OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	腎臓における器質的障害と尿中D/L-アミノ酸比の変動に関する相関解析
Author(s)	福田, 幸祐
Citation	大阪大学, 2026, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/105403
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

腎臓における器質的障害と尿中 D/L-アミノ酸比の変動に関する相関解析

福　田　幸　祐

2026年1月

大阪大学大学院工学研究科

目次

用語集 4

第 1 章 緒論 6

1.1 社会における腎疾患 6

1.2 腎障害の分類 6

1.3 腎障害の検出 8

1.4 腎障害の確定診断 10

1.5 腎障害と D-アミノ酸の関連 10

1.6 本博士論文の目的と構成 12

第 2 章 シスプラチンを用いた腎障害モデルラットにおける D/L-アミノ酸比の変動解析 13

2.1 緒言 13

2.2 実験材料と実験方法 13

2.2.1 試薬 13

2.2.2 実験動物 14

2.2.3 被験物質投与用試料の調製 15

2.2.4 アミノ酸混合標準溶液の調製法 15

2.2.5 動物実験デザイン 15

2.2.6 尿検査 16

2.2.7 血液生化学的検査 16

2.2.8 病理組織学的検査 16

2.2.9 D/L-アミノ酸分析 16

2.2.10 相関解析 18

2.2.11 統計手法 18

2.3 結果と考察 18

2.3.1 シスプラチン投与による薬剤性腎障害モデルラットの作製 18
2.3.2 シスプラチン投与後の血漿中 D/L-アミノ酸比の変動 23
2.3.3 シスプラチン投与後の尿中 D/L-アミノ酸比の変動 29
2.3.4 シスプラチン投与後の血漿中及び尿中 D/L-アミノ酸比の相関解析 38
2.3.5 小括 41
第 3 章 5/6 腎臓摘出モデルラットを用いた尿中 D/L-アミノ酸比と腎障害の相関解析 42
3.1 緒言 42
3.2 実験材料と実験方法 42
3.2.1 試薬 42
3.2.2 実験動物 43
3.2.3 アミノ酸混合標準溶液の調製法 43
3.2.4 動物実験デザイン 43
3.2.5 尿検査 44
3.2.6 血液生化学的検査 44
3.2.7 病理組織学的検査 44
3.2.8 D/L-アミノ酸比分析 45
3.2.9 相関解析 46
3.2.10 統計手法 47
3.3 結果と考察 47
3.3.1 5/6 腎臓摘出モデルラットの作製 47
3.3.2 5/6 腎摘出後の尿中 D/L-アミノ酸比の変動 51
3.3.1 尿中 D/L-アミノ酸比と病理組織学的変化の相関解析 60
3.3.2 小括 68
第 4 章 総括と展望 69

4.1 本研究の総括 69
4.2 今後の展望 70
引用文献 72
学術論文 93
学会発表 94
謝辞 96

用語集

アミノ酸

DL-Ala: DL-alanine、DL-アラニン

DL-Arg: DL-arginine、DL-アルギニン

DL-Asn: DL-asparagine、DL-アスパラギン

DL-Asp: DL-aspartic acid、DL-アスパラギン酸

DL-Cys: DL-cysteine、DL-システイン

DL-Gln: DL-glutamine、DL-グルタミン

DL-Glu: DL-glutamic acid、DL-グルタミン酸

DL-His: DL-histidine、DL-ヒスチジン

DL-Ile: DL-isoleucine、DL-イソロイシン

DL-allo-Ile: DL-allo-isoleucine、DL-allo-イソロイシン

DL-Leu: DL-leucine、DL-ロイシン

DL-Lys: DL-lysine、DL-リジン

DL-Met: DL-methionine、DL-メチオニン

DL-Phe: DL-phenylalanine、DL-フェニルアラニン

DL-Ser: DL-serine、DL-セリン

DL-Thr: DL-threonine、DL-トレオニン

DL-allo-Thr: DL-allo-threonine、DL-allo-トレオニン

DL-Trp: DL-tryptophan、DL-トリプトファン

DL-Tyr: DL-tyrosine、DL-チロシン

DL-Val: DL-valine、DL-バリン

アミノ酸以外

Alb: Albumin、アルブミン

AUC: Area under the curve、曲線下面積

BM: Biomarker、バイオマーカー

BUN: Blood urea nitrogen、血中尿素窒素

Cre: Creatinine、クレアチニン

CKD: Chronic kidney disease、慢性腎臓病

DAO: D-amino acid oxidase、D アミノ酸オキシダーゼ

eGFR: Estimated glomerular filtration rate、推定糸球体濾過量

GFR: Glomerular filtration rate、糸球体濾過量

GSH: Glutathione、グルタチオン

HPLC: High performance liquid chromatography、高速液体クロマトグラフィー

H&E: Hematoxylin-Eosin、ヘマトキシリン・エオジン

IRI: Ischemia-reperfusion injury、虚血再灌流障害

KIM-1: Kidney Injury Molecule-1、腎臓傷害分子-1

KRT: Kidney replacement therapy、腎代替療法

LC-MS/MS: Liquid chromatography-tandem mass spectrometry、液体クロマトグラフィー－四重極型質量分析計

Nrf2: NF-E2-related factor 2、NF-E2 関連因子 2

OCT2: Organic cation transporter 2、有機カチオントランスポーター2

QOL: Quality of life、生活の質

ROC: Receiver operating characteristic、受信者操作特性

ROS: Reactive oxygen species、活性酸素種

S.D.: Standard deviation、標準偏差

SOX/POD: Sarcosine oxidase/peroxidase、サルコシンオキシダーゼ／ペルオキシダーゼ

WHO: World Health Organization、世界保健機関

第1章　緒論

1.1　社会における腎疾患

腎疾患の一種である慢性腎臓病（Chronic Kidney Disease; CKD）は、世界で 8 億 5000 万人程が罹患し（1）、最も急速に増加している死因の一つである（2）。CKD は、腎病態進行に伴う末期腎臓病への進展、さらに最悪の場合には死に至ることがある（3）、複雑かつ多面的な疾患である（4、5）。CKD に直接起因する世界の年間死亡者数は 5〜1000 万人と推定されており（6）、世界保健機関（World Health Organization; WHO）は、2040 年までに世界における死因の第 5 位になると推定している（6、7）。

CKD の治療には透析や腎移植等の腎代替療法（Kidney replacement therapy; KRT）が用いられるが（8）、その経済的負担は非常に高額である（9）。透析は腎臓の全ての機能を完全に代替するものではなく、また、継続した治療が必要となる。そのため治療自体が腎臓病患者の負担となることで、生活の質（Quality of life; QOL）の低下につながることが知られる（10、11）。CKD は依然として優先して解決すべき社会的課題の一つとして認知されており、このような状況を踏まえ、2025 年に WHO は腎臓病の予防戦略に関する決議を行った（12）。しかしながら、有病率が高く、世界的な公衆衛生問題として認識されているにもかかわらず（1、13）、初期の CKD 患者は自身が CKD を患っていても気が付かないことが多い（14）。その理由の一つには、CKD による症状が末期腎臓病になるまで顕在化しにくいことが挙げられる（5）。

1.2　腎障害の分類

腎臓病は腎障害を有する病態を示し、腎障害は腎機能が低下した状態を示す（15）。腎障害は腎機能低下と病態発症期間の点で多様であり（4、16）、大きく急性腎障害、急性腎臓病及び CKD の 3 種類に区分される（17 – 19）。現在の国際的診断ガイドラインでは、急性腎障害は 7 日以内の血清中クレアチニン（Creatinine; Cre）の高値等により定義され、急性腎臓病は急性腎障害及び CKD に該当しない 3 カ月未満の腎障害

と定義される（14）。CKD は要因に関わらず、少なくとも 3 か月継続する糸球体濾過量（Glomerular filtration rate; GFR）の 60 mL/min/1.73 m^2 未満への低下、尿中アルブミン（Albumin; Alb）等の腎障害に関連するバイオマーカー（Biomarker; BM）による病態と定義され（5、20、21）、さらにその重症度は GFR の値により 5 段階に分類される（図 1-1）。CKD の病態進行は個々により異なるが、G3a 及び G3b から G4 または G5 まで約 10 年で進行したと報告される（22 – 24）。急性腎障害の進展が CKD リスク要因となり、またその逆も同様であり、相互にリスク要因として影響しうることが知られる（25 – 27）。

腎障害は多くの場合、スクリーニング検査（尿試験紙法または血液検査）での発見時、または腎障害による症状が重症化した際に診断がなされる。しかしながら、尿中 Alb は糸球体や尿細管等への器質的障害が生じた後に変動することが報告されている（28）。また、腎機能には代償性があり、推定糸球体濾過量（Estimated glomerular filtration rate; eGFR）の推定に用いられる血清中 Cre 等は GFR が約 50%程度まで低下した際にようやく増加することも報告されている（29、30）。

近年の医療技術の発展にもかかわらず、CKD の根治療法は確立されておらず、発症予防と進行抑制しか対処法がない（5、31）。薬物療法並びに食事療法等による進行抑制に重きが置かれるものの（31、32）、CKD は一般に不可逆的に進行するため（33 – 35）、これらの治療を行ったとしても有害事象の発生や CKD の進行リスクは依然として残る（5）。治療に奏功せず CKD が進行し、腎機能が著しく損なわれてしまうと、腎移植や透析等の負担を伴う治療が必要になる（31）。そのため、腎機能に関する評価に加えて、器質的状態の評価が腎臓の状態を把握するために重要であると考えられる。

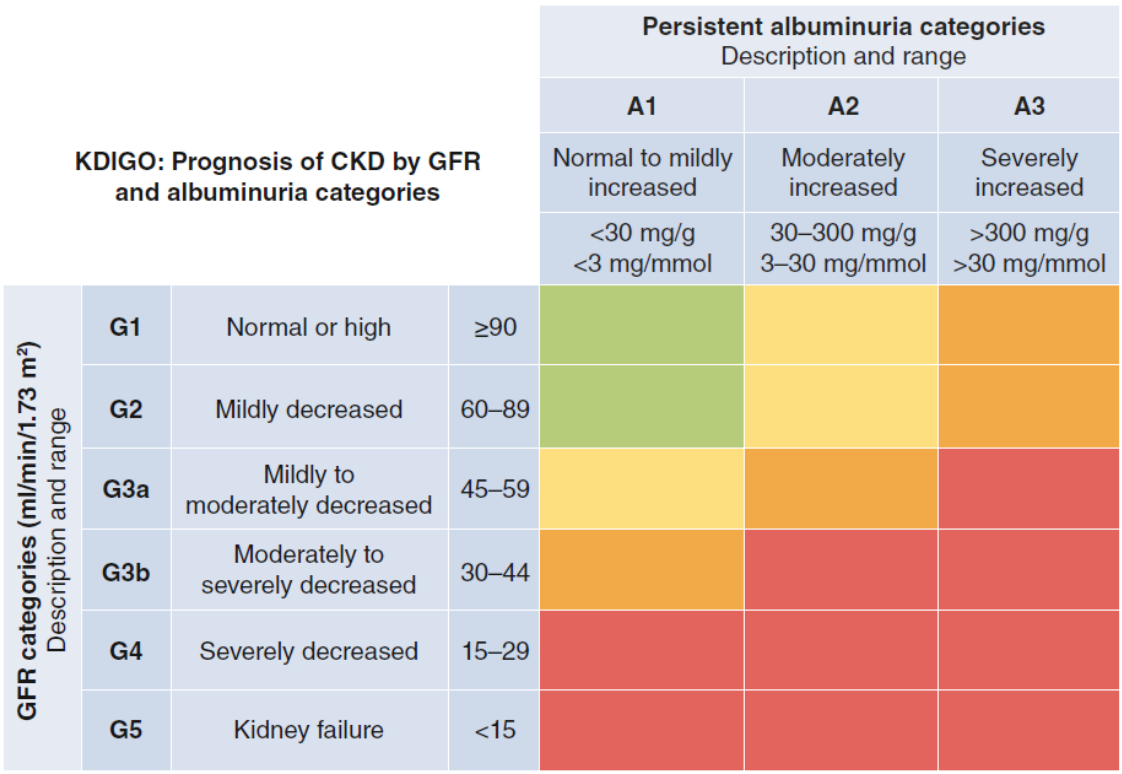

図 1-1 GFR に基づく CKD ステージ分類

緑色：低リスク（他の腎障害 BM 変動がない場合）、黄色：中程度のリスク、橙色：高リスク、赤：非常に高リスク。

Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group. KDIGO 2024 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. Kidney Int. 2024 Apr;105(4S):S117-S314.（引用文献 21）中の S126 引用

1.3 腎障害の検出

腎臓はネフロンと呼ばれる機能単位で構成され（図 1-2）、ネフロンはさらに腎小体（糸球体及びボーマン嚢）と尿細管から構成されている（36）。これらの部位ではそれぞれ血液の濾過や物質の分泌及び再吸収を担うことで、生体に不要な物質の排泄に寄与する（37、38）。腎臓における器質的障害は、それらの障害部位によって糸球体障害、並びに尿細管障害のように異なる表現型として発現する（39）。

腎障害時に変動する BM は過去に報告されており(40)、これらの変動は腎疾患の生理学的理解において重要である。血中尿素窒素(Blood urea nitrogen; BUN)や血清中 Cre 等の一般的な腎障害 BM は、主に糸球体濾過のような機能的影響に焦点を当てているが(41)、理想的な腎障害 BM は容易に測定でき、非侵襲的であることに加えて、器質的変化をよく反映するものと考えられている(42 – 44)。

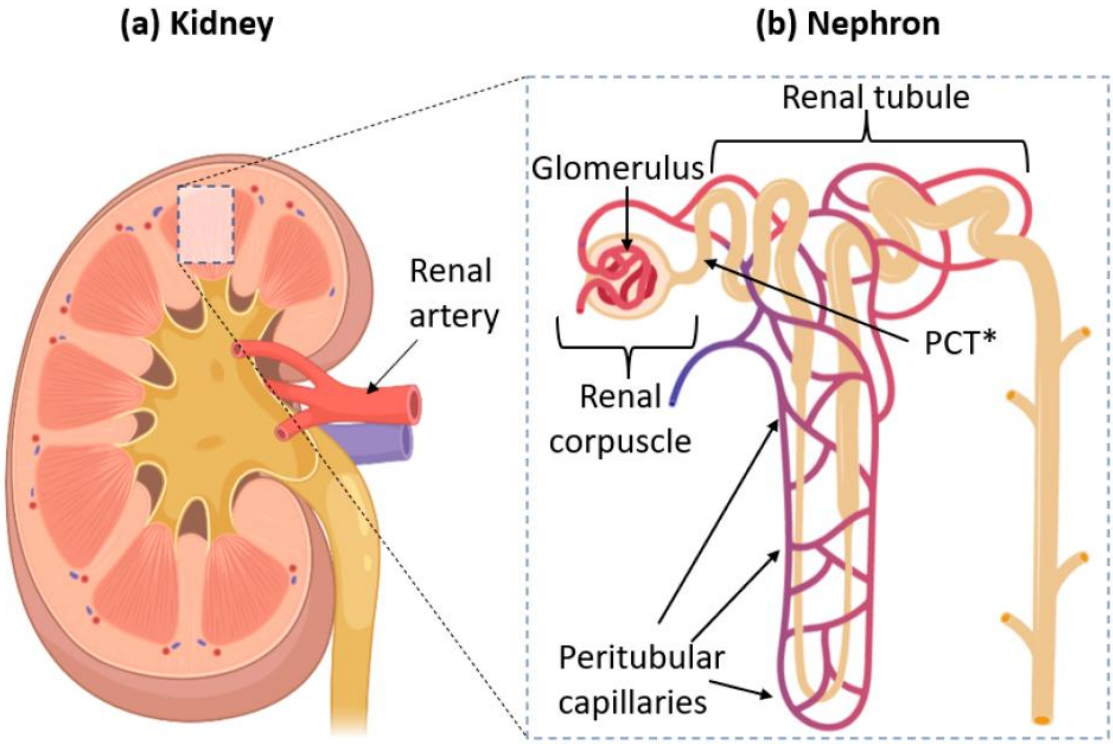

図 1-2 ヒト腎臓の構造 (a)腎臓の構造、(b)ネフロンの構造

Glomerulus:糸球体、Peritubular capillaries:尿細管周囲毛細血管、PCT (Proximal convoluted tubule):近位尿細管、Renal artery:腎動脈、Renal corpuscle:腎小体、Renal tubule:尿細管

Adhipandito CF, Cheung SH, Lin YH, Wu SH. Atypical Renal Clearance of Nanoparticles Larger Than the Kidney Filtration Threshold. Int J Mol Sci. 2021 Oct 17;22(20):11182.(引用文献 36)中の Fig. 1. 引用

1.4 腎障害の確定診断

腎臓の器質的障害の評価には、一般に腎生検が用いられる。腎生検で採取した腎組織検体を病理組織学的に検査することで、その要因を正確に特定することができる（45）。病理評価の結果は医療従事者及び患者に対する適切な治療指針及び予後評価のための重要な指針となる（45、46）。一方で、当該手法は高い侵襲性を伴う検査であり、リスクを伴う診断法であることが報告されている（47、48）。外科的手技を伴うことから、スクリーニング検査のように簡便に行うことは困難であり、また、禁忌により腎障害患者に対して適応できない場合もある（表 1-1）。そのため、腎臓の器質的状態の評価には、実施が容易で、かつ身体への負担が少ない非侵襲的な評価方法が望ましいと考えられる。

表 1-1 腎生検の禁忌理由（一部抜粋）

患者の状態	理由
高血圧	出血リスクの増加
凝固障害	早期治療再開が必要な場合、出血リスク
萎縮腎	技術的に困難
手術不能	施術に耐えられない

Hull KL et al. Indications and considerations for kidney biopsy: an overview of clinical considerations for the non-specialist. Clin Med (Lond).: 22 (1):34-40 2022（引用文献 48）中の Table 2 を一部改変

1.5 腎障害と D-アミノ酸の関連

近年、L-アミノ酸の光学異性体である D-アミノ酸は、ホルモン合成（49、50）や統合失調症、筋萎縮性側索硬化症、アルツハイマー病を代表とする精神疾患（51 – 54）等、

生体内で多様な機能を有していることが報告されている。また、腎障害との関連を示す報告も増えつつあり、急性腎障害モデルの一種である虚血再灌流障害（Ischemia-reperfusion injury; IRI）モデルマウスを用いた先行研究では、腎障害時の D/L-セリン（D/L-Serine; D/L-Ser）比が、腎障害分子-1（Kidney Injure Molecule-1; KIM-1）等の既存の腎障害マーカーよりも早期に変化することが報告されている（55）。

また、別の研究では D-Ser が GFR を反映し、急速進行性糸球体腎炎の BM として報告され、腎疾患の状態をモニターする上での有用性が示唆されている（56）。さらに、CKD 患者を対象とした臨床研究では、eGFR 等の腎機能 BM と、D-Ser 含量、D-アラニン（D-Alanine; D-Ala）並びに他の D/L-アミノ酸比等との間に強い相関が示されている（57、58）。

D-アミノ酸は代謝酵素の一種である D-アミノ酸オキシダーゼ（D-amino acid oxidase; DAO）により酸化代謝され、最終的に 2-オキソ酸、過酸化水素並びにアンモニアを生成する（59）。DAO は広範な器質特異性を示し、また、腎臓の近位尿細管に主に発現することが知られる（58、60）。IRI モデルラット並びにマウスを用いた研究では、腎障害時に DAO の活性が低下することが報告されている（55、61、62）。また、アミノ酸は尿細管で再吸収されるが（63 – 65）、近位尿細管には複数の中性アミノ酸トランスポーターが発現し、腎障害時に輸送活性が低下することで再吸収能が低下することも報告されている（66）。このように、腎障害時の近位尿細管における D アミノ酸の代謝及び排泄過程の変化に伴い、D アミノ酸の生体内挙動にも変化が生じるために、D-アミノ酸及び D/L-アミノ酸比が腎障害の有望な指標となる可能性が示唆されている（57、58）。

従来の腎障害マーカーは腎機能変化の検出に用いられるが、一方で器質的な変化は鋭敏に捉えにくいことが知られる（67、68）。腎臓の機能変化に先立ち器質的変化が生じうることから（29）、器質的変化を検出することで、従来の腎障害マーカーでは検出しにくい腎障害を捉えられる可能性が考えられた。しかしながら、D-アミノ酸または D/L-アミノ酸比と腎臓における研究は腎機能との関係に焦点を当てたものが多く、

特定の器質的変化との関係を研究した報告は限定的である。そのため、器質的障害時の D/L-アミノ酸比を評価することで、機能的評価を補完する器質的マーカーとして腎病態像を非侵襲的に捉えられる新たな可能性が考えられた。

尿中 BM 濃度は採取尿量に応じて試料中で希釈されることが課題になるが（69）、D-アミノ酸及び L-アミノ酸の比により算出される D/L-アミノ酸比は、濃度値を用いた評価ではないことから、希釈の影響を受けにくいと考えられる。また、D/L-アミノ酸比は質量分析法を用いて測定することができる。臨床検査における質量分析の応用は過去 10 年間で非常に発展しており（70）、複数対象の同時測定に優れていることから（71）、単一試料の分析から多くの評価が可能である。今後も発展が期待される質量分析法を用いた D/L-アミノ酸比の評価と、腎臓における病理組織学的変化との相関性に関する研究は、腎障害評価の観点で貴重な知見を提供すると考えられた。

1.6 本博士論文の目的と構成

本研究では、腎障害時の D/L-アミノ酸比の変動と腎臓の病理組織学的変化との相関解析を行うことで、尿細管障害の定量的指標となりえる D/L-アミノ酸比を同定することを目的とした。

本研究の流れは、まず第 2 章において、薬剤性腎障害を示すことが知られるシスプラチンを用いて腎障害モデルを構築し、その際の血漿中及び尿中 D/L-アミノ酸比の変動について検討を行った。次に第 3 章において、非侵襲的に腎障害のプロファイリングを行うことを目的とし、5/6 腎臓摘出モデルラットを用いた尿中 D/L-アミノ酸比と腎臓の病理組織学的所見との相関解析を行った。第 4 章では、本研究で得られた知見を総括し、今後の展望を考察した。

第2章　シスプラチンを用いた腎障害モデルラットにおける D/L-アミノ酸比の変動解析

2.1 緒言

第 1 章で述べた通り、本研究では、腎障害時の D/L-アミノ酸比の変動と腎臓での病理組織学的変化の相関解析を行うことで、D/L-アミノ酸比の変動と相関性が高い器質的障害を同定することを目的とした。

本章では、腎障害性薬剤の一種であるシスプラチンを用い、薬剤性腎障害時の血漿中及び尿中の D/L-アミノ酸比の変動を検討した。シスプラチンは臨床では強力な抗がん剤として使用されており、最も重篤な有害事象の一つに急性腎障害が挙げられる。シスプラチンは尿細管への分泌後、再吸収され、尿細管細胞に蓄積される場合がある（72）。シスプラチンの蓄積が生じると、近位尿細管を障害することが知られ（73）、その機序の一つとして、酸化ストレスが報告されている（72、74）。また、アミノ酸は尿細管で再吸収されること（63 – 65、75）、さらにアミノ酸代謝と酸化ストレスの関連が報告されていることから（76）、シスプラチン投与により、腎臓での部位特異的障害が生じた際の D/L-アミノ酸比の変動が検討可能と考えられた。尿検査及び血液生化学的検査、並びに病理組織学的検査により腎障害モデルの妥当性を確認するとともに、本モデルから採取した血漿及び尿中 D/L-アミノ酸比を分析し、両試料における変動を検討した。

2.2 実験材料と実験方法

2.2.1 試薬

DL-Ala、DL-アルギニン塩酸塩（DL-arginine; DL-Arg）、DL-アスパラギン一水和物（DL-asparagine; DL-Asn）、DL-アスパラギン酸（DL-aspartic acid; DL-Asp）、DL-グルタミン酸（DL-glutamic acid; DL-Glu）、DL-グルタミン（DL-glutamine; DL-Gln）、DL-ヒスチジン（DL-histidine; DL-His）、DL-イソロイシン（DL-isoleucine; DL-Ile、DL-allo-

isoleucine; DL-allo-Ile を含む 4 種類の光学異性体の混合物）、DL-ロイシン（DL-leucine; DL-Leu）、DL-リジン一塩酸塩（DL-lysine; DL-Lys）、DL-メチオニン（DL-methionine; DL-Met）、DL-フェニルアラニン（DL-phenylalanine; DL-Phe）、DL-セリン（DL-serine; DL-Ser）、DL-トレオニン（DL-threonine; DL-Thr）、DL-トリプトファン（DL-tryptophan; DL-Trp）、DL-チロシン（DL-tyrosine; DL-Tyr）、DL-バリン（DL-valine; DL-Val）は東京化成工業（東京、日本）から購入した。シスプラチン、L-アラニン、DL-システイン塩酸塩一水和物（DL-cysteine; DL-Cys）、DL-allo-トレオニン（DL-allo-threonine; DL-allo-Thr）、0.1 mol/L 塩酸及び高速液体クロマトグラフィー（High performance liquid chromatography; HPLC）グレードエタノールは富士フイルム和光純薬株式会社（大阪、日本）から購入した。HPLC グレードトリフルオロ酢酸、LC/MS グレードメタノール-Plus、LC/MS グレードアセトニトリル-Plus は関東化学株式会社（東京、日本）から購入した。HPLC グレードクロロホルムはキシダ化学株式会社（大阪、日本）から購入した。生理食塩水（大塚生食注）は大塚製薬株式会社（東京、日本）から購入した。DL-Ala-2,3,3,3-d_4 は Santa Cruz Biotechnology Inc.（Texas、USA）から購入した。

