

腎障害に関連する腸内細菌叢由来代謝物を  
標的とした分析手法構築と応用

金光 祥臣

本学位論文は、下記の原著論文を基に作成され、東北大学薬学研究科に提出されたものである。

1. **Simultaneous quantitative analysis of uremic toxins by LC-MS/MS with a reversed-phase/cation-exchange/anion-exchange tri-modal mixed-mode column**

Yoshitomi Kanemitsu, Kei Asaji, Yotaro Matsumoto, Hiroki Tsukamoto, Daisuke Saigusa, Chikahisa Mukawa, Tatsuki Tachikawa, Takaaki Abe, and Yoshihisa Tomioka

*Journal of Chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 2017 Nov;1068—1069:1-8.

2. **Generation and characterization of anti-phenyl sulfate monoclonal antibodies and a potential use for phenyl sulfate analysis in human blood**

Yoshitomi Kanemitsu, Hiroki Tsukamoto, Yotaro Matsumoto, Kanako Nozawa-Kumada, Yoshinori Kondo, Takaaki Abe, and Yoshihisa Tomioka  
*Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2018;41(8):1170—1177.

3. **Comprehensive and semi-quantitative analysis of carboxyl-containing metabolites related to gut microbiota on chronic kidney disease using 2-picolylamine isotopic labeling LC-MS/MS**

Yoshitomi Kanemitsu, Eikan Mishima, Masamitsu Maekawa, Yotaro Matsumoto, Daisuke Saigusa, Hiroaki Yamaguchi, Jiro Ogura, Hiroki Tsukamoto, Yoshihisa Tomioka, Takaaki Abe, and Nariyasu Mano  
*Scientific Reports*, 2019 Dec 13;9 (1) :19075.

略語表

1NS	1-naphthol sulfate
2NS	2-naphthol sulfate
2PA	2-picolyamine
2PA- <i>d</i> <sub>6</sub>	2-picolyamine- <i>d</i> <sub>6</sub>
4-EPS	4-ethylphenyl sulfate
4MUS	4-methylumbelliferyl sulfate
AcONH <sub>4</sub>	ammonium acetate
aMCA	α-muricholic acid
bMCA	β-muricholic acid
BSA	bovine serum albumin
BUN	blood urea nitrogen
C12 : 0	lauric acid
C14 : 0	myristic acid
C16 : 0	palmitic acid
C16 : 1	palmitoleic acid
C18 : 0	stearic acid
C18 : 1	oleic acid
C18 : 2	linoleic acid
C18 : 3 n-3	α-linolenic acid
C18 : 3 n-6	γ-linolenic acid
C18 : 4	stearidonic acid
C20 : 0	arachidic acid
C20 : 3	dihomo-γ-linolenic acid
C20 : 4	arachidonic acid
C20 : 5	eicosapentaenoic acid
C22 : 4	adrenic acid
C22 : 5	docosapentaenoic acid
C22 : 6	docosahexaenoic acid
C24 : 0	lignoceric acid
C24 : 1	nervonic acid
C3:0	propanoic acid
C4:0	butyric acid
CA	cholic acid

CDCA	chenodeoxycholic acid
CID	collision-induced dissociation
CIL	chemical isotope labeling
CKD	chronic kidney disease
Cre	creatinine
CVD	cardiovascular disease
DCA	deoxycholic acid
DMSO	dimethyl sulfoxide
DPDS	2,2'-dipyridyl disulfide
eGFR	estimated glomerular filtration rate
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ESI	electrospray ionization
GaMCA	glyco- $\alpha$ -muricholic acid
GbMCA	glyco- $\beta$ -muricholic acid
GCA	glycocholic acid
GCDCA	glycochenodeoxycholic acid
GDCA	glycodeoxycholic acid
GF	germ-free
GHCA	glycohyocholic acid
GHDC	glycohyodeoxycholic acid
GLCA	glycolithocholic acid
GMBS	4-maleimidobutyric acid <i>N</i> -hydroxysuccinimide ester
GUDCA	glycoursodeoxycholic acid
HAT	hypoxanthine-aminopterin-thymidine
HCA	hyocholic acid
HDCA	hyodeoxycholic acid
HILIC	hydrophilic interaction liquid chromatography
HRMS	high-resolution mass spectrometry
HRP	horseradish peroxidase
HSA	human serum albumin
HT	hypoxanthine-thymidine
IAA	indole-3-acetic acid
InS	indoxyl sulfate
IPA	isopropanol
IS	internal standard
KLH	keyhole limpet hemocyanin

