ヒト血漿メタボローム分析の基礎知識と臨床への応用について

三　枝　　大　輔

1　はじめに

1･1　メタボローム分析

オミックス解析は，疾患の予防あるいは治療に大きく貢献している．特にゲノム解析技術は，次世代シークエンサーの飛躍的な発展により，他のオミクス解析技術に先行して臨床現場で活用されている．しかしながら，疾患の発症には，遺伝要因に加えて環境要因が影響することが示唆されており，予防医療は環境要因を考慮して戦略を練らなければならない．したがって，臨床において環境要因を反映する新たな疾患予防マーカー探索技術の開発が急務である．

近年，生体内代謝物群（メタボローム）が環境要因を比較的よく反映することが示されている[1]．メタボロームは，図 1 に示すような生体の恒常性の維持に重要な役割を担う各種代謝系に含まれる約三千種程度の分子に加え，細胞膜形成やエネルギー貯蔵に重要な脂質分子群（リピドーム）および食事，サプリメントや薬剤など環境から摂取する分子を含めると，合計数万種存在すると考えられている．いずれも分子量は，数百から千程度の低分子に分類されるが，構造異性体や類似構造体が多いことから，メタボロームを網羅的に分析する（メタボロミクス）には，適切な分離分析手法を組み合わせる必要がある[2]．

1･2　メタボローム分析の技術開発

メタボロミクス技術開発当初の 1980 年代は，主に核磁気共鳴法（nuclear magnetic resonance, NMR）が主流であり，数十から百種程度を高精度に定量できるため，多くのバイオマーカー探索研究に応用されてきた．しかしながら，生体内濃度が mmol～μmol/L レベル以下の微量成分分析や，各種メタボロームの分離分析に多くの課題が残されていた．一方 2000 年代は，質量分析法（mass spectrometry, MS）の技術革新が目覚ましく，

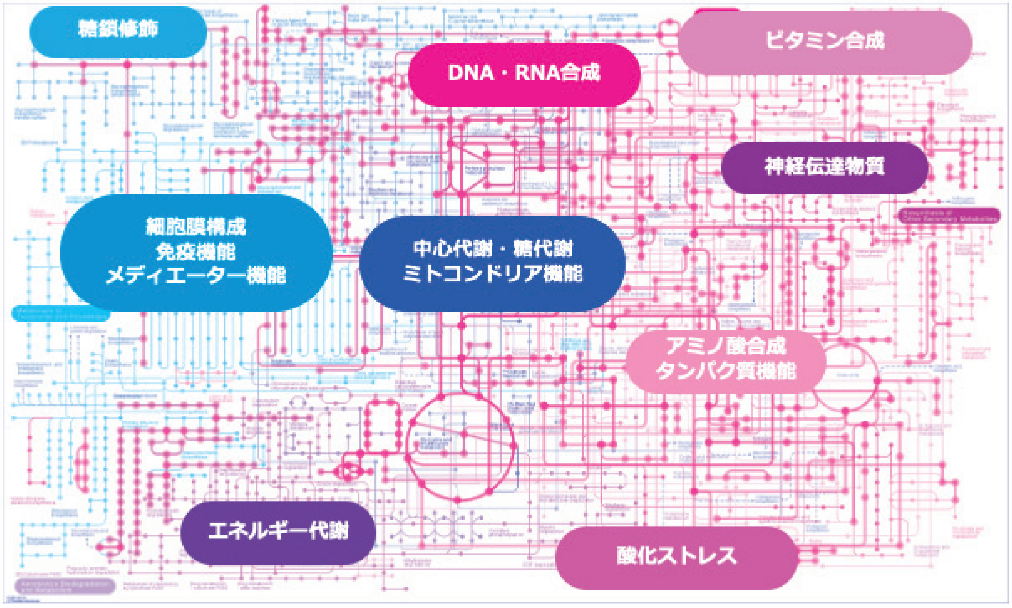

図 1　各種メタボローム経路連関図（KEGG MAP より）
（http://www.kegg.jp/kegg-bin/show_pathway?map01100）

Analytical Technique for Plasma Metabolic Profiling.

微量成分を高感度かつ高分解能で分析できるようになった．特にガスクロマトグラフィー，高速液体クロマトグラフィー（high-performance liquid chromatography, HPLC），超臨界クロマトグラフィー，キャピラリー電気泳動法，イオンクロマトグラフィーなど，様々な分離手法と組み合わせ，多成分の網羅的な検出が可能になり，2010 年代は数百から数千の生体内分子を一回のメタボローム分析で検出できる手法が開発された．また，メタボローム分析は，一回の分析に要する時間が一般的に 15〜30 分程度であるため，数十から百検体規模の臨床研究に応用できることが示され，メタボローム分析による疾患バイオマーカー探索研究が活発に実施された[3)]．

1･3　メタボローム臨床応用に向けた課題

一方この頃から，サンプル規模を大きくした際の分析精度について議論されるようになった．特に，メタボローム分析は，長時間の連続分析による質量分析計の汚れによるイオン強度値の低下や，分析時期や装置切り替えによる分析値への影響が散見され，分析の再現性に大きな課題が残されていた[4)]．さらには，検体の採取条件や長期保管によるメタボローム変化に関する論文も数多く発表された[5)]．したがって，ある臨床検体群で疾患バイオマーカー候補を同定したとしても，別の臨床検体群で再現ができないため，臨床応用に至るまでに，大きな障壁があることが判明した．