2.2.2 実験動物

日本チャールス・リバー株式会社（滋賀、日本）から 5 週齢の Crl:CD（SD）系雄ラット（SPF）を 23 匹購入し、アルミニウム製の前面・床面金網ケージに1ケージあたり 1 匹収容し、飼育した。なお、蓄尿時には代謝ケージに個体別で飼育した。動物室は室温を 24.0±2.0°C に、相対湿度を 55.0±15.0%に制御し、12 時間の明暗サイクル（点灯：8:00～20:00、消灯：20:00～8:00）に制御した。固型飼料（CE-2）はオリエンタル酵母株式会社（東京、日本）から購入し、飼育期間中は飼料と水道水を自由に摂取させたが、蓄尿時には絶食とした。すべての動物実験操作は住友ファーマ株式会社の動物実験委員会の承認を受けた。

2.2.3 被験物質投与用試料の調製

秤量したシスプラチンに必要量の生理食塩水を加え、溶解させることにより 2.5 mg/mL 液を調製した。引き続き生理食塩水を用いて希釈することにより、1.25 及び 0.625 mg/mL をそれぞれ調製した。

2.2.4 アミノ酸混合標準溶液の調製法

20 μmol/mL のアミノ酸混合標準溶液を調製するために、それぞれのアミノ酸試料を 50%メタノール（メタノール：水＝1：1、v/v）、50%メタノール-0.02 mol/mL-HCl（DL-Glu、DL-His 及び DL-Trp 用）、または 50%メタノール-0.05 mol/mL-HCl（DL-Asp 及び DL-Tyr 用）に溶解した。アミノ酸混合標準溶液に内部標準物質として、DL-Ala-2,3,3,3-d_4 を 1000 nmol/mL となるように加えた。

2.2.5 動物実験デザイン

1 週間の馴化期間後、6 週齢のラットを 5 匹ずつ無作為に媒体対照群、シスプラチン投与群（低、中及び高用量群）の 4 群に割り当てた。シスプラチンの投与量は腎臓に病理組織学的影響が報告されている 5 mg/kg を高用量に設定し（77）、以下公比 2 を用いて 2.5 及び 1.25 mg/kg を中用量及び低用量にそれぞれ設定した。投与前日を Day -1（Pre）、初回投与日を投与 1 日（Day 1）と定義し、1 回／週（投与 1 日及び投与 8 日に合計 2 回）の頻度で腹腔内投与した。体重は Day 1、Day 3、Day 8、Day 11 及び Day 14 の合計 5 回測定した。また、Pre、Day 7 及び Day 14 に採尿と採血を行った。尿試料は 6 時間の蓄尿で採取した。尿検査用試料は測定まで冷蔵庫（4°C）で保管し、尿中 D/L-アミノ酸比分析用試料は、分析前処理を行うまで–80°C で保管した。採血はテルモシリンジ注射針付 1 mL（テルモ株式会社、東京、日本）を用い、無麻酔下で頸静脈から約 0.8 mL 採血し、ヘパリンリチウム入り血液採取容器キャピジェクト（テルモ株式会社、東京、日本）で抗凝固処理した後、遠心分離（2150 × g、5°C、10

分）を行った。血漿を採取した後、血液生化学的検査及び血漿中 D/L-アミノ酸比の分析を行うまで–80°C で保管した。

2.2.6 尿検査

尿試料は Alb 測定のために使用した。測定は臨床検査自動分析装置（JCA-ZS050、日本電子株式会社、東京、日本）を用いて実施した。Alb は免疫比濁法で測定した。

2.2.7 血液生化学的検査

ヘパリン処理された血漿試料は BUN 及び Cre 測定のために使用した。測定は臨床検査自動分析装置（JCA-ZS050、日本電子株式会社、東京、日本）を用いて実施した。BUN はウレアーゼ・UV 法（LED アンモニア回避法）、Cre はサルコシンオキシダーゼ／ペルオシキダーゼ（Sarcosine oxidase/peroxidase; SOX/POD）法で測定した。

2.2.8 病理組織学的検査

Day 15 にすべての動物を剖検に供し、イソフルラン吸入麻酔下にて、腹大動脈より全採血し安楽死を実施した。安楽死後、腎臓を摘出し、10％中性緩衝ホルマリン液に浸漬し、固定した。ヘマトキシリン・エオジン（Hematoxylin-Eosin; H&E）染色した標本を作製し、光学顕微鏡にて観察した。

2.2.9 D/L-アミノ酸分析

測定試料の前処理並びに液体クロマトグラフィー－四重極型質量分析計（Liquid chromatography-tandem mass spectrometry; LC-MS/MS）での分析方法は既存の方法に従った（78）。

血漿試料 50 µL に対してメタノール 200 µL 及び内部標準物質（DL-Ala-2,3,3,3-d_4）20 µL（1 µmol/mL）を混合し、10 秒間ボルテックスをした後、遠心分離した（10000 rpm、

4°C、10 分)。上清 400 μL に水 200 μL とクロロホルム 400 μL を混合し、10 秒間ボルテックスした後、遠心分離した(10000 rpm、4°C、10 分)。上清 350 μL を分取し、凍結乾燥した。凍結乾燥後の試料に移動相[アセトニトリル、エタノール、水、トリフルオロ酢酸を 80/15/5/0.5(体積比)で混合した溶液]100 μL を添加し、バイアルに移して、LC-MS/MS 分析を行った。

尿試料 100 μL に対しては、メタノール 350 μL、内部標準物質(DL-Ala-2,3,3,3-d_4) 20 μL(20 μmol/mL)及び水 50 μL を混合し、10 秒間ボルテックスをした後、遠心分離(10000 rpm、4°C、10 分)を行った。上清 360 μL に水 180 μL とクロロホルム 360 μL を混合し、10 秒間ボルテックスした後、遠心分離(10000 rpm、4°C、10 分)を行った。上清 50 μL にアセトニトリル 160 μL とエタノール 40 μL を混合し、10 秒間ボルテックスをした後、遠心分離(10000 rpm、4°C、10 分)を行った。100 μL の上清をバイアルに移して、LC-MS/MS 分析を行った。

LC-MS/MS 分析は Nexera HPLC システム(株式会社島津製作所、京都、日本)と LCMS-8060(島津製作所、京都、日本)を用いた。また流路切換バルブは FCV-32AH (株式会社島津製作所、京都、日本)を用いた。液体クロマトグラフィーにおける分離には内径 3.0 mm、長さ 150 mm、粒子径 5 μm の CROWNPAK CR-I(+)及び CROWNPAK CR-I(−)(株式会社ダイセル、大阪、日本)を分析カラムとして用いた。キラル固定相の不斉中心近傍で第一級アミノ酸基を有する化合物を光学分割することができ、D-アミノ酸と L-アミノ酸のピーク分離が可能となる(79)。移動相にはアセトニトリル、エタノール、水、トリフルオロ酢酸を80/15/5/0.5(体積比)で混合した溶液を用い、流速 0.4 mL/min のアイソクラティック条件で分析を行った。インジェクション量は 1 μL とし、オーブン温度は 25°C に設定した。イオン源にはエレクトロスプレーイオン化法と大気圧化学イオン化法を組み合わせたデュアルイオンソースを利用した。ポジティブイオンモードで、下記のパラメータで分析を行った。ネブライザーガス:3 L/min、ヒーティングガス:5 L/min、ドライイングガス:15 L/min、インターフェイス温度:230°C、DL 温

度:250°C、ヒートブロック温度:310°C 及びインターフェイス電圧:4 kV。トリプル四重極型質量分析計は MRM モードで使用した。標準品のプリカーサ―イオンとプロダクトイオンの *m/z* と保持時間により、化合物の同定を行った。データ取得および解析は LabSolutions(株式会社島津製作所、京都、日本)を使用して行った。

なお、D/L-アミノ酸比は各 D-アミノ酸のピークエリア値を、対応する L-アミノ酸のピークエリア値で除すことで算出した。

2.2.10 相関解析

血漿中 D/L-アミノ酸比と尿中 D/L-アミノ酸比の相関はピアソンの積率相関係数を用いて評価した。

2.2.11 統計手法

尿検査、血液生化学的検査及び D/L-アミノ酸比分析の評価で得られたデータは群平均値及び標準偏差を用いて表記した。各測定値は SAS version 9.4 software (SAS Institute Inc.、Cary、NC、USA)を用いて統計処理した。各採取日における媒体対照群と被験物質投与各群のデータについて、Dunnett の多重比較検定により差を両側、有意水準 5%で検定した。

2.3 結果と考察

2.3.1 シスプラチン投与による薬剤性腎障害モデルラットの作製

本実験では、薬剤性腎障害化合物の一種であるシスプラチンを投与した際の血漿中及び尿中 D/L-アミノ酸比の変動を評価した。

シスプラチンの投与期間中に合計 5 回体重を測定したが、いずれの投与量及び投与日においても、媒体対照群と比較して影響は認められなかった(図 2-1)。次にシスプラチン投与前、並びに投与後に血液生化学的検査と尿検査のため週 1 回の頻度で

血液と尿試料を採取した。一般的な腎障害マーカーとして、血漿中の BUN と Cre、並びに尿中の Alb を測定した。シスプラチン投与群のいずれの投与量及び投与日においても、血漿中 BUN（図 2-2）及び血漿中 Cre（図 2-3）に媒体対照群と比較して影響は認められなかった。一方で、尿中 Alb は、高用量群において媒体対照群と比較して有意な高値を示した（図 2-4）。また、Day 15 に腎臓を摘出し、病理組織学的検査を実施した。観察された所見を一覧にした（表 2-1）。シスプラチン投与群に、髄質外帯外層の近位尿細管の変性／壊死、再生、巨大核及び拡張、間質の単核細胞浸潤、並びに硝子円柱が認められた。近位尿細管での病理組織学的変化の重症度は、概ね用量依存性を示し、高用量でより強く影響が認められた。また、本実験で認められた腎臓での障害部位は近位尿細管であると考えられ、これは過去の報告と同様であった（77)。血液生化学的査値では変動が認められなかったものの、尿検査では Alb の高値が検出され、また、病理組織学的検査で腎臓での器質的障害が検出されたことから、シスプラチン投与により腎障害モデルが適切に構築できたと考えられた。

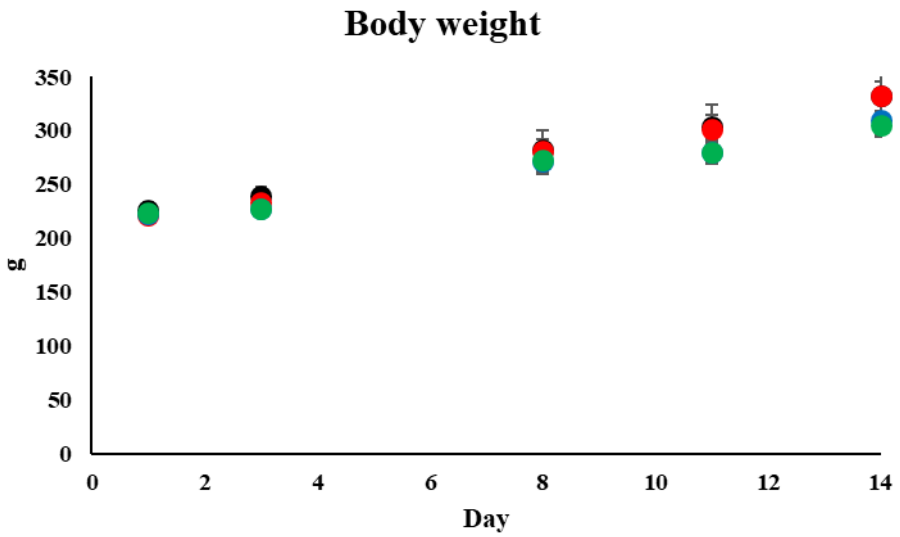

図 2-1 シスプラチン投与後の体重推移

●：媒体対照群、●：シスプラチン 1.25 mg/kg 群、●：シスプラチン 2.5 mg/kg 群、●：

シスプラチン 5 mg/kg 群、平均値±S.D.

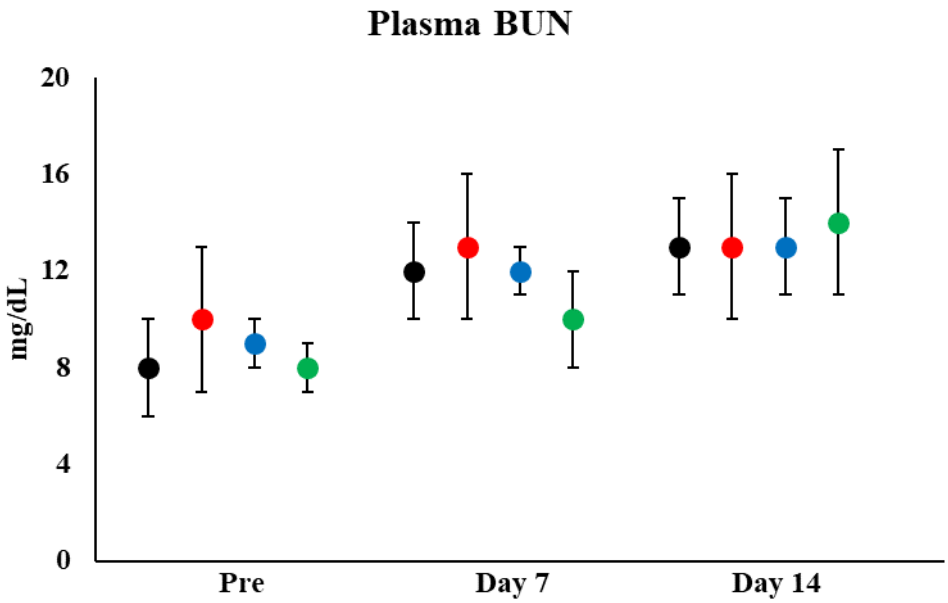

図 2-2 シスプラチン投与後の血漿中 BUN 変化

●:媒体対照群、●:シスプラチン 1.25 mg/kg 群、●:シスプラチン 2.5 mg/kg 群、●:シスプラチン 5 mg/kg 群、平均値±S.D.

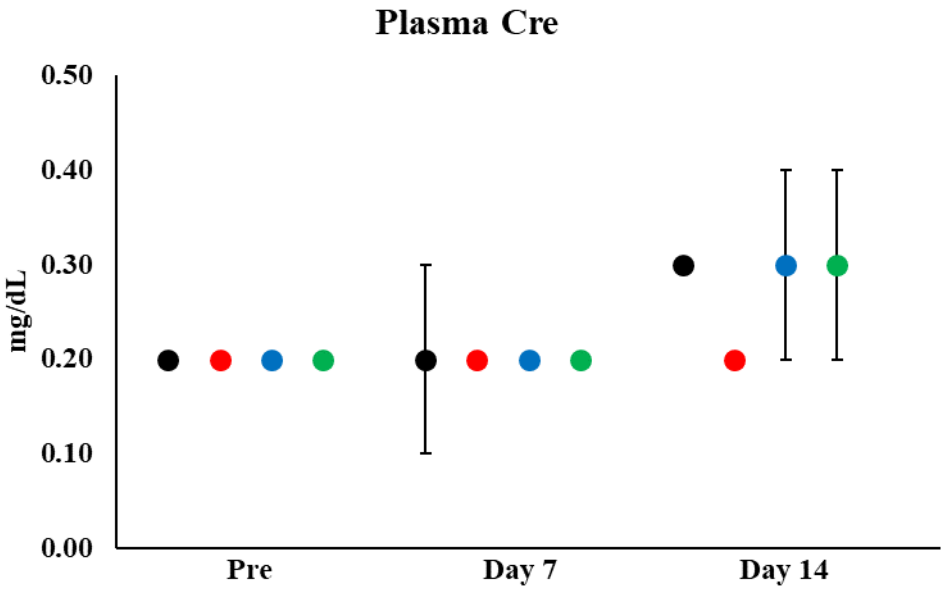

図 2-3 シスプラチン投与後の血漿中 Cre 変化

●:媒体対照群、●:シスプラチン 1.25 mg/kg 群、●:シスプラチン 2.5 mg/kg 群、●:シスプラチン 5 mg/kg 群、平均値±S.D.

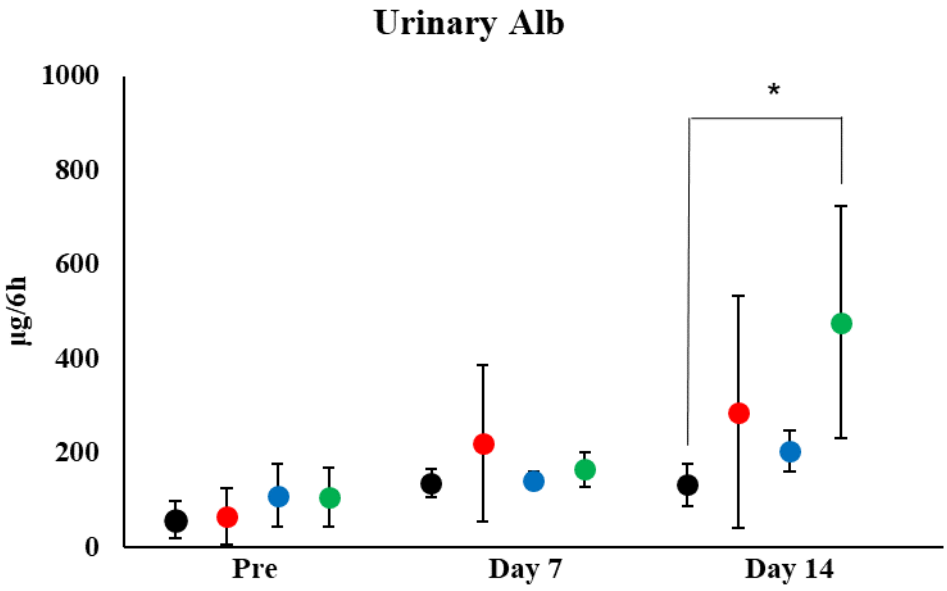

図 2-4 シスプラチン投与後の尿中 Alb 変化

●:媒体対照群、●:シスプラチン 1.25 mg/kg 群、●:シスプラチン 2.5 mg/kg 群、●:シスプラチン 5 mg/kg 群、平均値±S.D.、有意差:* $p < 0.05$

表 2-1 シスプラチン投与後の病理組織学的所見一覧

病理組織学的所見	媒体対照群	シスプラチン群		
重症度	**0 mg/kg**	**1.25 mg/kg**	**2.5 mg/kg**	**5 mg/kg**
髄質外帯外層の近位尿細管の変性及び壊死				
Not remarkable	5	0	0	0
Minimal	0	4	0	0
Mild	0	1	3	1
Moderate	0	0	2	4
髄質外帯外層の近位尿細管の再生				
Not remarkable	5	4	0	0
Minimal	0	1	0	0
Mild	0	0	5	1
Moderate	0	0	0	4
Marked	0	0	0	0
髄質外帯外層の近位尿細管の巨大核				
Not remarkable	5	5	1	0
Minimal	0	0	2	2
Mild	0	0	2	3
髄質外帯外層の近位尿細管の拡張				
Not remarkable	5	5	4	1
Minimal	0	0	1	3

病理組織学的所見　媒体対照群	シスプラチン群		
重症度	0 mg/kg	1.25 mg/kg	2.5 mg/kg	5 mg/kg
Mild	0	0	0	1
硝子円柱				
Not remarkable	5	5	5	2
Minimal	0	0	0	1
Mild	0	0	0	2
間質の単核細胞浸潤				
Not remarkable	5	3	2	3
Minimal	0	2	3	1
Mild	0	0	0	1

2.3.2 シスプラチン投与後の血漿中 D/L-アミノ酸比の変動

シスプラチン投与ラットから採取した血漿中 D/L-アミノ酸比の分析では、Pre、Day 7 及び Day 14 を通じて D/L-Ala 比（図 2-5）、D/L-Asp 比（図 2-6）、D/L-Leu 比（図 2-7）、D/L-Ser 比（図 2-8）及び D/L-Val 比（図 2-9）、これらの 5 種類の D/L-アミノ酸比が得られた（表 2-2）。しかしながら、過去に腎障害との関連が報告されている D/L-Ser 比及び D/L-Ala 比を含め、いずれの採取日においてもこれら 5 種の血漿中 D/L-アミノ酸比に媒体対照群と比較して有意な変化は認められず、シスプラチン投与による影響は認められなかった。また、その他の D/L-アミノ酸比は、D-アミノ酸が検出されず、得られなかった。

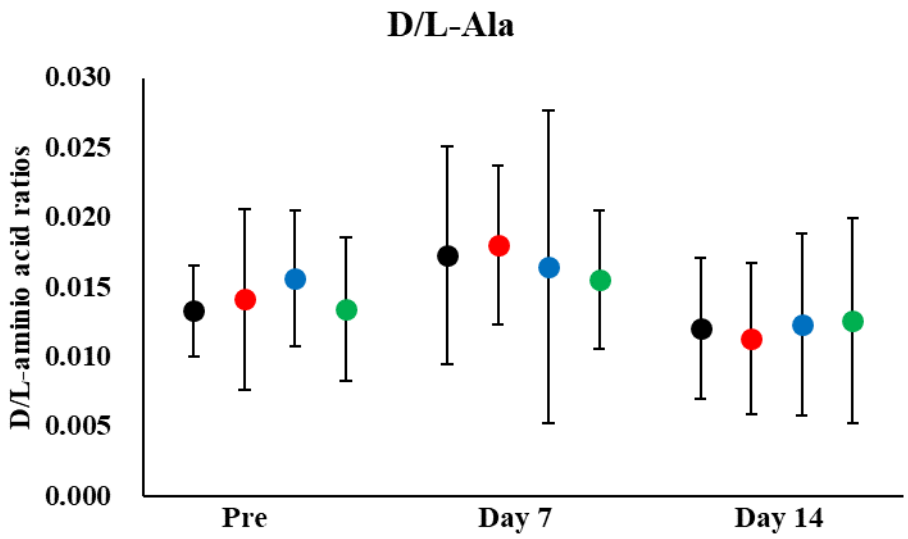

図 2-5 シスプラチン投与後の血漿中 D/L-Ala 比変化

●:媒体対照群、●:シスプラチン 1.25 mg/kg 群、●:シスプラチン 2.5 mg/kg 群、●:シスプラチン 5 mg/kg 群、平均値±S.D.

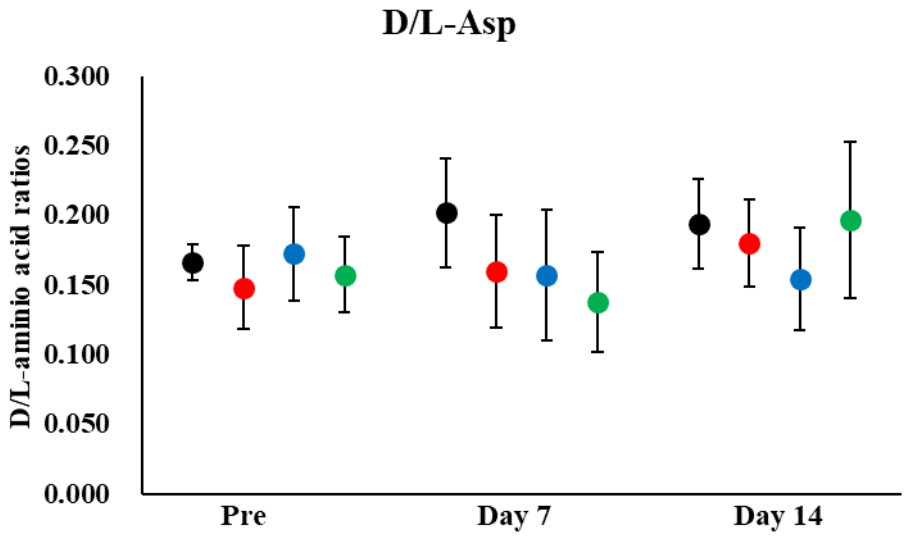

図 2-6 シスプラチン投与後の血漿中 D/L-Asp 比変化

●:媒体対照群、●:シスプラチン 1.25 mg/kg 群、●:シスプラチン 2.5 mg/kg 群、●:シスプラチン 5 mg/kg 群、平均値±S.D.

