	200	40	40	400
誘導体化時の容器	1.5 mL チューブ	1.5 mL チューブ	1.5 mL チューブ	1.5 mL チューブ
ピペットチップ	Sapphire	Sapphire	Sapphire	Sapphire
MeOX/ピリジン(μL)	50	50	50	50
MSTFA (μL)	50	50	50	50
注入量 (μL)	1	2	2	2
スプリット比	25	10	10	10
ピーク数* (サンプル/ブランク>3)	46	37	38	66
ピーク数** (RSD<30%, n=4)	33	29	34	6

*検出強度≥2000, サンプル/ブランクの平均>3, 検出強度補正なし.

**検出強度≥2000, サンプル/ブランクの平均>3, RSD<30%, 検出強度補正なし.

カラムに導入する試料量の増加の影響（P50_200 vs. P50_040）に着目すると，分析に供するサンプル量を減らして導入量を増やした場合では検出ピーク数・再現性ともに劣る傾向が確認された．注入量を増やした場合では溶媒等に由来するバックグラウンド信号の増加により微量アナライトの検出が遮蔽されていると考えられる．抽出操作をスケールダウンした場合（P50_200 vs. P05_040）でも同様の傾向が確認されたことから，抽出におけるブランクマトリックスの影響は少ないことが示唆された．

検討した分析条件の中では，濃縮量と導入量を増加させた条件（P05_400）で検出化合物数が最も多かった．この条件ではサンプルに対する抽出液量の比が他の条件と比較して大きいため，代謝物の抽出効率（特にタンパク質と結合している代謝物）が改善されたと考えられた．しかし，RSD<30%のピークは非常に少なかった．高い RSD を与える要因としては血漿サンプルの分注時の誤差が考えられたが，個々のサンプルで各代謝物の検出強度は同様の変化を示さなかった．従って，前項で確認されたような，ブランクマトリックスの増加によって誘導体化反応に誤差を与えている可能性が示唆された．

結果として，抽出液の濃縮とカラム導入量の増加は顕著な効果を示さなかったが，抽出溶媒比率を大きくした条件，血漿 5 μL+水 195 μL＋アセトニトリル 800 μL の抽出条件で代謝物カバレッジの向上が期待された．

2.3.3. 誘導体化時に使用する容器およびマイクロピペットチップの検討

これまでの検討から，誘導体化時に混入するブランクマトリックスの存在が微量サンプルの誘導体化効率などに影響を与えていることが強く示唆され，それら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，本実験においては 3 種の容器（ポリプロピレン製 1.5 mL チューブおよび 0.5 mL チューブ，0.3 mL 不活性化処理済みガラスインサート）を用いてメトキシム化およびトリメチルシリル化後，La-Pha-Pack ガラスインサート付きオートサンプラーバイアル（以下 GC バイアル）に反応液を移す（EP15，EP05，

GI2V)もしくは反応液の入ったバイアルインサートをガラスバイアルに移した(GID, GID). それらをGC-MS分析に供し, 検出ピークおよび検出強度を比較した. 使用した容器を図 5に示す. 特徴的な化合物の抽出には部分的最小二乗-判別分析(PLS-DA)を用い, ローディング値の高い化合物を選択した.

表 3:検討に用いた実験器具の組み合わせおよび誘導体化試薬量

誘導体化時の容器	1.5 mL チューブ	0.5 mL チューブ	ガラス インサート	ガラス インサート	ガラス インサート
ピペットチップ	Gilson	Gilson	Gilson	Gilson	Greiner
$MeONH_2$/ピリジン(μL)	50	50	50	50	50
MSTFA(μL)	50	50	50	50	50
保存容器	GC バイアル	GC バイアル	GC バイアル	ガラス インサート	ガラス インサート
サンプル名称	EP15	EP05	GI2V	GID	GIG

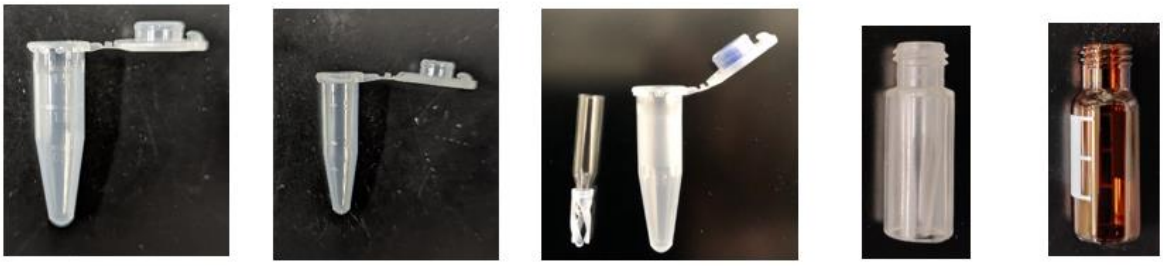


図 5:使用した容器. 左から1.5 mLチューブ, 0.5 mLチューブ, 0.3 mL不活性化処理済みガラスインサート(PTFEセプタム付き1.5 mLチューブに入れて使用), GCバイアル(ガラスインサート付きオートサンプラーバイアル), ガラスバイアル.

各実験器具に特徴的なブランクマトリックスとして推定されたピークを表 4 に示す．分析時に GC バイアル を用いた場合，グリセロールが特徴的に検出された．GC バイアルは梱包材にプラスチックフィルムが用いられており，当該フィルムの可塑剤として混合されていたグリセロールが容器内に吸着したと考えられる．マイクロチューブを誘導体化反応に使用した場合では，パルミチン酸やステアリン酸などが検出されたが，溶出傾向は容器容量によって異なっていた．パルミチン酸やステアリン酸はプラスチック容器の離型剤として含まれており，その際に浸潤したものが溶出していると考えられる．容器容量の違いによるブランクマトリックスの差は，容器の厚さの違いによる前述した離型剤の保持量の差に由来するものではないかと推察された．また，異なるメーカーのマイクロピペットチップを使用した場合においても，いくつかの Unknown ピークにおいて検出強度に差が確認できた．

本結果から，以降の誘導体化反応においては，不活性化処理済み 0.2 mL バイアルインサートとギルソン社製ダイアモンドチップを採用した．

表 4:実験器具に特徴的なブランクマトリックス由来ピーク.

	検出強度の平均値(n=4)					由来する実験器具			
ピーク番号	EP15	EP05	GI2V	GID	GIG	GC バイアル	1.5 mL チューブ	0.5 mL チューブ	Sapphire チップ
Glycerol_131	77016	95427	83075	1784	1690	*			
Unknown_133	2047	3094	2390	226	83	*			
Unknown_161	2445	1015	1427	303	318	*			
Unknown_222	681	1154	933	141	123	*			
Unknown_220	1338	1300	360	497	688		*	*	
Unknown_226	512	978	185	323	220		*	*	
Unknown_258	4925	2749	982	1033	1002		*	*	
Palmitic acid_259	10803	5797	2258	2399	2243		*	*	
Unknown_240	881	296	267	320	222		*		
Unknown_241	1185	344	249	166	135		*		
Unknown_265	2529	1241	1223	1009	966		*		
Stearic acid_266	8870	4110	3182	2736	3387		*		
Unknown_267	2633	1319	1163	1089	1026		*		
Unknown_268	2632	1316	1171	1079	1029		*		
Unknown_178	311	951	296	290	268			*	
Unknown_295	232	162	130	138	1239				*
Unknown_296	509	589	480	676	1059				*
Unknown_309	168	181	155	198	1454				*
Unknown_323	295	355	405	364	1426				*
Unknown_324	170	218	284	151	1861				*
Unknown_325	213	222	307	233	814				*
Unknown_334	403	241	369	228	1388				*
Unknown_335	229	223	204	237	1847				*
Unknown_353	219	170	199	181	1168				*

EP15: ダイアモンドチップを使用し, 1.5 mL チューブ で反応させ GC バイアルに移したもの.

EP05: ダイアモンドチップを使用し, 0.5 mL チューブ で反応させ GC バイアルに移したもの.

GI2V: ダイアモンドチップを使用し, 0.3 mL ガラスインサートで反応させ GC バイアルに移したもの.

GID: ダイアモンドチップを使用し, 0.3 mL ガラスインサートで反応させそのまま分析に供したもの.

GIG: Sapphine ピペットチップを使用し, 0.3 mL ガラスインサートで反応させそのまま分析に供したもの.

検出強度補正なし. *は各実験器具に由来すると分類されたピークを示す.

2.3.4.ヒト血漿への適用

上記の結果を踏まえて，最も良い結果を示すと予想される，血漿 5 μL+水 195 μL＋アセトニトリル 800 μL での抽出とガラスインサートを用いた誘導体化を組み合わせた場合の適用性を検証した．コントロールは誘導体化時の容器として 1.5mL マイクロチューブを採用した従来法とした（P50_200）．本実験の比較対象である P05_400 に加えて，誘導体化操作をスケールダウンした P05_120 を比較対象として加え，より少ないサンプル量で分析可能かどうか検討を行った．実験条件を表 5 に，実験手順を図 6 に示す．

表 5：前処理・注入条件およびピーク数の比較

サンプル名称	P50_200	P05_120	P05_400
血漿（μL）	50	5	5
超純水（μL）	150	195	195
アセトニトリル（μL）	800	800	800
遠心上清（μL）	200	120	400
誘導体化時の容器	1.5 mL チューブ	0.3 mL ガラスインサート	0.3 mL ガラスインサート
ピペットチップ	Gilson	Gilson	Gilson
MeOX/ピリジン（μL）	50	15	50
MSTFA (μL)	50	15	50
注入量 (μL)	1	2	2
スプリット比	25	10	10
ピーク数* (サンプル/ブランク>3)	56	55	71
ピーク数** (RSD<30%, n=4)	53	45	53

*検出強度≥2000，サンプル/ブランクの平均>3，検出強度補正なし．

**検出強度≥2000，サンプル/ブランクの平均>3，RSD<30%，検出強度補正なし．

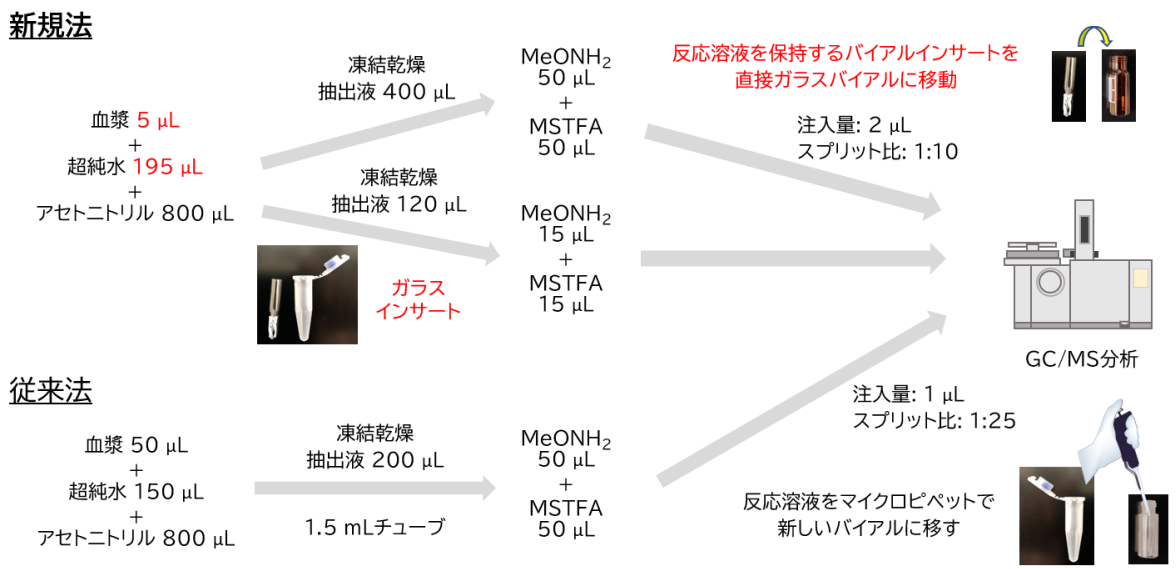


図 6:ヒト血漿での適用性検証における実験手順

本研究で見いだされた手法は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であった．スケールダウンの検証結果（表 2）におけるポリプロピレン製 1.5 mL チューブを用いて同様の前処理を行ったサンプル（P05_400）と比較して RSD30%以下のピーク数が増加し，再現性が大幅に改善された．すなわち，同様の実験手順であっても使用する実験器具に由来するブランクマトリックスが再現性に影響を与えることが示された．ガラスインサートを用いた場合ではブランクマトリックスの溶出がほとんどないと考えられるため，誘導体化反応のスケールダウンによる影響はないと予想されたが，依然として検出化合物数には大きな差が見られた．これについてはガラスインサート中のヘッドスペース比が大きくなることによって誘導体化反応に何らかの影響を与えていることが推察された．