そこで本項では，特に LC-MS によるメタボローム分析を実施する際に考慮すべき点と基礎的なノウハウについて記述した．はじめに，血漿（けっしょう）試料の準備，最適な前処理法および分析条件の選択について概説する．次に，データ取得と処理時のポイントについて記述し，多検体メタボローム分析結果を正しく評価できるデータ解析方法について解説する．さらに，大規模血漿コホートメタボローム分析実施例を挙げ，応用性や世界の動向について触れる．

2　血漿試料の準備

2･1　血漿採取時の注意点

予防医療の実現には，日常診療レベルで簡便かつ非侵襲的に得られる試料を用いる必要がある．尿や唾液などによる臨床バイオマーカー研究も散見されるが，遺伝要因と環境要因の双方の影響を比較的よく反映し，臨床応用を目指す場合は，バイオプシーで得られる血液が好適である．

血液を用いるメタボローム分析の場合，血清と血漿のどちらを使用すべきかについて良く議論される．先行研究から血液中のメタボロームは保管温度および時間で変化することが示されているため，採取条件に配慮が必要である．血清は，日常診療で得やすいという利点はあるが，採取後室温で 30 分程度放置する工程があるため，前述の点からメタボローム分析に不向きと考えられる．一方血漿は，採血後 4 時間以内に 4 ℃ に保管することでメタボロームの変動を最小限に抑えられることが示されているため，メタボローム分析に好適である[6)]．しかしながら，血漿は採血直後に 4 ℃ に保管しなければならならず，日常的に得るためには，あらかじめ共同研究者にプロトコルを提案するなど，臨床現場との連携が重要である．

また，メタボローム分析に用いる血漿は凝固剤にも注意が必要である．例えば，ヘパリン血漿と EDTA 血漿を用いてメタボローム分析を実施した場合，多変量解析の一種である主成分分析で，異なるクラスターができてしまう．したがって，採血管の品番を統一する（ベネディクト II 真空採血管 EDTA-2Na など）必要がある．他にも，採血時間（例えば朝食前など）や，血漿を得るまでのプロトコルを統一することも重要である．

2･2　メタボローム分析に用いる血漿の品質評価法

単一のメタボローム分析プロジェクトの場合には，採血条件を合わせやすいが，長期に渡るコホート研究の場合などは，保存条件を統一することは極めて難しい．そこで，あらかじめ保管条件により変動することが示されている基準代謝物類（ヒポキサンチン，グルコースやリン脂質など）の情報を用いることにより，血漿の品質を評価することができる．

例えば，図 2 のように血漿試料を室温に 48 時間保存した場合，リン脂質やグルコースは時間経過に応じて有意に増加あるいは減少する．このように保管条件で大きく変動する代謝物を，複数の分析条件から 40 種抽出し，検量線を作成する．その後，臨床検体などのサンプルを分析し，得られた各代謝物の結果を回帰することでスコア値をサンプルごとに計算する[7)]．

$$Score = CP\sum_{k=0}^{10} P_k + CN\sum_{k=0}^{5} P_k + HP\sum_{k=0}^{10} P_k + CP\sum_{k=0}^{15} P_k$$

$$P_k(point\ for\ metabolite\ k) = \frac{100}{40} \times \frac{NLA_k(48h) - NLA_k(Sample)}{NLA_k(48h)}$$

CP, C18pos ; CN, C18neg; HP, HILICpos ; HN, HILICneg
NLAk［48 h］: the mean NLA of metabolite k in plasma from standard blood specimens kept at 25 ℃ for 48 h
NLAk［sample］: the NLA of metabolite k in the plasma for the quality assay

上記計算式によりスコア値を算出し，検体の質を評価する．例えば一定の値よりも低いサンプルは，あらかじめデータ解析から除外できるため，信頼度の高いバイオマーカーを同定することができる．