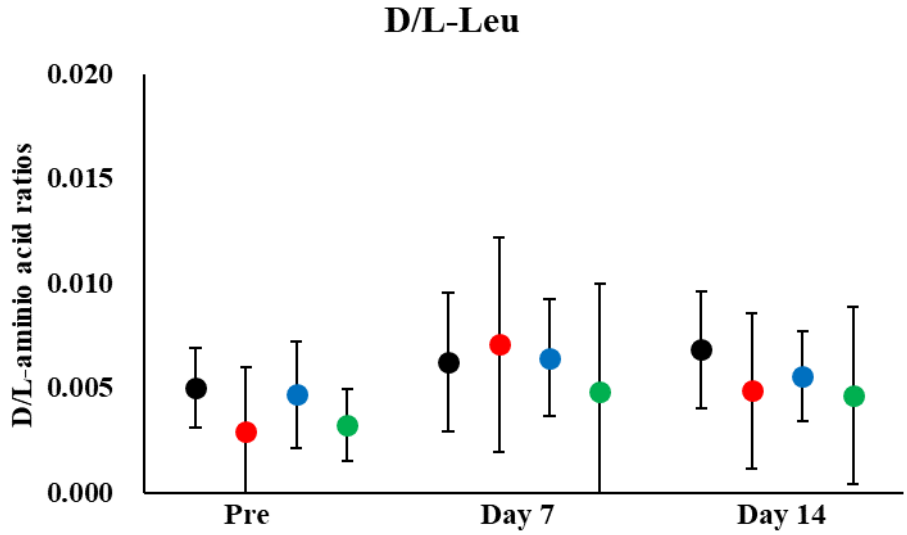

図 2-7 シスプラチン投与後の血漿中 D/L-Leu 比変化

●:媒体対照群、●:シスプラチン 1.25 mg/kg 群、●:シスプラチン 2.5 mg/kg 群、●:シスプラチン 5 mg/kg 群、平均値±S.D.

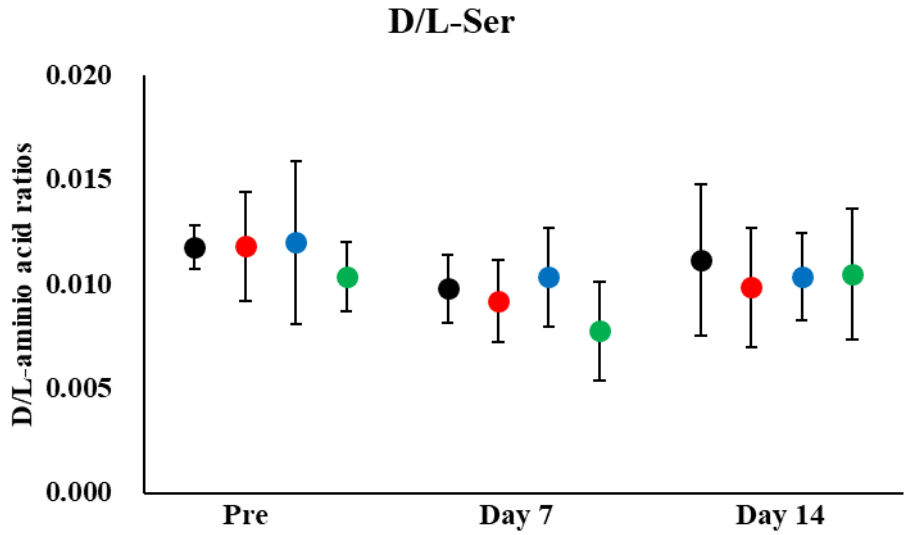

図 2-8 シスプラチン投与後の血漿中 D/L-Ser 比変化

●:媒体対照群、●:シスプラチン 1.25 mg/kg 群、●:シスプラチン 2.5 mg/kg 群、●:

シスプラチン 5 mg/kg 群、平均値±S.D.

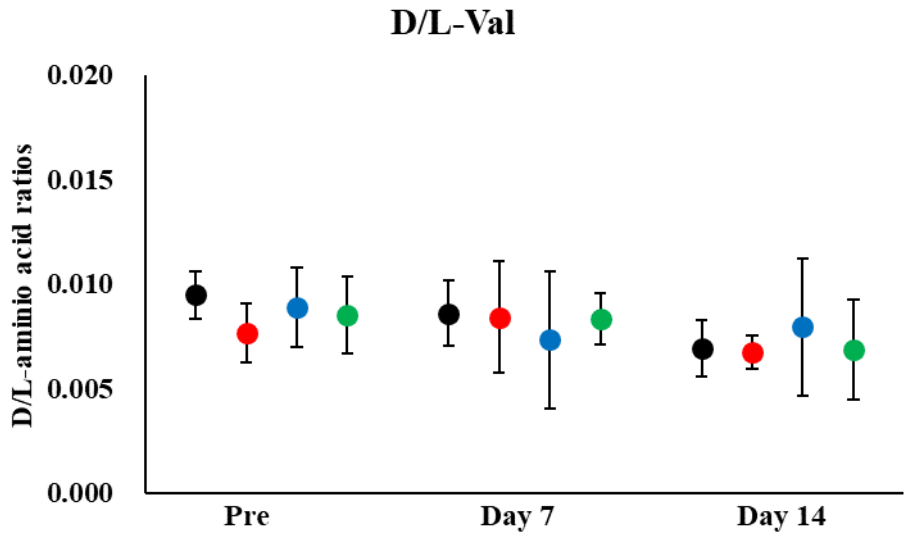

図 2-9 シスプラチン投与後の血漿中 D/L-Val 比変化

●:媒体対照群、●:シスプラチン 1.25 mg/kg 群、●:シスプラチン 2.5 mg/kg 群、●:シスプラチン 5 mg/kg 群、平均値±S.D.

表 **2-2** シスプラチン投与後の血漿中 **D/L-**アミノ酸比の一覧

Days	媒体対照群	シスプラチン群		
	0 mg/kg	**1.25 mg/kg**	**2.5 mg/kg**	**5 mg/kg**
D/L-Ala				
Pre	0.013 ± 0.003	0.014 ± 0.006	0.016 ± 0.005	0.013 ± 0.005
Day 7	0.017 ± 0.008	0.018 ± 0.006	0.016 ± 0.011	0.016 ± 0.005
Day 14	0.012 ± 0.005	0.011 ± 0.005	0.012 ± 0.007	0.013 ± 0.007
D/L-Asp				
Pre	0.166 ± 0.013	0.148 ± 0.030	0.173 ± 0.034	0.158 ± 0.027
Day 7	0.202 ± 0.039	0.160 ± 0.040	0.157 ± 0.047	0.138 ± 0.036
Day 14	0.194 ± 0.032	0.180 ± 0.032	0.154 ± 0.037	0.197 ± 0.056
D/L-Leu				
Pre	0.005 ± 0.002	0.003 ± 0.003	0.005 ± 0.003	0.003 ± 0.002
Day 7	0.006 ± 0.003	0.007 ± 0.005	0.006 ± 0.003	0.005 ± 0.005
Day 14	0.007 ± 0.003	0.005 ± 0.004	0.006 ± 0.002	0.005 ± 0.004

Days	媒体対照群	シスプラチン群		
	0 mg/kg	**1.25 mg/kg**	**2.5 mg/kg**	**5 mg/kg**
D/L-Ser				
Pre	0.012 ± 0.001	0.012 ± 0.003	0.012 ± 0.004	0.010 ± 0.002
Day 7	0.010 ± 0.002	0.009 ± 0.002	0.010 ± 0.002	0.008 ± 0.002
Day 14	0.011 ± 0.004	0.010 ± 0.003	0.010 ± 0.002	0.010 ± 0.003
D/L-Val				
Pre	0.010 ± 0.001	0.008 ± 0.001	0.009 ± 0.002	0.009 ± 0.002
Day 7	0.009 ± 0.002	0.008 ± 0.003	0.007 ± 0.003	0.008 ± 0.001
Day 14	0.007 ± 0.001	0.007 ± 0.001	0.008 ± 0.003	0.007 ± 0.002

平均値±S.D.

2.3.3 シスプラチン投与後の尿中 D/L-アミノ酸比の変動

シスプラチン投与ラットから採取した尿中 D/L-アミノ酸比の分析では、Pre、Day 7 及び Day 14 を通じて 9 種類の尿中 D/L-アミノ酸比が算出された（表 2-3）。Day 14 において、これら 9 種の D/L-アミノ酸比のうち D/L-Arg 比（図 2-11）、D/L-Gln 比（図 2-13）、D/L-His 比（図 2-15）及び D/L-Ser 比（図 2-17）には、媒体群対照と比較して有意な変化が認められた。過去に腎障害との関連が報告されている D/L-Ser 比は、媒体対照群と比較して中用量群と高用量群でそれぞれ 3.4 倍及び 3.0 倍の高値を示した。また、D/L-Arg 比、D/L-Gln 比及び D/L-His 比は、媒体対照群と比較して高用量群でそれぞれ 0.6 倍、0.5 倍及び 0.2 倍の低値を示した。

D/L-アミノ酸比の変化のメカニズムは完全には解明されていないが、L-Arg は酸化ストレスへの応答として、抗酸化転写因子である NF-E2 関連因子 2（NF-E2-related factor 2; Nrf2）の活性化、並びにグルタチオン（Glutathione; GSH）合成を促進することが報告されている（80）。また、L-Arg は一酸化窒素の前駆体であり、腎障害動物に L-Arg を投与することで、腎機能の改善が報告されている（81 – 84）。シスプラチン投与ラットでは、血清中 L-Gln 濃度が増加することが報告されている（85）。また、L-Gln はシスプラチンの腎臓への取り込みに関与する有機カチオントランスポーター2（Organic cation transporter 2; OCT2）の発現を抑制することで、シスプラチンの腎臓への蓄積を抑制し、腎障害を軽減することが報告されている（86）。L-His も同様に腎障害時の酸化ストレスを抑制することが報告されている（87、88）。そのため、尿中 D/L-Arg 比、D/L-Gln 比及び D/L-His の低値の一因として、シスプラチン投与による腎障害に対する生体反応として L-Arg、L-Gln 並びに L-His が増加し、その結果 D/L-Arg 比、D/L-Gln 比及び D/L-His の低下が生じた可能性が考えられた。

一方で、D/L-Ala 比（図 2-10）、D/L-Asn 比（図 2-12）、D/L-Glu 比（図 2-14）、D/L-Lys 比（図 2-16）及び D/L-Val 比（図 2-18）には変化が認められず、その他の D/L-アミノ酸比は得られなかった。

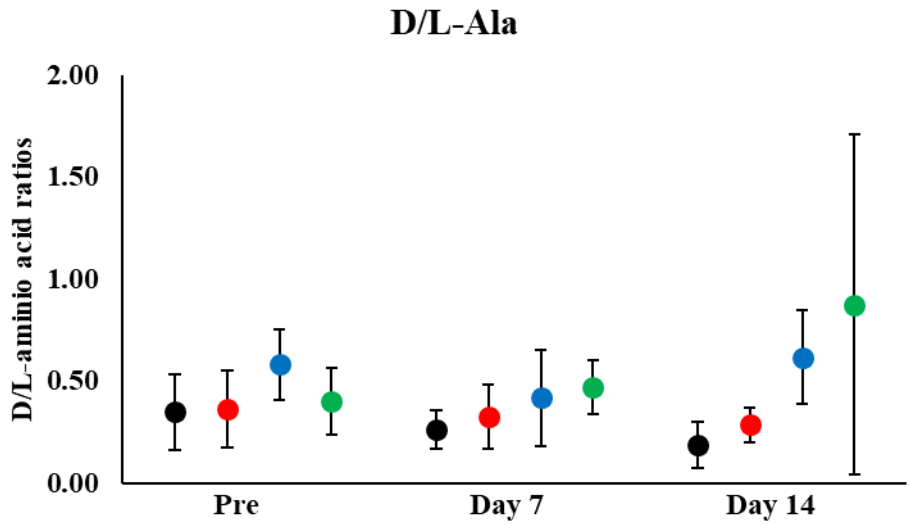

図 2-10 シスプラチン投与後の尿中 D/L-Ala 比変化

●:媒体対照群、●:シスプラチン 1.25 mg/kg 群、●:シスプラチン 2.5 mg/kg 群、●:シスプラチン 5 mg/kg 群、平均値±S.D.

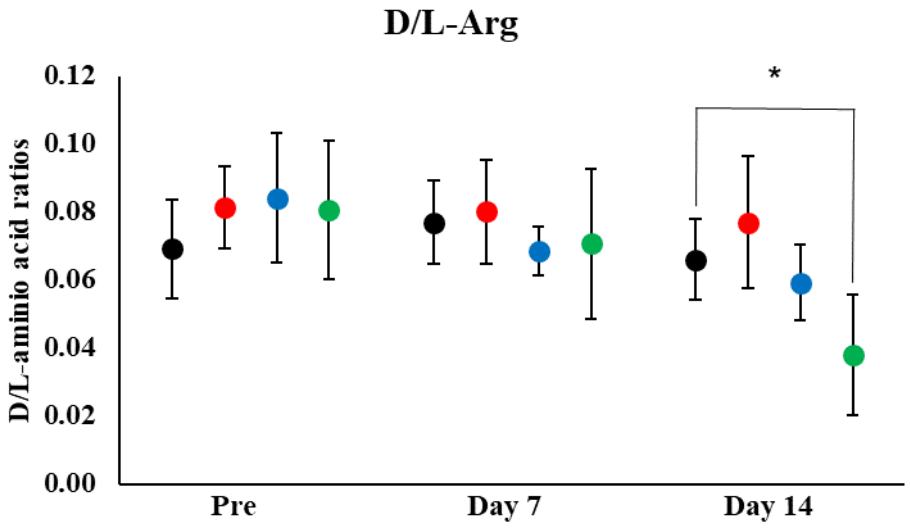

図 2-11 シスプラチン投与後の尿中 D/L-Arg 比変化

●:媒体対照群、●:シスプラチン 1.25 mg/kg 群、●:シスプラチン 2.5 mg/kg 群、●:

シスプラチン 5 mg/kg 群、平均値±S.D.、有意差:* $p < 0.05$

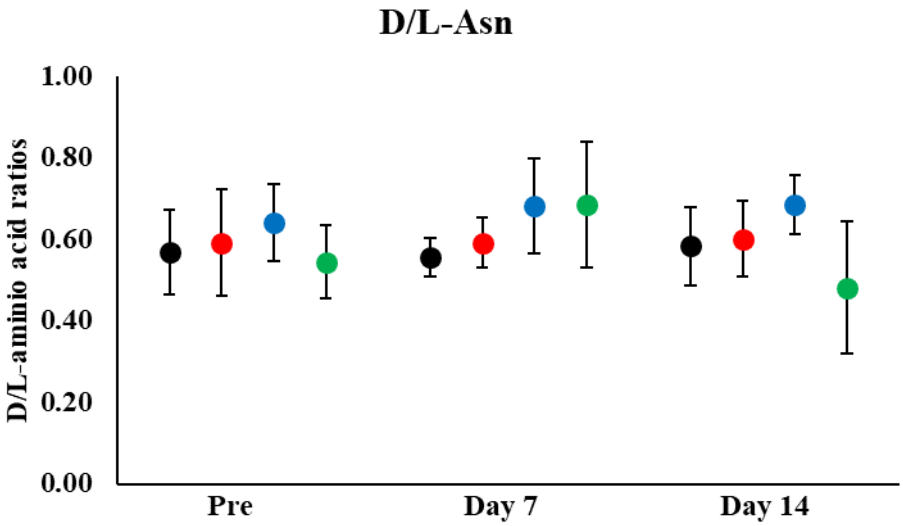

図 2-12 シスプラチン投与後の尿中 D/L-Asn 比変化

●:媒体対照群、●:シスプラチン 1.25 mg/kg 群、●:シスプラチン 2.5 mg/kg 群、●:シスプラチン 5 mg/kg 群、平均値±S.D.

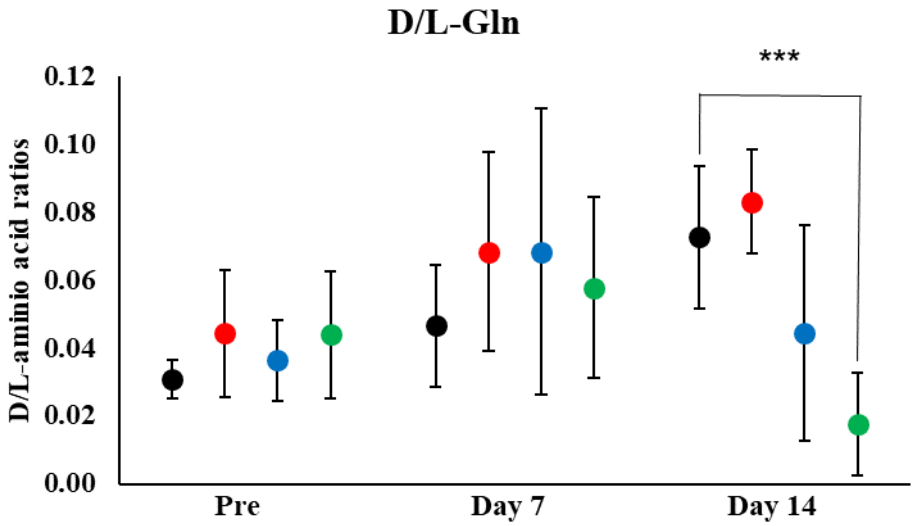

図 2-13 シスプラチン投与後の尿中 D/L-Gln 比変化

●:媒体対照群、●:シスプラチン 1.25 mg/kg 群、●:シスプラチン 2.5 mg/kg 群、●:シスプラチン 5 mg/kg 群、平均値±S.D.、有意差:*** $p < 0.005$

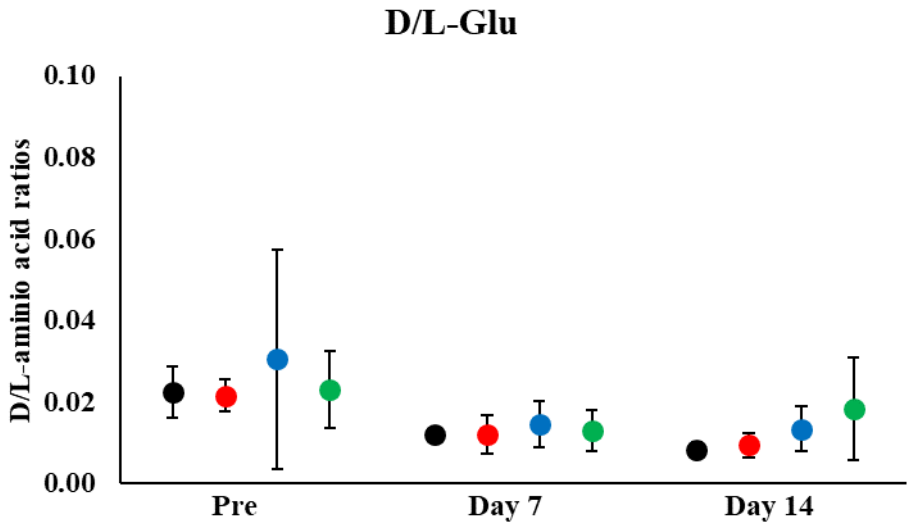

図 2-14 シスプラチン投与後の尿中 D/L-Glu 比変化

●:媒体対照群、●:シスプラチン 1.25 mg/kg 群、●:シスプラチン 2.5 mg/kg 群、●:シスプラチン 5 mg/kg 群、平均値±S.D.

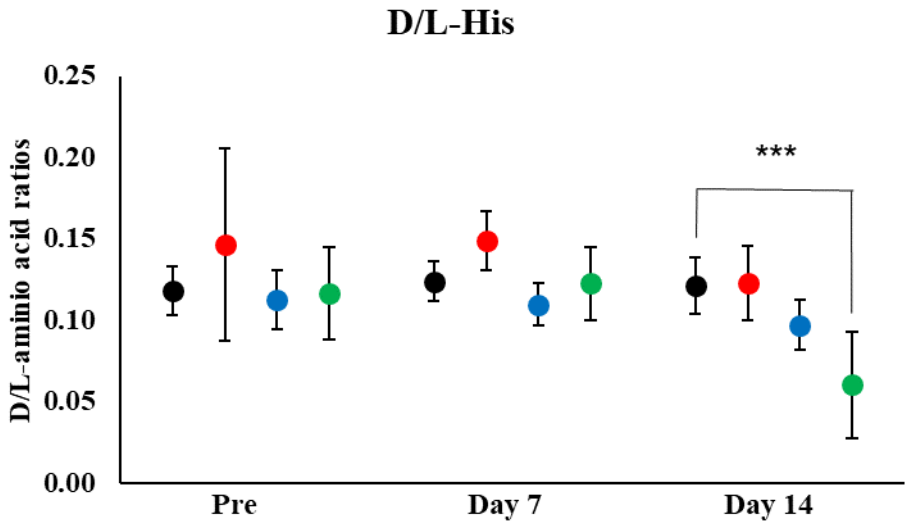

図 2-15 シスプラチン投与後の尿中 D/L-His 比変化

●:媒体対照群、●:シスプラチン 1.25 mg/kg 群、●:シスプラチン 2.5 mg/kg 群、●:シスプラチン 5 mg/kg 群、平均値±S.D.、有意差:*** $p < 0.005$

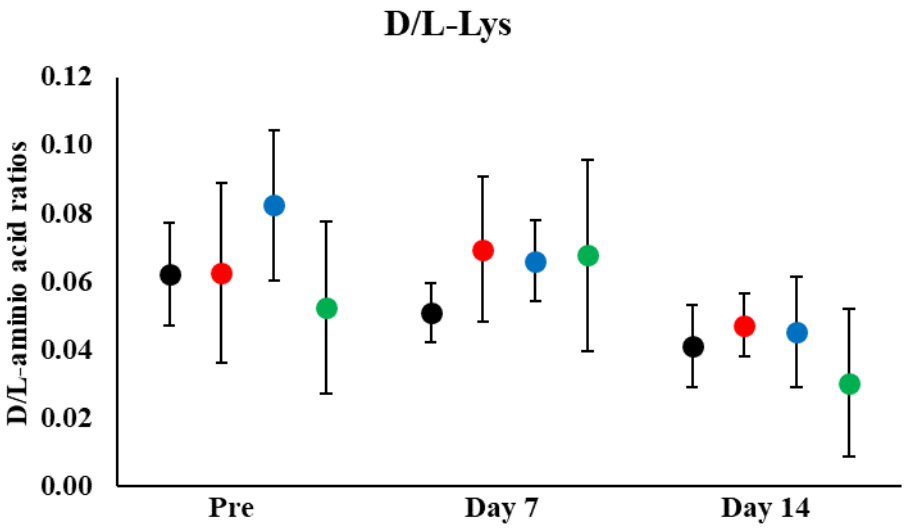

図 2-16 シスプラチン投与後の尿中 D/L-Lys 比変化

●:媒体対照群、●:シスプラチン 1.25 mg/kg 群、●:シスプラチン 2.5 mg/kg 群、●:シスプラチン 5 mg/kg 群、平均値±S.D.