KMUS	<i>N</i> -(11-maleimidoundecanoyloxy) succinimide
LCA	lithocholic acid
LC-MS/MS	liquid chromatography/tandem mass spectrometry
LOQ	limit of quantification
m1A	1-methyladenosine
MeCN	acetonitrile
MeOH	methanol
NMR	nuclear magnetic resonance
oCS	<i>o</i> -cresyl sulfate
ODS	octadecylsilyl
OVA	ovalbumin
PBS	phosphate buffered salts
pCPS	<i>p</i> -chlorophenyl sulfate
pCS	<i>p</i> -cresyl sulfate
PEG	polyethylene glycol
pNPS	<i>p</i> -nitrophenyl sulfate
PS	phenyl sulfate
PUFA	polyunsaturated fatty acids
QC	quality control
QS	quinolinol sulfate
RF	renal failure
RPMI	roswell park memorial institute
SCFA	short-chain fatty acid
SMCC	succinimidyl trans-4-(maleimidylmethyl) cyclohexane-1-carboxylate
SPF	specific pathogen free
SRM	selected reaction monitoring
TMAO	trimethylamine <i>N</i> -oxide
TMB	3,3',5,5'-tetramethylbenzidine
TPP	triphenylphosphine
UDCA	ursodeoxycholic acid
UTx	uremic toxins
UV	ultraviolet
wMCA	$\omega$ -muricholic acid

## 目次

緒論 .....	1
第 1 章 ミックスドモードカラムを用いた LC-MS/MS による UT <sub>x</sub> 一斉定量系の構築	
第 1 節 序 .....	8
第 2 節 分析カラムの選定 .....	12
第 3 節 LC 条件の検討 .....	15
第 4 節 MS/MS 条件の検討 .....	17
第 5 節 m1A-d <sub>5</sub> 、pCS-d <sub>5</sub> 及び 4-EPS-d <sub>4</sub> の合成 .....	19
第 6 節 分析バリデーション .....	21
第 7 節 CKD 患者血漿中の UT <sub>x</sub> 濃度と腎機能との相関解析 .....	26
第 8 節 結語 .....	31
第 2 章 抗 PS モノクローナル抗体の作製と競合 ELISA によるヒト血中 PS 測定系の構築	
第 1 節 序 .....	33
第 2 節 ハプテンのデザインと調製 .....	36
第 3 節 抗 PS モノクローナル抗体の作製 .....	38
第 4 節 競合 ELISA における抗 PS モノクローナル抗体の特異性評価 .....	39
第 5 節 ヒト血漿又は血清測定における抗原特異性に関する検討 .....	44
第 6 節 CKD 患者血清中の PS 定量精度の評価 .....	50
第 7 節 結語 .....	52

第 3 章 2PA 安定同位体標識 LC-MS/MS を用いた腸内細菌関連カルボキシル  
基含有代謝物の網羅的相対定量法の構築

第 1 節 序.....	54
第 2 節 2 PA 重水素標識体の合成.....	58
第 3 節 LC 条件の検討.....	60
第 4 節 MS/MS 条件の検討.....	62
第 5 節 相対定量法の確立.....	65
第 6 節 通常飼育又は無菌飼育マウスの腎障害有無における血液、糞及び盲腸 内容物中の胆汁酸、脂肪酸、IAA の解析.....	73
第 7 節 結語.....	83
総括.....	84
謝辞.....	88
実験の部.....	91
引用文献.....	118