この結果から，誘導体化処理時の容器としてブランクマトリックスの溶出が非常に少ない不活性処理済みガラスインサートを用い，十分量の誘導体化試薬を添加することが，微量サンプル分析において重要であることが明らかとなった．

2.4. 小括

微量臨床検体のメタボローム分析方法を確立するため，従来法のスケールダウンを試みたが，このアプローチでは目標達成が難しいことがわかった．これを解決するために原因を考察したところ，ブランクマトリックスの存在が分析結果に影響を与えることが示唆された．検証のために，ブランクマトリックスの由来を検討し，ブランクマトリックスの混入を低減した場合と従来法との比較を行った．

結果として，従来法と同等かそれ以上の検出感度を持つメタボローム分析方法の開発に成功した．微量サンプルでのメタボローム分析においては，少ないサンプル量から効率よく抽出を行うために抽出溶媒比を大きくすること，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）が重要であることが明らかとなった．ブランクマトリックスの検出強度と誘導体化における比接触面積に相関がみられたことから，比接触面積を最小とするような容器形状が適していると考えられた．

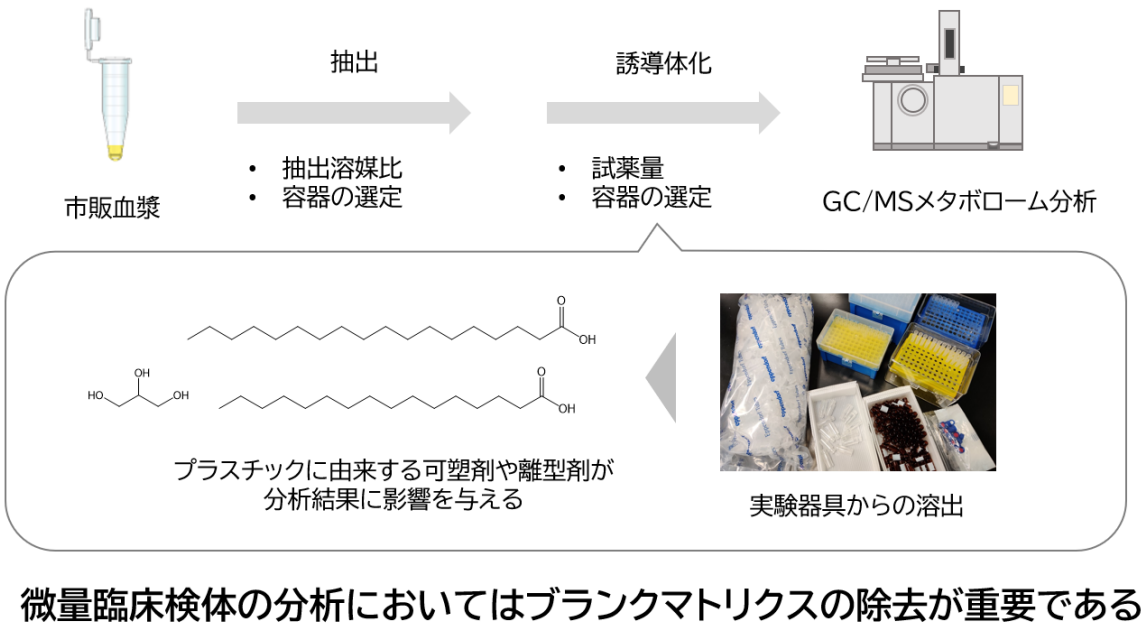


図 7:第 2 章の概略図

3. 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

3.1. 緒言

2 章において，微量臨床検体の前処理（特に誘導体化処理）に用いる実験器具に由来するブランクマトリックスがメタボローム分析に影響を与えることが明らかとなった．これを受けて，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．

本章では対象サンプルを歯肉溝滲出液（GCF）とした．GCF は歯周ポケットに蓄積する部位特異的な組織液であり，歯周病の進行におけるバイオマーカー探索用のサンプルとして用いられる．低侵襲に採取可能であり，口腔内細菌や免疫細胞，組織液など様々な由来を持つ物質が混在するサンプルである．しかし，GCF の蓄積量は歯周ポケットに数 μL 程度であり，分析法開発における制限となっていた．

GCF の採取には，ペリオペーパー®が頻用される(Baima et al. 2021a; Griffiths 2003)．ペリオペーパーは濾紙による毛細管現象を利用して GCF を吸収・保持する利便性の高いサンプル採取ツールである．その一方で，包装フィルムや保持部の樹脂および接着剤などに由来する可塑剤や離型剤を始めとする添加剤をも保持している可能性が高い．これらサンプル採取ツール等に由来するブランクマトリックスは抽出段階でアナライトと同様に溶出し，濃縮されてメタボローム分析に影響を及ぼすだろう．従って，ペリオペーパーは GCF のサンプル採取ツールとして不適切であると考えられる．我々が知る限り，GCF メタボローム分析におけるサンプル採取方法や分析方法の妥当性についての報告はない．

この背景から，GCF のメタボローム分析を実施するにあたってブランクマトリックスの混入を回避する新規のサンプル採取ツールを提案した．既存法としてのペリオペーパーと新規サンプル採取ツールを比較し，微量臨床検体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．

3.2. 実験材料および実験方法

3.2.1. 試薬

抽出には，GenPure UV-TOC xCAD plus (Thermo Fisher Scientific)で製造された超純水，およびアセトニトリル（LC-MS グレード，関東化学）を使用した．誘導体化には，メトキシアミン塩酸塩（MeOX）(Sigma-aldrich)，ピリジン（インフィニティピュアグレード，富士フイルム和光純薬），N-メチル-N-トリメチルシリルトリフルオロアセトアミド（MSTFA）（ジーエルサイエンス）を用いた．内部標準物質として DL-Alanine-2,3,3,3-d_4 （Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA）を用いた．保持指標の計算には，炭化水素混合試料（C9-C40，ジーエルサイエンス）を用いた．

3.2.2. 実験器具

採取方法の評価用サンプルとして，市販正常ヒト血漿（ヘパリン処理，コスモ・バイオ）を用いた．4℃で解凍後 1.5 mL チューブに 50 µL ずつ分注し，使用時まで-30℃保存した．

サンプル採取ツールには，既存法としてペリオペーパー（Oraflow Inc., Amityville, NY, USA），新規法として 200 µL ゲルローディングチップ（Scientific Specialties, Inc., Lodi, CA, USA）とシリコンニップルを用いた．

実験器具は前章に基づき，次に示すものを使用した．抽出時の容器：1.5 mL セーフロックチューブ（Eppendorf），誘導体化時の容器：0.3 mL 不活性化処理済みガラスインサート（Thermo Fisher Scientific），ピペットチップ：PIPETMAN® ダイアモンドチップ （Gilson）．

3.2.3. GCF の採取

当該サンプルの採取は，大阪大学歯学部倫理審査委員会の承認を受け，ヘルシンキ宣言の原則に従って実施された．

ピペットチップによる GCF 採取は次の手順で大阪大学歯学部にて行われた．綿ロールで

の簡易防湿およびエアー乾燥後，綿球で可能な限りプラークを除去した．ニップル付きピペットチップを内部が陰圧の状態で歯周ポケットに挿入し，抵抗を感じた部分で圧を開放しながらピペットチップを引き抜いて GCF を採取した．サンプル採取ポイントごとにチップは取り替えた．採取された GCF は即座に内部標準物質入り純水 50 μL に全量懸濁した．サンプル採取後は次の手順を実施するまで－30℃で保存した．

3.2.4. サンプル前処理

ペリオペーパー採取およびピペットチップ採取を評価するために，1，2，5 μL の血漿をチューブ内に留置し，各手法で採取した．使用するペリオペーパーは 1 サンプルにつき 1 枚とした．採取は一つの試験区で 4 回繰り返した（n=4）．振盪には ThermoMixer C（Eppendorf）を用いた．ペリオペーパーを内部標準物質入り純水 50 μL に留置もしくはピペットチップ内の血漿を内部標準物質入り純水 50 μL に懸濁し，抽出した（4℃，1200 rpm，10 分）．続いて，同チューブにアセトニトリル 200 μL を加え除タンパク処理（4℃，1200 rpm，10 分）を行った後，遠心（4℃，16000×*g*，3 分）にて得られた上清をサンプル溶液とした．サンプル溶液は遠心濃縮および凍結乾燥処理後，20 mg/mL MeOX/ピリジン溶液 7.5 μL でオキシム化（30℃，1200 rpm，90 分），MSTFA 7.5 μL でトリメチルシリル化（37℃，1200 rpm，30 分）処理後，反応液を GC/MS に供した．

3.2.5. GC-MS 分析

分析には GCMS-TQ8040（島津製作所，京都，日本）を用いた．分析カラムには InertCap 5MS/NP（30 m × 0.25 mm ID，df=0.25 μm，ジーエルサイエンス）を用いた．キャリアーガスにはヘリウムを使用し，流量は 1.12mL/min，注入温度は 270℃に設定した．オーブン温度は 80℃で 2 分保持後 15℃/min で昇温し 330℃で 6 分保持した．トランスファーライン温度は 310℃，イオン源温度は 280℃とし，マスレンジは 85-500 *m/z* かつスキャン速度を 3333 *m/z* sec^{-1} に設定した．

3.2.6. データ解析

すべてのデータ解析（ピーク検出，アノテーション，アライメント）は MS-DIAL ver 4.24 で行った．データ行列作成後，R 言語を用いてボルケーノプロットの作図および主成分分析（PCA）を行った．

3.3. 結果と考察

3.3.1. サンプル採取方法の違いによるブランクマトリックスの比較

これまで GCF の採取に頻用されてきたペリオペーパーは紙片による毛細管現象を利用して吸収するものである．2 章でも述べたようにブランクマトリックスが混入すること，吸収体積が限られていること，ろ紙の弱い弾性による深部への差し込みにくさなど，当該手法には多くの制限が存在することから，より利便性の高いサンプル採取ツールの開発が必要である．これを克服するため，ポリプロピレン製ピペットチップにシリコン製ニップルを装着したものをメタボローム分析用 GCF 採取ツールとすることが良いと考えた．本ツールは，ニップルをホールドした状態でチップ先端を歯周ポケットに挿入し，抵抗を感じる深さで開放しながら抜き取ることにより，深部の GCF までサンプル採取することが可能である．

手法の違いに由来するブランクピークを比較するために，超純水（n=4）を分析して得られた検出ピーク（図 8）についてボルケーノプロットを作成した（図 9）．ペリオペーパー採取では紙片から溶出したと思われる糖類関連化合物や，梱包材もしくは樹脂部に由来すると思われる脂肪酸および多量のフタル酸エステルが検出された．その一方で，ピペットチップ採取ではこれらのピークはほぼ検出されなかった．