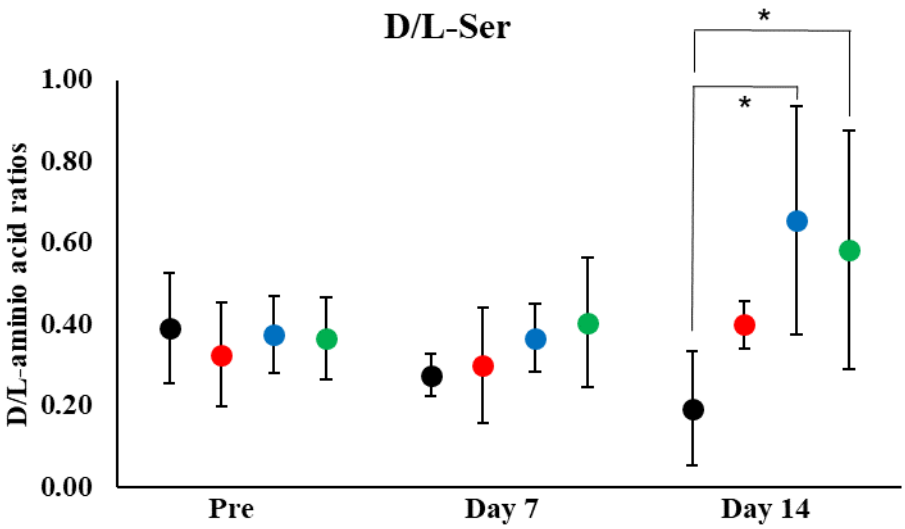

図 2-17 シスプラチン投与後の尿中 D/L-Ser 比変化

●:媒体対照群、●:シスプラチン 1.25 mg/kg 群、●:シスプラチン 2.5 mg/kg 群、●:シスプラチン 5 mg/kg 群、平均値±S.D.、有意差:* $p < 0.05$

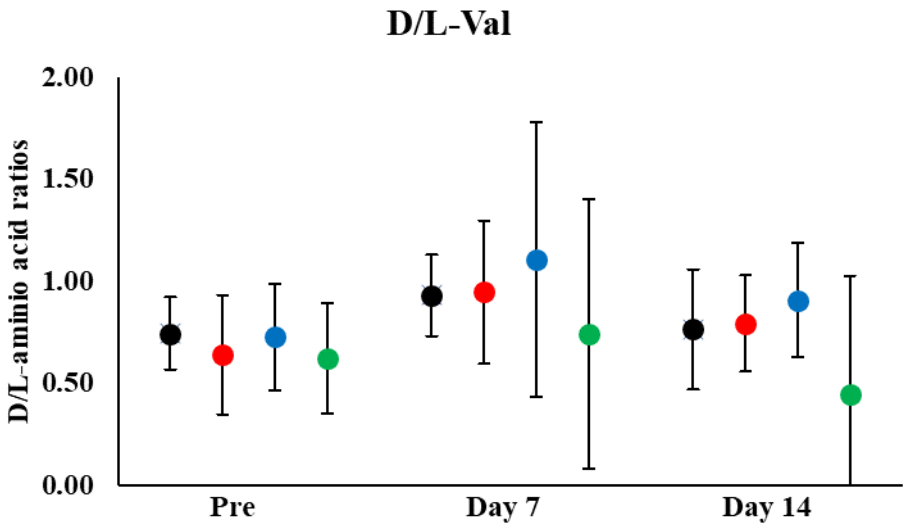

図 2-18 シスプラチン投与後の尿中 D/L-Val 比変化

●:媒体対照群、●:シスプラチン 1.25 mg/kg 群、●:シスプラチン 2.5 mg/kg 群、●:シスプラチン 5 mg/kg 群、■:シスプラチン 5 mg/kg 群

表 **2-3** シスプラチン投与後の尿中 **D/L-**アミノ酸比の一覧

Days	媒体対照群	シスプラチン群		
	0 mg/kg	**1.25 mg/kg**	**2.5 mg/kg**	**5 mg/kg**
D/L-Ala				
Pre	0.35 ± 0.19	0.36 ± 0.19	0.58 ± 0.17	0.40 ± 0.16
Day 7	0.27 ± 0.09	0.33 ± 0.16	0.42 ± 0.24	0.47 ± 0.13
Day 14	0.19 ± 0.11	0.29 ± 0.08	0.62 ± 0.23	0.88 ± 0.84
D/L-Arg				
Pre	0.07 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.08 ± 0.02	0.08 ± 0.02
Day 7	0.08 ± 0.01	0.08 ± 0.02	0.07 ± 0.01	0.07 ± 0.02
Day 14	0.07 ± 0.01	0.08 ± 0.02	0.06 ± 0.01	0.04 ± 0.02*
D/L-Asn				
Pre	0.57 ± 0.10	0.59 ± 0.13	0.64 ± 0.09	0.54 ± 0.09
Day 7	0.56 ± 0.05	0.59 ± 0.06	0.68 ± 0.12	0.69 ± 0.15
Day 14	0.58 ± 0.09	0.60 ± 0.09	0.69 ± 0.07	0.48 ± 0.16

Days	媒体対照群	シスプラチン群		
	0 mg/kg	**1.25 mg/kg**	**2.5 mg/kg**	**5 mg/kg**
D/L-Gln				
Pre	0.03 ± 0.01	0.04 ± 0.02	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.02
Day 7	0.05 ± 0.02	0.07 ± 0.03	0.07 ± 0.04	0.06 ± 0.03
Day 14	0.07 ± 0.02	0.08 ± 0.02	0.04 ± 0.03	0.02 ± 0.02***
D/L-Glu				
Pre	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.00	0.03 ± 0.03	0.02 ± 0.01
Day 7	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01
Day 14	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.01	0.02 ± 0.01
D/L-His				
Pre	0.12 ± 0.02	0.15 ± 0.06	0.11 ± 0.02	0.12 ± 0.03
Day 7	0.12 ± 0.01	0.15 ± 0.02	0.11 ± 0.01	0.12 ± 0.02
Day 14	0.12 ± 0.02	0.12 ± 0.02	0.10 ± 0.02	0.06 ± 0.03***
D/L-Lys				
Pre	0.06 ± 0.02	0.06 ± 0.03	0.08 ± 0.02	0.05 ± 0.03

Days	媒体対照群	シスプラチン群		
	0 mg/kg	**1.25 mg/kg**	**2.5 mg/kg**	**5 mg/kg**
Day 7	0.05 ± 0.01	0.07 ± 0.02	0.07 ± 0.01	0.07 ± 0.03
Day 14	0.04 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.02	0.03 ± 0.02
D/L-Ser				
Pre	0.39 ± 0.14	0.33 ± 0.13	0.38 ± 0.09	0.37 ± 0.10
Day 7	0.28 ± 0.05	0.30 ± 0.14	0.37 ± 0.08	0.40 ± 0.16
Day 14	0.19 ± 0.14	0.40 ± 0.06	0.66 ± 0.28*	0.58 ± 0.29*
D/L-Val				
Pre	0.74 ± 0.18	0.64 ± 0.29	0.73 ± 0.26	0.63 ± 0.27
Day 7	0.93 ± 0.20	0.95 ± 0.35	1.11 ± 0.67	0.74 ± 0.66
Day 14	0.77 ± 0.29	0.80 ± 0.24	0.91 ± 0.28	0.44 ± 0.58

平均値±S.D.、* $p < 0.05$、*** $p < 0.005$

2.3.4 シスプラチン投与後の血漿中及び尿中 D/L-アミノ酸比の相関解析

シスプラチン投与ラットから採取した血漿及び尿中の D/L-アミノ酸比のうち、D/L-Ala 比、D/L-Ser 比及び D/L-Val 比は両試料中で得られた。血漿中の D/L-アミノ酸比には統計的有意な変化は認められなかったものの、シスプラチン投与回数に伴う血漿及び尿中 D/L-アミノ酸比の変動相関を検証するため、D/L-アミノ酸比分析用試料採取日ごとに、ピアソンの積率相関係数を用いて試料間の測定値の相関を解析した。

D/L-Ala 比（図 2-19）、D/L-Ser 比（図 2-20）及び D/L-Val 比（図 2-21）の各 D/L-アミノ酸比の散布図では、各測定値が図内にばらつき、見かけ上良好な相関は認められなかった。また、解析の結果 3 種の D/L-アミノ酸比は共通して、シスプラチンの投与前に採取した試料（Pre）における相関係数が同一アミノ酸比内で最高値を示し、その後シスプラチンの投与回数増加に伴い、相関係数が減少傾向を示すことが明らかとなった（表 2-4）。D/L-Ser 及び D/L-Val では Day 7 及び Day 14 を通じて相関係数（*r*）が 0.10 未満を示し、これらの血漿中及び尿中 D/L-アミノ酸比の変動には相関性が乏しいことが明らかとなった（89）。

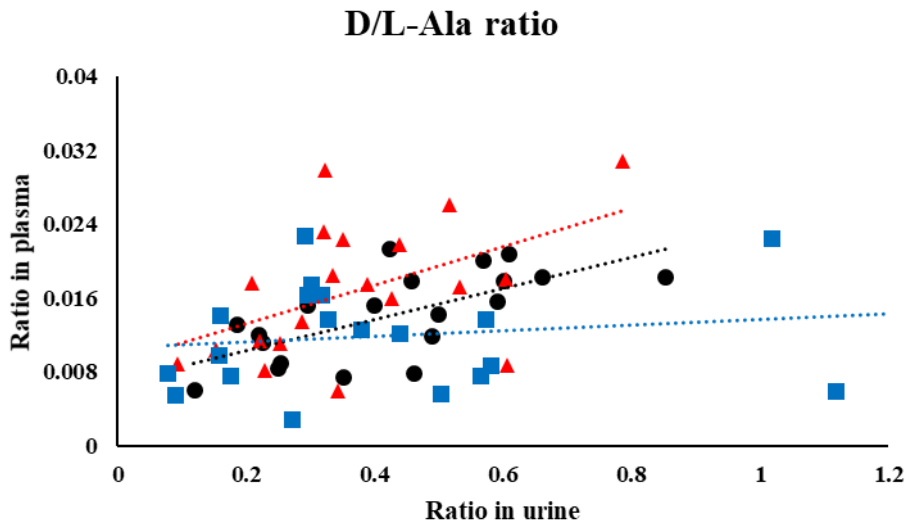

図 2-19 血漿中及び尿中 D/L-Ala 比の相関推移

●：Pre、▲：Day 7、■：Day 14

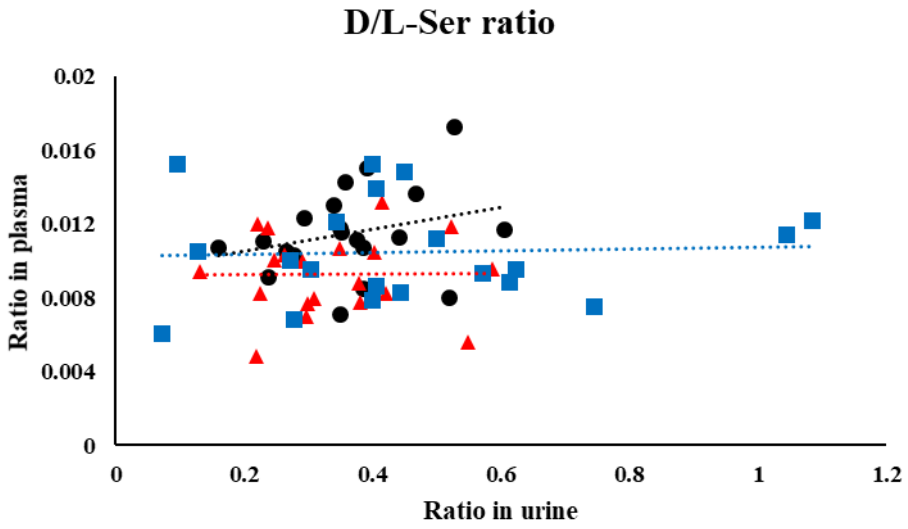

図 2-20 血漿中及び尿中 D/L-Ser 比の相関推移

●:Pre、▲:Day 7、■:Day 14

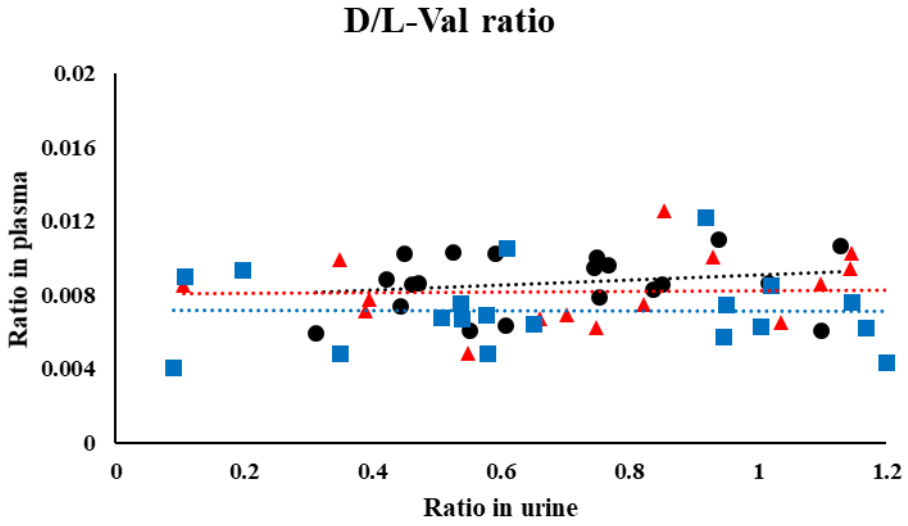

図 2-21 血漿中及び尿中 D/L-Val 比の相関推移

●:Pre、▲:Day 7、■:Day 14

表 2-4 シスプラチン投与後の血漿及び尿中 D/L-アミノ酸比の相関係数

D/L amino acid	Pre	Day 7	Day 14
D/L-Ala	0.67	0.49	0.27
D/L-Ser	0.27	0.01	0.05
D/L-Val	0.20	0.04	-0.01

相関係数（*r*）を記載

本章では、シスプラチン誘発性腎障害モデルラットを用いて D/L-アミノ酸比の変動を検討した。本実験では血漿中の腎障害マーカーに有意な変動は認められなかったものの、尿中での腎障害マーカーの高値及び病理組織学的検査における腎障害所見を示した。これらの結果は、当該モデルに関する過去の報告（77）と概ね一致したため、シスプラチン誘発性腎障害モデルラットは適切に構築されたと結論付けた。

血漿中 D/L アミノ酸比の測定では、5 種類の D/L-アミノ酸比（Ala、Asp、Leu、Ser 及び Val）が得られたが、媒体対照群と比較して変動は認められなかった。尿中 D/L-アミノ酸比の測定では、9 種類の D/L-アミノ酸比が得られ、そのうち 4 種類（Arg、Gln、His 及び Ser）に媒体対照群と比較して有意な変化が認められた。この際、シスプラチンの投与回数増加に伴い、相関係数が減少傾向を示し、血漿と尿試料間の D/L-アミノ酸比の変動には相関性が乏しいことが明らかとなった。一般に尿中の腎障害 BM は血清中の腎障害 BM よりも早期に変動することが報告されている（90）。また、腎障害時には血漿中 BM は生体のホメオスタシスの影響により、その変動が抑制される可能性があり、尿中 BM の方が腎障害をより反映することが報告されている（91）。そのため、本実験においても尿中 D/L-アミノ酸比のみが統計的有意な変化を示した可能性が考えられた。

また、D/L-アミノ酸比は D-アミノ酸と L-アミノ酸の比で算出される無次元数である。

D-アミノ酸またはL-アミノ酸を定量分析する際には、対象集団（腎機能障害の有無）やその変動幅に応じた検量線範囲（定量上限値及び定量下限値）の設計等、多岐にわたる要因を考慮した分析法を構築する必要がある（92、93）。一方で、D/L-アミノ酸比は各アミノ酸の定量性によらず算出可能であるため、各アミノ酸の定量分析法を構築する必要はない。無次元数を BM として活用することで、定量に関連する煩雑な対応を回避できるメリットが報告されていることからも（94）、D/L-アミノ酸比は個人の状態に限定されない、より一般化された評価指標となる可能性が考えられた（95）。

以上の実験結果を踏まえ、D/L-アミノ酸比を用いた腎障害評価には、尿試料を用いることがより適切と考えられた。

2.3.5 小括

本章では、シスプラチンによる薬剤性腎障害ラットを用いて、D/L-アミノ酸比の血漿及び尿試料間での変動を検討した。尿中 D/L-Arg 比、D/L-Gln 比及び D/L-His 比の低値、並びに尿中 D/L-Ser 比の高値が認められた。これらの D/L-アミノ酸比が変動した一因として、腎障害時の酸化ストレスへの応答である可能性が考えられた。また、投与期間の経過に伴い、血漿中及び尿中 D/L-アミノ酸比の相関が低下することが明らかとなり、腎障害時の D/L-アミノ酸比評価には尿試料がより適していることを確認できた。尿中 D/L-アミノ酸比を評価することで、腎臓の生理学的状態に関する洞察を得ることで、非侵襲的に腎障害を検出できる可能性が示された。

第3章　5/6 腎臓摘出モデルラットを用いた尿中 D/L-アミノ酸比と腎障害の相関解析

3.1　緒言

第 2 章では、シスプラチンを用いた薬剤性腎障害モデルラットを用いた血漿中及び尿中 D/L-アミノ酸比の変動を検討した。薬剤投与による腎障害発現の際には、薬剤応答性の内因性物質変動も考えられるため、薬剤誘発性腎障害とは異なる腎障害モデルでの検討が D/L-アミノ酸比と腎障害の関連を検討するために有用と考えられた。そのため、本章では CKD モデルとして知られる 5/6 腎臓摘出モデルラットを評価に選択した（96、97）。5/6 腎臓摘出モデルは、腎臓摘出により物理的にネフロン数を減らすことで、臨床における腎臓病の病態を模したモデルである（98、99）。また、施術後の時間経過に応じて腎障害が重篤化するモデルであり（100）、一般に施術 4 週間後にかけて Cre クリアランス低下や、糸球体や尿細管障害が認められ、施術 12 週間後には尿毒症により死亡が散見される（101 − 103）。当該モデルを用いることで腎障害が顕在化した際の D/L-アミノ酸比の変動が明確に捉えることができると考えられた。シスプラチン誘発性腎障害モデルの結果、D/L-アミノ酸比の変動が捉えられ、かつ非侵襲的に採取できるメリットから、尿試料を用いて D/L-アミノ酸比と腎臓の病理組織障害所見との関連を検討することを目的とした。

3.2　実験材料と実験方法

3.2.1　試薬

DL-Ala、DL-Arg、DL-Asn、DL-Asp、DL-Glu、DL-Gln、DL-His、DL-Ile、DL-Leu、DL-Lys、DL-Met、DL-Phe、DL-Ser、DL-Thr、DL-Trp、DL-Tyr、DL-Val は東京化成工業（東京、日本）から購入した。L-Ala、DL-Cys、DL-allo-Thr、0.1 mol/L 塩酸及び HPLC グレードエタノールは富士フイルム和光純薬株式会社（大阪、日本）から購入した。HPLC グレードトリフルオロ酢酸、LC/MS グレードメタノール-Plus、LC/MS グレード

アセトニトリル-Plus は関東化学株式会社（東京、日本）から購入した。HPLC グレードクロロホルムはキシダ化学株式会社（大阪、日本）から購入した。DL-Ala-2,3,3,3-d_4 は Santa Cruz Biotechnology Inc.（Texas、USA）から購入した。

3.2.2 実験動物

日本チャールス・リバー株式会社（滋賀、日本）から 4 週齢の Crl:CD（SD）系雄ラット（SPF）を 26 匹購入し、アルミニウム製の前面・床面金網ケージに1ケージあたり 1 匹収容し、飼育した。なお、蓄尿時には代謝ケージに個体別で飼育した。動物室は室温を 24.0±2.0°C に、相対湿度を 55.0±15.0%に制御し、12 時間の明暗サイクル（点灯：8:00～20:00、消灯：20:00～8:00）に制御した。固型飼料（CE-2）はオリエンタル酵母株式会社（東京、日本）から購入し、飼育期間中は飼料と水道水を自由に摂取させたが、蓄尿時には絶食とした。すべての動物実験操作は住友ファーマ株式会社の動物実験委員会の承認を受けた。

3.2.3 アミノ酸混合標準溶液の調製法

20 μmol/mL のアミノ酸混合標準溶液を調製するために、それぞれのアミノ酸試料を 50%メタノール（メタノール：水＝1：1、v/v）、50%メタノール-0.02 mol/mL-HCl（DL-Glu、DL-His 及び DL-Trp 用）、または 50%メタノール-0.05 mol/mL-HCl（DL-Asp 及び DL-Tyr 用）に溶解した。アミノ酸混合標準溶液に内部標準物質として、DL-Ala-2,3,3,3-d_4 を 1000 nmol/mL となるように加えた。

3.2.4 動物実験デザイン

1 週間の馴化期間後、5 週齢のラットを無作為に 2 群に割り当てた。最初の群を 5/6 腎臓摘出群（n = 19）、2 番目の群を Sham 群（n = 7）とした。割り当て 1 週間後から 5/6 腎臓摘出群は二回の手術により腎臓を摘出した（100）。最初の手術で左側の 2/3 の腎

臓をイソフルラン吸入麻酔下にて摘出した。1 週間の回復期間を設けた後、右側の腎臓をイソフルラン吸入麻酔下にてすべて摘出した。Sham 群は腎臓摘出以外の処置を 5/6 腎臓摘出群と同様に行った。施術 1 週間後から 4 週間後に掛けて、週に一度の頻度で採尿と採血を行った。尿試料は 6 時間の蓄尿で採取した。尿検査用試料は測定まで冷蔵庫（4°C）で保管し、尿中 D/L-アミノ酸比分析用試料は、分析前処理を行うまで–80°C で保管した。

採血はテルモシリンジ注射針付 1 mL（テルモ株式会社、東京、日本）を用いた。無麻酔下で頸静脈から約 0.5 mL 採血し、ヘパリンリチウム入り血液採取容器キャピジェクト（テルモ株式会社、東京、日本）で抗凝固処理した後、遠心分離（2150 × g、5°C、10 分）を行った。血漿を採取した後、分析を行うまで–80°C で保管した。

3.2.5 尿検査

尿試料は Alb 測定のために使用した。測定は臨床検査自動分析装置（JCA-ZS050、日本電子株式会社、東京、日本）を用いて実施した。Alb は免疫比濁法で測定した。

3.2.6 血液生化学的検査

ヘパリン処理された血漿試料は BUN 及び Cre 測定のために使用した。測定は臨床検査自動分析装置（JCA-ZS050、日本電子株式会社、東京、日本）を用いて実施した。BUN はウレアーゼ・LED・UV 法、Cre は SOX/POD 法で測定した。

3.2.7 病理組織学的検査

5/6 腎臓摘出モデル作製 4 週間後に、すべての動物を剖検に供し、イソフルラン吸入麻酔下にて、腹大動脈より全採血し安楽死を実施した。安楽死後、腎臓を摘出し、10％中性緩衝ホルマリン液に浸漬し、固定した。H&E 染色した標本を作製し、光学顕微鏡にて観察した。

3.2.8 D/L-アミノ酸比分析

測定試料の前処理並びに LC-MS/MS での分析方法は既存の方法に従った（78）。100 μL の尿サンプルにメタノール 350 μL 及び、内部標準物質（DL-Ala-2,3,3,3-d_4）20 μL（20 μmol/mL）及び水 50 μL を混合し、10 秒間ボルテックスをした後、遠心分離（10000 rpm、4°C、10 分）を行った。上清 360 μL に水 180 μL とクロロホルム 360 μL を混合し、10 秒間ボルテックスした後、遠心分離した（10000 rpm、4°C、10 分）。上清 50 μL にアセトニトリル 160 μL とエタノール 40 μL を混合し、10 秒間ボルテックスした後、遠心分離した（10000 rpm、4°C、10 分）。100 μL の上清をバイアルに移して、LC-MS/MS 分析を行った。

LC-MS/MS 分析は Nexera HPLC システム（株式会社島津製作所、京都、日本）と LCMS-8060（株式会社島津製作所、京都、日本）を用いた。また流路切換バルブは FCV-32AH（株式会社島津製作所、京都、日本）を用いた。液体クロマトグラフィーにおける分離には内径 3.0 mm、長さ 150 mm、粒子径 5 μm の CROWNPAK CR-I(+)及び CROWNPAK CR-I(−)（株式会社ダイセル、大阪、日本）を分析カラムとして用いた。移動相にはアセトニトリル、エタノール、水及びトリフルオロ酢酸を 80/15/5/0.5（体積比）で混合した溶液を用い、流速 0.4 mL/min のアイソクラティック条件で分析を行った。インジェクション量は 1 μL とし、オーブン温度は 25°C に設定した。イオン源にはエレクトロスプレーイオン化法と大気圧化学イオン化法を組み合わせたデュアルイオンソースを利用した。ポジティブイオンモードで、下記のパラメータで分析を行った。ネブライザーガス：3 L/min、ヒーティングガス：5 L/min、ドライイングガス：15 L/min、インターフェイス温度：230°C、DL 温度：250°C、ヒートブロック温度：310°C 及びインターフェイス電圧：4 kV。トリプル四重極型質量分析計は MRM モードで使用した。標準品のプリカーサーイオンとプロダクトイオンの *m/z* と保持時間により、化合物の同定を行った。データ取得および解析は LabSolutions（株式会社島津製作所、京都、日本）を使用して行っ