## 緒論

ヒトの腸管内には、100 兆個にも及ぶ細菌が「腸内細菌叢」として存在し、それらは、腸内で多様な代謝物を産生する<sup>1,2</sup>。近年、次世代シーケンサーやメタボローム研究の普及により、血中に存在する全代謝物の 10%以上が、生体内濃度に腸内細菌叢の影響を受けることが明らかにされた<sup>3</sup>。代謝物は、主として全身循環から腎臓へと流れ込んだ後、不要なものが尿として体外へ排出される。したがって、慢性腎臓病 (chronic kidney disease, CKD)\* などの腎障害は、宿主の異化・同化産物の排泄障害に止まらず、腸内細菌叢が関与する様々な代謝物恒常性の破堤に繋がる。腸内細菌叢が産生する代謝物の中には、病原体に対するバリア機能、腸管上皮の分化誘導、宿主免疫システムの維持などの生理機能を担うものが見出され、その分子作用機構の解明が急速に進んでいる<sup>4</sup>。その結果、肥満、糖尿病、動脈硬化、発がん、及び自閉症などの腸疾患以外の全身性病態に対する腸内細菌叢の関与が、知られてきた<sup>5</sup>。特に CKD においては、腸と腎臓が炎症反応、免疫機序などを介して相互に病態へ影響を及ぼし合うという「腸腎連関」の概念が、提唱されつつある<sup>6</sup>。この概念の鍵となるものが、正常な腎機能であれば体外へ排泄されるはずの有毒な代謝物——尿毒症物質 (uremic toxins, UTx) である<sup>7-12</sup>。

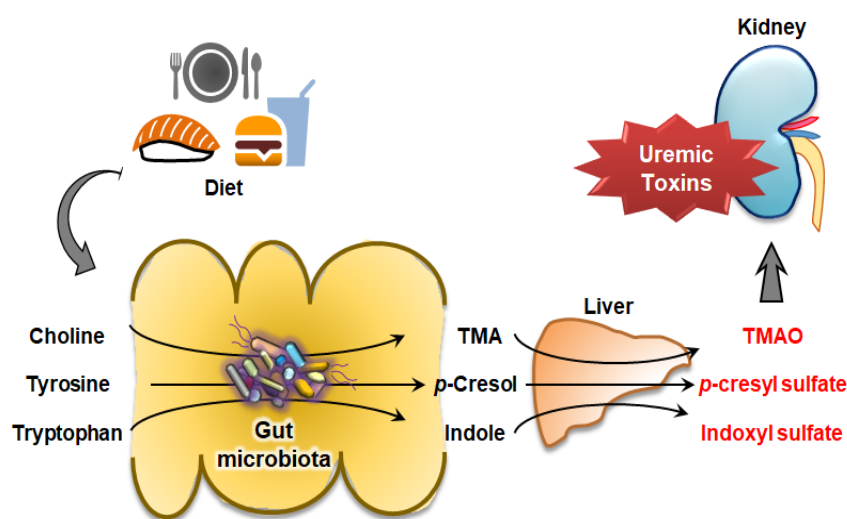
UTx は、欧州の専門委員会 (European Work Group on Uremic toxins) によって水溶性低分子、水溶性中分子、蛋白結合型に分類され<sup>13,14</sup>、2019 年現在では、130 以上の物質が定義されている。このうち、水溶性低分子に属するトリメチルアミン-N-オキシド (trimethylamine N-oxide, TMAO) は、その血中濃度と CKD 患者の腎機能が強く負に相関し、さらに全身性炎症や動脈硬化の促進、及び心血管病

---

\* 糸球体濾過量で表される腎機能の低下があるか、もしくは腎臓の障害を示唆する所見が、3 カ月以上持続する状態を指す。日本における CKD 患者数は、約 1,330 万人と推計され、増加し続けている。…日本腎臓学会 エビデンスに基づく CKD 診療ガイドライン 2018、日本透析医学会 わが国の慢性透析療法の現況 (2017 年末) より



(cardiovascular disease, CVD) 発症率と死亡率の予測因子となり得る<sup>15-17</sup>。また、蛋白結合型であるインドキシル硫酸 (indoxyl sulfate, InS) と *p*-クレジル硫酸 (*p*-cresyl sulfate, pCS) は、CKD の病態進行を反映するバイオマーカーとしての役割に加え<sup>18</sup>、その高い血中濃度は、死亡率に関連する<sup>19-21</sup>。興味深いことに、TMAO、InS、及び pCS は、それぞれ食事由来のホスファチジルコリン (又はコリンや L-カルニチン)、トリプトファン、及びチロシンを原料として、腸内細菌叢による代謝を経て生成される UTx である<sup>3,22-24</sup> (Fig. 1)。また、宿主の食事の質や量、抗菌薬の服用によって、これらの血中濃度が変動することも明らかにされた<sup>24,25</sup>。すなわち、腸内細菌叢と UTx が、CKD と食習慣、CVD 及び全身性疾患をつなぐメカニズムに深く関与する。



**Figure 1 Schematic representation of origin and synthesis of the major uremic toxins from gut microbiome.** TMA, trimethylamine; TMAO, trimethylamine *N*-oxide.