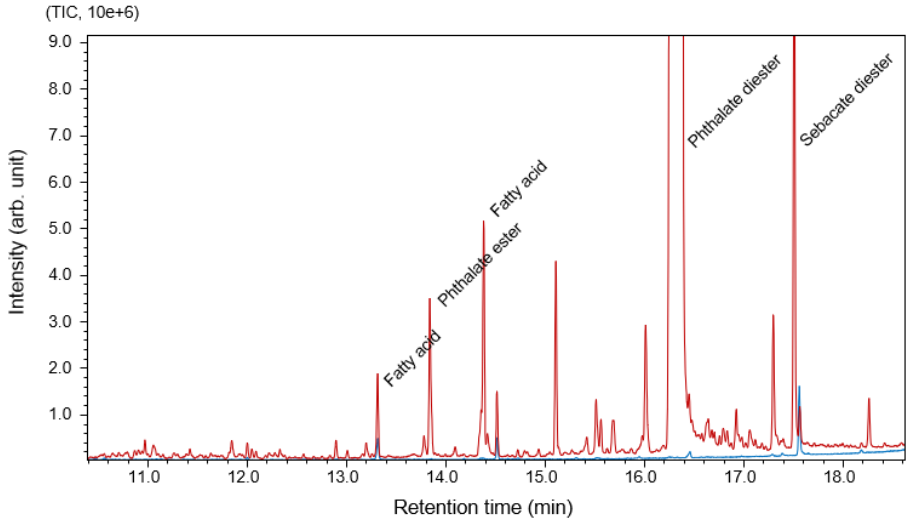


図 8:サンプル負荷なし条件のクロマトグラム(一部拡大).
赤:ペリオペーパー採取, 青:ピペットチップ採取

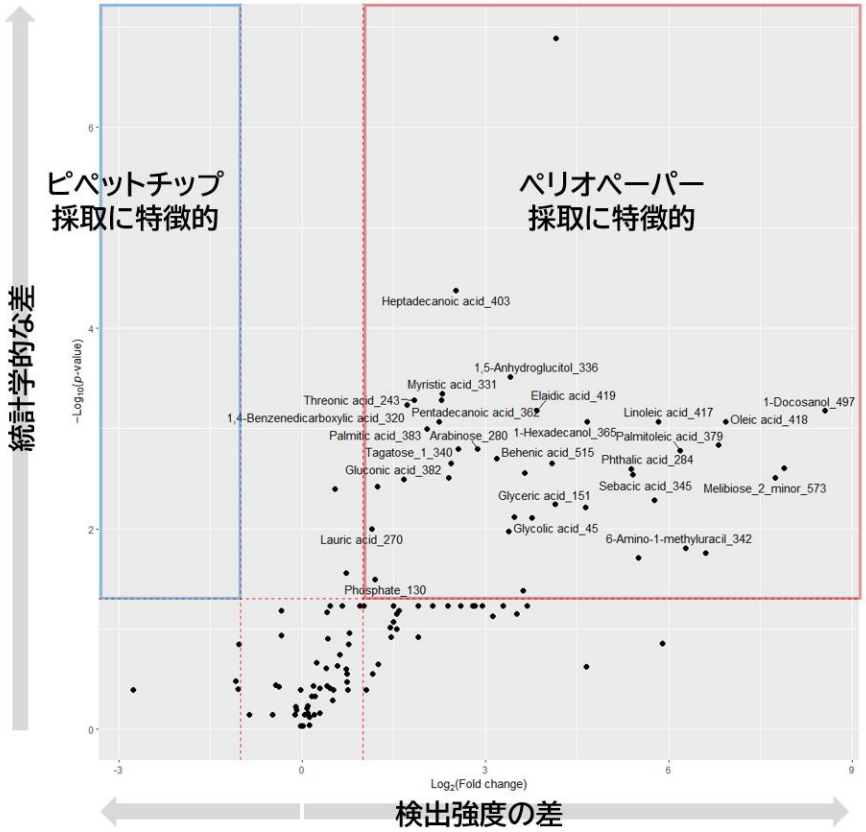


図 9:サンプル負荷なし条件で検出されたピークのボルケーノプロット;ペリオペーパー採取(右)およびピペットチップ採取(左)に特徴的なブランクマトリックスの比較. 各 p 値は Benjamini-Hochberg 法によって補正された. クロマトグラムで確認されたテレフタル酸エステルのピークは過度のサチュレーションのため除外された. 各ラベルはライブラリサーチによってアノテーションされた化合物名およびピーク ID を示す.

3.3.2. サンプル採取方法の違いによるサンプル由来ピークの比較

続いて，各採取方法の実サンプル適用性を検証した．しかしながら，一定量の GCF を確保することは困難であるため，市販血漿を GCF モデルサンプルとして GC/MS メタボローム分析を行った．GCF のサンプル量が炎症の進行度によって増加することを考慮し，血漿 1 μL，2 μL，5 μL をペリオペーパーまたはニップル付きピペットチップで吸引し内部標準物質を含んだ水 50 μL に懸濁させた．採取量の差による検出強度への影響は各ピークの検出強度を内部標準物質の検出強度で割ることで補正された．

各採取法での検出ピークをデータ行列とした主成分分析の結果を図 10 に示す．PC1 軸はサンプル負荷量，PC2 軸は採取法の違いとして解釈された．スコアプロットにおいて着目すべきは，高負荷サンプル（PP5）のペリオペーパー採取で PC1 軸において中負荷サンプル（PP2）との分離がピペットチップ採取と比較して小さいことである．これはペリオペーパーによる最大採取量が限られていることを示しており，実際に血漿 5 μL 採取時では血漿サンプルが回収しきれずチューブ内に残存していた．ローディングプロットではペリオペーパー採取時のみ脂肪酸類の検出強度が高くなる傾向が確認できたが，パルミトレイン酸，オレイン酸，エラグ酸をはじめとしたこれらの脂肪酸はブランクマトリックスとして含まれており（図 11），その高いバックグラウンドがトポロジーに寄与していた．ピペットチップ採取においてはブランクサンプル（PT0）で脂肪酸類の検出強度は非常に低く，サンプル負荷量依存的な検出強度の増加が確認されたことから，より実際の代謝物プロファイルを反映していると示唆された．また，アミノ酸類の検出強度が高かったが，これは前述したサンプル負荷量による影響が大きいと考えられる．

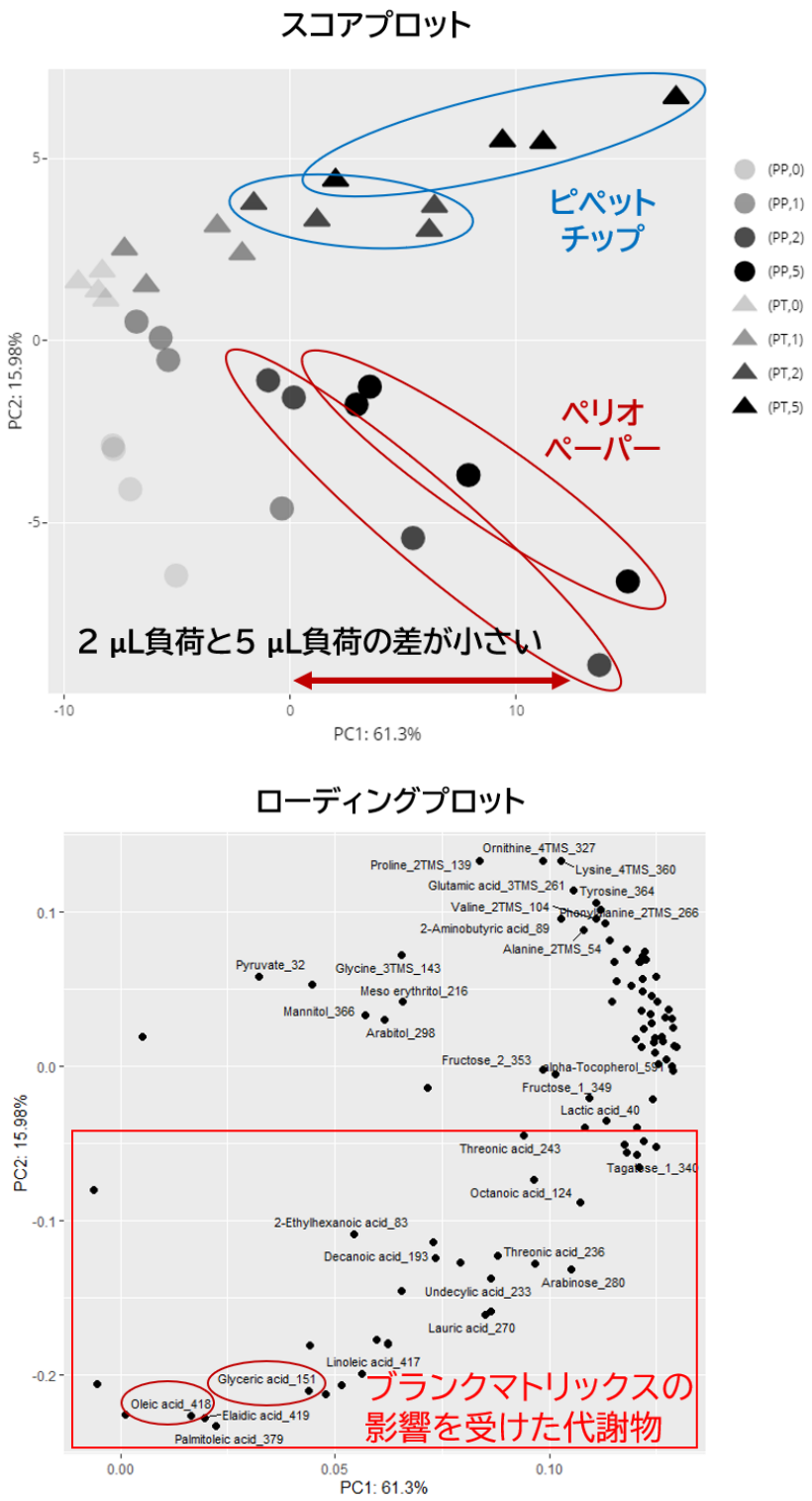


図 10:主成分分析;血漿を代替サンプルとした採取法による代謝物カバレッジの違い.
PP:ペリオペーパー採取, PT:ピペットチップ採取, 数字はサンプル負荷量を示す.
総ピーク数 96(内部標準物質および LOWESS による検出強度補正あり, RSD(QC サンプル) <0.3, 検出強度 2000 以上, サンプル/ブランク強度比(平均)>3, 少なくとも 1 つの群でこれらの基準を満たしサンプル由来と判定されたピーク).

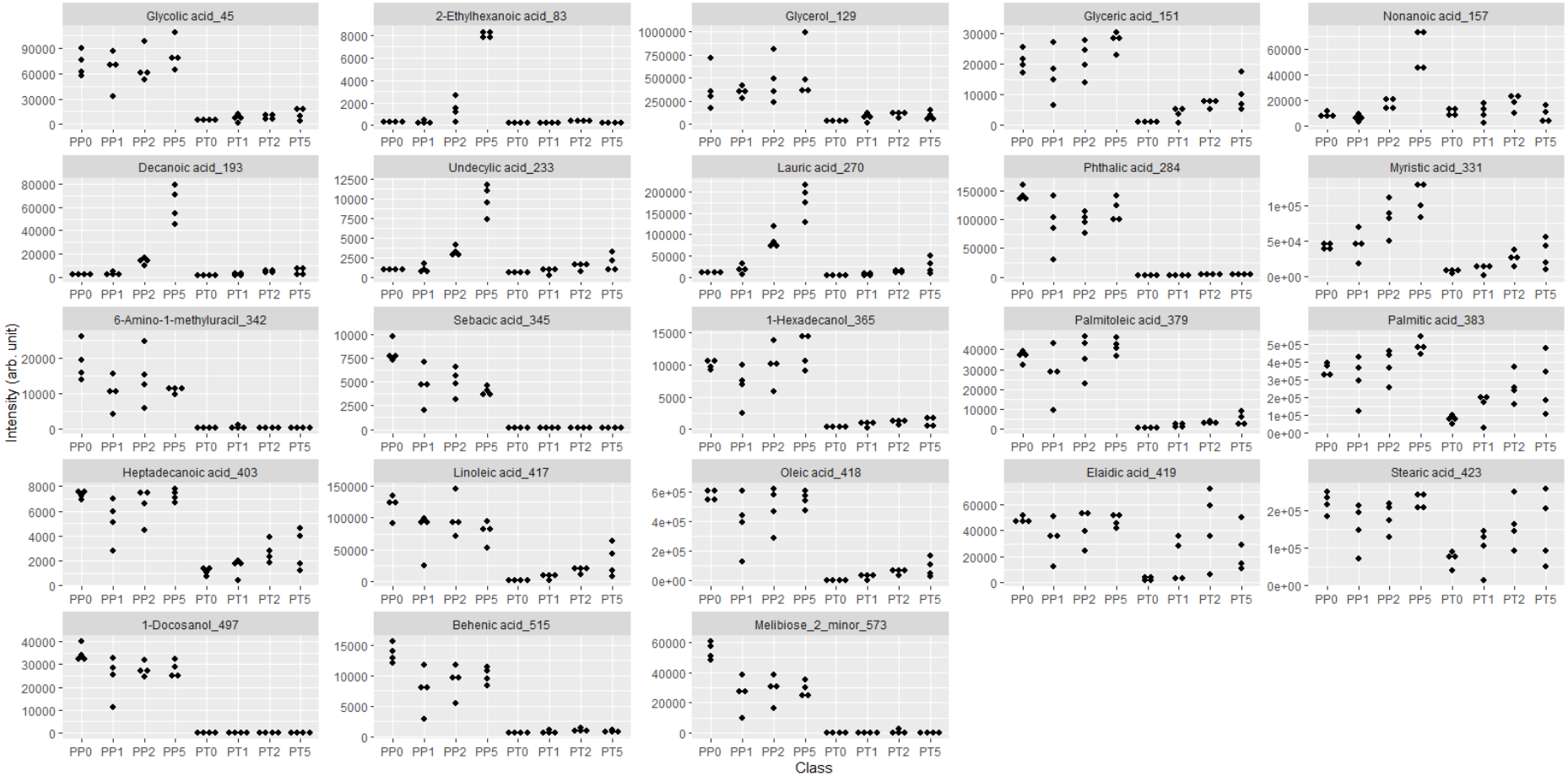


図 11:ペリオペーパー採取(PP)およびピペットチップ採取(PT)におけるサンプル負荷量(血漿 0, 1, 2, 5 μL)と検出強度の比較

3.3.3. 歯周病患者から採取した GCF のメタボローム分析

前項の実験より，ピペットチップ採取が GCF メタボローム分析に適していることが確認されたため，一人の歯周病患者から採取した GCF サンプルの分析を行った．サンプル情報を表 6 に示す．前処理や QC サンプルの作成については前回と同様に行い，GC/MS へのサンプル注入条件は保持時間の再現性向上のため注入量 1 μL，スプリット比 1:25 に設定した（サンプル注入量 5 分の 1）．