た。

なお、D/L-アミノ酸比は各 D-アミノ酸のピークエリア値を、対応する L-アミノ酸のピークエリア値で除すことで算出した。

3.2.9 相関解析

Sham 群及び 5/6 腎臓摘出群を対象とし、病理組織学的検査で評価された各所見の重症度と D/L-アミノ酸比の相関はスピアマンの順相関係数を用いて評価した。病理組織学的検査の重症度は次のように 6 段階にスコア化した：0（Not remarkable）、1（Minimal）、2（Mild）、3（Moderate）、4（Marked）及び 5（Severe）。スコア化した重症度の順位（R_x）と D/L-アミノ酸比の順位（R_y）を用いて、次の式に従いそれらの順位相関係数（rs 値）を計算した（104）。n は解析に用いたデータ数を示す。また、R_x または R_y の中で同一順位を示したデータについては、それらの順位の平均値を割り当てた。

$$d_i = R_x - R_y$$

$$rs = 1 - \frac{6\sum_{i=1}^{n} d_i^2}{n(n^2-1)}$$

D/L-アミノ酸比を用いた病理組織学的変化の検出能は受信者操作特性（Receiver operating characteristic; ROC）解析で得られる曲線下面積（Area under the curve; AUC）を用いて評価した。ROC 解析では 5/6 腎臓摘出群でのみ認められた重症度を対象に「陽性」、Sham 群で認められた重症度を「陰性」とそれぞれ定義した。D/L-アミノ酸比の閾値を変化させた際の「真の陽性率（感度）」を縦軸に、「偽陽性率（1−特異度）」を横軸にそれぞれ設定した際のプロットを作成した。なお、各閾値における真の陽性率と偽陽性率はそれぞれ次のように算出した。

真の陽性率＝真の陽性／（真の陽性＋偽陰性）

偽陽性率＝偽陽性／（偽陽性＋真陰性）

3.2.10 統計手法

尿検査、血液生化学的検査及び D/L-アミノ酸比分析の評価で得られたデータは群平均値及び標準偏差を用いて表記した。各測定値は SAS version 9.4 software (SAS Institute Inc.、Cary、NC、USA)を用いて統計処理した。5/6 腎臓摘出群及び Sham 群間の平均値の差の検定は Student's t 検定（有意水準 5%）を用いて評価した。

3.3 結果と考察

3.3.1 5/6 腎臓摘出モデルラットの作製

本章では、CKD モデルの一種としてよく知られる 5/6 腎臓摘出モデルラットを作製し、D/L-アミノ酸比の変動と腎臓での病理組織学的変化との関係を評価した。モデル作製と評価の流れを図 3-1 に示した。

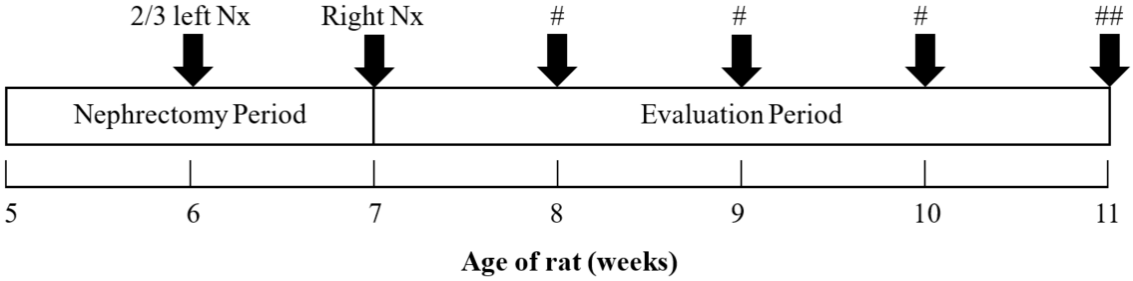

図 3-1 5/6 腎臓摘出モデルラット作製のワークフロー（群分け後）

Nx：腎臓摘出（Nephrectomy）

5/6 腎臓摘出モデルの作製後、血液生化学検査と尿検査のために週 1 回の頻度で血液と尿試料を採取した。一般的な腎障害マーカーとして、血漿中の BUN と Cre、並びに尿中の Alb を測定した。Sham 群と比較して、5/6 腎臓摘出群では施術 1 週間後から 4 週間後まで、血漿中 BUN（図 3-2）、血漿中 Cre（図 3-3）、並びに尿中 Alb（図 3-4）の値が一貫して高値を示した。また、5/6 腎臓摘出モデル作製の 4 週間後、病理

組織学的検査のために腎臓を摘出した。病理組織学的検査の結果、観察された所見を一覧に示した（表 3-1）。多くの 5/6 腎臓摘出モデルラットで、好塩基性尿細管と尿細管拡張、線維化及びメサンギウム細胞の過形成が観察された。

好塩基性尿細管は尿細管損傷への修復応答に関する所見である（105、106）。線維化は腎臓の器質的障害に対する修復過程で生じる細胞外マトリクスの蓄積を反映した所見であり（107）、尿細管拡張は尿細管の損傷に伴い生じる所見である（108）。これらの所見は進行性腎疾患の特徴である（109）。また、メサンギウム細胞の過形成はメサンギウム細胞の増殖に伴う所見であり、糸球体障害により生じる（110）。これらの所見が観察されたことで、尿細管部位及び糸球体部位に障害を生じていることが示され、5/6 腎臓摘出モデルラットは適切に構築されたと考えられた（98）。尿細管において観察された病理組織学的所見像は、糸球体における所見よりも重度であった。

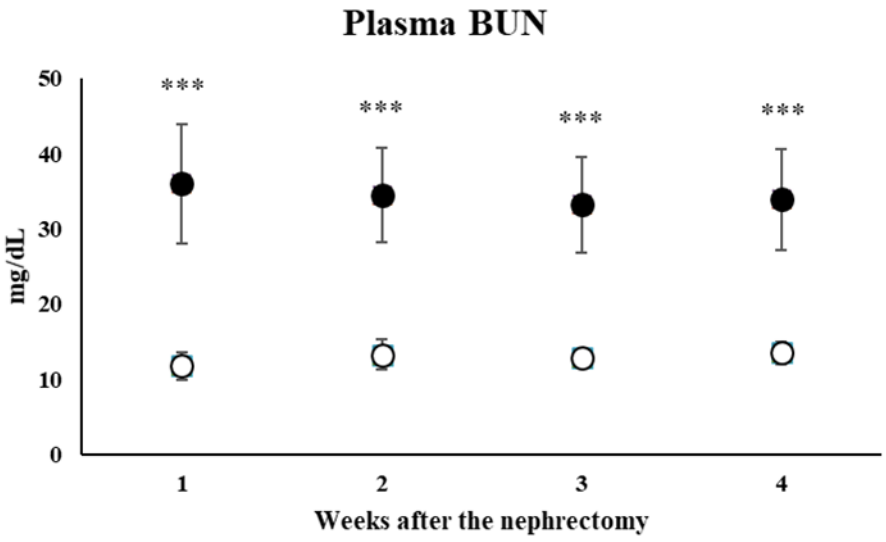

図 3-2 5/6 腎臓摘出後の血漿中 BUN 推移

●：5/6 腎臓摘出群、○：Sham 群、平均値±S.D.、有意差：*** $p < 0.005$

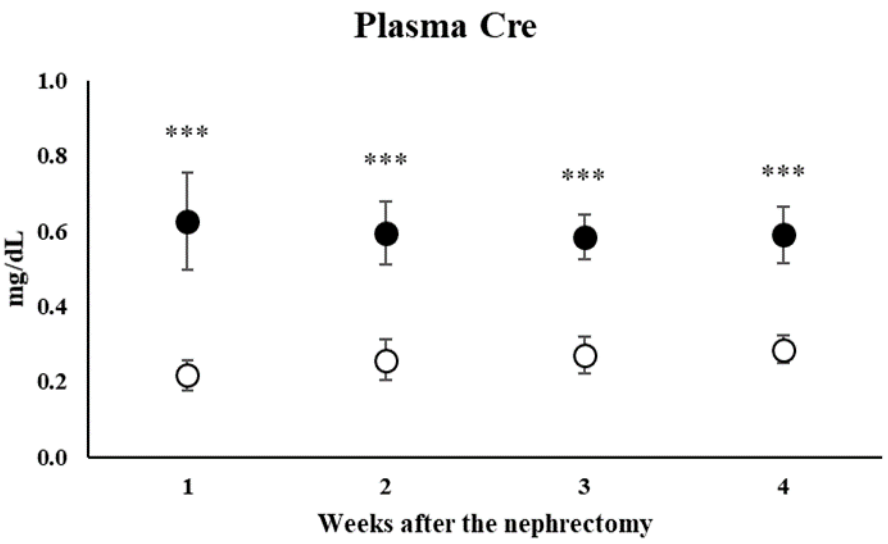

図 3-3 5/6 腎臓摘出後の血漿中 Cre 推移

●:5/6 腎臓摘出群、○:Sham 群、平均値±S.D.、有意差:*** $p < 0.005$

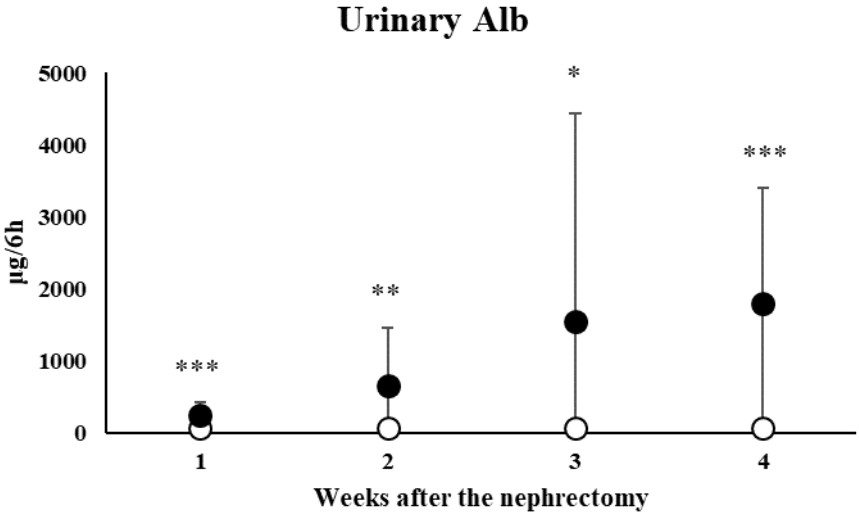

図 3-4 5/6 腎臓摘出後の尿中 Alb 推移

●:5/6 腎臓摘出群、○:Sham 群、平均値±S.D.、有意差:* $p < 0.05$、** $p < 0.01$、*** $p < 0.005$

表 3-1 5/6 腎臓摘出ラットの腎臓病理組織学的の所見一覧

病理組織学的検査 重症度	Sham 群	5/6 腎臓摘出群
好塩基性尿細管		
Not remarkable	1	4
Minimal	6	11
Mild	0	3
Moderate	0	1
尿細管拡張		
Not remarkable	7	4
Minimal	0	4
Mild	0	4
Moderate	0	6
Marked	0	1
線維化		
Not remarkable	6	17
Minimal	1	1
Mild	0	1
メサンギウム細胞の過形成		
Not remarkable	7	10
Minimal	0	8
Mild	0	1
異常なし		
	1	1

3.3.2 5/6 腎摘出後の尿中 D/L-アミノ酸比の変動

5/6 腎臓摘出モデルラットの尿中 D/L-アミノ酸比の分析では、13 種類の尿中 D/L-アミノ酸比が算出された。腎障害との関連が過去に報告されている D/L-Ser 比及び D/L-Ala 比は、施術 1 週間後に sham 群と比較して 3.0 倍及び 9.3 倍の高値を示した（図 3-15、図 3-5、表 3-2）。その他の D/L-アミノ酸比にも変動が認められ、D/L-Arg 比、D/L-Asn 比、D/L-His 比、D/L-Ile 比、D/L-Lys 比、D/L-Phe 比及び D/L-Thr 比はそれぞれ 3.3 倍、2.0 倍、1.3 倍、3.3 倍、2.3 倍、3.2 倍及び 1.4 倍高値を示した（それぞれ図 3-6、図 3-7、図 3-10、図 3-11、図 3-13、図 3-14、図 3-16）。これらの尿中 D/L-アミノ酸比は、評価期間を通して、sham 群と比較して高値を示した。D/L-Leu 比（図 3-12）、D/L-Glu 比（図 3-9）、並びに D/L-Ala 比は施術 1 週間後に最高値に達し、D/L-Thr 比及び D/L-Lys 比は施術 2 週間後に最高値を示した。一方で、D/L-Gln 比のみが評価期間中に sham 群の値と比較して低値を示した（図 3-8）。D/L-Val 比には変動が認められず（図 3-17）、D/L-Cys 比及び D/L-Met 比は各 D 体が検出されなかったため、得られなかった。