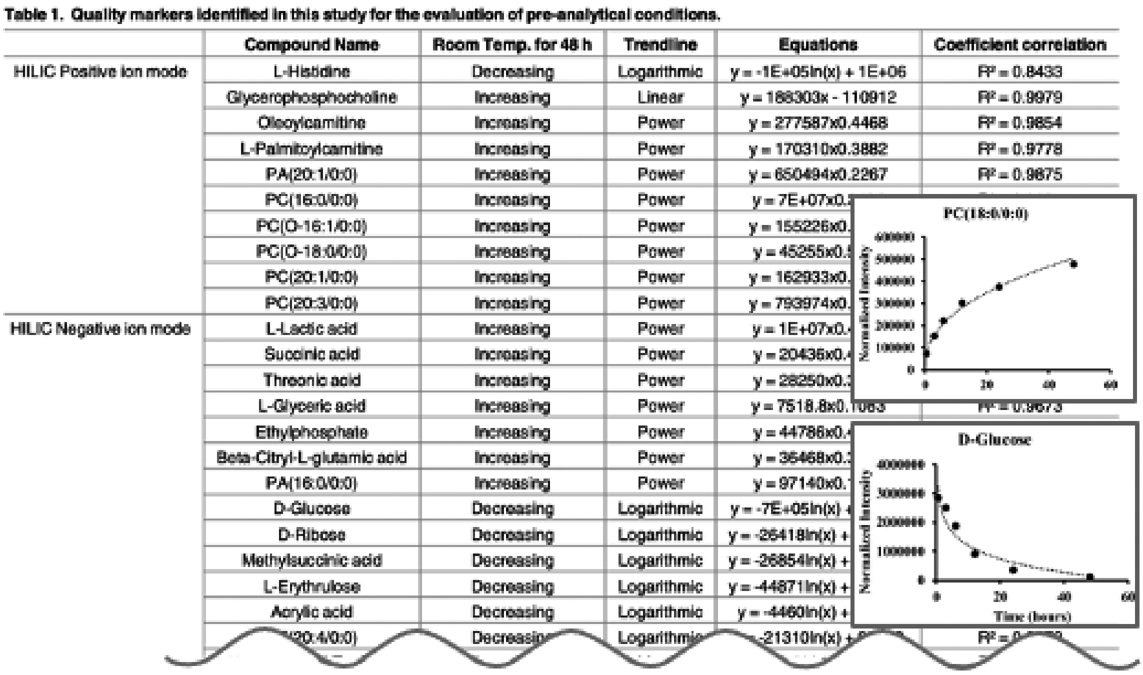

Table 1. Quality markers identified in this study for the evaluation of pre-analytical conditions.

	Compound Name	Room Temp. for 48 h	Trendline	Equations	Coefficient correlation
HILIC Positive ion mode	L-Histidine	Decreasing	Logarithmic	y = -1E+05ln(x) + 1E+06	R² = 0.8433
	Glycerophosphocholine	Increasing	Linear	y = 188303x - 110912	R² = 0.9979
	Oleoylcarnitine	Increasing	Power	y = 277587x0.4468	R² = 0.9854
	L-Palmitoylcarnitine	Increasing	Power	y = 170310x0.3882	R² = 0.9778
	PA(20:1/0:0)	Increasing	Power	y = 650494x0.2267	R² = 0.9875
	PC(16:0/0:0)	Increasing	Power	y = 7E+07x0.	[illegible]
	PC(O-16:1/0:0)	Increasing	Power	y = 155226x0.	[illegible]
	PC(O-18:0/0:0)	Increasing	Power	y = 45255x0.	[illegible]
	PC(20:1/0:0)	Increasing	Power	y = 162933x0.	[illegible]
	PC(20:3/0:0)	Increasing	Power	y = 793974x0.	[illegible]
HILIC Negative ion mode	L-Lactic acid	Increasing	Power	y = 1E+07x0.	[illegible]
	Succinic acid	Increasing	Power	y = 20436x0.	[illegible]
	Threonic acid	Increasing	Power	y = 28250x0.	[illegible]
	L-Glyceric acid	Increasing	Power	y = 7518.8x0.1063	R² = 0.9673
	Ethylphosphate	Increasing	Power	y = 44786x0.	[illegible]
	Beta-Citryl-L-glutamic acid	Increasing	Power	y = 36468x0.	[illegible]
	PA(16:0/0:0)	Increasing	Power	y = 97140x0.	[illegible]
	D-Glucose	Decreasing	Logarithmic	y = -7E+05ln(x) +	[illegible]
	D-Ribose	Decreasing	Logarithmic	y = -26418ln(x) +	[illegible]
	Methylsuccinic acid	Decreasing	Logarithmic	y = -26854ln(x) +	[illegible]
	L-Erythrulose	Decreasing	Logarithmic	y = -44871ln(x) +	[illegible]
	Acrylic acid	Decreasing	Logarithmic	y = -4460ln(x) +	[illegible]
	20:4/0:0)	Decreasing	Logarithmic	-21310ln(x) +	R² =

図 2　血漿の室温保管時間による代表的な代謝物の検出値への影響
（*PLoS One.*, **11**（**8**）, e0160555（2016）. より改変）

3　前処理方法と分析条件の選択

3･1　前処理方法

メタボローム分析に供する試料の前処理方法は，研究目的によるため，本項では主に多検体メタボローム分析を対象として記述する．

前処理方法は，比較的幅広い極性の分子を対象とした場合，最も簡便なメタノールによる抽出法を選択する．具体的には，血漿 50 μL にメタノール 150 μL を添加後，ミキサーにて 30 秒ほど攪拌（かくはん）後，超音波水槽にて 10 分間さらに攪拌する．その後，16400×*g*，4 ℃ で 20 分間遠心分離し，上清 150 μL をサンプルバイアルに回収し，メタボローム分析用サンプルとする．

メタボローム分析は，後に説明するように適切なクオリティーコントロール（quality control, QC）サンプルを分析する．QC は，各前処理済みのすべてのサンプルから 10〜20 μL 程度採取し，混合して作成する．

さらに，QC サンプルを 2 倍，4 倍，8 倍および 16 倍に希釈した diluted（d）QC（d2QC, d4QC, d8QC および d16QC）サンプルも準備する．QC ならびに dQC をどのようにデータ解析に用いるかについては，以降で説明する．

多検体メタボローム分析は，一般に再現性が重要視されるため，簡便なメタノールによる抽出法を選択することが多い．一方，本項では取り上げないが，疎水性分子を対象としたリピドーム分析の場合 Bligh ＆ Dyer 法が好適である．

3･2　分析カラムの選択

生体内メタボロームは，図 3 のように親水性と疎水性の幅広い極性の分子が存在しており，LC-MS によるメタボローム分析の場合，LC の固定相は分析対象分子の極性に応じて選択する[2]．例えば，親水性分子は hydrophilic interaction chromatography（HILIC）カラム，疎水性分子は C18 カラムを選択して分析することにより，各種対象分子を分析カラムに保持し，分離して検出できるため，高精度にバイオマーカー探索研究を実施できる．また近年開発された，超高速液体クロマトグラフィー（ultra-HPLC, UHPLC）は，分析時間を短縮できるため，多検体メタボローム分析に応用されつつある．