表 6：GCF サンプルのサンプル採取ポイントおよび臨床所見

サンプル番号	歯の位置	サンプル採取位置	プローブ深度（mm）	出血の有無	歯の動揺度
1	右上6	頬側近心	4	なし	0 度
2	右上6	頬側遠心	2	あり	0 度
3	右上6	口蓋側近心	5	あり	0 度
4	右上6	口蓋側遠心	2	あり	0 度
5	右下7	頬側近心	2	なし	0 度
6	右下7	頬側遠心	4	なし	0 度
7	右下7	舌側近心	3	あり	0 度
8	右下7	舌側遠心	3	なし	0 度
9	左下7	頬側近心	6	なし	0 度
10	左下7	頬側遠心	4	なし	0 度
11	左下7	舌側近心	4	あり	0 度
12	左下7	舌側遠心	2	なし	0 度
13	右下2	唇側近心	2	なし	0 度
14	右下2	唇側遠心	2	あり	0 度
15	右下2	舌側近心	2	なし	0 度
16	右下2	舌側遠心	2	なし	0 度

本実験でアノテーションされた計 38 化合物（同一化合物由来のピークを含め 40 ピーク）の検出強度を図 11 に示す．同一の歯から採取されたサンプルにおいてもプロービング深度が異なると代謝物の検出強度が異なる傾向が見られた．プロービング深度の深い（5-6 mm）GCF サンプルで検出強度が高い傾向を示した代謝物として，エライジン酸，コレステロ

ール，アスパラギン酸，グルタミン酸が挙げられた．興味深いことに，エライジン酸はペリオペーパー採取においてブランクマトリックスと判定された化合物であり，ピペットチップ採取でのみサンプル由来化合物として検出されるピークであった．この事実から，ピペットチップによるGCF採取法では重要な代謝物をより多く検出できることが示唆された．

続いて，先述のアノテート代謝物をデータマトリックスとして主成分分析を行った（図 12）．スコアプロットにおいて，各サンプルは主に出血の有無によって二分され，さらにプラーク形成によるポリアミン産生亢進段階（PC2の正側）と歯周組織の破壊（PC1の正側）までの一連の変化をトレースした．すなわち，ポリアミン（cadaverine，putrescine）や taurine，5-aminovaleric acid, valine, leucine, ribose など，先行研究(Ozeki et al. 2016)や唾液メタボローム分析(Baima et al. 2021b)において報告された複数の代謝物を検出可能であった．S01は出血の所見が認められなかったが，隣接する部位に深いポケットと出血の所見が確認されていることと，綿球で除去しきれないプラークが残存していたことから，その影響を受けた可能性がある．プロービング深度が最も深い S09（6 mm）では，プラークコントロールの状態が良かったことから歯周病菌の影響が少なかった一方で，歯周組織の破壊が進んでいることから組織液の滲出が多く宿主由来と考えられる成分（アミノ酸類，コレステロール，エライジン酸）の検出強度が上昇していた．結果として，ピペットチップ採取法は採取部位ごとに歯周病菌の代謝亢進と歯周組織の破壊に関するメタボローム変動を捉えることが可能であった．

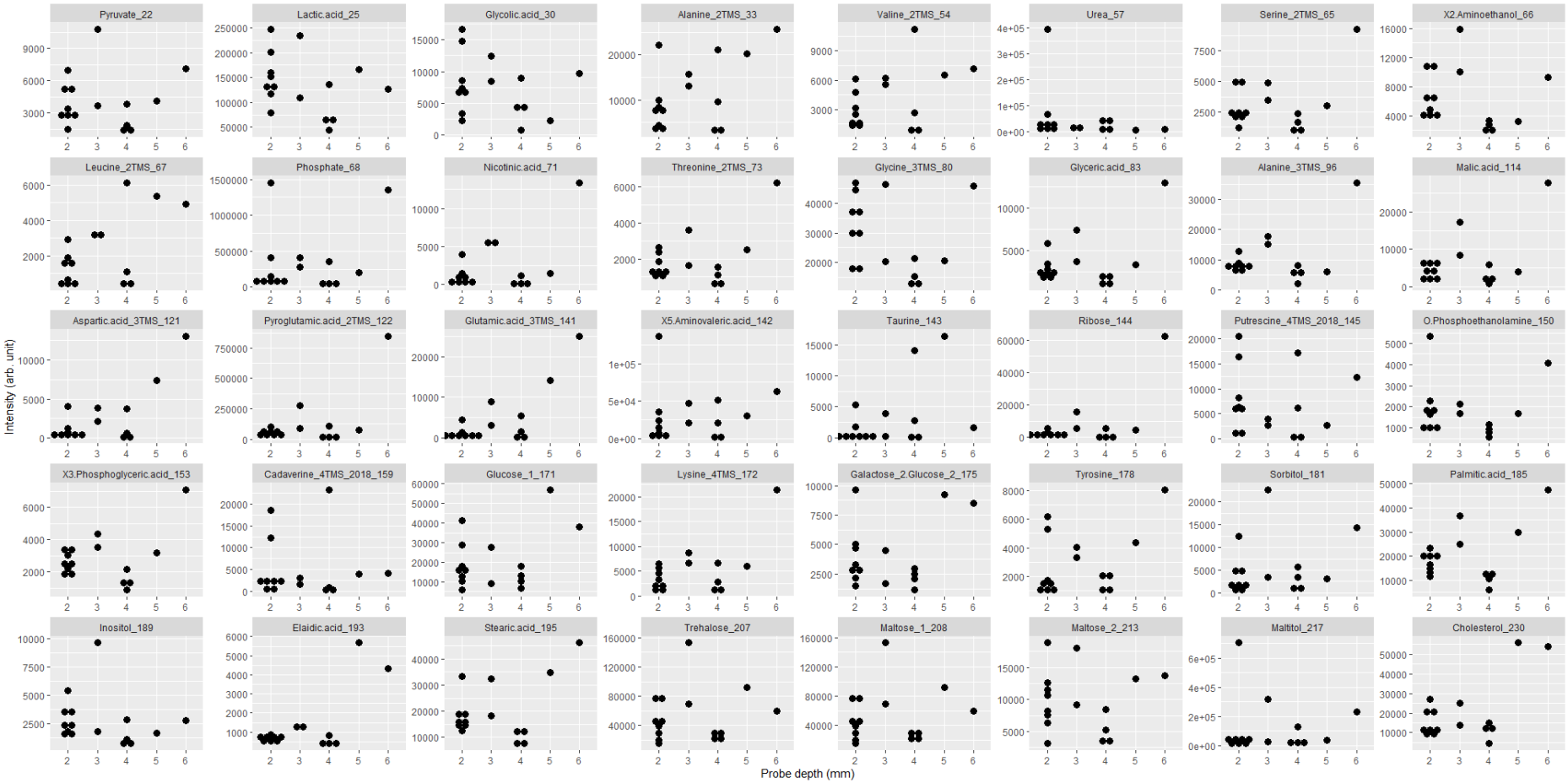


図 12:プロービング深度の異なる GCF サンプルから検出されたアノテートされた代謝物の検出強度.

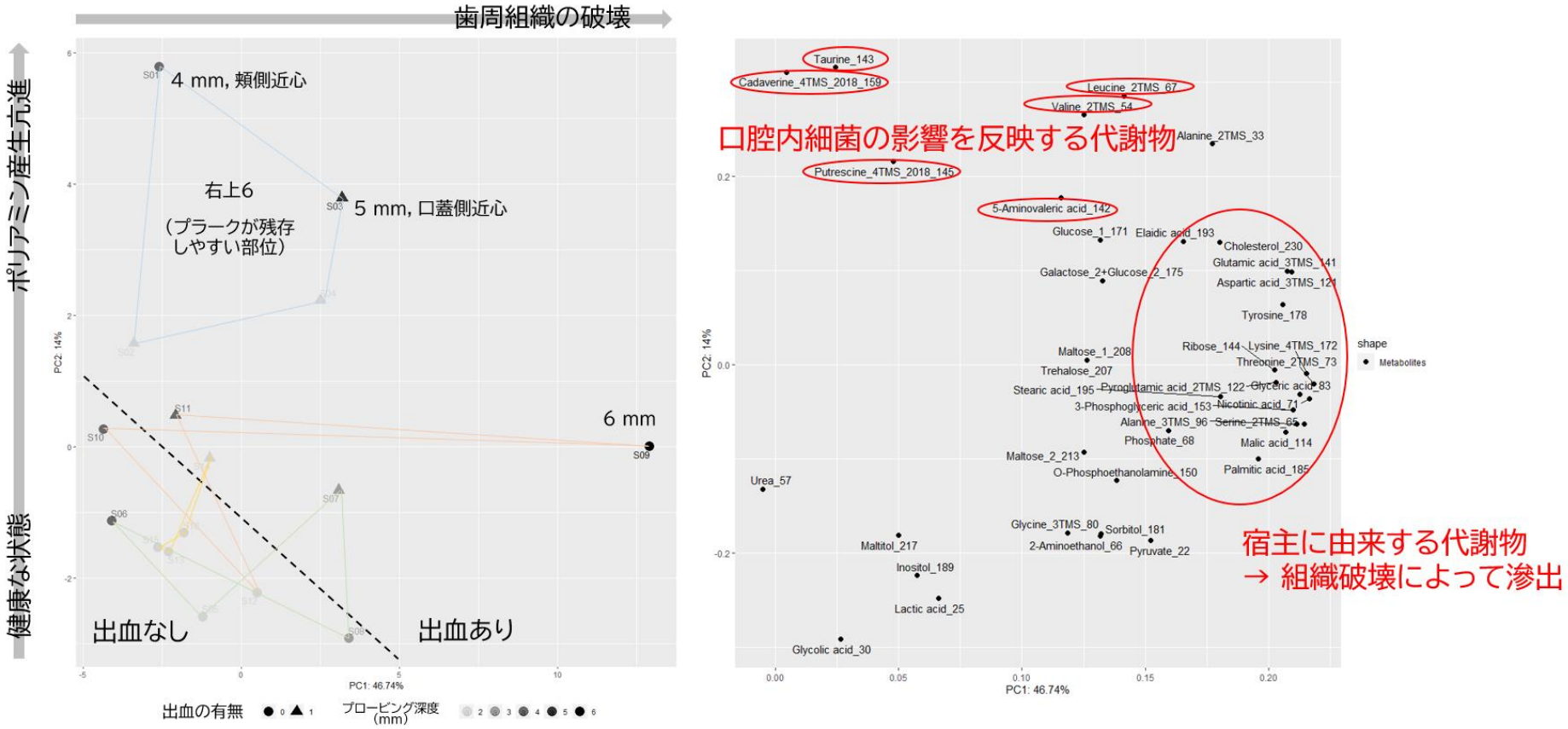


図 13：主成分分析；プロービング深度の異なる GCF サンプルと代謝物の関連．
同色の線で結ばれたプロットは同じ歯の隣合う位置にあることを示す．

3.4. 小括

微量臨床検体のメタボローム分析におけるサンプル採取ツールに由来するブランクマトリックスの影響を評価するために，GCF を対象サンプルとしてメタボローム分析を行った．

GCF のメタボローム分析に求められる要件を満たした採取法かどうかを検証するため，頻用されるペリオペーパーと本研究で提案されたピペットチップによる採取法を比較した．ペリオペーパー採取では多種多様なブランクマトリックス（フタル酸エステルやジカルボン酸エステル，脂肪酸；プラスチックに含まれる可塑剤，離型剤）が検出された一方で，ピペットチップ採取では検出されなかった．血漿によるサンプル負荷量の検討では，ピペットチップ採取がより多くのサンプルを採取することができ，ブランクマトリックスの低減によって検出可能な代謝物カバレッジの向上が示唆された．実際の歯周病患者から採取された GCF のメタボローム分析結果は，プロービング深度と出血の有無，プラークコントロールなどの影響を反映していることから，当該採取法および分析方法が適していることを示した．

本章において，サンプル採取ツールに由来するブランクマトリックスにおいても微量臨床検体のメタボローム分析に影響を与えることが明らかとなり，前処理のみならずサンプル採取工程で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．