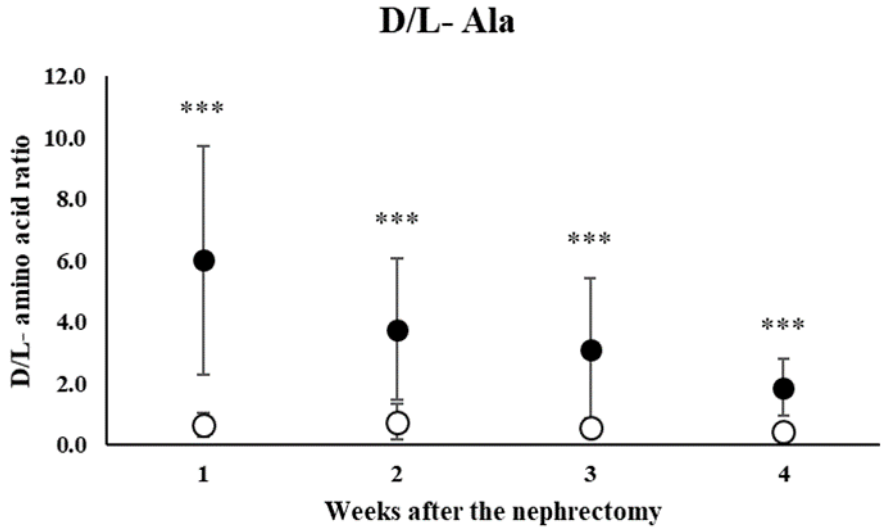

図 3-5 5/6 腎臓摘出後の尿中 D/L-Ala 推移

●:5/6 腎臓摘出群、○:Sham 群、平均値±S.D.、有意差:*** p < 0.005

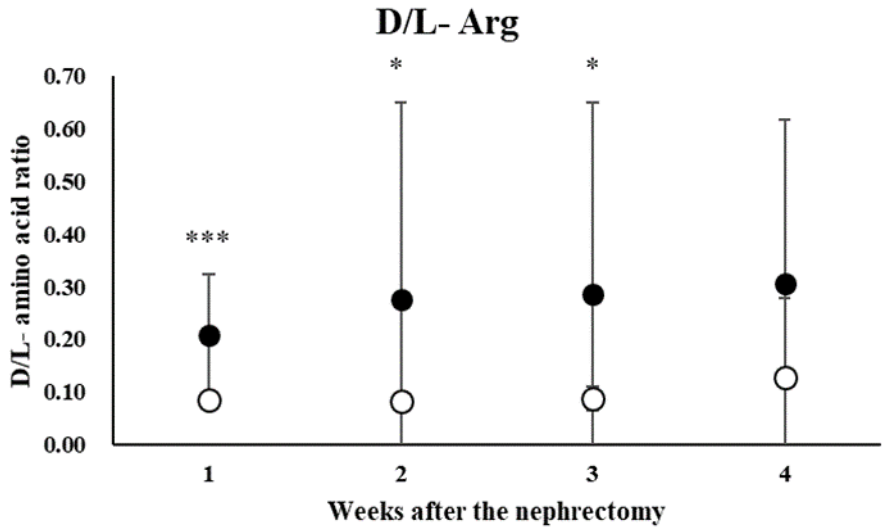

図 3-6 5/6 腎臓摘出後の尿中 D/L-Arg 推移

●:5/6 腎臓摘出群、○:Sham 群、平均値±S.D.、有意差:* p < 0.05、*** p < 0.005

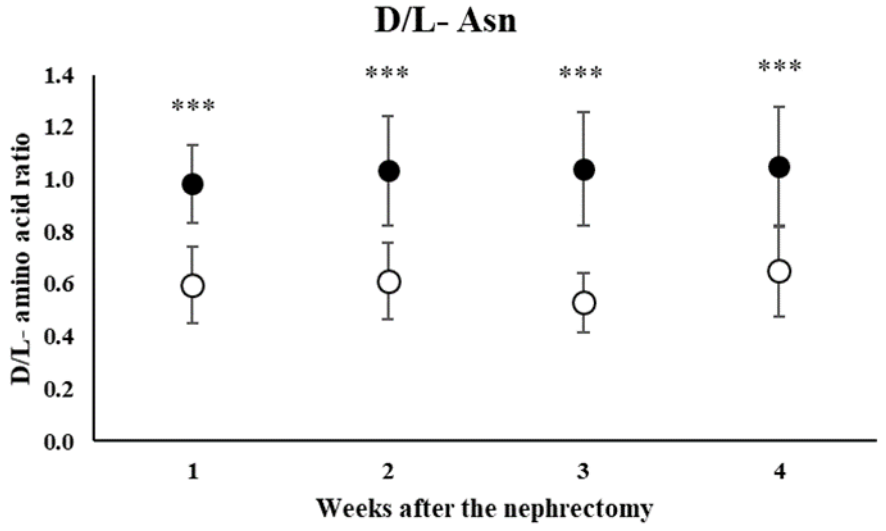

図 3-7 5/6 腎臓摘出後の尿中 D/L-Asn 推移

●:5/6 腎臓摘出群、○:Sham 群、平均値±S.D.、有意差:*** p < 0.005

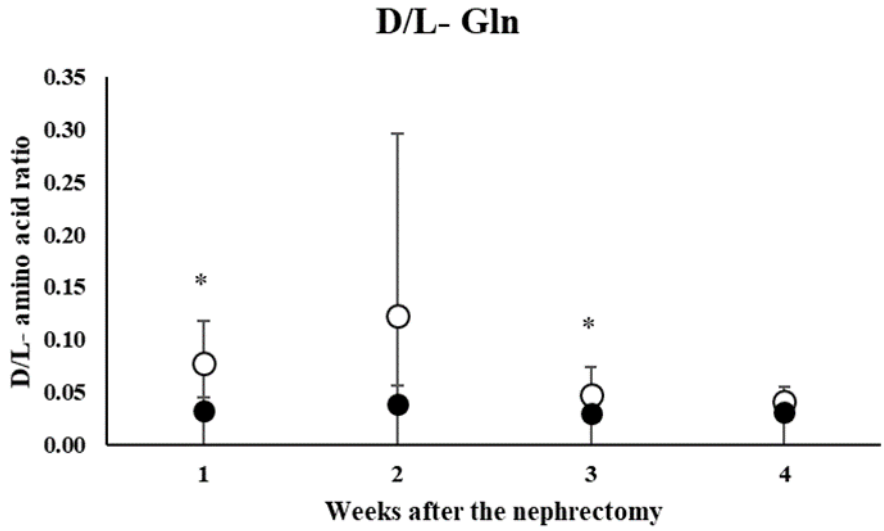

図 3-8 5/6 腎臓摘出後の尿中 D/L-Gln 推移

●:5/6 腎臓摘出群、○:Sham 群、平均値±S.D.、有意差:* $p < 0.05$

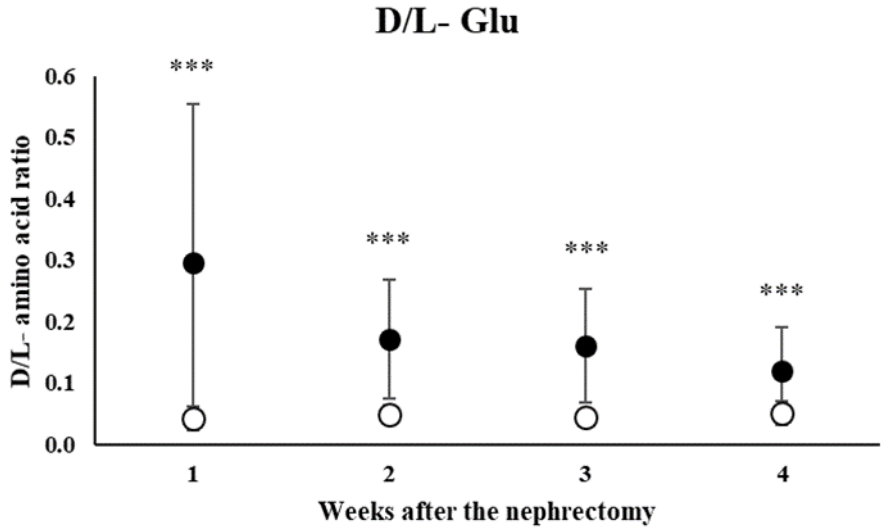

図 3-9 5/6 腎臓摘出後の尿中 D/L-Glu 推移

●:5/6 腎臓摘出群、○:Sham 群、平均値±S.D.、有意差:*** $p < 0.005$

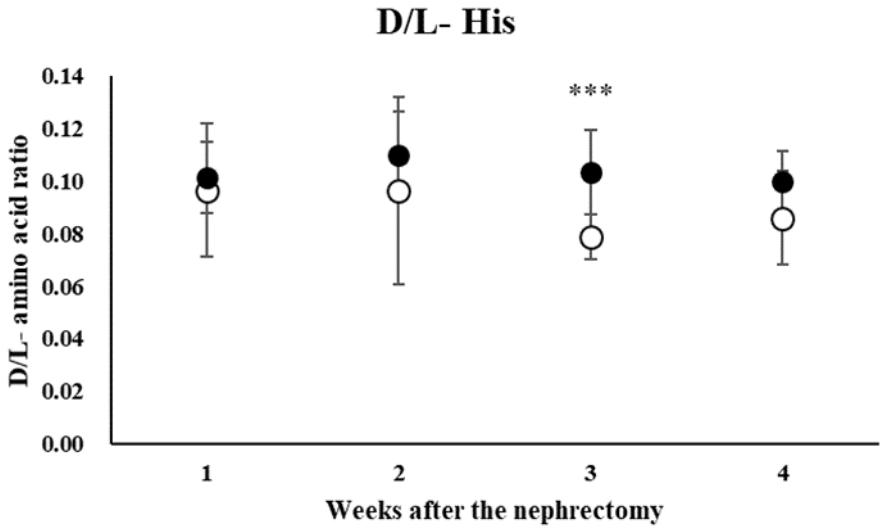

図 3-10 5/6 腎臓摘出後の尿中 D/L-His 推移

●:5/6 腎臓摘出群、○:Sham 群、平均値±S.D.、有意差:*** $p < 0.005$

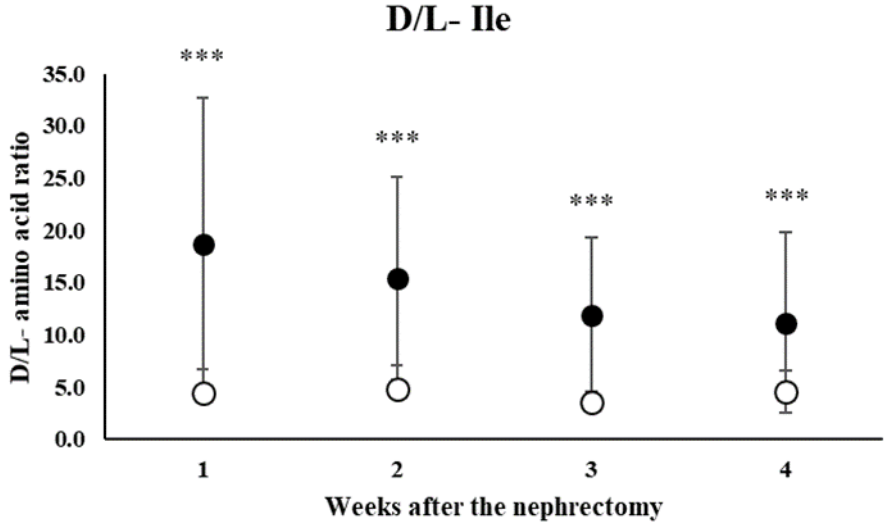

図 3-11 5/6 腎臓摘出後の尿中 D/L-Ile 推移

●:5/6 腎臓摘出群、○:Sham 群、平均値±S.D.、有意差:*** $p < 0.005$

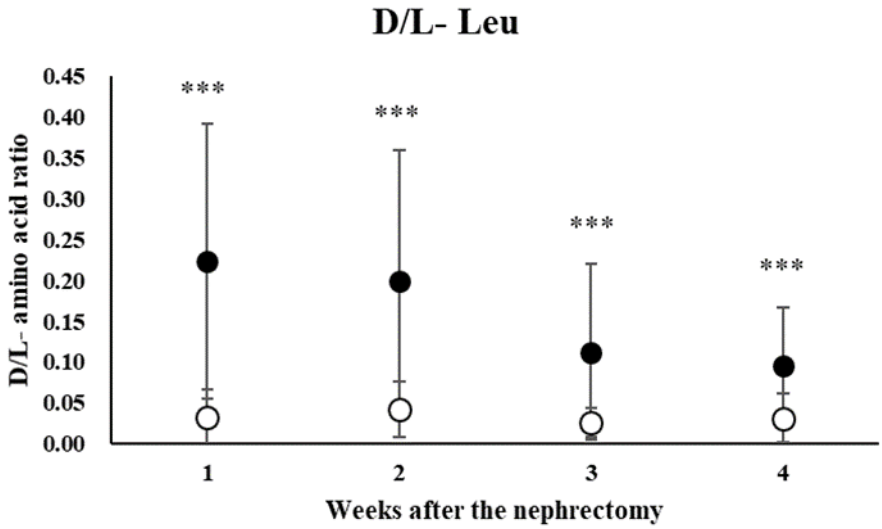

図 3-12 5/6 腎臓摘出後の尿中 D/L-Leu 推移

●:5/6 腎臓摘出群、○:Sham 群、平均値±S.D.、有意差:*** $p < 0.005$

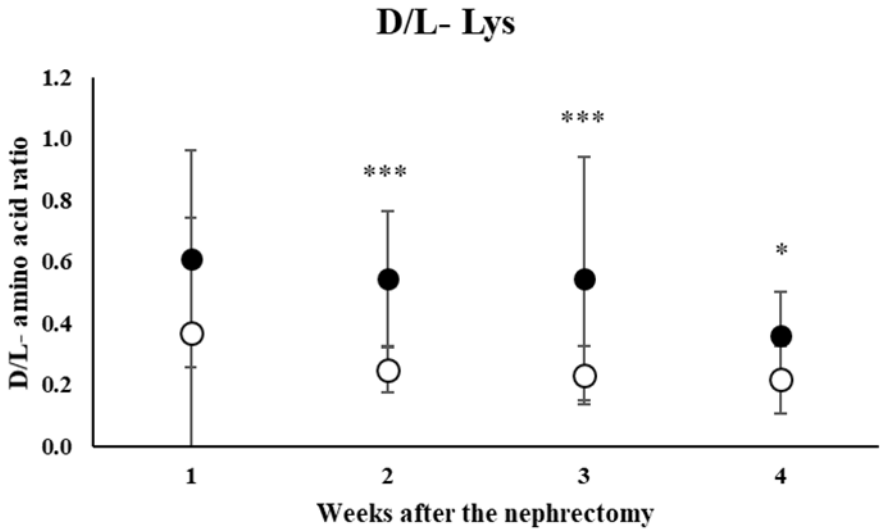

図 3-13 5/6 腎臓摘出後の尿中 D/L-Lys 推移

●:5/6 腎臓摘出群、○:Sham 群、平均値±S.D.、有意差:* $p < 0.05$、*** $p < 0.005$

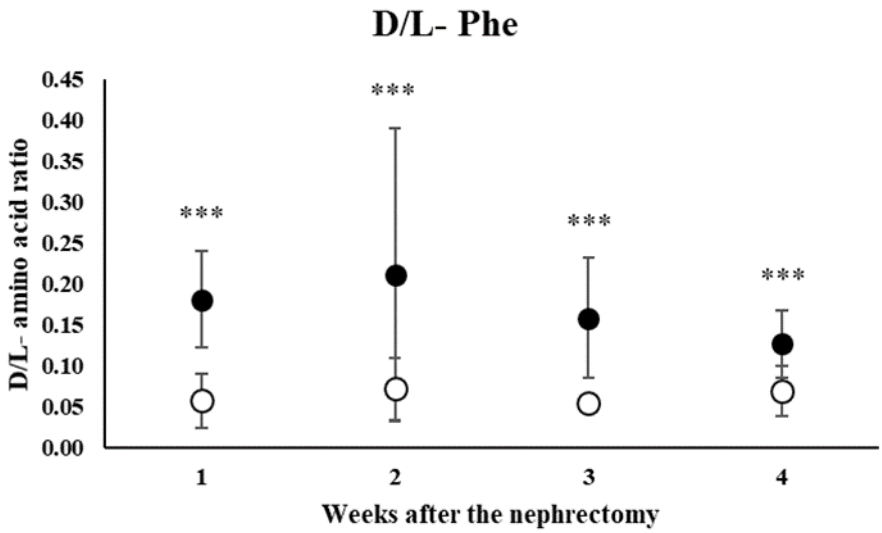

図 3-14 5/6 腎臓摘出後の尿中 D/L-Phe 推移

●:5/6 腎臓摘出群、○:Sham 群、平均値±S.D.、有意差:*** $p < 0.005$

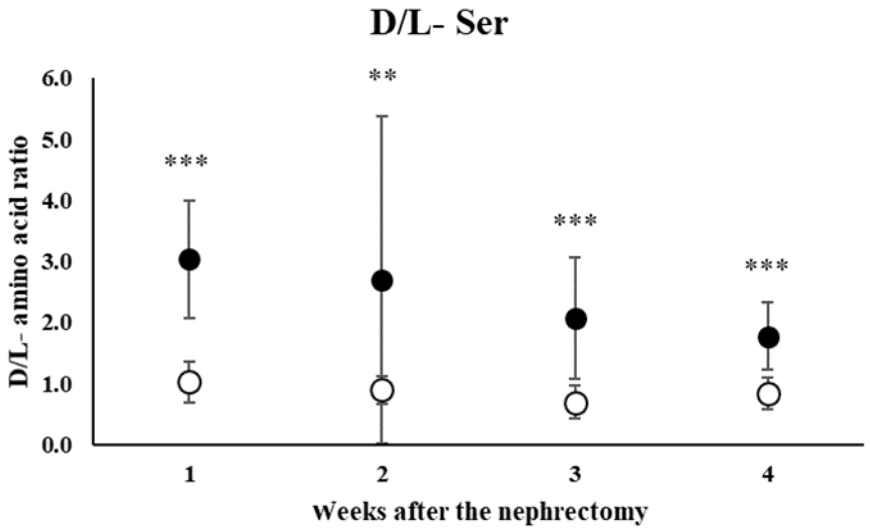

図 3-15 5/6 腎臓摘出後の尿中 D/L-Ser 推移

●:5/6 腎臓摘出群、○:Sham 群、平均値±S.D.、有意差:** $p < 0.01$

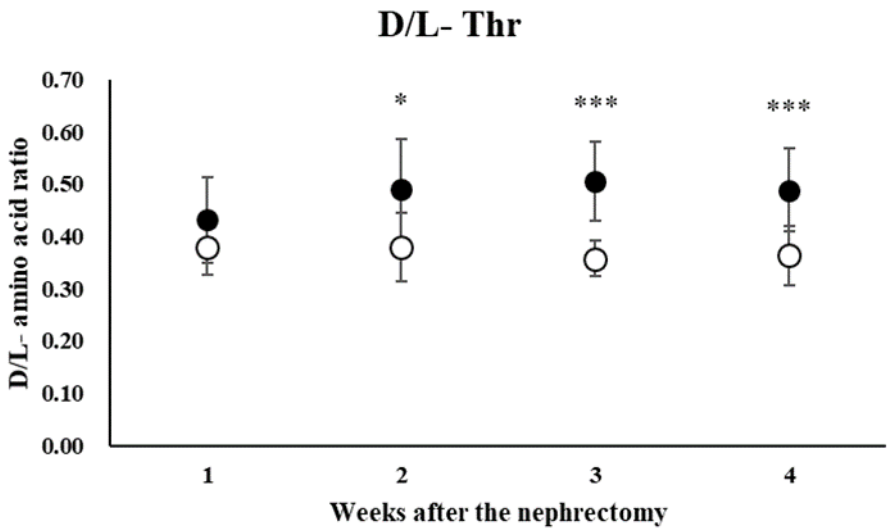

図 3-16 5/6 腎臓摘出後の尿中 D/L-Thr 推移

●:5/6 腎臓摘出群、○:Sham 群、平均値±S.D.、有意差:* $p < 0.05$、** $p < 0.01$

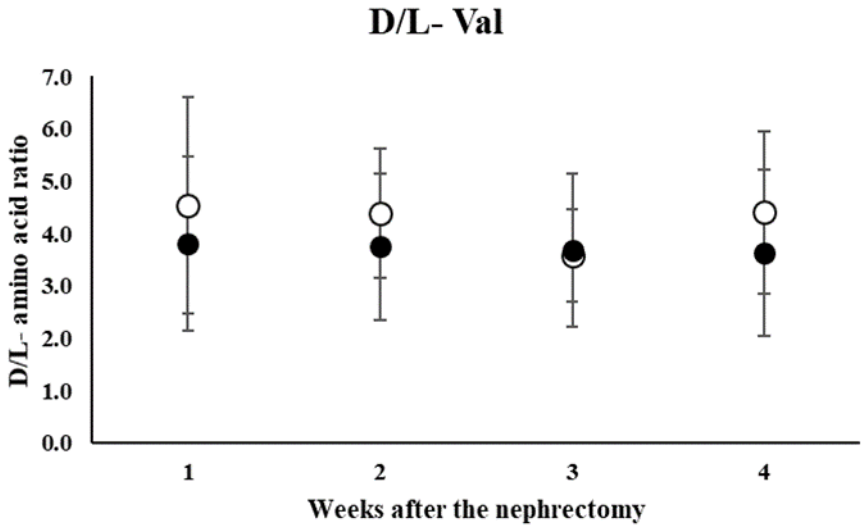

図 3-17 5/6 腎臓摘出後の尿中 D/L-Val 推移

●:5/6 腎臓摘出群、○:Sham 群、平均値±S.D.

表 **3-2 5/6** 腎臓摘出後の尿中 **D/L-**アミノ酸比一覧

D/L-amino acid	**Sham** 群				**5/6** 腎臓摘出群			
	1 week	**2 weeks**	**3 weeks**	**4 weeks**	**1 week**	**2 weeks**	**3 weeks**	**4 weeks**
D/L-Ser ratio	1.03 ± 0.34	0.90 ± 0.23	0.70 ± 0.27	0.85 ± 0.26	3.03 ± 0.96	2.70 ± 2.67	2.07 ± 0.99	1.78 ± 0.56
D/L-Val ratio	4.54 ± 2.06	4.39 ± 1.24	3.59 ± 0.89	4.41 ± 1.54	3.80 ± 1.66	3.76 ± 1.40	3.70 ± 1.46	3.64 ± 1.59
D/L-Thr ratio	0.38 ± 0.05	0.38 ± 0.07	0.36 ± 0.03	0.36 ± 0.06	0.43 ± 0.08	0.49 ± 0.10	0.51 ± 0.07	0.49 ± 0.08
D/L-Ile ratio	4.41 ± 2.34	4.81 ± 2.26	3.59 ± 0.98	4.55 ± 2.05	18.7 ± 13.9	15.4 ± 9.8	11.9 ± 7.4	11.2 ± 8.6
D/L-Leu ratio	0.03 ± 0.03	0.04 ± 0.03	0.03 ± 0.02	0.03 ± 0.03	0.22 ± 0.17	0.20 ± 0.16	0.11 ± 0.11	0.10 ± 0.07
D/L-Asn ratio	0.60 ± 0.15	0.61 ± 0.15	0.53 ± 0.11	0.65 ± 0.17	0.98 ± 0.15	1.03 ± 0.21	1.04 ± 0.22	1.05 ± 0.23
D/L-Gln ratio	0.08 ± 0.04	0.12 ± 0.17	0.05 ± 0.03	0.04 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.04 ± 0.02	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.01
D/L-Lys ratio	0.37 ± 0.37	0.25 ± 0.07	0.23 ± 0.10	0.22 ± 0.11	0.61 ± 0.35	0.55 ± 0.22	0.54 ± 0.40	0.36 ± 0.14
D/L-Glu ratio	0.04 ± 0.02	0.05 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.05 ± 0.02	0.30 ± 0.26	0.17 ± 0.10	0.16 ± 0.09	0.12 ± 0.07
D/L-His ratio	0.10 ± 0.03	0.10 ± 0.04	0.08 ± 0.01	0.09 ± 0.02	0.10 ± 0.01	0.11 ± 0.02	0.10 ± 0.02	0.10 ± 0.01
D/L-Phe ratio	0.06 ± 0.03	0.07 ± 0.04	0.05 ± 0.01	0.07 ± 0.03	0.18 ± 0.06	0.21 ± 0.18	0.16 ± 0.07	0.13 ± 0.04
D/L-Arg ratio	0.09 ± 0.01	0.08 ± 0.02	0.09 ± 0.02	0.13 ± 0.15	0.21 ± 0.12	0.28 ± 0.37	0.29 ± 0.37	0.31 ± 0.31

D/L-Ala ratio	0.64 ± 0.38	0.75 ± 0.57	0.56 ± 0.28	0.41 ± 0.22	6.01 ± 3.72	3.76 ± 2.29	3.11 ± 2.32	1.85 ± 0.93

平均値±S.D.、Sham 群（n = 7）、5/6 腎臓摘出群（n = 19）

3.3.1 尿中 D/L-アミノ酸比と病理組織学的変化の相関解析

D/L-アミノ酸比の変動と腎臓の病理組織学的変化の重症度との関連を検討するために相関解析を行った。本実験では、腎障害の進行に伴う変化を考慮し、施術 1 週間後と 4 週間後の D/L-アミノ酸比の値について相関解析を実施した。病理組織学的所見の重症度は半定量的データであるのに対し、D/L-アミノ酸比は定量的データであるため、これらの相関解析にはスピアマンの順位相関係数を用いた。当該解析手法は、一般に $rs \geq 0.6$ または $rs \leq -0.6$ が良好な相関と報告されている（111、112）。

施術 1 週間後では、腎臓で観察された所見の一つである尿細管拡張と D/L-Glu 比及び D/L-Ala 比との間に良好な正の相関が認められ、相関係数はそれぞれ 0.617 及び 0.636 であった（表 3-3）。D/L-Gln 比には良好な負の相関が認められ、相関係数は-0.628 であった。その他の D/L-アミノ酸比は$|rs| < 0.6$ であった。

施術 4 週間後では、相関係数の値は術後 1 週目と比較して、D/L-Ala、D/L-Gln、および D/L-Glu 比でそれぞれ 0.410、-0.123、及び 0.282 を示し、絶対値として低下傾向を示した（表 3-4）。他の D/L-アミノ酸比は$|rs| \leq 0.6$ を示し、上記 3 つの D/L-アミノ酸比のように尿細管拡張と良好な相関を示さなかった。また、他の D/L-アミノ酸比と好塩基性尿細管、線維化、並びにメサンギウム細胞過形成との間には$|rs| > 0.6$ となる良好な相関は認められなかった。

D/L-アミノ酸比と腎臓の尿細管拡張との相関関係をさらに検証するため、ROC 曲線解析を行った（表 3-5）。Sham 群で認められた所見の重症度「Not remarkable」を「陰性」と定義し、5/6 腎臓摘出群でのみ認められた「Minimal」、「Mild」、「Moderate」及び「Marked」を「陽性」として定義した。施術 1 週間後では D/L-Gln、D/L-Glu、D/L-Ala の AUC はそれぞれ 0.890（図 3-20）、0.833（図 3-21）、0.873（図 3-18）であった。施術 4 週間後では D/L-Thr と D/L-Asn の AUC はそれぞれ 0.873（図 3-22）と 0.855（図 3-19）であった。一般にモデルの性能は AUC 値> 0.8 が良好と報告されており（113 – 115）、これらの D/L-アミノ酸比は腎臓の尿細管拡張と良好な相関関係を示したと考えられた。

その他の D/L-アミノ酸比は 0.8 未満であった。

表 3-3 5/6 腎臓摘出 1 週間後の尿中 D/L-アミノ酸比と病理組織学的所見の相関

D/L−アミノ酸	好塩基性尿細管	尿細管拡張	線維化	メサンギウム細胞の過形成
D/L-Ser	0.100	0.391*	0.238	0.335
D/L-Val	-0.444*	-0.351	-0.252	-0.178
D/L-Thr	-0.129	0.067	-0.129	0.184
D/L-Ile	0.144	0.507**	0.263	0.224
D/L-Leu	-0.225	0.252	-0.186	0.066
D/L-Asn	-0.031	0.434*	-0.087	0.320
D/L-Gln	-0.214	-0.628***	0.003	-0.341
D/L-Lys	-0.138	0.214	-0.044	0.217
D/L-Glu	0.147	0.617***	0.108	0.444*
D/L-His	-0.093	0.143	0.119	0.257
D/L-Phe	0.107	0.417*	0.040	0.311
D/L-Arg	0.314	0.500*	0.346	0.423*
D/L-Ala	0.226	0.636***	0.228	0.498**

スピアマンの順位相関係数で算出された rs 値を記載した。

表 **3-4 5/6** 腎臓摘出 **4** 週間後の尿中 **D/L-**アミノ酸比と病理組織学的所見の相関

D/L−アミノ酸	好塩基性尿細管	尿細管拡張	線維化	メサンギウム細胞の過形成
D/L-Ser	0.045	0.441*	0.021	0.239
D/L-Val	-0.161	-0.170	-0.154	-0.191
D/L-Thr	0.071	0.564***	0.094	0.450*
D/L-Ile	0.081	0.436*	-0.127	0.212
D/L-Leu	0.043	0.206	0.039	0.093
D/L-Asn	0.250	0.569***	-0.144	0.435*
D/L-Gln	0.166	-0.123	-0.091	0.145
D/L-Lys	0.434	0.009	0.226	0.188
D/L-Glu	-0.249	0.282	-0.067	-0.004
D/L-His	0.073	0.421*	-0.051	0.318
D/L-Phe	-0.003	0.381*	-0.148	0.136
D/L-Arg	0.039	0.424*	0.202	0.508***
D/L-Ala	-0.088	0.410*	0.042	0.134

スピアマンの順位相関係数で算出された rs 値を記載した。

表 **3-5 5/6** 腎臓摘出後の尿中 **D/L-**アミノ酸比と尿細管拡張における **ROC** 曲線解析

D/L−アミノ酸	**1 week**	**4 weeks**
D/L-Ser	0.714	0.685
D/L-Val	0.620	0.597
D/L-Thr	0.593	0.873
D/L-Ile	0.763	0.721
D/L-Leu	0.667	0.561
D/L-Asn	0.790	0.855
D/L-Gln	0.890	0.588
D/L-Lys	0.690	0.536
D/L-Glu	0.833	0.630
D/L-His	0.553	0.688
D/L-Phe	0.780	0.739
D/L-Arg	0.770	0.618
D/L-Ala	0.873	0.703

ROC 解析で得られた AUC 値を記載した。

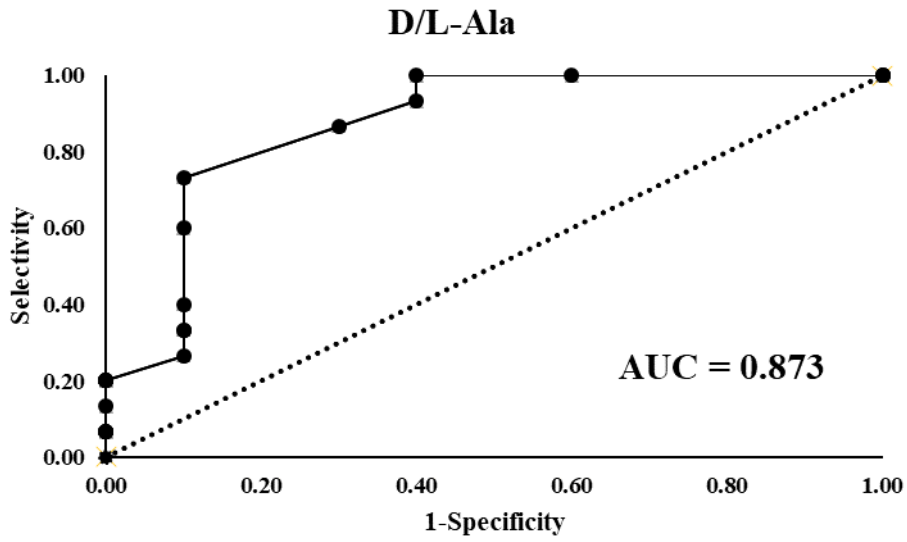

図 3-18 5/6 腎臓摘出 1 週間後の尿中 D/L-Ala 比と尿細管拡張の ROC 曲線

縦軸:真の陽性率(感度)、横軸:偽陽性率(1-特異度)

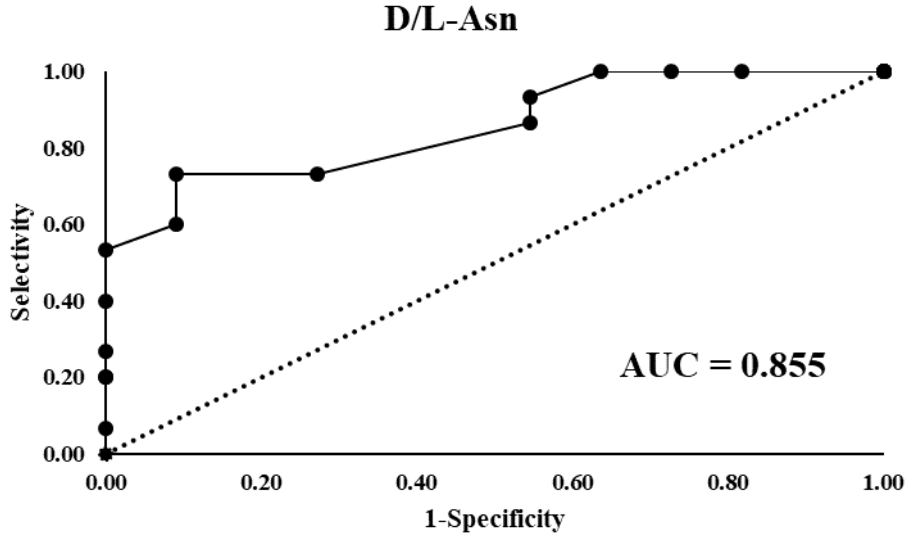

図 3-19 5/6 腎臓摘出 4 週間後の尿中 D/L-Asn 比と尿細管拡張の ROC 曲線

縦軸:真の陽性率(感度)、横軸:偽陽性率(1-特異度)

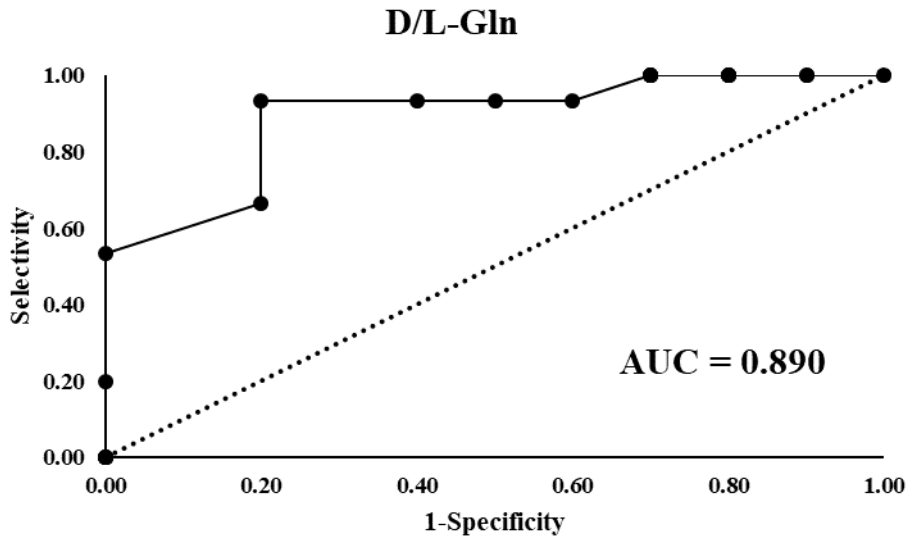

図 3-20 5/6 腎臓摘出 1 週間後の尿中 D/L-Gln 比と尿細管拡張の ROC 曲線

縦軸:真の陽性率(感度)、横軸:偽陽性率(1-特異度)