一方，HILIC と C18 の 2 種のカラムで分析した場合，データ量も 2 倍になるため，データ解析が煩雑になることが懸念されている．近年，イオン交換型と C18 による分配型の両方の性質を有するミックスモードカラムが開発された．移動相条件の最適化に時間がかかることと，カラムの寿命が短いという欠点もあるが，一回の分析で疎水性と親水性の幅広い極性分子を一斉分析できる利点がある．したがってミックスモードカラムは，数十検体程度の臨床メタボローム分析には応用であることが示されている[8]．

3･3　質量分析計の選択

また，一般に網羅的に分子を検出するメタボローム分析の場合，高分解能型 MS（high resolution MS, HRMS）を用いる．HRMS は，飛行時間型（time-of-flight, TOF）

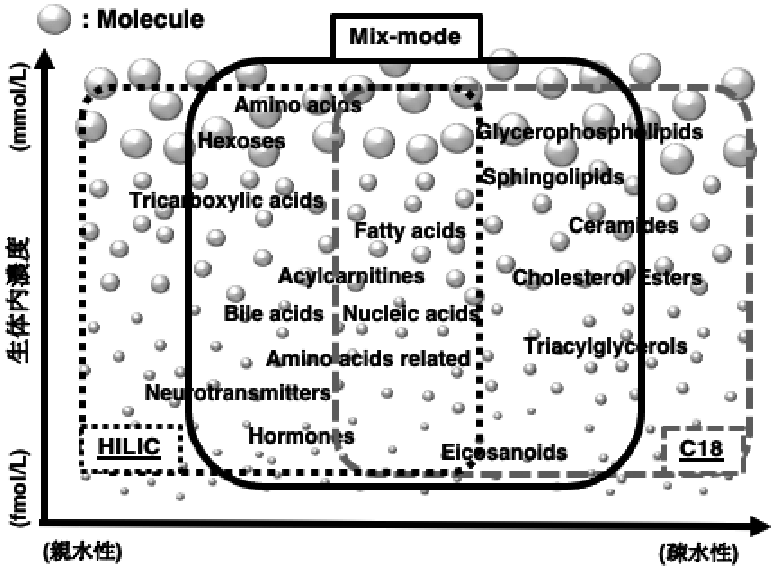

図 3　幅広い極性を有する生体内メタボロームと，C18 カラム，HILIC カラムおよび mix-mode カラムを用いた際の保持対象分子のイメージ
（*Drug Metab Pharmacokinet*., 2020, 37 :100373. より改変）

やフーリエ変換型（Furies transform, FT）がメタボローム分析に汎用されている．例えば，一定の *m*/*z* 範囲を検出するフルスキャン分析に，分子組成や構造の同定を目的としたデータ依存的あるいはデータ非依存的な MS^n 分析を組み合わせ，MS^n で得られたプロダクトイオンスペクトルを解析する手法が代表的である．特に近年，キングドンイオントラップ型である orbitrap（Thermo Fisher Scientific 製）は，低分子化合物の高精密スペクトル検出に効果的であるため，メタボローム分析に活用されている．

4　メタボロームデータの処理

4･1　データ取得方法

LC-MS によるメタボローム分析を実施する場合，データを取得する際の分析順番にも配慮が必要である．図 4 は，分析時間 15 分で 72 サンプルを分析する際の具体例である[9]．

はじめにブランクサンプル（blank, BK）を 3 回，次にカラムコンディショニング用に QC を 10 回分析後，目的のサンプルを，ランダマイズされた順番で分析し

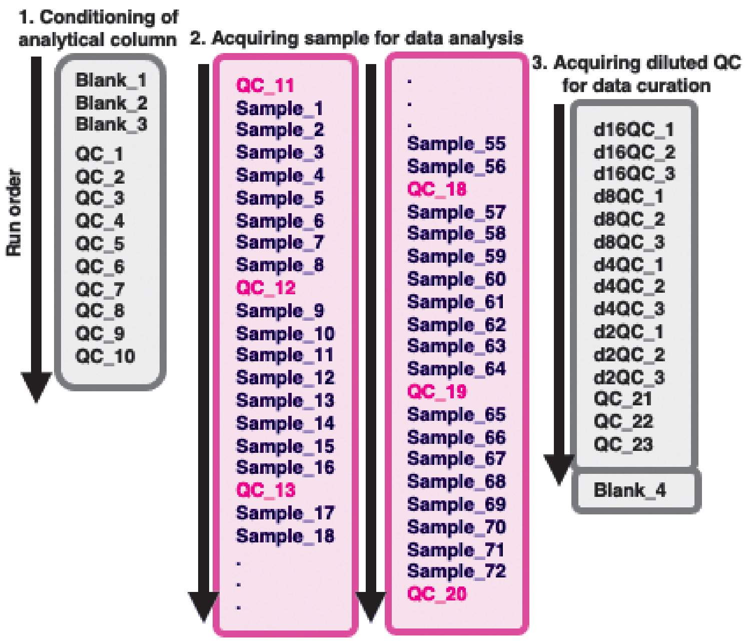

図 4　メタボローム分析におけるサンプル分析の順番
（*Sci Rep*., 2020 Apr 16 ; 10（1）: 6507. より改変）

(Microsoft Excel の“=RUND()”機能を使用）する．その際サンプル分析は，8 検体に一回 QC を分析するが，すべてのサンプル分析の前後に 1 回ずつ QC を分析する．次に，d16QC, d8QC, d4QC, d2QC およびオリジナル QC を 3 回ずつ分析し，最後に BK を分析する．