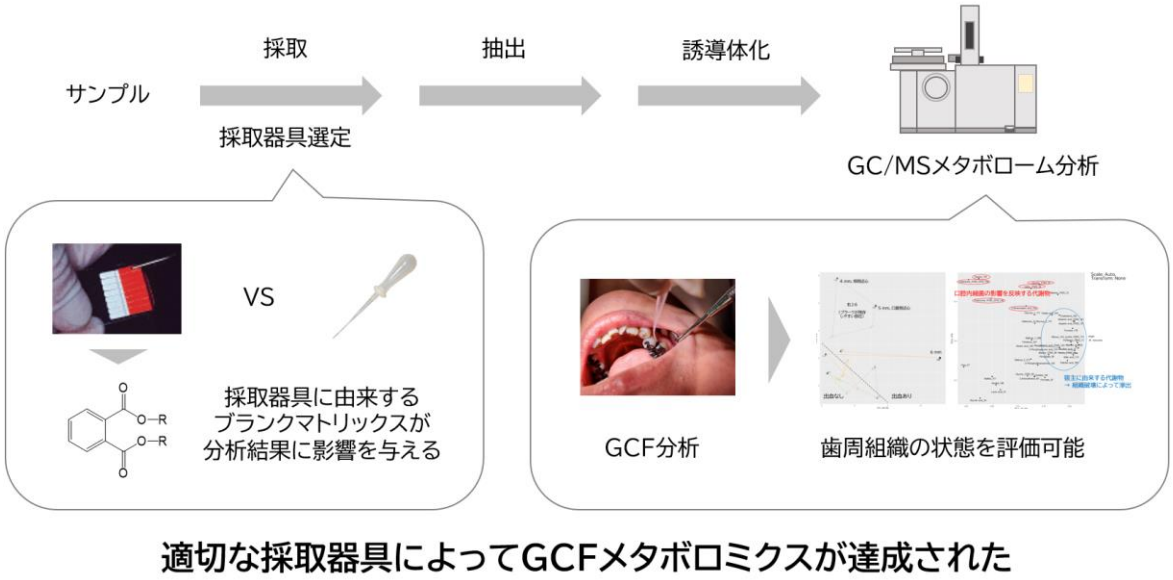


図 14：第 3 章の概略図

4. 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

4.1. 緒言

第 2 章および第 3 章の結果から，実験器具や採取器具に由来するブランクマトリックスが微量臨床検体のメタボローム分析において大きな負の影響を与えることが示された．

本章ではこれまで明らかとなった知見を活用して，ブランクマトリックスの影響を最小限に抑えた微量臨床検体のメタボローム分析系（以下微量法）の適用性，すなわち微量臨床検体が通常量の臨床検体と同様の代謝物プロファイルを示すかどうかを確認するため，マウスから実際に微量の血液を採取し，従来法と比較した．

4.2. 実験材料および実験方法

4.2.1. 試薬

抗凝固剤コーティングしたキャピラリーチューブの作成に，エチレンジアミン四酢酸（EDTA）（Sigma-aldrich），エタノール（HPLC グレード，富士フイルム和光純薬），アンモニア水（富士フイルム和光純薬）を用いた．抽出には，GenPure UV-TOC xCAD plus（Thermo Fisher Scientific）で製造された超純水，およびアセトニトリル（LC-MS グレード，関東化学）を使用した．誘導体化には，メトキシアミン塩酸塩（MeOX）（Sigma-aldrich），ピリジン（インフィニティピュアグレード，富士フイルム和光純薬），N-メチル-N-トリメチルシリルトリフルオロアセトアミド（MSTFA）（ジーエルサイエンス）を用いた．内部標準物質としてDL-Alanine-2,3,3,3-d_4（Santa Cruz Biotechnology）を用いた．保持指標の計算には，炭化水素混合試料（C9-C40，ジーエルサイエンス）を用いた．

4.2.2. 血液採取用キャピラリーチューブの作成

血液 20 μL を採取するために，抗凝固剤コーティングしたフューズドシリカキャピラリーチューブを作成した．10 mg/mL EDTA/75%エタノール/25%アンモニア水を調製し，3 m のフュー

ズドシリカキャピラリーチューブ（内径 0.53 mm，ジーエルサイエンス）に上記の溶液を満たし，窒素ガスを通過させて EDTA コーティングを施した．その後チューブを 10 cm にカットした．

4.2.3. マウスからの血漿採取

マウスの血液採取は大阪大学医学部にて実施した．サンプルとして雄の BALB/c CrSlcマウス（8 週令，21-26 g，計 6 匹）（日本エスエルシー，静岡，日本）を使用した．指頭穿刺血の代替として尾部静脈血，静脈穿刺血の代替として顔面静脈血をそれぞれ採取した．

血液採取はマウスが受けるストレスを考慮して尾部静脈血から行われた．カミソリを用いて尾の表面に浅い切り込みを入れ，にじみ出てきた血液 20 μL を抗凝固剤コーティングしたフューズドシリカキャピラリーチューブとピペットマンで吸い上げた．ピペットマンとチューブの接続はピペットチップを用い，チューブ-ピペットチップ間のシーラントとしてパラフィルム（Bemis Flexible Packaging, Neenah, WI, USA)を使用した．血液を吸い上げたキャピラリーチューブの末端を粘土で封じ，遠心分離（4℃，1000×*g*，10 分）によって血球と血漿成分を分離し，上層を血漿として用いた（T05）．

顔面静脈血の採取は次の手順で行われた．21G の穿刺針でマウスの頬部を軽く刺し，出てきた血液をキャピジェクト® II CJ-2DK（テルモ，東京，日本）に受け約 250 μL を回収した．当該チューブ内の EDTA-2K 顆粒とよく混合したのち，抗凝固剤コーティングしたキャピラリーチューブで採取し前述の尾部静脈血と同様の手順で得られた血漿（F05）とキャピジェクトの遠心分離（4℃，1000×*g*，10 分）によって得られた 50 μL の血漿（F50）をサンプルとして採取した．

4.2.4. サンプル前処理

実験器具として次のものを用いた．抽出時の容器：1.5 mL セーフロックチューブ（Eppendorf），誘導体化時の容器：0.3 mL 不活性化処理済みガラスインサート（Thermo Fisher Scientific），ピペットチップ：PIPETMAN® ダイアモンドチップ （Gilson）．振盪には

ThemoMixer C（Eppendorf）を用いた.

キャピラリーチューブによって得られた微量血漿は上層部を 25 mm の長さでカットし，血漿 5 µL を内部標準物質入り超純水 195 µL に浸漬した．キャピジェクトで得られた通常の血漿 50 µL には内部標準物質入り超純水 150 µL を加え希釈・抽出を行った（4℃，1200 rpm，10 分）．続いて，同チューブにアセトニトリル 800 µL を加え除タンパク処理（4℃，1200 rpm，10 分）を行った後，遠心（4℃，16000×*g*，3 分）にて得られた上清をサンプル溶液とした．微量血漿サンプル（T05，F05）は上清 400 µL，通常の血漿サンプル（F50）は上清 200 µL を遠心濃縮および凍結乾燥処理に供し，20 mg/mL MeOX/ピリジン溶液でオキシム化（30℃，1200 rpm，90 分），MSTFA でトリメチルシリル化（37℃，1200 rpm，30 分）処理後，反応液を GC/MS に供した.

4.2.5. GC-MS 分析

分析には GCMS-TQ8040（島津製作所，京都，日本）を用いた．分析カラムには InertCap 5MS/NP（30 m × 0.25 mm ID，df=0.25 µm，ジーエルサイエンス）を用いた．キャリアーガスにはヘリウムを使用し，流量は 1.12mL/min，注入温度は 270℃に設定した．注入量およびスプリット比については，微量血漿サンプル（T05，F05）は 1 µL 注入の 1:25，通常の血漿サンプル（F50）は 2 µL の 1:10 に設定した．オーブン温度は 80℃で 2 分保持後 15℃/min で昇温し 330℃で 6 分保持した．トランスファーライン温度は 310℃，イオン源温度は 280℃とし，マスレンジは 85-500 *m/z* かつスキャン速度を 3333 *m/z* sec^{-1} に設定した.

4.2.6. データ解析

すべてのデータ解析（ピーク検出，アノテーション，アライメント）は MS-DIAL ver 4.24 で行い，データ行列を作成した.

4.3. 結果と考察

4.3.1. 微量血液採取の再現性

近年報告された微量血液の採取技術に volumetric absorption microsampling（VAMS）がある(Denniff and Spooner 2014). VAMS ツールは一定量の血液（～10 μL）を吸収する多孔質基材とそれを保持する芯材で構成されており，当該技術を用いたメタボローム分析(Meesters 2019)においては全血をサンプルとしており，赤血球由来の代謝物も含めて分析している．従って，血漿中に遊離してきた極微量の細胞由来代謝物が重要な場合は厳密に評価できなくなる可能性がある．また，本研究の結果から明らかとなったように，サンプル採取ツールにプラスチック製品を用いることは可塑剤や離型剤の混入リスクを高めることにつながるため，特にメタボローム分析用の微量サンプル採取においては避けるべき材料だといえる．

本研究では，ブランクマトリックスの混入や代謝物の吸着を最小限にするために，溶出化合物が最も少ないとされる不活性化処理済みフューズドシリカキャピラリーチューブを採用した．

当該ツールによるサンプル採取の再現性については重量法で確認した．切り出した 25 mm キャピラリーチューブの重さは 5.6±0.1 mg（RSD = 1.5%, n = 4），超純水で満たした 25 mm キャピラリーチューブの重さは 11.3 ± 0.2 mg（RSD = 1.7%, n = 6），そしてウサギ脱繊維血液で満たした 25 mm キャピラリーチューブの重さは 11.4 ± 0.1 mg（RSD = 0.7%, n = 5）であった．この結果から，キャピラリーチューブによるサンプル採取ツールには十分な再現性があると判断し，以降の実験に用いた．

4.3.2. マウス血漿のメタボロームプロファイル比較

本項では，これまでの血漿分析で用いられていた方法を従来法，第 2 章・第 3 章で示されたブランクマトリックスの混入を極力排除し微量臨床検体の分析に特化した方法を微量法とし，各手法でマウス血漿のメタボローム分析を実施・分析結果を比較することで微量法の実サンプルへの適用性を検討した．マウス顔面静脈血を通常の静脈穿刺，マウス尾部静脈血を指頭穿刺と仮定した．それぞれの実験手順を図 15 に示す．

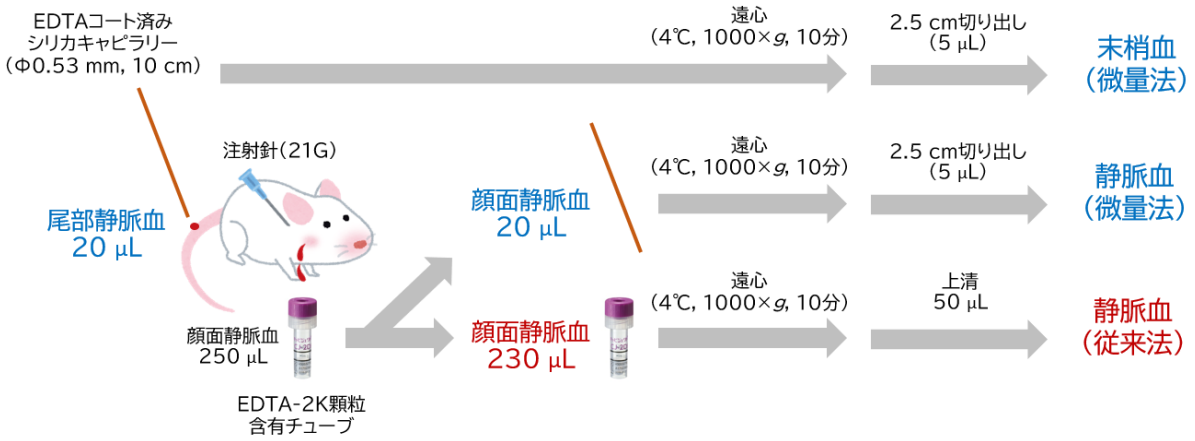


図 15：通常量および微量臨床検体を仮定したマウス血漿の採取手順

各サンプルで特徴的に検出されたピーク数を図 16 に示す．顔面静脈血由来マウス血漿を従来法で分析した場合(F50)に 36 ピークが検出されたのに対し，顔面静脈血マウス血漿を微量法で分析した場合(F05)では 57 ピーク，尾静脈血由来マウス血漿を微量法で分析した場合(T05)では 54 ピークを検出することができ，それらは従来法で検出されたピークの殆どを内包していた．したがって，当該手法が代謝物カバレッジの面で従来法よりも優れていることが明らかとなった．その要因として，殆どの化合物において従来法よりも検出感度が高いことが挙げられる．これは第 2 章でも説明したように，抽出溶媒比を大きくしたことにより抽出効率が改善されたためだと考えられる．

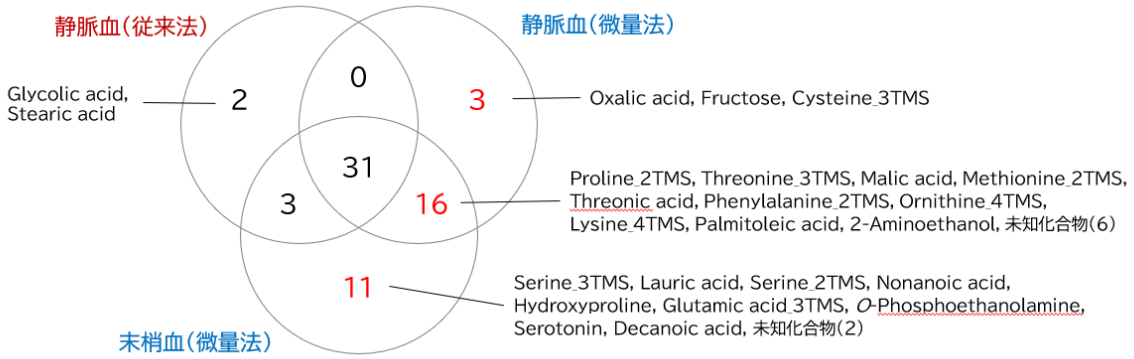


図 16:各サンプルで特徴的に検出されたピークの比較.
(検出強度補正なし, RSD<0.3, 検出強度 2000 以上, サンプル/ブランク強度比(平均)>3).