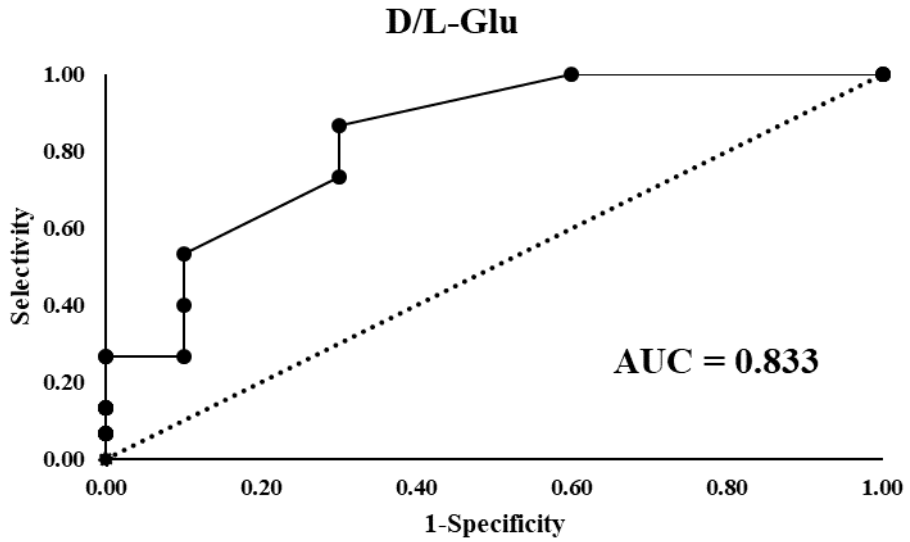

図 3-21 5/6 腎臓摘出 1 週間後の尿中 D/L-Glu 比と尿細管拡張の ROC 曲線

縦軸:真の陽性率(感度)、横軸:偽陽性率(1-特異度)

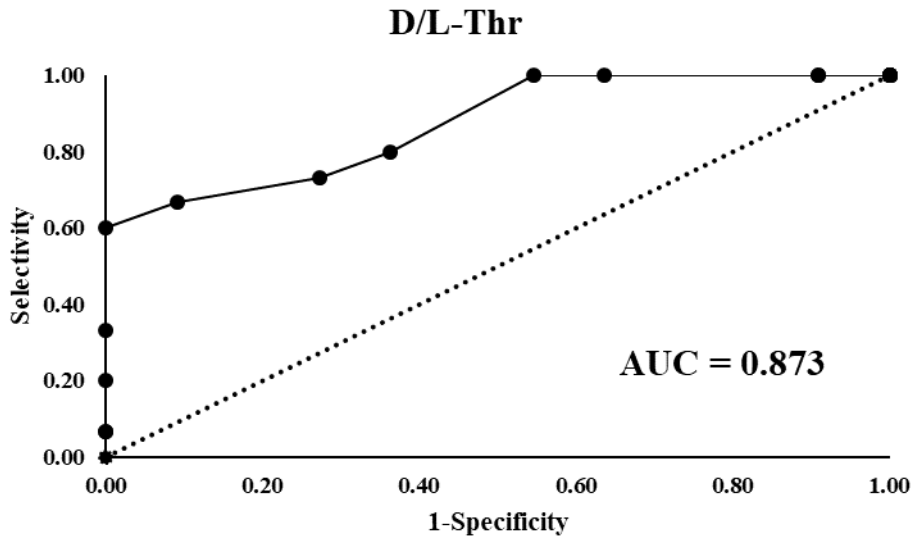

図 3-22 5/6 腎臓摘出 4 週間後の尿中 D/L-Thr 比と尿細管拡張の ROC 曲線

縦軸:真の陽性率(感度)、横軸:偽陽性率(1-特異度)

本章では、5/6 腎臓摘出モデルラットを腎障害モデルに選択し、尿中 D/L-アミノ酸比と腎臓の病理組織障害所見との関連を検討した。作製したモデルは尿検査及び血液生化学検査での腎障害マーカーの高値、並びに病理組織学的検査における腎障害所見を示した。これらの結果は、当該モデルに関する過去の報告(116、117)と一致していたため、5/6 腎臓摘出モデルラットは適切に構築されたと結論付けた。

尿中 D/L-アミノ酸比の測定では、9 種類の D/L-アミノ酸比(Ser、Ala、Arg、Asn、His、Ile、Lys、Phe、Thr)が Sham 群と比較して高値を示した。一方で D/L-Gln は低値を示した。D/L-Ala 比、D/L-Glu 比及び D/L-Gln 比と尿細管拡張との間には、スピアマンの順位相関係数及び ROC 曲線解析の両方において良好な相関が示された。尿細管拡張は腎障害進行の特徴の一つとして報告されており(109)、D/L-アミノ酸比を用いて尿細管拡張を評価することで、非侵襲的な腎障害評価に通ずる可能性が示唆された。

5/6 腎臓臓出モデルは腎障害過程において酸化ストレスが誘導されることが報告されている(118、119)。当該モデルでは、腎臓摘出後 4 週間で残余腎臓の GSH 量が

低下することが報告されている。最近の研究では、一般的に酸化ストレスの蓄積が様々な腎疾患の根底にあることが実証されている。また、IRI マウスの腎臓においては抗酸化転写因子である Nrf2 の活性化が報告されており（120）、活性化 Nrf2 は GSH 合成（121）及び Gln 分解（122）を促進することも報告されている。本実験では L-または D-アミノ酸を定量測定していないものの、GSH の減少を補うために前駆体としての L-Glu が減少し、その結果 D/L-Glu 比が増加した可能性が考えられた。Gln に関しては、前駆体として細胞内 Glu 量を調整し、Glu の枯渇を防ぐことが報告されている（123）。したがって、L-Gln が増加し、その結果 D/L-Gln 比が低下した可能性が考えられた。IRI モデルマウスを使用した別の研究では、Gln の静脈内投与により腎障害が軽減され、酸化ストレスに対する保護効果が報告されている（124）。さらに、D-Ala は IRI モデルマウスにおいて活性酸素種（Reactive oxygen species; ROS）産生を抑制し、腎障害を改善すると報告されている（125）。腎障害時にはネフロンのどの部分も影響を受ける可能性があるが、近位尿細管は代謝率が高いため特に脆弱であると報告されている（126）。施術 1 週間後に病理組織学的検査は実施していないが、先行研究では 5/6 腎臓摘出モデルと同様の別の腎臓摘出モデルにおいて、施術 2 週間後に尿細管拡張等の腎障害が認められたと報告されている（127）。また、IRI モデルでは施術 4 時間後においても尿中 D/L-Ser 比の変化が報告されている（55）。施術 1 週間後と 4 週間後における相関性の低下のメカニズムは不明であるが、施術 1 週間後における D/L-アミノ酸比の変化は、同時期に生じた病理組織学的変化を反映している可能性が考えられた。

3.3.2 小括

本章では、5/6 腎臓摘出モデルラットで複数の尿中 D/L-アミノ酸比を同時に評価し、D/L-Ala、D/L-Glu 及び D/L-Gln 比の変動と、腎障害所見の一つである尿細管拡張との間に良好な相関関係があることを確認した。尿細管拡張は腎障害進行の特徴であり、尿中 D/L-アミノ酸比を評価することで、腎臓の尿細管拡張を非侵襲的に検出し、腎障害評価に役立つ知見を得ることができる可能性が示唆された。

第4章　総括と展望

4.1　本研究の総括

腎障害の評価では、その障害像の正確な評価のため、一般に腎生検が行われる。腎生検では患者から採取した腎組織試料を用いた腎障害像の確定診断が可能である。一方で、当該手法は侵襲性を伴う検査であり、被検者に対する検査リスクを否定できない。また、手法に対する禁忌により全ての患者に適用することができない。そこで腎臓におけるD-及びL-アミノ酸の代謝過程の変化が腎臓の器質的障害を反映すると仮説を立てた。本研究では、腎臓の非侵襲的な器質的障害の評価に資するため、腎障害時の D/L-アミノ酸比と腎障害所見との関連について解析を行い、尿細管障害の定量的指標となりえるD/L-アミノ酸比を同定することを目的とした。

第 2 章では、腎障害時の D/L-アミノ酸比評価試料の選択を検討するため、薬剤性腎障害を生じることが報告されるシスプラチンを用いて、血漿及び尿中 D/L-アミノ酸比の変動並びに相関を検討した。本実験では血漿中及び尿中の D/L-アミノ酸比を測定し、4 種類の尿中 D/L-アミノ酸比の変化を確認した。BM と同様に、血漿中よりも尿中D/L-アミノ酸比の方がより腎障害を反映した可能性が考えられた。また、従来の D/L-アミノ酸比と腎障害に関する研究では血漿のみ、あるいは血漿及び尿の両試料を評価対象とする事例が多いが、本実験を通じて D/L-アミノ酸比の評価には尿試料を用いることがより適切であることを確認した。

続いて、第 3 章では、第 2 章で実施した薬剤性腎障害モデルとは異なる腎障害モデルである 5/6 腎臓摘出モデルを用いて、尿中 D/L-アミノ酸比の変動と腎障害時の病理組織学的変化の重症度との関連を検討した。その結果、5/6 腎臓摘出モデル群でD/L-Ala 比及びD/L-Glu 比がsham 群と比較し高値を示し、またD/L-Gln 比には低値が認められた。これらの D/L-アミノ酸比の変動は、腎障害所見の一種であり、腎障害進行に特徴的な所見である尿細管拡張と良好な相関を示した。本研究では D/L-アミノ酸比の変動機序を完全に明らかにはできてはいないが、過去の報告から、その機

序の一因として腎障害時に生じる酸化ストレスへの応答が考えられた。

一般的な腎障害 BM は腎機能変化の検出に用いられるが、器質的障害は鋭敏に反映しないことが知られる。また、D/L-アミノ酸比と器質的障害に関する報告は限定的であり、腎臓組織における障害像との関連が十分に明らかではなかった。本研究から尿中 D/L-Ala 比、D/L-Glu 比及び D/L-Gln 比の変化を評価することで、腎臓での尿細管拡張を非侵襲的に評価できる可能性を実験的に示すことができた。これら 3 種の D/L-アミノ酸比は、尿細管における器質的障害を良好に反映する新規 BM となりえると考えられた。

4.2 今後の展望

本研究では、D/L-アミノ酸比と腎臓の器質的障害の一種である尿細管拡張との相関を示すことができた。本研究で得られた知見を応用することで、腎臓で発生している器質的障害のタイムリーな評価手法が構築できる。例えば、定期健康診断のような尿検体を採取する機会に合わせて D/L-アミノ酸比を評価することで、腎機能に加えて腎臓の器質的状態を経過観察することができる。また、セルフメディケーションの一環として、我々個人が尿試料を D/L-アミノ酸比の分析／評価会社に提供し、評価結果から自身の生活習慣を見直す機会を得ることができると考えられた。このように D/L-アミノ酸比を通じた評価が社会的に一般化することで、腎障害に対する認知度が向上し、社会的課題とされる腎障害の低減への寄与が期待される。

また、臨床の観点では、腎生検が禁忌の場合に、D/L-アミノ酸比を評価することで、尿細管部位での障害かを評価できるようになる。また、D/L-アミノ酸比のうち、酸化ストレス等、特定の変動因子に関連する D/L-アミノ酸比に限局した変化が認められるような場合には、抗酸化物質の使用を提案する等、治療方針の提案に寄与することができる。

本研究では D/L-アミノ酸比と腎障害の相関の一部を明らかにすることができた。今後、

腎障害モデル動物を用いた種横断的なD/L-アミノ酸比の変動、並びに器質的障害の寛解に伴うD/L-アミノ酸比の変動等、器質的障害とD/L-アミノ酸比の変動について更なる知見の蓄積が期待される。また、非臨床動物に限らず、健常人並びに腎障害患者から得られた尿試料を用い、臨床検体での D/L-アミノ酸比の基礎データが取得され、腎臓病理との関連について更なる理解の進展が期待される。

このように、本研究で得られた知見を基盤として、D/L-アミノ酸比を用いた腎障害評価法のさらなる精緻化を進めることで、腎臓での器質的障害が侵襲的手法に依らずに評価可能となり、腎障害の早期検出、治療方針の立案、さらには腎臓病患者への新たな治療機会の提供に貢献することが期待できる。

引用文献

1. **Francis, A., Harhay, MN., Ong, ACM., Tummalapalli, SL., Ortiz, A., Fogo, AB., Fliser, D., Roy-Chaudhury, P., Fontana, M., Nangaku, M., Wanner, C., Malik, C., and other 10 authors:** Chronic kidney disease and the global public health agenda: an international consensus, Nat. Rev. Nephrol., **20**, 473-485 (2024).

2. **Ortiz, A., Yanagita, M., Yokoi, H., Torra, R.:** Evolving strategies for early diagnosis, proactive prevention and treatment of CKD, Nephrol. Dial. Transplant., **8**, gfaf151 (2025).

3. **Luyckx, VA., Tonelli, M., Stanifer, JW.:** The global burden of kidney disease and the sustainable development goals, Bull World Health Organ., **96**, 414-422D (2018).

4. **Yeh, TH., Tu, KC., Wang, HY., Chen, JY.:** From Acute to Chronic: Unraveling the Pathophysiological Mechanisms of the Progression from Acute Kidney Injury to Acute Kidney Disease to Chronic Kidney Disease, Int. J. Mol. Sci., **25**, 1755 (2024).

5. **Evans, M., Lewis, RD., Morgan, AR., Whyte, MB., Hanif, W., Bain, SC., Davies, S., Dashora, U., Yousef, Z., Patel, DC., Strain, WD.:** A Narrative Review of Chronic Kidney Disease in Clinical Practice: Current Challenges and Future Perspectives, Adv. Ther., **39**, 33-43 (2022).

6. **Lou-Meda, R., Pérez, JB.:** Reducing the burden of chronic kidney disease in the world, Lancet, **405**:1810 (2025).

7. **Borg, R., Carlson, N., Søndergaard, J., Persson, F.:** The Growing Challenge of Chronic Kidney Disease: An Overview of Current Knowledge, Int. J. Nephrol., **1**, 9609266 (2023).

8. **Himmelfarb, J., Vanholder, R., Mehrotra, R., Tonelli, M.:** The current and future landscape of dialysis, Nat. Rev. Nephrol., **16**, 573-585 (2020).

9. **Ortiz, A., Arreola, Guerra JM., Chan, JCN., Jha, V., Kramer, H., Nicholas, SB., Pavkov, ME., Wanner, C., Wong, LP., Cheung, M., and other 5 authors:** Preventing chronic kidney disease and maintaining kidney health: conclusions from a Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Controversies Conference, Kidney Int., **108**, 555-571 (2025).

10. **Krishnan, A., Teixeira-Pinto, A., Lim, WH., Howard, K., Chapman, JR., Castells, A., Roger, SD., Bourke, MJ., Macaskill, P., Williams, G., and other 17 authors:** Health-Related Quality of Life in People Across the Spectrum of CKD, Kidney Int. Rep., **5**, 2264-2274 (2020).

11. **So, S., Brown, MA., Li, K.:** Factors associated with quality of life in patients with kidney failure managed conservatively and with dialysis: a cross-sectional study, BMC Nephrol., **24**, 322 (2023).

12. **World Health Organization:** Reducing the burden of noncommunicable diseases through promotion of kidney health and strengthening prevention and control of

kidney disease, WHA78.6, Seventy-eighth World Health Assembly (2025), available at https://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA78/A78_R6-en.pdf.

13. **Levey, AS., Atkins, R., Coresh, J., Cohen, EP., Collins, AJ., Eckardt, KU., Nahas, ME., Jaber, BL., Jadoul, M., Levin, A., Powe, NR., Rossert, J., and other 3 authors:** Chronic kidney disease as a global public health problem: approaches and initiatives - a position statement from Kidney Disease Improving Global Outcomes, Kidney Int., **72**, 247-259 (2007).

14. **Plantinga, LC., Tuot, DS., Powe, NR.:** Awareness of chronic kidney disease among patients and providers, Adv. Chronic Kidney Dis., **17**, 225-36 (2010).

15. **Altamura, S., Pietropaoli, D., Lombardi, F., Del Pinto, R., Ferri, C.:** An Overview of Chronic Kidney Disease Pathophysiology: The Impact of Gut Dysbiosis and Oral Disease, Biomedicines, **11**, 3033 (2023).

16. **Chawla, LS., Bellomo, R., Bihorac, A., Goldstein, SL., Siew, ED., Bagshaw, SM., Bittleman, D., Cruz, D., Endre, Z., Fitzgerald, RL., and other 18 authors:** Acute kidney disease and renal recovery: consensus report of the Acute Disease Quality Initiative (ADQI) 16 Workgroup, Nat. Rev. Nephrol., **13**, 241-257 (2017).

17. **Levey, AS., Becker, C., Inker, LA.:** Glomerular filtration rate and albuminuria for detection and staging of acute and chronic kidney disease in adults: a systematic review, JAMA. **313**, 837-46 (2015).

18. **Lameire, NH., Levin, A., Kellum, JA., Cheung, M., Jadoul, M., Winkelmayer, WC., Stevens, PE.:** Conference Participants. Harmonizing acute and chronic kidney disease definition and classification: report of a Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Consensus Conference, Kidney Int., **100**, 516-526 (2021).

19. **Wang, H., Lambourg, E., Guthrie, B., Morales, DR., Donnan, PT., Bell, S.:** Patient outcomes following AKI and AKD: a population-based cohort study, BMC Med., **20**, 229 (2022).

20. **Neyra, JA., Chawla, LS.:** Acute Kidney Disease to Chronic Kidney Disease, Crit. Care Clin., **37**, 453-474 (2021).

21. **Rossiter, A., La, A., Koyner, JL., Forni, LG.:** New biomarkers in acute kidney injury, Crit. Rev. Clin. Lab. Sci., **61**, 23-44 (2024).

22. **Figueroa-García, J., Granados-García, V., Hernández-Rivera, JCH., Lagunes-Cisneros, M., Alvarado-Gutiérrez, T., Paniagua-Sierra, JR.:** Evolution of the stage of chronic kidney disease from the diagnosis of hypertension in primary care, Aten. Primaria., **54**, 102364 (2022).

23. **Caravaca-Fontán, F., Azevedo, L., Luna, E., Caravaca, F.:** Patterns of progression of chronic kidney disease at later stages, Clin. Kidney J., **11**, 246-253 (2018).

24. **van der Burgh, AC., Sedaghat, S., Ikram, MA., Hoorn, EJ., Chaker, L.:** Trajectories of kidney function and risk of mortality, Int. J. Epidemiol., **52**, 1959-1967

(2023).

25. **Turgut, F., Awad, AS., Abdel-Rahman, EM.: Acute Kidney Injury:** Medical Causes and Pathogenesis, J. Clin. Med., 12, 375 (2023).

26. **Webster, AC., Nagler, EV., Morton, RL., Masson, P.:** Chronic Kidney Disease, Lancet, **389**, 1238-1252 (2017).

27. **Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group.:** KDIGO 2024 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease, Kidney Int., **105**, S117-S314 (2024).

28. **Chaudhary, K., Phadke, G., Nistala, R., Weidmeyer, CE., McFarlane, SI., Whaley-Connell, A.:** The emerging role of biomarkers in diabetic and hypertensive chronic kidney disease. Curr. Diab. Rep., **10**, 37-42 (2010).

29. **Devarajan P.:** The use of targeted biomarkers for chronic kidney disease, Adv. Chronic Kidney Dis., **17**, 469-79 (2010).

30. **Zhang, WR., Parikh, CR.:** Biomarkers of Acute and Chronic Kidney Disease. Annu. Rev. Physiol., **10**, 309-333 (2019).

31. **Pethő, ÁG., Tapolyai, M., Csongrádi, É., Orosz, P.:** Management of chronic kidney disease: The current novel and forgotten therapies, J. Clin. Transl. Endocrinol., **36**, 100354 (2024).

32. **Kalantar-Zadeh, K., Jafar, TH., Nitsch, D., Neuen, BL., Perkovic, V.:** Chronic kidney disease, Lancet, **398**, 786-802 (2021).

33. **Kalantar-Zadeh, K., Fouque, D.:** Nutritional Management of Chronic Kidney Disease. N. Engl. J. Med., **377**, 1765-1776 (2017).

34. **Yan, MT., Chao, CT., Lin, SH.:** Chronic Kidney Disease: Strategies to Retard Progression, Int. J. Mol. Sci., **22**, 10084 (2021).

35. **Humphries, TLR., Vesey, DA., Galloway, GJ., Gobe, GC., Francis, RS.:** Identifying disease progression in chronic kidney disease using proton magnetic resonance spectroscopy, Prog. Nucl. Magn. Reason. Spectrosc., **134-135**, 52-64 (2023).

36. **Adhipandito, CF., Cheung, SH., Lin, YH., Wu, SH.:** Atypical Renal Clearance of Nanoparticles Larger Than the Kidney Filtration Threshold, Int. J. Mol. Sci., **22**, 11182 (2021).

37. **Oxburgh, L.:** Kidney Nephron Determination, Annu. Rev. Cell Dev. Biol., **34**, 427-450 (2018).

38. **Bhatraju, PK., Chai, XY., Sathe, NA., Ruzinski, J., Siew, ED., Himmelfarb, J., Hoofnagle, AN., Wurfel, MM., Kestenbaum, BR.:** Assessment of kidney proximal tubular secretion in critical illness, JCI Insight, **6**, e145514 (2021).

39. **McDaniel, BL., Bentley, ML.:** The role of medications and their management in acute kidney injury. Integr. Pharm. Res. Pract., **4**, 21-29 (2015).

40. **Shankar, M., Goldstein, SL.:** Kidney Disease Complexity Manifested: One Biomarker Size Does Not Fit All, Kidney Int. Rep., **7**, 1458-1460 (2022).

41. **Bufkin, KB., Karim, ZA., Silva, J.:** Review of the limitations of current biomarkers in acute kidney injury clinical practices, SAGE Open Med., **5**, 20503121241228446 (2024).

42. **Maguire, DP., Turton, JA., Scudamore, CL., Swain, AJ., McClure, FJ., Smyth, R., Pereira, IB., Munday, MR., York, MJ.:** Correlation of histopathology, urinary biomarkers, and gene expression responses following hexachloro-1:3-butadiene-induced acute nephrotoxicity in male Hanover Wistar rats: a 28-day time course study, Toxicol. Pathol., **41**, 779-794 (2013).

43. **Lisowska-Myjak, B.:** Serum and urinary biomarkers of acute kidney injury, Blood Purif., **29**, 357-365 (2010).

44. **Tesch GH.:** Review: Serum and urine biomarkers of kidney disease: A pathophysiological perspective, Nephrology (Carlton), **15**, 609-616 (2010).

45. **Gaut, JP., Liapis, H.:** Acute kidney injury pathology and pathophysiology: a retrospective review, Clin. Kidney J., **14**, 526-536 (2020).

46. **Nguyen, TTU., Nguyen, AT., Kim, H., Jung, YJ., Park, W., Kim, KM., Park, I., Kim, W.:** Deep-learning model for evaluating histopathology of acute renal tubular injury, Sci. Rep., **14**, 9010 (2024).

47. **Luciano, RL., Moeckel, GW.:** Update on the Native Kidney Biopsy: Core Curriculum 2019. Am. J. Kidney Dis., **73**, 404-415 (2019).

48. **Hull, KL., Adenwalla, SF., Topham, P., Graham-Brown, MP.:** Indications and considerations for kidney biopsy: an overview of clinical considerations for the non-specialist, Clin. Med. (Lond)., **22**, 34-40 (2022).

49. **Nagata, Y., Homma, H., Lee, JA., Imai, K.:** D-Aspartate stimulation of testosterone synthesis in rat Leydig cells, FEBS. Lett., **444**, 160-164 (1999).

50. **Usiello, A., Di Fiore, MM., De Rosa, A., Falvo, S., Errico, F., Santillo, A., Nuzzo, T., Chieffi Baccari, G.:** New Evidence on the Role of D-Aspartate Metabolism in Regulating Brain and Endocrine System Physiology: From Preclinical Observations to Clinical Applications, Int. J. Mol. Sci., **21**, 8718 (2020).

51. **Piubelli, L., Murtas, G., Rabattoni, V., Pollegioni, L.:** The Role of D-amino acids in Alzheimer's Disease, J. Alzheimers Dis., **80**, 475-492 (2021).

52. **Hashimoto, K., Engberg, G., Shimizu, E., Nordin, C., Lindström, LH., Iyo, M.:** Reduced D-serine to total serine ratio in the cerebrospinal fluid of drug naive

schizophrenic patients, Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry., **29**, 767-769 (2005).

53. **Sasabe, J., Miyoshi, Y., Suzuki, M., Mita, M., Konno, R., Matsuoka, M., Hamase, K., Aiso, S.:** D-Amino acid oxidase controls motoneuron degeneration through D-serine, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **109**, 627-632 (2012).

54. **Wolosker, H., Dumin, E., Balan, L., Foltyn, VN.:** D-amino acids in the brain: D-serine in neurotransmission and neurodegeneration, FEBS. J., **275**, 3514-26 (2008).

55. **Sasabe, J., Suzuki, M., Miyoshi, Y., Tojo, Y., Okamura, C., Ito, S., Konno, R., Mita, M., Hamase, K., Aiso, S.:** Ischemic acute kidney injury perturbs homeostasis of serine enantiomers in the body fluid in mice: early detection of renal dysfunction using the ratio of serine enantiomers, PLoS One., **29**, e86504 (2014).