コンディショニング用に分析する QC の数は，カラムの種類によって異なり，例えば HILIC カラムは 10 回以上が推奨される．また，QC 分析の頻度は，2 時間ごとが推奨されているが，実際は柔軟に変更することが多い．

4･2　データ処理プロセス

一般に，メタボローム分析で得られた生データは，無償あるいは有償のソフトウェアにすべてインポートし，図 5 に示すように検出強度の相対値が示されるような 3 次元的プロットで示される．その際，ソフトウェア上で各種プロセスにてデータ補正が必要である．図 5 に，ProgenesisQI（Waters 製）によるデータ処理プロセスの一部を拡大して示した．

はじめに，データをインポートし，イオン種ならびにアダクトイオンを選択する①．次に，アラインメント（保持時間と *m/z* の補正）の基準になるサンプル（一般的に QC を用いる）を選択し，条件を設定後にアラインメントを実施する②．次に，図のようにピークピッキングされたイオンについて③，デコンボリューション後（同一分子由来の異なるイオン種をまとめる），保持時間（t_R）_*m/z* の独立した ID が付される④．その後，データベースを用いて化合物同定候補リストを作成する⑤．この段階で数万種程度の成分が同定される．

4･3　偽陽性データの除外

しかしながら，この時点では偽陽性検出成分が多く含まれているため，QC および dQC を用いて成分数を絞り込む必要がある．

例えば（1）QC 分析の変動係数 <30 % の成分，（2）それぞれの dQC の 3 回分析の変動係数 > 30 % の成分を除外する．（1）と（2）は，同じ検体を分析しているにもかかわらず，検出値が大きくばらつくということから，再現性が低い成分であると判断し，バイオマーカー候補分子として不適切であるため除外する．

また dQC 分析の結果，（3）d16QC および d8QC における検出値が最大であると示された成分，（4）d1QC と d2QC における検出値が最小であると示された成分を除去する．（3）と（4）は，希釈しているにもかかわらず一番検出値が高い成分あるいは希釈していないにもかかわらず一番検出値が低い成分であり，希釈溶媒由来や夾雑（きょうざつ）物である可能性が高いため除外する必要がある．さらに，（5）BK のみで検出された成分はサンプル由来でない成分と判断し，除外する．

以上の（1）～(5）のデータ処理により，ピークピッキング段階の成分数から約 10～20 % 程度まで減少する．したがって，メタボローム分析において再現性と信頼度の高いバイオマーカーを同定するためには，データの前処理が極めて重要であることがわかる[7]．

最終的に作成した t_R_*m/z* の ID が付された検体ごとの代謝物検出値リストを，csv 形式のファイルなどにエクスポートし，その後の統計解析に用いる．

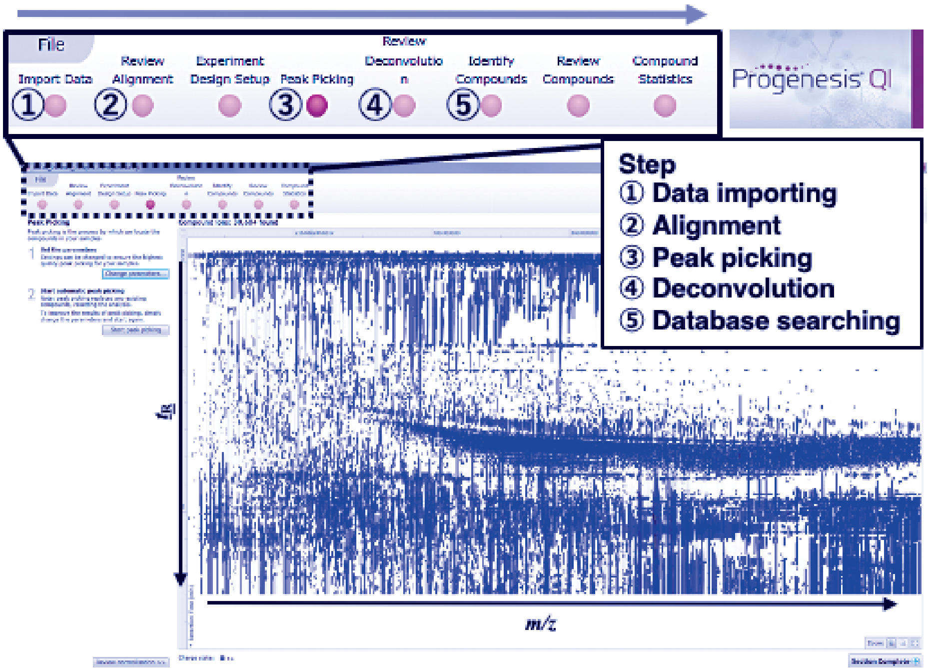

図 5　メタボローム分析結果と ProgenesisQI ソフトウェアを用いたデータ処理プロセス

4･4　データ補正

多検体メタボローム分析は，分析中の装置のコンディションの影響を受けた検出値の変動がしばしば問題になる．例えば，図 6−1 のように 3 種類の異なる血漿検体 A, B および C を 96 ウェルプレート 3 枚に準備し，LC-MS によるメタボローム分析を実施する．

検出された数千成分の中央値を算出し分析順にグラフにすると，図 6−2 のように分析中の検出強度値の低下が観察されることがある．次に，これらの成分を用いて主成分分析を実施すると，図 6−3 の右図のスコアプロットのように，個体の特徴成分よりも分析順番に応じて変動する傾向が観察される．一般に，このようなデータ群に沿うように滑らかな曲線を引くことができる場合は，中央値補正やノンパラメトリック回帰の手法の一つである locally weighted scatter plot smoother（LOWESS）補正が有効であると考えられているが，メタボローム分析の場合は，成分毎に増減傾向が異なる可能性がある．そこで，QC に含まれる各成分の変動を基準とし，図 6−4