一方で、ある種の腸内細菌叢が産生する水酸化脂肪酸やオキシ脂肪酸<sup>26,27</sup>、短鎖脂肪酸<sup>†</sup> (short-chain fatty acid, SCFA)<sup>28-30</sup>、D-アミノ酸<sup>31</sup>、5-メチルトリプトファンなどは<sup>32</sup>、抗炎症作用や腸管免疫の制御を介した腎保護的な側面も有する。しかし、

<sup>†</sup> 脂肪酸のうち炭素数が 2 から 6 の脂肪酸の総称。酢酸、プロピオン酸、酪酸、イソ酪酸やイソ吉草酸などが含まれる。

CKD 患者では、健常者と比べて腸内細菌叢の多様性が減少するため<sup>33,34</sup>、これらの生体内濃度は、UTx と反して減少する。さらに、InS や pCS の前駆体となるインドールや *p*-クレゾールなどを産生する悪性の菌体が増加し、SCFA を産生する良性の菌体が減少する<sup>35</sup>。このような腸内細菌叢の乱れは、ディスバイオーシスと呼ばれ、腸管上皮のタイトジャンクションに関与するタンパク質の発現を低下させる要因となる。その結果、腸管透過性の亢進をきたし、UTx と菌体が、全身循環に侵入し易くなるため、慢性炎症が惹起される<sup>34,36-38</sup>。CKD によってディスバイオーシスが生じる機序は、一元的ではなく、合併する代謝性アシドーシスや虚血や浮腫による腸管機能の低下のほか、UTx の関与が考えられている<sup>37</sup>。したがって、CKD の病態と腸内細菌叢の状態は、相互に影響し合い、UTx の蓄積や炎症反応の助長を介して、腎機能とディスバイオーシスをさらに悪化させる、負の循環が存在する<sup>37,39</sup> (Fig. 2)。