56. **Hesaka, A., Yasuda, K., Sakai, S., Yonishi, H., Namba-Hamano, T., Takahashi, A., Mizui, M., Hamase, K., Matsui, R., Mita, M., and other 3 authors.:** Dynamics of D-serine reflected the recovery course of a patient with rapidly progressive glomerulonephritis, CEN. Case Rep., **4**, 297-300 (2019).

57. **Kimura, T., Hesaka, A., Isaka, Y.:** D-Amino acids and kidney diseases, Clin. Exp. Nephrol., **24**, 404-410 (2020).

58. **Hesaka, A., Sakai, S., Hamase, K., Ikeda, T., Matsui, R., Mita, M., Horio, M., Isaka, Y., Kimura, T.:** D-Serine reflects kidney function and diseases, Sci. Rep., **25**,

5104 (2019).

59. **Kimura, T., Sakai, S., Isaka, Y.:**. D-Serine as a sensor and effector of the kidney, Clin. Exp. Nephrol., **27**, 891-900 (2023).

60. **Koga, R., Miyoshi, Y., Sakaue, H., Hamase, K., Konno, R:**. Mouse d-Amino-Acid Oxidase: Distribution and Physiological Substrates, Front. Mol. Biosci., **4**, (2017).

61. **Sacchi, S., Cappelletti, P., Murtas, G.:** Biochemical Properties of Human D-amino Acid Oxidase Variants and Their Potential Significance in Pathologies, Front. Mol. Biosci., **5**, 55 (2018).

62. **Zhang, H., Qi, L., Lin, Y., Mao, L., Chen, Y.:** Study on the decrease of renal D-amino acid oxidase activity in the rat after renal ischemia by chiral ligand exchange capillary electrophoresis, Amino Acids, **42**, 337-45 (2012).

63. **Verrey, F., Ristic, Z., Romeo, E., Ramadan, T., Makrides, V., Dave, MH., Wagner, CA., Camargo, SM.:** Novel renal amino acid transporters, Annu. Rev. Physiol., **67**, 557-572 (2005).

64. **Kimura, T., Sakai, S., Isaka, Y.:** D-Serine as a sensor and effector of the kidney, Clin. Exp. Nephrol., **27**, 891-900 (2023).

65. **van de Poll, MC., Soeters, PB., Deutz, NE., Fearon, KC., Dejong, CH.:** Renal metabolism of amino acids: its role in interorgan amino acid exchange, Am. J. Clin.

Nutr., **79**, 185-97 (2004).

66. **Suzuki, M., Gonda, Y., Yamada, M., Vandebroek, AA., Mita, M., Hamase, K., Yasui, M., Sasabe, J.:** Serum D-serine accumulation after proximal renal tubular damage involves neutral amino acid transporter Asc-1, Sci. Rep., **9**, 16705 (2019).

67. **Bufkin, KB., Karim, ZA., Silva, J.:** Review of the limitations of current biomarkers in acute kidney injury clinical practices, SAGE Open Med., **5**, 20503121241228446 (2024).

68. **Sancho-Martínez, SM., Herrero, M., Fontecha-Barriuso, M., Mercado-Hernández, J., López-Hernández, FJ.:** The Urinary Level of Injury Biomarkers Is Not Univocally Reflective of the Extent of Toxic Renal Tubular Injury in Rats, Int. J. Mol. Sci., **23**, 3494 (2022).

69. **Naka, C., Takahashi, H., Shiba, K., Fujita, Y., Fukuta, I., Kosaka, H., Sakamoto, H.:** [Usefulness of protein/creatinine ratio in spot urine using test strips], Rinsho Byori., **53**, 810-7 (2005).

70. **Seger, C., Salzmann, L.:** After another decade: LC-MS/MS became routine in clinical diagnostics, Clin. Biochem, **82**, 2-11 (2020).

71. **van Duijl, TT., Ruhaak, LR., van Kooten, C., de Fijter, JW., Cobbaert, CM.:** Multiplex LC-MS/MS Testing for Early Detection of Kidney Injury: A Next-Generation Alternative to Conventional Immunoassays?, J. Appl. Lab. Med., **7**, 923-

930 (2022).

72. **McSweene,y KR., Gadanec, LK., Qaradakhi, T., Ali, BA., Zulli, A., Apostolopoulos, V.:** Mechanisms of Cisplatin-Induced Acute Kidney Injury: Pathological Mechanisms, Pharmacological Interventions, and Genetic Mitigations, Cancers (Basel)., **13**, 1572 (2021).

73. **Kong, D., Yang, Z., Zhang, X., Song, Y., Anayyat, U., Li, Y., Liu, H., Ou, Z., Pang, S., Wang, X.:** Cisplatin-induced acute kidney injury is alleviated by BMSCs-derived exosome via mmu-miR-874-3p-mediated activation of the wnt/β-catenin signaling pathway, Regen. Ther., **30**, 719-729 (2025).

74. **Lin, Q., Li, S., Jin, H., Cai, H., Zhu, X., Yang, Y., Wu, J., Qi, C., Shao, X., Li, J., Zhang, K., Zhou, W., Zhang, M., Cheng, J., Gu, L., Mou, S., Ni, Z.:** Mitophagy alleviates cisplatin-induced renal tubular epithelial cell ferroptosis through ROS/HO-1/GPX4 axis, Int. J. Biol. Sci., **19**, 1192-1210 (2023).

75. **Kanbay, M., Copur, S., Guldan, M., Ozbek, L., Hatipoglu, A., Covic, A., Mallamaci, F., Zoccali, C.:** Proximal tubule hypertrophy and hyperfunction: a novel pathophysiological feature in disease states, Clin. Kidney J., **17**, sfae195 (2024).

76. **Abulikemu, A., Zhao, X., Xu, H., Li, Y., Ma, R., Yao, Q., Wang, J., Sun, Z., Li, Y., Guo, C.:** Silica nanoparticles aggravated the metabolic associated fatty liver disease through disturbed amino acid and lipid metabolisms-mediated oxidative

stress, Redox Biol., **59**,102569 (2023).

77. **Kuwata, K., Nakamura, I., Ide, M., Sato, H., Nishikawa, S., Tanaka, M.:** Comparison of changes in urinary and blood levels of biomarkers associated with proximal tubular injury in rat models, J. Toxicol. Pathol., **3**, 151-164 (2015).

78. **Umakoshi, Y., Nakano, Y., Fukuda, K., Watanabe, K., Miyawaki, I., Fukusaki, E.:** Automatic switching valve system to minimize variation of liquid chromatography-tandem mass spectrometry-based chiral amino acid profiling, J. Biosci. Bioeng., **128**, 773-779 (2019).

79. **Konya, Y., Taniguchi, M., Fukusaki, E.:** Novel high-throughput and widely-targeted liquid chromatography-time of flight mass spectrometry method for d-amino acids in foods, J. Biosci. Bioeng., **123**, 126-133 (2017).

80. **Liang, M., Wang, Z., Li, H., Cai, L., Pan, J., He, H., Wu, Q., Tang, Y., Ma, J., Yang, L.:** l-Arginine induces antioxidant response to prevent oxidative stress via stimulation of glutathione synthesis and activation of Nrf2 pathway, Food Chem. Toxicol., **115**, 315-328 (2018).

81. **Li, Q., Bowmer, CJ., Yates, MS.:** Effect of arginine on cisplatin-induced acute renal failure in the rat, Biochem. Pharmacol., **47**, 2298-301 (1994).

82. **Saleh, S., El-Demerdash, E.:** Protective effects of L-arginine against cisplatin-induced renal oxidative stress and toxicity: role of nitric oxide, Basic Clin. Pharmacol.

Toxicol., **97**, 91-7 (2005).

83. **Cherla, G., Jaimes, EA.:**. Role of L-arginine in the pathogenesis and treatment of renal disease, J. Nutr., **134**, 2801S-2806S; discussion 2818S-2819S (2004).

84. **Senbel, AM., Omar, AG., Abdel-Moneim, LM., Mohamed, HF., Daabees, TT.:** Evaluation of l-arginine on kidney function and vascular reactivity following ischemic injury in rats: protective effects and potential interactions, Pharmacol. Rep., **66**, 976-83 (2014).

85. **Ryu, SH., Lee, JD., Kim, JW., Kim, S., Kim, S., Kim, KB.:** ^{1}H NMR toxicometabolomics following cisplatin-induced nephrotoxicity in male rats, J. Toxicol. Sci., **44**, 57-71 (2019).

86. **Kim, HJ., Park, DJ., Kim, JH., Jeong, EY., Jung, MH., Kim, TH., Yang, JI., Lee, GW., Chung, HJ., Chang, SH.:** Glutamine protects against cisplatin-induced nephrotoxicity by decreasing cisplatin accumulation, J. Pharmacol. Sci., **127**, 117-26 (2015).

87. **Vera-Aviles, M., Vantana, E., Kardinasari, E., Koh, NL., Latunde-Dada, GO.:** Protective Role of Histidine Supplementation Against Oxidative Stress Damage in the Management of Anemia of Chronic Kidney Disease, Pharmaceuticals (Basel), **11**, 111 (2018)

88. **Mansouri, S., Farshid, AA., Tamaddonfard, E.:** Effects of histidine and N-

acetylcysteine on acute kidney injury induced by doxorubicin in rats: roles of anti-oxidative, anti-inflammatory and anti-apoptotic mechanisms, Vet. Res. Forum., **16**, 507-514 (2025).

89. **Schober, P., Boer, C., Schwarte, LA.:** Correlation Coefficients: Appropriate Use and Interpretation, Anesth. Analg., **6**, 1763-1768 (2018).

90. **Uchino, H., Fujishima, J., Fukuoka, K., Iwakiri, T., Kamikuri, A., Maeda, H., Nakama, K.:** Usefulness of urinary biomarkers for nephrotoxicity in cynomolgus monkeys treated with gentamicin, cisplatin, and puromycin aminonucleoside, J. Toxicol. Sci., **42**, 629-640 (2017).

91. **Gao Y.:** Urine is a better biomarker source than blood especially for kidney diseases, Adv. Exp. Med. Biol., **845**, 3-12 (2015).

92. **U.S. Food and Drug Administration:** Bioanalytical Method Validation for Biomarkers: Guidance for Indusrty, U.S. Department of Health and Human Services, January 2025, available at: https://www.hhs.gov/guidance/sites/default/files/hhs-guidance-documents/FDA/biomarkers-guidance-level-2.pdf?mptk=12ca3c4bf78c6ccdd6f5770d6041e079869e76e7a93fcb93d3c570dd96e5f9ee57bbcfd331aa786762c48a6d5e8eaf79_87363bae8a799c39c193584aaa304da2

93. **International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH):** Bioanalytical Method Validation and

Study Sample Analysis M10, Final version, Adopted on 24 May 2022, available at https://www.pmda.go.jp/files/000246792.pdf

94. **Altes, A., Thellier, N., Rusinaru, D., Marsou, W., Bohbot, Y., Chadha, G., Leman, B., Paquet, P., Ennezat, PV., Tribouilloy, C., Maréchaux, S.:** Dimensionless Index in Patients With Low-Gradient Severe Aortic Stenosis and Preserved Ejection Fraction, Circ. Cardiovasc. Imaging, **13**, e010925 (2020).

95. **Rogers, B., Mourot, L., Doucende, G., Gronwald, T.:** Fractal correlation properties of heart rate variability as a biomarker of endurance exercise fatigue in ultramarathon runners, Physiol. Rep., **9**, e14956 (2021).

96. **Yano, H., Tamura, Y., Kobayashi, K., Tanemoto, M., Uchida, S.:** Uric acid transporter ABCG2 is increased in the intestine of the 5/6 nephrectomy rat model of chronic kidney disease, Clin. Exp. Nephrol., **18**, 50-5 (2014).

97. **Hamzaoui, M., Djerada, Z., Brunel, V., Mulder, P., Richard, V., Bellien, J., Guerrot, D.:** 5/6 nephrectomy induces different renal, cardiac and vascular consequences in 129/Sv and C57BL/6JRj mice, Sci. Rep., **10**, 1524 (2020).

98. **Homma, K., Enoki, Y., Uchida, S., Taguchi, K., Matsumoto, K.:** A combination of 5/6-nephrectomy and unilateral ureteral obstruction model accelerates progression of remote organ fibrosis in chronic kidney disease, FASEB. Bioadv., **5**, 377-394 (2023).

99. **Liang, J., Liu, Y.:** Animal Models of Kidney Disease: Challenges and Perspectives, Kidney360, **4**, 1479-1493 (2023).

100. **Adam, RJ., Williams, AC., Kriegel, AJ.: Comparison of the surgical resection and infarct 5/6 nephrectomy rat models of chronic kidney disease, Am. J. Physiol. Ren. Physiol., 1, F639-F654 (2022).**

101. **Barata, K., Yoshida, M., Hokao, R., Maekawa, A.:** Sequential alterations in clinical biochemical indicators of renal function in 5/6 nephrectomized rats--basic study for renal toxicity using 5/6 nephrectomized rats, J. Toxicol. Sci., **23**, 433-42 (1998).

102. **Lim, BJ,, Yang, HC., Fogo, AB.:** Animal models of regression/progression of kidney disease, Drug Discov. Today Dis. Models., **11**, 45-51 (2014).

103. **Yamamoto, Y., Iyoda, M., Tachibana, S., Matsumoto, K., Wada, Y., Suzuki, T., Iseri, K., Saito, T., Fukuda-Hihara, K., Shibata, T.:** Erlotinib attenuates the progression of chronic kidney disease in rats with remnant kidney, Nephrol. Dial. Transplant., **33**, 598-606 (2018).

104. **Mukaka, MM.:** Statistics corner: A guide to appropriate use of correlation coefficient in medical research, Malawi Med. J., **24**, 69-71 (2012).

105. **Byun, JS., Lee, JH., Kang, JS., Han, BS.:** Comparative analysis of imaging diagnostic models for tubular basophilia and mineralization of kidney, Lab. Anim.

Res., **38**, 29 (2022).

106. **Seely, JC., Frazier, KS.:** Regulatory Forum Opinion Piece*: Dispelling Confusing Pathology Terminology: Recognition and Interpretation of Selected Rodent Renal Tubule Lesions, Toxicol. Pathol., **43**, 457-63 (2015).

107. **Liu Y.:** Renal fibrosis: new insights into the pathogenesis and therapeutics, Kidney Int., **69**, 213-7 (2006).

108. **Huang, R., Fu, P., Ma, L.:** Kidney fibrosis: from mechanisms to therapeutic medicines, Signal Transduct. Target Ther., **8**, 129 (2023).

109. **Takahashi, RH., Forrest, WF., Smith, AD., Badee, J., Qiu, N., Schmidt, S., Collier, AC., Parrott, N., Fowler, S.:** Characterization of Hepatic UDP-Glucuronosyltransferase Enzyme Abundance-Activity Correlations and Population Variability Using a Proteomics Approach and Comparison with Cytochrome P450 Enzymes, Drug Metab. Dispos., **49**, 760-769 (2021).

110. **Schöcklmann, HO., Lang, S., Sterzel, RB.:** Regulation of mesangial cell proliferation, Kidney Int., **56**, 1199-207 (1999).

111. **Chow, R., Chiu, N., Bruera, E., Krishnan, M., Chiu, L., Lam, H., DeAngelis, C., Pulenzas, N., Vuong, S., Chow, E.:** Inter-rater reliability in performance status assessment among health care professionals: a systematic review, Ann. Palliat. Med., **5**, 83-92 (2016).

112. **White, N., Parsons, R., Collins, G., Barnett, A.:** Evidence of questionable research practices in clinical prediction models, BMC Med., **21**, 339 (2023).

113. **Nahm, FS.:** Receiver operating characteristic curve: overview and practical use for clinicians, Korean J. Anesthesiol., **75**, 25-36 (2022).

114. **Wu, W., Song, Y., Sun, M., Li, Y., Xu, Y., Xu, M., Yang, Y., Li, S., Zhang, F.:** Corneal metabolic biomarkers for moderate and high myopia in human, Exp. Eye Res., **237**, 109689 (2023).

115. **Zhang, X., Li, T., Wang, L., Li, Y., Ruan, T., Guo, X., Wang, Q., Meng, X.:** Relative comparison of chronic kidney disease-mineral and bone disorder rat models, Front Physiol., **3**, 1083725 (2023).

116. **Kovalčíková, AG., Pavlov, K., Lipták, R., Hladová, M., Renczés, E., Boor, P., Podracká, Ľ., Šebeková, K., Hodosy, J., Tóthová, Ľ., Celec, P.:** Dynamics of salivary markers of kidney functions in acute and chronic kidney diseases, Sci. Rep., **10**, 21260 (2020).

117. **Wang, F., Otsuka, T., Takahashi, K., Narui, C., Colvin, DC., Harris, RC., Takahashi, T., Gore, JC.:** Renal tubular dilation and fibrosis after unilateral ureter obstruction revealed by relaxometry and spin-lock exchange MRI, NMR Biomed., **34**, e4539 (2021).

118. **Aparicio-Trejo, OE., Tapia, E., Molina-Jijón, E., Medina-Campos, ON., Macías-Ruvalcaba, NA., León-Contreras, JC., Hernández-Pando, R., García-Arroyo, FE., Cristóbal, M., Sánchez-Lozada, LG., Pedraza-Chaverri, J.:** Curcumin prevents mitochondrial dynamics disturbances in early 5/6 nephrectomy: Relation to oxidative stress and mitochondrial bioenergetics, Biofactors., **43**, 293-310 (2017).

119. **Yu, X., Liu, H., Zou, J., Zhu, J., Xu, X., Ding, X.:** Oxidative stress in 5/6 nephrectomized rat model: effect of alpha-lipoic acid, Ren Fail., **34**, 907-914 (2012).

120. **Nezu, M., Suzuki, N.:** Roles of Nrf2 in Protecting the Kidney from Oxidative Damage, Int. J. Mol. Sci., **8**, 2951 (2020).

121. **Nezu, M., Souma, T., Yu, L., Suzuki, T., Saigusa, D., Ito, S., Suzuki, N., Yamamoto, M.:** Transcription factor Nrf2 hyperactivation in early-phase renal ischemia-reperfusion injury prevents tubular damage progression, Kidney Int., **2**, 387-401 (2017).

122. **Mitsuishi, Y., Taguchi, K., Kawatani, Y., Shibata, T., Nukiwa, T., Aburatani, H., Yamamoto, M., Motohashi, H.:** Nrf2 redirects glucose and glutamine into anabolic pathways in metabolic reprogramming, Cancer Cell., **1**, 66-79 (2012).

123. **Amores-Sánchez MI, Medina MA.:** Glutamine, as a precursor of glutathione, and oxidative stress, Mol. Genet. Metab., **2**, 100-105 (1999).

124. **Thomas, K., Zondler, L., Ludwig, N., Kardell, M., Lüneburg, C., Henke, K., Mersmann, S., Margraf, A., Spieker, T., Tekath, T., Velic, A., Holtmeier, R., Hermann, J., and other 10 authors.:** Glutamine prevents acute kidney injury by modulating oxidative stress and apoptosis in tubular epithelial cells, JCI Insight., **7**, e163161 (2022).

125. **Iwata, Y., Nakade, Y., Kitajima, S., Yoneda-Nakagawa, S., Oshima, M., Sakai, N., Ogura, H., Sato, K., Toyama, T., Yamamura, Y., and other 15 authors.:** Protective effect of d-alanine against acute kidney injury, Am. J. Physiol. Renal Physiol., **322**, F667-F679 (2022).

126. **Li, C., Yu, Y., Zhu, S., Hu, Y., Ling, X., Xu, L., Zhang, H., Guo, K.:** The emerging role of regulated cell death in ischemia and reperfusion-induced acute kidney injury: current evidence and future perspectives, Cell Death Discov., **10**, 216 (2024).

127. **Piko, N., Bevc, S., Hojs, R., Ekart, R.:** The Role of Oxidative Stress in Kidney Injury, Antioxidants (Basel)., **12**, 1772 (2023).

学術論文

1. **Fukuda K,** Umakoshi Y, Watanabe K, Yahata M, Miyawaki I, Fukusaki E. Correlation analysis of urinary D/L-amino acid ratios and renal injury by using 5/6 nephrectomy model rats. J Biosci Bioeng. 2025 Oct;140(4):260-266. doi: 10.1016/j.jbiosc.2025.06.006.

   ※本学位論文に関与する論文

2. Suzuki K, Shitara Y, **Fukuda K**, Horie T. Long-lasting inhibition of the intestinal absorption of fexofenadine by cyclosporin A in rats. J Pharm Sci. 2012 Jul;101(7):2606-15. doi: 10.1002/jps.23174.

3. Umeya N, Yoshizawa Y, **Fukuda K**, Ikeda K, Kamada M, Miyawaki I. Availability of multistep light stimulus method for evaluation of visual dysfunctions. J Pharmacol Toxicol Methods. 2019 Mar-Apr;96:27-33. doi: 10.1016/j.vascn.2018.12.005.

4. Umakoshi Y, Nakano Y, **Fukuda K**, Watanabe K, Miyawaki I, Fukusaki E. Automatic switching valve system to minimize variation of liquid chromatography-tandem mass spectrometry-based chiral amino acid profiling. J Biosci Bioeng. 2019 Dec;128(6):773-779. doi: 10.1016/j.jbiosc.2019.06.005.

5. Umeya N, Yoshizawa Y, **Fukuda K**, Ikeda K, Kamada M, Inada H, Usui T, Miyawaki I. Detection of retinal dysfunction induced by HCN channel inhibitors using multistep light stimulus and long-duration light stimulus ERG in rats. Exp Eye Res. 2024 Apr;241:109847. doi: 10.1016/j.exer.2024.109847.

学会発表

国内学会・シンポジウムにおける発表

1. 福田幸祐、馬越泰、中野洋介、渡辺健一、中川徹也、福崎英一郎、宮脇出「5/6 腎臓摘出モデルラットを用いた尿中 D-/L-アミノ酸比の腎臓マーカーとしての検証」第 46 回日本毒性学会学術年会、徳島、2019 年 6 月

2. 馬越泰、福田幸祐、宮脇出、福崎英一郎「5/6 腎臓摘出ラットの尿中 DL-アミノ酸プロファイリング」第 13 回メタボロームシンポジウム、茨城、2019 年 10 月

3. 渡辺健一、福田幸祐、山田統一郎、髙山早余、中川徹也、只野純、吉沢佑基、栃谷智秋、宮脇出「IMS(イメージング MS)の創薬への応用」第 3 回医薬品毒性機序研究会、東京、2021 年 1 月

4. 福田幸祐、渡辺健一、山田統一郎、髙山早余、只野純、宮脇出「質量分析法を用いたアミトリプチリンによるリン脂質症のバイオマーカー探索」第 48 回日本毒性学会学術年会、神戸、2021 年 7 月

5. 羽成優、木村竜一朗、小島知子、清水浩之、谷口由華子、福田幸祐「LBA のライフサイクルマネジメント」第 14 回 JBF シンポジウム、東京、2023 年 3 月

6. 中沢庸徳、大塚之博、小島知子、新村彩絵、羽成優、福田幸祐、森原元彦、谷口由華子「ADA 測定のライフサイクルマネジメント」第 15 回 JBF シンポジウム、京都、2024 年 2 月

7. 福永智恵、伊藤利将、久野琢矢、公平陽子、才原良子、佐野拓也、澁谷映美、

田村美由紀、長濱彰宏、中村早希、樋口彩、福田幸祐、細川裕矢「レギュレーション対応の実際」第 16 回 JBF シンポジウム、兵庫、2025 年 3 月

8. 林優希、渡辺健一、福田幸祐、八幡昌寛、宮脇出、福崎英一郎、新間秀一「マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析イメージングによるマウス脳組織中のバルプロ酸およびγ-アミノ酪酸の可視化」日本農芸化学会 2025 年度大会、札幌、2025 年 3 月

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始ご懇篤なるご指導とご鞭撻を賜りました大阪大学大学院工学研究科　福崎英一郎　教授に謹んで感謝の意を表します。

本論文の作成にあたり、大阪大学大学院工学研究科　内山進　教授、大阪大学大学院工学研究科　渡邉肇　教授には、有益なご指導、ご助言およびご校閲を賜りました。厚く感謝申し上げます。

大阪大学大学院工学研究科　新間秀一　准教授、Sastia Prama PUTRI　准教授には、ご指導ならびに日頃からの貴重なご助言を頂きました。心から感謝申し上げます。

福﨑研究室の研究員、事務員、学生の方々には、研究生活において様々な面でご協力を賜りました。心より感謝申し上げます。

住友ファーマ株式会社　宮脇出博士、八幡昌寛博士、中川徹也博士及び渡辺健一博士（現　株式会社住化分析センター）には、私の博士後期課程での研究を様々な面でサポートいただきました。厚く感謝申し上げます。

最後に、博士後期課程への挑戦を支えてくれた家族、応援してくれた友人に深い感謝の意を表して謝辞とします。