尾静脈血由来サンプルと顔面静脈血由来サンプルで検出された代謝物プロファイルはほとんど同じだったものの, いくつかのピークはどちらかのみで検出された. これは採血部位によって代謝物プロファイルが異なることを示唆しており, 既報でも同様の示唆を与えている(Bando et al. 2011).

血漿メタボロームを再現良く分析しようとした場合, これまでは少なくとも 50 µL の血漿サンプルを確保する必要があり(Dunn et al. 2011), 指先穿刺などの被験者に負担の少ないサンプル採取手法を選択することが不可能であった. しかし, 本研究で構築された前処理法を実施することにより, 1/10 の血漿サンプル(5 µL)で従来よりも高感度に分析を行うことが実証された. 生体由来サンプルは採取量が限られるものが多いことから, 従来法では得られなかったサンプルのメタボローム情報が期待される.

表 7:従来法および微量法における代謝物カバレッジおよび検出強度の比較

	サンプル負荷なし			マウス血漿			ピーク検出		
Metabolite_ID	F50	T05	F05	F50	T05	F05	F50	T05	F05
Pyruvic acid_23	42	1396	1513	3696	7161	12595	***	***	***
Lactic acid_28	2167	27223	51570	161588	413386	609899	***	***	***
Alanine_2TMS_40	252	1043	539	13998	32902	28751	***	***	***
3-Hydroxybutyric acid_52	336	1414	632	18396	28624	32762	***	***	***
Valine_2TMS_61	109	663	657	8675	23588	15705	***	***	***
Urea_62	4645	22184	21653	706075	838379	892377	***	***	***
Leucine_2TMS_71	91	378	174	4425	12693	7638	***	***	***
Glycerol_72	4837	11678	11350	39697	92347	112190	***	***	***
Phosphoric acid_73	5216	27800	27826	39874	495381	472739	***	***	***
Isoleucine_2TMS_76	88	157	90	3349	10127	6131	***	***	***
Glycine_3TMS_80	373	5765	5342	19691	86932	69010	***	***	***
Pyroglutamic acid_2TMS_112	421	4953	3792	3879	21184	20270	***	***	***
Glutamine_3TMS_136	140	121	80	6877	23780	24778	***	***	***
Citric acid_141	55	203	167	2333	28448	50385	***	***	***
1,5-Anhydroglucitol_143	233	342	243	3115	7435	8324	***	***	***
Allantoin_145	59	101	132	2521	3067	3349	***	***	***
Mannose_1_147	51	109	98	3107	6733	9276	***	***	***
Unknown_148	71	113	80	4772	11144	13448	***	***	***
Glucose_149	137	3027	756	373170	808707	1068058	***	***	***
Galactose+Glucose_152	164	476	232	67761	147825	198250	***	***	***
Tyrosine_153	97	731	431	5184	19739	15603	***	***	***
Unknown_155	65	72	92	2972	6169	8393	***	***	***
Unknown_160	47	123	74	11339	29095	37650	***	***	***
Inositol_162	73	229	81	3373	26196	18229	***	***	***
Linoleic acid_164	906	1190	592	6689	12810	9014	***	***	***
Oleic acid_166	1108	1705	1329	14510	28539	18148	***	***	***
Tryptophan_3TMS_169	72	431	174	15504	30469	33920	***	***	***
Unknown_172	342	194	193	2186	3413	2897	***	***	***
Unknown_174	1863	10565	8636	64062	105223	1302954	***	***	***
Unknown_178	227	78	213	2974	3562	3072	***	***	***
Cholesterol_190	210	864	268	47647	65936	57493	***	***	***
Unknown_39	4861	29891	120838	76491	221113	205712	***	***	**
Myristic acid_142	325	1375	1965	4999	8617	5866	***	***	**
Palmitic acid_159	11301	37565	51575	64867	145994	124520	***	***	**

Unknown_57	1180	5412	7580	2711	20578	29424	**	***	***
Unknown_53	336	1184	647	1119	6951	5985	*	***	***
Proline_2TMS_77	40	168	48	1851	6128	4888	*	***	***
Threonine_3TMS_91	101	417	1521	1381	6966	6225	*	***	***
Malic acid_106	294	798	867	1146	6625	9544	*	***	***
Methionine_2TMS_111	74	132	52	1213	3765	2359	*	***	***
Threonic acid_119	333	327	566	1839	6493	5235	*	***	***
Phenylalanine_2TMS_124	92	162	77	1740	4073	2786	*	***	***
Ornithine_4TMS_140	84	1839	1133	1039	15958	8873	*	***	***
Lysine_4TMS_150	42	672	228	1850	32794	23049	*	***	***
Palmitoleic acid_157	182	239	238	1988	3791	2440	*	***	***
Unknown_16	124	631	738	735	10625	9982	-	***	***
Unknown_51	248	299	254	919	8373	4629	-	***	***
Unknown_56	149	397	654	764	6014	3576	-	***	***
Unknown_65	130	813	990	207	5939	11089	-	***	***
2-Aminoethanol_70	191	632	530	998	3683	3210	-	***	***
Glycolic acid_34	787	4423	4524	2994	7932	8867	***	**	**
Stearic acid_168	8009	40255	49802	30669	96416	94407	***	**	**
Serine_3TMS_88	175	2106	5064	1629	15182	10849	*	***	**
Unknown_116	258	1280	4523	1076	5150	4872	*	***	**
Lauric acid_125	183	460	548	1292	4119	1491	*	***	*
Serine_2TMS_68	121	1542	1175	673	4692	3244	-	***	**
Nonanoic acid_86	382	885	575	617	5781	1298	-	***	**
Hydroxyproline_113	50	42	77	572	2236	1553	-	***	*
Glutamic acid_3TMS_123	70	234	151	631	4191	1960	-	***	*
O-Phosphoethanolamine_138	51	104	95	120	2767	1202	-	***	*
Unknown_171	263	419	304	713	2031	1061	-	***	*
Serotonin_176	80	92	75	133	8064	1913	-	***	*
Decanoic acid_101	134	476	414	383	4470	797	-	***	-
Oxalate_45	807	3238	3825	1723	8212	15175	*	**	***
Fructose_1_144	132	2103	1272	602	4110	3842	-	**	***
Cysteine_3TMS_117	72	110	86	267	1082	2324	-	*	***

サンプル負荷なし: n=1, マウス血漿: n=6(生物学的反復), QC サンプルで RSD<30%のピークを抽出した. 検出強度補正なし. F50:従来法で分析された顔面静脈血, F05:微量法で分析された顔面静脈血, T05:微量法で分析された尾部静脈血. ***:2 つの基準を満たす, **:サンプル/ブランク比の平均値>3, *:サンプルでの検出強度≥2000, -:未検出.

4.4. 小括

第 2 章，第 3 章で示されたブランクマトリックス排除の重要性について，実サンプル分析での影響を評価し適用性を検討するために，マウスから血漿のサンプル採取とメタボローム分析を実施した．結果として，採血量の少ない尾静脈からの採血（20μL）で顔面静脈血（250 μL）と同等以上の代謝物カバレッジが得られたことから，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．

5. 総括と展望

5.1. 本研究の総括

これまでのメタボローム分析は一定以上のサンプル量を必要とすることから，サンプル量が確保しにくい臨床検体においては実施が難しくなり，特別に構築された分析機器を要求される点が問題として挙げられた．従って，一般的な構成の分析機器を用いた微量臨床検体の分析方法が求められている．しかしながら，微量サンプルでのメタボローム分析法を検証した報告はほとんどない．

少ないサンプル量でメタボロームを実施するために，前処理のスケールダウンを試みたが，誘導体化率の違いなどからこのアプローチでは達成できないと判断した．また，誘導体化時の容器との比接触面積およびブランクマトリックスの検出強度が比例関係にあり，スケールダウン比率が大きいほどブランクマトリックスの比率が大きくなっていた．このことから，ブランクマトリックスの混入を可能な限り排除することで微量サンプルでのメタボローム分析が達成できるのではないかと考え，適切な実験器具を選定したところ良好な結果が得られた．

上記の結果を受けて，サンプル採取器具からブランクマトリックスが混入する可能性についてさらに検討した．メタボローム分析に適した要件を満たさない採取器具，すなわちブランクマトリックスが混入する採取方法では一部のサンプル由来代謝物を検出できないことが示されたことにより，適切な採取器具を選択することの重要性並びに微量サンプルにおけるブランクマトリックスを除去することの重要性が増々示された．

最後に，臨床検体でのメタボローム分析を仮定して，マウスを対象として微量採血と一般的な採血で得られた血漿のメタボローム分析結果を比較した．本研究で構築されたブランクマトリックスが与える負の影響を可能な限り排除した微量臨床検体に特化したメタボローム分析法は，従来法と同等以上の代謝物カバレッジを示し，高い検出感度を示したことから，微量臨床検体のメタボローム分析系が構築できたと結論付けた．

5.2. 今後の展望

血液は全身を循環していることから臨床研究において重要なサンプルの一つであるが，メタボローム分析においては採血量が実施制限になっていた．本研究で構築された手法は指先穿刺によって得られる血液（20 μL）で分析可能であることから，乳幼児などの採血そのものが難しい被験者や，短時間に連続的なサンプル採取を行う必要がある研究に適用できると考える．これまでにも任意のイベントに対する血液内代謝物の時間変化をモニターする研究は多くあるが，そのためにはルート採血（針を留置し弁を開閉することによって血液を定期的に採取する手法）が必要であり被験者への負担が大きい．これと比較して指先穿刺による採血は圧倒的に採血量が少なく，侵襲性も低いため，研究を実施するための倫理審査のハードルや患者のリクルート障壁も低くなることが予想される．

歯肉溝浸出液（GCF）のメタボローム分析については，すべての既報がペリオペーパー採取を採用しており，網羅性や再現性の低い分析結果であることが示唆される．第 3 章で実施された歯周病患者由来 GCF のメタボローム分析はサンプル数が少ないにも関わらず，出血の有無やプロービング深度，プラークの付着状況などに応じた一定の分離傾向が確認できている．今後はサンプル数を増やし，GCF と関連の深い歯周病の疾患メカニズム解明に役立つことが期待される．

引用文献

Baima, G., Corana, M., Iaderosa, G., Romano, F., Citterio, F., Meoni, G., Tenori, L., Aimetti, M.: Metabolomics of gingival crevicular fluid to identify biomarkers for periodontitis: A systematic review with meta-analysis. *J. Periodontal Res.*, 56, 633-645 (2021a), DOI: 10.1111/jre.12872.

Baima, G., Iaderosa, G., Citterio, F., Grossi, S., Romano, F., Berta, G.N., Buduneli, N., Aimetti, M.: Salivary metabolomics for the diagnosis of periodontal diseases: a systematic review with methodological quality assessment. *Metabolomics*, 17, 1 (2021b), DOI: 10.1007/s11306-020-01754-3.

Bando, K., Kunimatsu, T., Sakai, J., Kimura, J., Funabashi, H., Seki, T., Bamba, T., Fukusaki, E.: GC-MS-based metabolomics reveals mechanism of action for hydrazine induced hepatotoxicity in rats. *J. Appl. Toxicol.*, 31, 524-535 (2011), DOI: 10.1002/jat.1591.

Chen, S., Qin, R., Mahal, L.K.: Sweet systems: technologies for glycomic analysis and their integration into systems biology. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 56, 301-320 (2021), DOI: 10.1080/10409238.2021.1908953.

Denniff, P., Spooner, N.: Volumetric Absorptive Microsampling: A Dried Sample Collection Technique for Quantitative Bioanalysis. *Anal. Chem.*, 86, 8489-8495 (2014), DOI: 10.1021/ac5022562.

Dunn, W.B., Broadhurst, D., Begley, P., Zelena, E., Francis-McIntyre, S., Anderson, N., Brown, M., Knowles, J.D., Halsall, A., Haselden, J.N., Nicholls, A.W., Wilson, I.D., Kell, D.B., Goodacre, R.: Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Nat. Protoc.*, 6, 1060-1083 (2011), DOI: 10.1038/nprot.2011.335.

Edwards, T., Cadigan, R.J., Evans, J.P., Henderson, G.E.: Biobanks containing clinical

specimens: Defining characteristics, policies, and practices. *Clin. Biochem.*, **47**, 245-251 (2014), DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2013.11.023.

Griffiths, G.S.: Formation, collection and significance of gingival crevice fluid. *Periodontol. 2000*, **31**, 32-42 (2003), DOI: 10.1034/j.1600-0757.2003.03103.x.