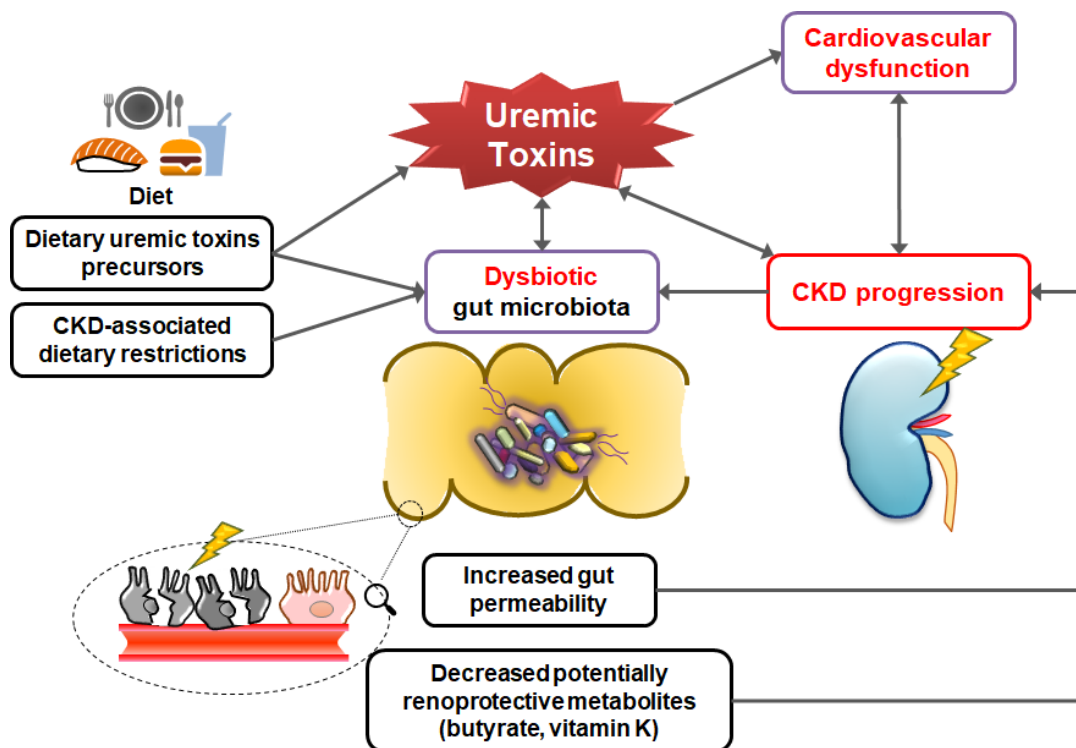


Figure 2 Bidirectional relationship between gut microbiota and chronic kidney disease (CKD) progression that may result in acceleration of CKD progression.

ここで、正常な腸内細菌叢が担う、宿主の脂肪酸やアミノ酸、胆汁酸代謝に対する寄与に顧みると<sup>40,41</sup>、ディスバイオーシスは、さらに多様な代謝物変化を介した、CKD 全身病態への関与が想定できる。これまでに、筆者らの研究グループは、腸内細菌叢が、尿毒症物質の産生と CKD 病態に与える影響を調べるため、無菌環境 (germ-free, GF) 下で飼育したアデニン食誘発性の慢性腎臓病モデル (renal failure, RF) マウス (以下、GF-RF マウスと称す) に対するメタボローム解析を実施した<sup>42</sup>。その結果、腎障害時の血中代謝物プロファイルにも大きな違いを及ぼすこと、そして InS、pCS、TMAO などを含む 11 種が、腎機能と腸内細菌叢の影響を大きく受ける「腸内細菌叢由来 UTx」であることを明らかにした<sup>42</sup>。しかし、これら個々の詳細な生理機能や CKD 全身病態との係り、腎障害との時空間的関連性については、未解明なものも多い。したがって、筆者は、その量的及び質的変動を詳細に捉えることが、「腸腎連関」を紐解く上で重要な意味を成すと考えた。近年、UTx などの代謝物分析は、液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法 (liquid chromatography/tandem mass spectrometry, LC-MS/MS) が主流であるが<sup>43-45</sup>、最新機器を駆使しても、感度、定量性、汎用性、利便性、網羅性などの分析化学的特性を全て兼ね備えた測定系の構築は、困難である。特に、LC 分離や MS のイオン化に付随する網羅性や定量性の問題により、研究目的や用途に応じた分析系を考えなければならない。例えば、生体中の UTx 濃度と腎機能の相関解析には、健常者検体を定量できる感度、多様な試料に適応できる堅牢性、及び精密な定量性を重視した絶対定量系が必要となる。また、膨大な腸内細菌叢関連代謝物から有意性のある分子の探索には、網羅性と簡便性を両立させた分析系が求められる。しかし一方で、有意な分子を見出した後に、バイオマーカーとして臨床実用するためには、簡便かつ汎用性に優れた免疫学的手法が、LC-MS/MS よりも有用となる。

そこで、本研究では、腎障害に関連する腸内細菌叢由来代謝物を主たる標的として、定量精度に特化した絶対定量法、臨床利用に適する免疫学的手法、及び網羅性を重視した相対定量手法、それぞれ 3 つの分析手法の構築を行った (Fig. 3)。各分析手法に係る課題を独自の技術によって解決し、新規定量系を構築できれば、「腸腎連関」に対する理解を推し進めるだけでなく、臨床バイオマーカー、新規治療標的の発見、さらには分析化学研究の発展にも結び付く。