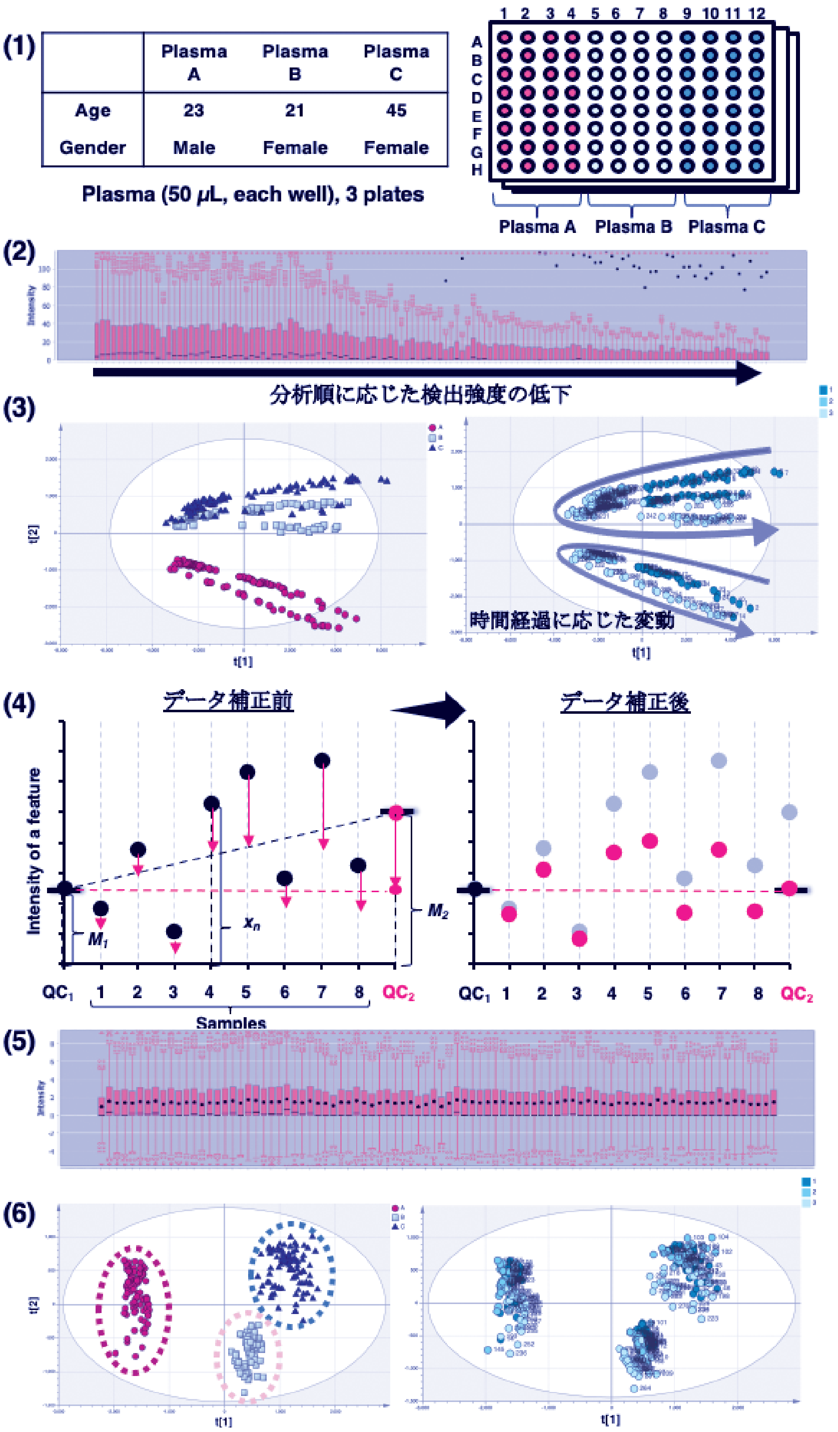

図 6　QC によるメタボロームデータ補正の効果
（*PLoS One.*, 2016, 11（8）: e0160555. より一部改変）

のようなデータ補正法を考案した[7]．例えば，QC で検出された成分の値は常に一定であるという仮説を立て，間に分析したサンプルに含まれる同一成分の値はその順番に応じた変化率を考慮し，以下の式を用いて各成分の値を補正する．

$$y = x_n M_1 \{n(M_2 - M_1)/9 + M_1\}^{-1}$$

x_n = *Intensity of a feature in a* "sample 1～8" *between* QC_1 *and* QC_2

n = *Injection number of a* "sample 1～8" *between* QC_1 *and* QC_2

M_1 = Intensity of a feature in QC_1,

M_2 = *Intensity of a feature in* QC_2

したがって，成分ごとに変動が異なる場合においても適切な補正が実行されることから，補正後の中央値は，図 6-5 のように安定し，主成分分析におけるスコアプロットは，図 6-6 のように，サンプルごとの特徴成分を明らかにすることができるような分布になる．なお，このメタボローム分析データを自動で補正するプログラムは，Quantbolome ソフトウェアとして一般公開されている（https://github.com/informationsea/Quantbolome）．