Hasokawa, M., Shinohara, M., Tsugawa, H., Bamba, T., Fukusaki, E., Nishiumi, S., Nishimura, K., Yoshida, M., Ishida, T., Hirata, K.I.: Identification of biomarkers of stent restenosis with serum metabolomic profiling using gas chromatography/mass spectrometry. *Circ. J.*, **76**, 1864-1873 (2012), DOI: 10.1253/circj.CJ-11-0622.

Jumhawan, U., Putri, S.P., Yusianto, Marwani, E., Bamba, T., Fukusaki, E.: Selection of discriminant markers for authentication of asian palm civet coffee (Kopi Luwak): A metabolomics approach. *J. Agric. Food Chem.*, **61**, 7994-8001 (2013), DOI: 10.1021/jf401819s.

Kawai, T., Ota, N., Okada, K., Imasato, A., Owa, Y., Morita, M., Tada, M., Tanaka, Y.: Ultrasensitive Single Cell Metabolomics by Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry with a Thin-Walled Tapered Emitter and Large-Volume Dual Sample Preconcentration. *Anal. Chem.*, **91**, 10564-10572 (2019), DOI: 10.1021/ACS.ANALCHEM.9B01578.

Meesters, R.: Biofluid Collection in Metabolomics by the Application of the novel Volumetric Absorptive Microsampling Technology: a mini-Review. *Rev. Sep. Sci.*, **1**, 34-46 (2019), DOI: 10.17145/rss.19.004.

Nakatani, K., Izumi, Y., Hata, K., Bamba, T.: An Analytical System for Single-Cell Metabolomics of Typical Mammalian Cells Based on Highly Sensitive Nano-Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Mass Spectrom.*, **9**, A0080-A0080 (2020), DOI: 10.5702/MASSSPECTROMETRY.A0080.

Ochi, H., Naito, H., Iwatsuki, K., Bamba, T., Fukusaki, E.: Metabolomics-based

component profiling of hard and semi-hard natural cheeses with gas chromatography/time-of-flight-mass spectrometry, and its application to sensory predictive modeling. *J. Biosci. Bioeng.*, **113**, 751-758 (2012), DOI: 10.1016/j.jbiosc.2012.02.006.

Omori, K., Katakami, N., Arakawa, S., Yamamoto, Y., Ninomiya, H., Takahara, M., Matsuoka, T., Tsugawa, H., Furuno, M., Bamba, T., Fukusaki, E., Shimomura, I.: Identification of Plasma Inositol and Indoxyl Sulfate as Novel Biomarker Candidates for Atherosclerosis in Patients with Type 2 Diabetes. -Findings from Metabolome Analysis Using GC/MS-. *J. Atheroscler. Thromb.*, **27**, 1053-1067 (2020), DOI: 10.5551/jat.52506.

Ozeki, M., Nozaki, T., Aoki, J., Bamba, T., Jensen, K.R., Murakami, S., Toyoda, M.: Metabolomic Analysis of Gingival Crevicular Fluid Using Gas Chromatography/Mass Spectrometry. *Mass Spectrom.*, **5**, A0047 (2016), DOI: 10.5702/massspectrometry.A0047.

Pongsuwan, W., Bamba, T., Yonetani, T., Kobayashi, A., Fukusaki, E.: Quality prediction of Japanese green tea using pyrolyzer coupled GC/MS based metabolic fingerprinting. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. (*pp. 744-750*). American Chemical Society.(2008), DOI: 10.1021/jf072791v.

Shiga, K., Yamamoto, S., Nakajima, A., Kodama, Y., Imamura, M., Sato, T., Uchida, R., Obata, A., Bamba, T., Fukusaki, E.: Metabolic profiling approach to explore compounds related to the umami intensity of soy sauce. *J. Agric. Food Chem.*, **62**, 7317-7322 (2014), DOI: 10.1021/jf501173r.

Shima, N., Miyawaki, I., Bando, K., Horie, H., Zaitsu, K., Katagi, M., Bamba, T., Tsuchihashi, H., Fukusaki, E.: Influences of methamphetamine-induced acute intoxication on urinary and plasma metabolic profiles in the rat. *Toxicology*, **287**, 29-

37 (2011), DOI: 10.1016/j.tox.2011.05.012.

Shriver, Z., Raguram, S., Sasisekharan, R.: Glycomics: A pathway to a class of new and improved therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **3**, 863-873 (2004), DOI: 10.1038/nrd1521.

Sun, T., Wang, X., Cong, P., Xu, J., Xue, C.: Mass spectrometry-based lipidomics in food science and nutritional health: A comprehensive review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, **19**, 2530-2558 (2020), DOI: 10.1111/1541-4337.12603.

Züllig, T., Trötzmüller, M., Köfeler, H.C.: Lipidomics from sample preparation to data analysis: a primer. *Anal. Bioanal. Chem.*, **412**, 2191-2209 (2020), DOI: 10.1007/s00216-019-02241-y.

発表論文

1. Omori, K., Katakami, N., Arakawa, S., Yamamoto, Y., Ninomiya, H., Takahara, M., Matsuoka, T., Tsugawa, H., Furuno, M., Bamba, T., Fukusaki, E., Shimomura, I.: Identification of Plasma Inositol and Indoxyl Sulfate as Novel Biomarker Candidates for Atherosclerosis in Patients with Type 2 Diabetes. -Findings from Metabolome Analysis Using GC/MS-. *J. Atheroscler. Thromb.*, 27, 1053-1067 (2020), DOI: 10.5551/jat.52506.
2. Katakami, N., Katakami, N., Omori, K., Taya, N., Arakawa, S., Takahara, M., Takahara, M., Matsuoka, T.A., Tsugawa, H., Furuno, M., Bamba, T., Fukusaki, E., Shimomura, I.: Plasma metabolites associated with arterial stiffness in patients with type 2 diabetes. *Cardiovasc. Diabetol.*, 19, 1-8 (2020), DOI: 10.1186/s12933-020-01057-w.
3. Arakawa, S., Furuno, M., Fukusaki, E.: Minimization of adverse effects of blank matrices from various apparatuses in the downsizing of gas chromatography-mass spectrometry-based metabolomics. *J. Biosci. Bioeng.*, 132, 102-107 (2021), DOI: 10.1016/j.jbiosc.2021.03.005.

   ※本学位論文に関与する論文
4. Taya, N., Katakami, N., Omori, K., Arakawa, S., Hosoe, S., Watanabe, H., Takahara, M., Miyashita, K., Nishizawa, H., Matsuoka, T.-A., Furuno, M., Bamba, T., Iida, J., Fukusaki, E., Shimomura, I.: Evaluation of change in metabolome caused by comprehensive diabetes treatment: A prospective observational study of diabetes inpatients with gas chromatography/mass spectrometry-based non-target metabolomic analysis. *J. Diabetes Investig.*, 2021 (2021), DOI: 10.1111/jdi.13600.
5. Tani, H., Li, B., Kusu, T., Okumura, R., Nishimura, J., Okuzaki, D., Motooka, D., Arakawa, S., Mori, A., Yoshihara, T., Ogino, T., Tsai, S.H., Furuta, Y., Muneta, M.,

Nakamura, S., Fukusaki, E., Yamamoto, K., Yagita, H., Kayama, H., et al.: The ATP-hydrolyzing ectoenzyme E-NTPD8 attenuates colitis through modulation of P2X4 receptor-dependent metabolism in myeloid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **118** (2021), DOI: 10.1073/pnas.2100594118.

6. **Arakawa, S., Kuboniwa, M., Fukusaki, E.**: Effect of sampling tools for gingival crevicular fluid in gas chromatography-mass spectrometry-based metabolomics. *J. Periodontal Res.* (to be submitted soon)
※本学位論文に関与する論文

学会発表

国際学会・シンポジウムにおける発表

1. Shoya Arakawa, Development of metabolome analytical method by using solid phase derivatization for human plasma, 13th KAIST-Osaka University Symposium 2018, Osaka, October (2018)
2. Shoya Arakawa, Minimization of adverse effects of blank matrices from various apparatuses in downsizing of GC/MS-based metabolome analysis, The 22nd Academic Exchange Seminar between Shanghai Jiao Tong University (SJTU) and Osaka University, Online, November (2020)

国内学会・シンポジウムにおける発表

1. 新川翔也, 佐々野僚一, 古野正浩, 福崎英一郎, 固相誘導体化法を用いた GC/MS メタボロミクス分析法の開発, 日本農芸化学会 2018 年度大会, 名古屋, 2018 年 3 月
2. 新川翔也, 佐々野僚一, 古野正浩, 福崎英一郎, 血漿メタボロミクスに資する固相誘導体化法を用いた GC/MS 分析法の開発, 第 70 回日本生物工学会大会, 大阪, 2018 年 9 月
3. 新川翔也, 佐々野僚一, 古野正浩, 福崎英一郎, GC/MS を基盤としたヒト血漿メタボロミクスにおける固相誘導体化法と従来誘導体化法の比較, 第 71 回日本生物工学会大会, 岡山, 2019 年 9 月
4. 新川翔也, 古野正浩, 福崎英一郎, ブランクマトリクスの影響を回避した指頭穿刺血用 GC/MS メタボローム分析法の開発, 生物工学若手研究者の集い, オンライン, 2021 年 7 月
5. 新川翔也, 歯肉溝滲出液の採取法が GC/MS メタボローム分析に与える影響, 第 15 回メタボロームシンポジウム, オンライン, 2021 年 10 月

謝辞

本論文は著者が大阪大学大学院工学研究科生命先端工学専攻において行った研究をまとめたものです.

本研究を実施するにあたり，指導教官として多大なる御指導ならびに御助言を頂きました大阪大学大学院工学研究科 福崎英一郎 教授に深謝の意を表します.

本論文の作成にあたり，有益な御指導，御助言，および御校閲を賜りました大阪大学大学院工学研究科 内山進 教授，大阪大学生物工学国際交流センター 本田孝祐 教授に厚く感謝申し上げます.

日頃より多くの御指導・御助言を頂きました新間秀一 准教授，多くの御援助を頂きました Sastia Prama Putri 助教に感謝の意を表します.

本研究において多くの御指導・御助言と度重なる議論の機会を頂き，私生活においても目をかけて頂きました古野正浩 研究員に深謝の意を表します．並びに，本研究において遂行の要となり多大なるご支援を賜りました，大阪大学大学院歯学研究科予防歯科学 久保庭雅恵 准教授， 坂中哲人 助教，大阪大学大学院医学系研究科免疫制御学 竹田潔 教授，香山尚子 准教授に厚く感謝申し上げます．また，日常の議論を通じて多くの知識や示唆を頂いたと共に，研究室生活をより楽しいものにしてくれた福崎研究室の諸先輩方，学生諸氏，研究員，事務補佐の方々に心から感謝の意を表します.

尚，本研究の一部は日本医療研究開発機構（AMED）の革新的先端研究開発支援事業（疾患における代謝産物の解析および代謝制御に基づく革新的医療基盤技術の創出，課題番号：JP18gm0710005）の助成を受け遂行されました.

最後に，博士進学を勧めてくださいました沖縄工業高等専門学校 生物資源工学科 玉城康智 教授，福崎研究室を進学先に推挙してくださいました佐賀大学大学院先進健康科学研究科 北垣浩志 教授，大学院進学を肯定してくれた家族，そのほか多くの人との関わりと御厚意を通じてここまで至ることができました．皆に深い感謝の意を表し謝辞の結びとさせて頂きます.