一方，データ補正は図 6 のような場合に有効であるが，必須ということではない．歪みのある場合にのみ用いられる．具体的には，QC 検体を主成分分析のスコアプロット上で確認し，中心に分布する場合は補正不要であると判断し，大きく外れた場所に分布あるいは図 6 のように分析順に外れていくような傾向がある場合は補正を実施する．例えば大規模コホートメタボローム分析の場合，数か月に渡って分析することも多いため，QC によるデータ補正を実施するが，比較的数十検体程度の小規模な臨床メタボローム分析の場合は，データに歪みが少なく，データ補正を実施しないことも多い．

4･5　多変量解析

メタボローム分析で得られたデータセットは，数百から千を超える多変量成分が含まれる．したがって，一般のエクセルなどを用いる統計解析では処理能力が足りないため，ソフトウェアによる多変量解析が有用であると考えられている．SIMCA® は，有償のソフトウェアであるが，主成分分析および判別分析に優れており，多変量から効率的にバイオマーカーを探索することに好適であった．近年，無償でオンライン環境にて使用できる多変量解析用ソフトウェア MetaboAnalyst 6.0（https://www.metaboanalyst.ca/）が開発され，メタボローム分析を行っている研究者の間で活用が増大している．特に，グループ化した csv ファイルを読み込むのみで，主成分分析，判別分析，階層クラスター解析に加え，パスウェイ解析やエンリッチメント解析を実施することが可能である．また，代謝物ごとの valuable importance in projection（VIP）スコア値の算出が容易であり，さらに臨床メタデータを用いる代謝物との相関解析なども実行可能である．加えて，それぞれのスクリプトも同時に公開するため，R や Python プログラムにもコピーして応用可能である．したがって，MetaboAnalyst は今後のメタボローム分析入門者が用いるソフトウェアとして汎用されると考えられる．

5　メタボロームデータベースの活用

ここまで，疾患バイオマーカー探索に用いられるメタボローム分析あるいはデータ解析手法のノウハウについて述べてきた．しかしながら，臨床検体から得られたメタボローム情報からバイオマーカーの応用性を考えた場合，基準値が不明であることが多い．したがって，健常者のメタボロームデータと直接比較する必要があるが，臨床現場において健常者由来メタボロームデータを同時に得ることは極めて難しい．

近年，東北大学東北メディカル・メガバンクプロジェクトにおいて独自に開発しているデータベース（jMorp, https://jmorp.megabank.tohoku.ac.jp/）が着目されている．15 万人規模の地域住民コホート研究の中で得られた各種検体から様々な解析が実施されているが，血漿メタボローム分析もそのプロジェクトに含まれている．具体的には，60000 人規模の NMR による血漿メタボローム分析と，10000 人規模の MS による血漿メタボローム分析の結果を，年齢や性別などの群でまとめた統計値を掲載している．各種メタボロームの定量値が掲載され，臨床メタボローム分析で得られた血液中の濃度と直接比較することができる．実際に，がん患者から得られた血漿メタボローム分析の結果と比較してがんマーカーを同定した研究も発表されており，今後の応用性が期待される．

6　キットによるメタボローム分析

一般に，MS によるメタボローム分析法は，定量値の精度や分析の再現性について課題が多く残されていた．また，他機関によるメタボローム分析の結果が一致しないことから，疾患特異的なバイオマーカー開発ならびに臨床応用に大きな障壁となっている．近年，前処理，分析，データ解析などの一連の分析プロトコルを統一したメタボローム分析用キットが開発された．その中でも，Biocrates 製の MxP Quant 500 kit® は，standard operating procedures に従って実施するメタボローム分析用キットの代表例であり，96 ウェルプレート上でサンプルに含まれる代謝物の誘導体化ならびに除タンパク処理を実施し，溶出した検体をそのまま UHPLC-MS/MS 分析に供することができる．また，プレートによる処理の際

に，QCや検量線作成の標準試薬に加え，内部標準物質が含まれるなど，分子の定量条件が整っている．さらに，MSのメーカーやグレードに応じて分析前にサンプルの希釈倍率を調整することにより，多機種に対応しているため，施設が異なる場合でも直接比較することができる[10]．分析手法の最適化も実施されていることから，USBメモリに含まれる各種プログラムを読み込むことで，ユーザー側の負担を極力減らすことができる．現在は，1000代謝物程度を一斉に定量することができるため，大規模コホート研究や臨床メタボローム分析に汎用する研究者ならびに施設が増えつつあるが[11]，価格やソフトウェア継続性の点で一部問題もある．また，代謝物の内訳を確認すると，80％以上が脂質分子種であり，異性体を分離分析できていないなどの課題も残されており，ゴールドスタンダードなメタボローム分析手法となるかどうかは，まだまだ検証が必要であると考える．

7　国内外の動向とまとめ

最後に国内外の大規模なメタボローム分析における動向について取り上げる．近年，メタボローム研究の臨床応用やデータ活用性の向上を目指し，Metabolomics学会やLipid Standard Initiative研究グループを中心とした国際コンソーシアムが形成され，メタボロームデータについての議論に加え，多施設間共同実験が行われている．具体的には，一つの研究機関が検体を準備し，複数の共同研究機関で同時にメタボロームあるいはリピドームデータを取得する．取りまとめの機関でデータ解析を実施し，直接比較の可能性，データ補正の有効性について検討を行い，最終的には学術論文として成果を発表する，という取り組みである．国内では10施設ほどが参加し，はじめは細胞内代謝物，次にヒト血漿の検証結果が発表された[12)13]．その結果は，既に国際共同研究の取り組み同様に，それぞれ独自のメタボローム分析法を用いたことが影響し，共通の検体を分析したとしても，各分子の定量値のバラツキは比較的大きく，QCなどを用いて補正することが困難であることが示された．一方，前述したようなキットによるメタボローム分析を用いて国際多施設間共同研究を実施した場合や，分析メソッドまで指定して分子種を少数に絞った場合には，バラツキは見られるものの，QCによるデータ補正で定量値が一致することが示されている[10]．このように現在，世界規模でメタボロームデータを比較あるいは共有する動きが散見されており，メタボローム研究を実施する研究者にとって良い環境が整いつつある．

本項では，臨床メタボローム分析について，サンプル準備，前処理，分析，データ解析のノウハウについて述べた．多くの分析手法が開発されているため，どの方法を採用するかは最終的に判断するのは研究目的次第であるが，分析化学者が臨床医と共にバイオマーカー開発を目指すのであれば，研究のマイルストーンや出口戦略をこまめに設定する必要がる．本項に記述したノウハウが，今後のメタボローム分析を実施する研究や疾患バイオマーカー開発に役立つことを期待する．

文　献

1）JK. Nicholson, E. Holmes, JM. Kinross, AW. Darzi, Z. Takats, JC. Lindon : *Nature*, **491**（7424）, 384（2012）.
2）D. Saigusa, N. Matsukawa, E. Hishinuma, S. Koshiba : *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **37**, 100373（2021）.
3）RK. Azad, V. Shulaev : *Brief. Bioinform.*, **20**, 1957（2019）.
4）MR. Lewis, JT. Pearce, K. Spagou, M. Green, AC. Dona, AH. Yuen, M. David, DJ. Berry, K. Chappell, V. Horneffer-van der Sluis, R. Shaw, S. Lovestone, P. Elliott, J. Shockcor, JC Lindon, O. Cloarec, Z. Takats, E. Holmes, JK. Nicholson : *Anal. Chem.*, **88**（**18**）, 9004（2016）.
5）M. Haid, C. Muschet, S. Wahl, W. Römisch-Margl, C. Prehn, G. Möller, J. Adamski : *J. Proteome Res.*, **17** 203（2018）
6）A. Sens, S. Rischke, L. Hahnefeld, E. Dorochow, SMG. Schäfer, D. Thomas, M. Köhm, G. Geisslinger, F. Behrens, R. Gurke : *J. Mass Spectrom. Adv. Clin. Lab.*, **28**, 35（2023）.
7）D. Saigusa, Y. Okamura, IN. Motoike, Y. Katoh, Y. Kurosawa, R. Saijyo, S. Koshiba, J. Yasuda, H. Motohashi, J. Sugawara, O. Tanabe, K. Kinoshita, M. Yamamoto : *PLoS One.*, **11**, e0160555（2016）.
8）K. Nagai, B. Uranbileg, Z. Chen, A. Fujioka, T. Yamazaki, Y. Matsumoto, H. Tsukamoto, H. Ikeda, Y. Yatomi, H. Chiba, SP. Hui, T. Nakazawa, R. Saito, S. Koshiba, J. Aoki, D. Saigusa, Y. Tomioka : *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **34 Suppl 1**（**Suppl 1**）, e8551（2020）.
9）S. Rashad, D. Saigusa, T. Yamazaki, Y. Matsumoto, Y. Tomioka, R. Saito, A. Uruno, K. Niizuma, M. Yamamoto, T. Tominaga : *Sci. Rep.*, **10**, 6507（2020）.
10）AP. Siskos, P. Jain P, W. Römisch-Margl, M. Bennett, D. Achaintre, Y. Asad, L. Marney, L. Richardson, A. Koulman, JL. Griffin, F. Raynaud, A. Scalbert, J. Adamski, C. Prehn, HC. Keun : *Anal. Chem.*, **89**, 656（2017）.
11）D. Saigusa, E. Hishinuma, N. Matsukawa, M. Takahashi, J. Inoue, S. Tadaka, IN. Motoike, A. Hozawa, Y. Izumi, T. Bamba, K. Kinoshita, K. Ekroos, S. Koshiba, M. Yamamoto : *Metabolites.*, **11**, 652（2021）.
12）Y. Izumi, F. Matsuda, A. Hirayama, K. Ikeda, Y. Kita, K. Horie, D. Saigusa, K. Saito, Y. Sawada, H. Nakanishi, N. Okahashi, M. Takahashi, M. Nakao, K. Hata, Y. Hoshi, M. Morihara, K. Tanabe, T. Bamba, Y. Oda : *Metabolites.*, **9**, 257（2019）.
13）S. Nishiumi, Y. Izumi, A. Hirayama, M. Takahashi, M. Nakao, K. Hata, D. Saigusa, E. Hishinuma, N. Matsukawa, SM. Tokuoka, Y. Kita, F. Hamano, N. Okahashi, K. Ikeda, H. Nakanishi, K. Saito, MY. Hirai, M. Yoshida, Y. Oda, F. Matsuda, T. Bamba : *Metabolites.*, **12**, 135（2022）.

三枝 大輔（Saigusa Daisuke）
帝京大学薬学部臨床分析学研究室（〒173-8605 東京都板橋区加賀2-11-1）．東北大学大学院薬学研究科博士課程前期2年の課程医療薬学専攻修了．博士（薬学）．《現在の研究テーマ》質量分析計による生体内メタボローム解析と臨床応用に資する研究．《趣味》お酒，映画，アニメ，ゲーム．