付録

補図 1:誘導体化時の容器に対する比接触面積とブランクマトリックス割合との相関 . 57

補図 2:抽出方法の違いとサンプル注入量増加手法の違いによる分析再現性の違い. 62

補表 1:GC カラムへの注入量増加時の各条件における炭化水素混合試料のシンメトリー係数(半値幅) 58

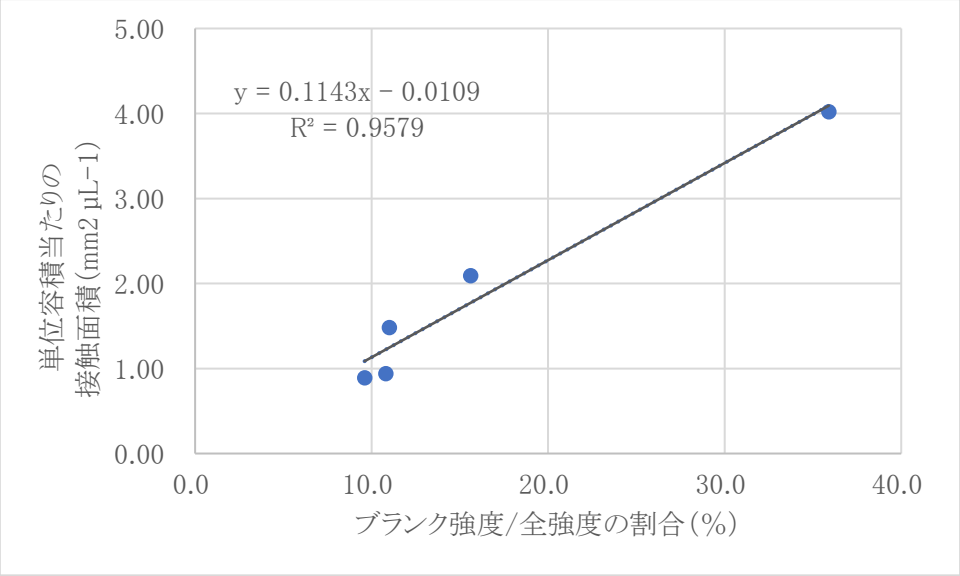
補表 2:GC カラムへの注入量増加時の各条件における炭化水素混合試料の検出強度 59

補表 3:誘導体化試薬(MSTFA)のロットやメーカーの違いによるブランクピーク数の差 60

補表 4:誘導体化試薬(MSTFA)のロットやメーカーの違いによる検出ピーク数(平均)の差(市販血漿, n=4) 60

補表 5:誘導体化試薬(MSTFA)のロットやメーカーの違いによる検出強度や再現性の差 60

補表 6:抽出方法の違いとサンプル注入量増加手法の違いの検討における前処理・注入条件 61



補図 1:誘導体化時の容器に対する比接触面積とブランクマトリックス割合との相関

補表 1:GC カラムへの注入量増加時の各条件における炭化水素混合試料のシンメトリー係数(半値幅)

注入量 (μL)	スプリット比	C10	C11	C12	C13	C14	C15	C16	C17	C18	C19	C20	C21	C22	C23
1	25	0.996	1.053	1.016	1.014	1.013	1.009	1.024	0.984	1.009	0.985	1.007	0.993	1.031	1.033
2	25	1.000	1.031	1.011	0.984	1.038	1.010	0.972	0.975	1.002	1.007	1.005	1.037	0.989	1.018
2	10	0.763	0.993	0.987	0.983	1.014	0.969	1.000	0.986	0.983	0.972	0.996	1.014	1.002	1.053
2	5	0.642	0.904	0.966	0.903	1.138	0.842	0.830	0.824	0.809	0.796	0.887	0.987	1.011	1.009
2	2	0.861	--	1.026	--	--	0.731	0.708	0.683	0.707	0.704	0.707	0.875	0.971	0.968

注入量 (μL)	スプリット比	C24	C25	C26	C27	C28	C29	C30	C31	C32	C33	C34	C35	C36	C37	シンメトリー係数の標準偏差
1	25	1.026	1.040	1.030	1.110	1.178	1.383	1.574	1.831	1.806	1.744	1.744	1.961	1.880	1.399	0.019
2	25	1.010	1.035	1.012	1.048	1.142	1.216	1.430	1.611	1.939	1.891	2.076	1.845	1.668	1.819	0.022
2	10	1.032	1.010	1.037	1.075	1.088	1.164	1.309	1.624	1.596	1.859	1.873	1.454	1.616	1.633	0.065
2	5	1.028	1.007	1.000	1.037	1.114	1.189	1.267	1.531	1.622	1.850	1.460	1.809	1.498	1.459	0.122
2	2	1.001	1.045	0.996	1.035	1.099	1.154	1.188	1.453	1.525	1.676	1.577	1.575	1.500	1.633	0.126

補表 2:GC カラムへの注入量増加時の各条件における炭化水素混合試料の検出強度

注入量 (μL)	スプリット比	C10	C11	C12	C13	C14	C15	C16	C17	C18	C19	C20	C21	C22	C23
1	25	49,318	27,639	36,212	41,808	46,991	51,021	56,609	57,938	63,072	63,040	144,125	68,232	69,796	67,954
2	25	46,814	27,176	35,494	43,037	48,891	54,331	56,897	56,901	63,220	64,152	151,431	70,803	73,355	81,445
2	10	40,071	29,949	40,501	45,582	51,898	54,148	57,874	60,650	62,760	73,820	161,724	81,680	84,324	82,955
2	5	34,528	26,218	35,972	40,817	39,244	39,736	41,300	43,868	49,126	52,765	133,779	64,693	66,855	67,890
2	2	30,273	25,331	36,246	28,808	36,008	33,184	32,762	34,537	38,287	41,790	105,760	59,829	65,265	69,586

注入量 (μL)	スプリット比	C24	C25	C26	C27	C28	C29	C30	C31	C32	C33	C34	C35	C36	C37	検出強度の合計
1	25	71,078	68,383	69,876	64,383	58,057	52,827	101,694	40,960	32,406	26,850	22,460	13,614	10,716	8,958	1,486,017
2	25	78,258	78,066	74,621	73,098	65,195	67,493	128,794	49,079	39,198	32,355	27,268	18,776	12,860	11,254	1,630,262
2	10	84,591	85,673	89,848	82,050	78,936	74,881	142,599	58,182	47,699	36,444	29,033	19,618	14,832	11,657	1,783,979
2	5	74,477	71,841	75,163	68,002	68,527	62,451	120,856	48,449	40,774	30,011	27,497	16,986	13,189	10,618	1,465,632
2	2	74,614	69,889	78,440	68,203	69,311	61,120	130,103	48,907	42,873	32,688	29,876	18,287	14,084	11,811	1,387,872

補表 3:誘導体化試薬(MSTFA)のロットやメーカーの違いによるブランクピーク数の差

	Annotated	Unknown	Total
GL#61543	10	56	66
GL#63824	14	69	83
Sigma	7	27	34

ロットに影響されない GL サイエンスの MSTFA 由来ブランク:21 ピーク, ロットに影響される GL サイエンスの MSTFA 由来ブランク:36 ピーク, Sigma の MSTFA 由来ブランク:4 ピーク.

補表 4:誘導体化試薬(MSTFA)のロットやメーカーの違いによる検出ピーク数(平均)の差(市販血漿, n=4)

	Annotated	Unknown	Total
GL#61543	46.3	159.8	206.0
GL#63824	46.5	193.5	240.0
Sigma	46.3	102.0	148.3

補表 5:誘導体化試薬(MSTFA)のロットやメーカーの違いによる検出強度や再現性の差

	Average	Average	Average	RSD%	RSD%	RSD%
	GL#61543	GL#63824	Sigma #BCCC174	GL#61543	GL#63824	Sigma #BCCC174
Glycolic acid	6,966	9,124	6,516	7.7%	9.0%	30.6%
2-Aminobutyric acid	7,158	7,399	7,008	31.0%	14.3%	12.5%
Valine_2TMS	76,119	84,434	74,165	13.3%	14.7%	25.7%
Leucine_2TMS	46,761	49,293	43,739	18.8%	18.2%	32.0%
Threonine_2TMS_minor	4,406	4,533	5,530	32.5%	17.1%	9.3%
Proline_2TMS	60,491	61,223	52,757	23.5%	20.8%	36.2%
Alanine_3TMS	7,611	7,812	8,161	41.5%	26.6%	28.8%
Putrescine_3TMS_2018	7,749	20,744	8,386	12.7%	11.1%	25.4%
Hydroxyproline	5,203	5,790	5,566	14.1%	9.5%	19.6%
Creatinine	2,326	2,011	3,286	38.7%	9.3%	11.8%
Mannose_1_major	7,128	7,749	7,071	31.0%	30.4%	9.9%
Tryptophan_3TMS	18,925	23,063	17,523	28.3%	22.5%	36.6%

補表 6：抽出方法の違いとサンプル注入量増加手法の違いの検討における前処理・注入条件

サンプル名称	C	CM1	CM2	NM1	NM2
血漿（μL）	50	50	50	5	5
内部標準 150 ng/μL（μL）	50	50	50	5	5
超純水（μL）	100	100	100	190	190
アセトニトリル（μL）	800	800	800	800	800
遠心上清（μL）	200	30	40	300	400
誘導体化時の容器	1.5 mL チューブ	ガラス インサート	ガラス インサート	ガラス インサート	ガラス インサート
ピペットチップ	Gilson	Gilson	Gilson	Gilson	Gilson
MeOX/ピリジン（μL）	50	7.5	50	7.5	50
MSTFA（μL）	50	7.5	50	7.5	50
注入量（μL）	1	1	2	1	2
スプリット比	25	25	10	25	10

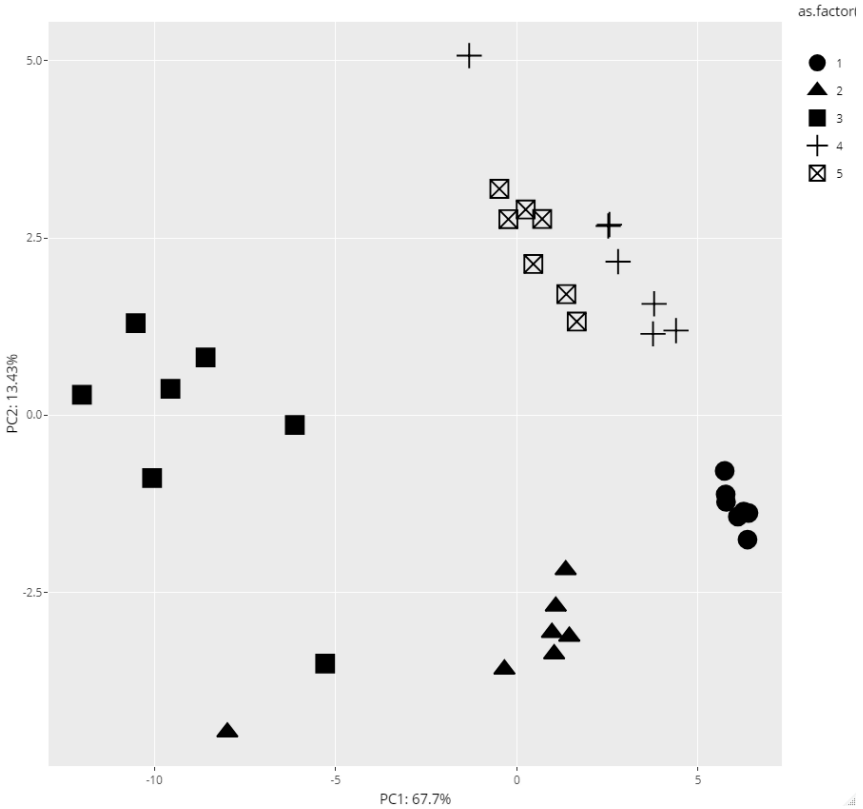
C：コントロールとしての従来法

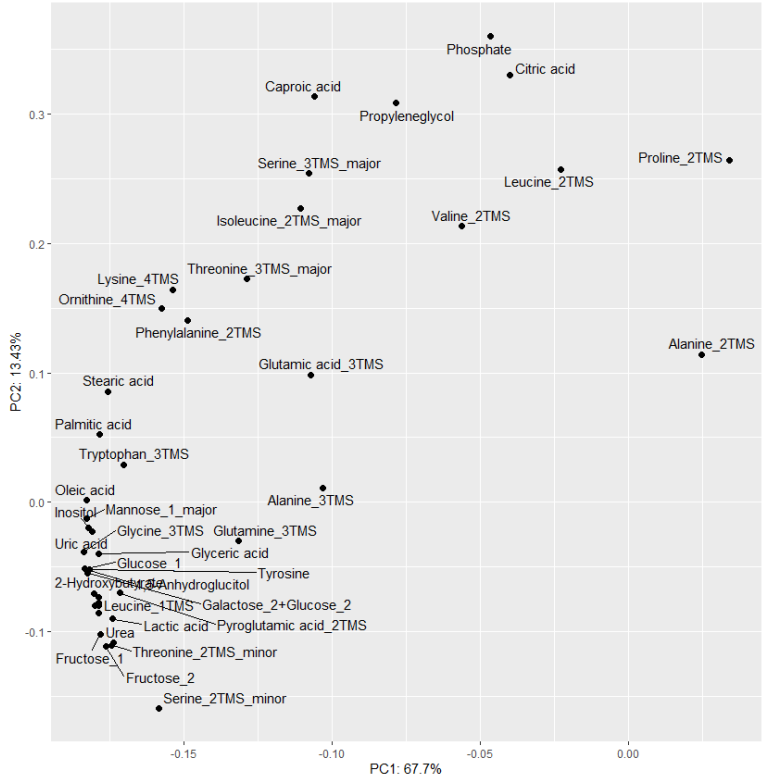
CM1：従来の抽出法，スケールダウンした誘導体化，従来の注入条件

CM2：従来の抽出法，従来の誘導体化，注入量の多い注入条件

NM1：微量法での抽出法，スケールダウンした誘導体化，従来の注入条件

NM2：微量法での抽出法，従来の誘導体化，注入量の多い注入条件





補図 2:抽出方法の違いとサンプル注入量増加手法の違いによる分析再現性の違い
黒丸:C, 黒三角:CM1, 黒四角:CM2, 十字:NM1, 白割り四角:NM2.