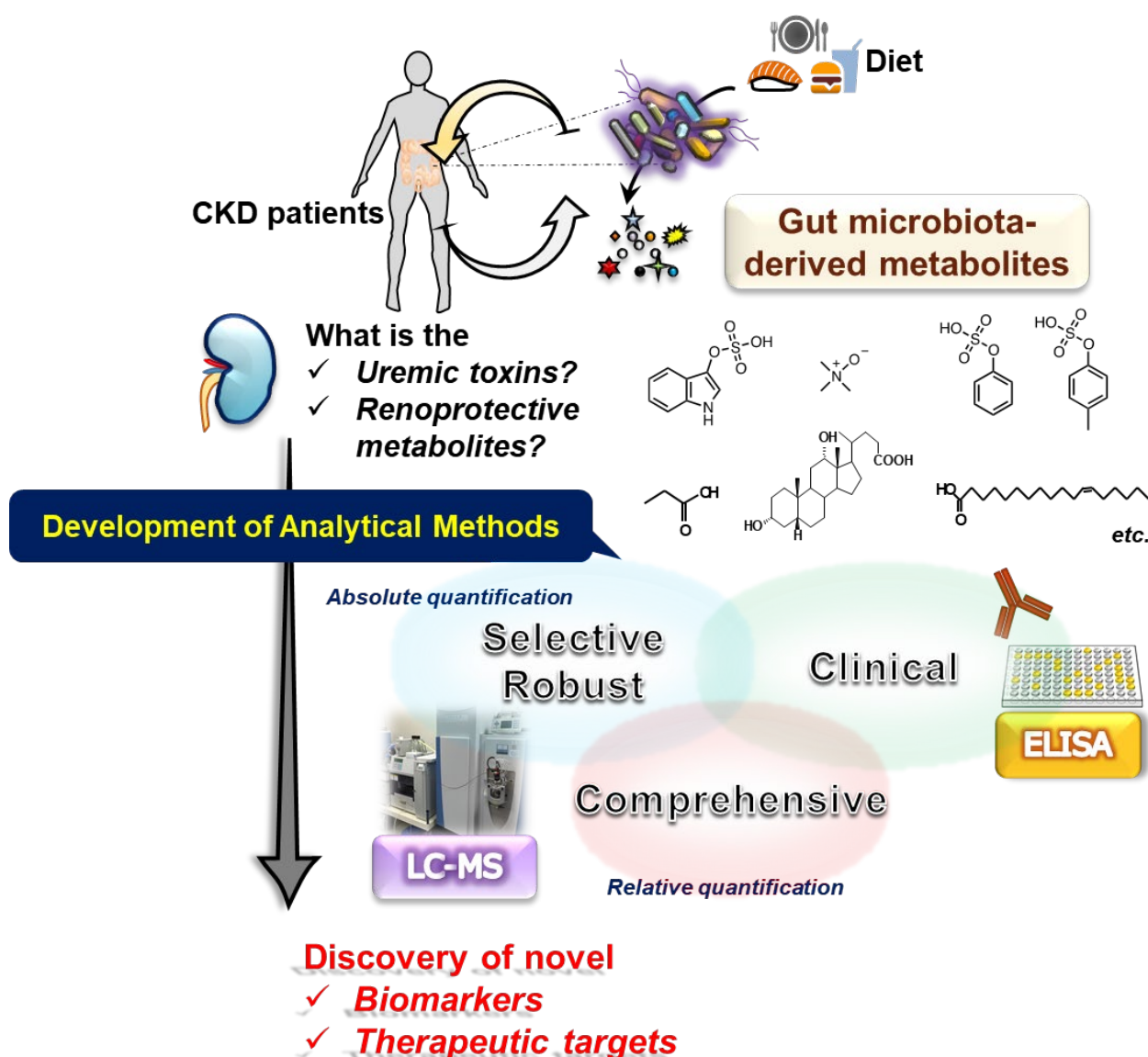


Figure 3 Overview of this study.

まず、本研究の第 1 章では、CKD 病態との関連性が示唆されている腸内細菌叢由来 UT<sub>x</sub> を標的とした、LC-MS/MS を用いる高感度かつ信頼性の高い一斉定量系の構築に挑んだ。単一固定相を用いたクロマトグラフィー分析に係る分離分析の課題を解決する手段として、ミックスドモードクロマトグラフィー技術を利用し、MS 及び LC 条件を精査して最適化するとともに、分析法バリデーションを実施したことを述べる。また、CKD 患者の腎機能と血清中の UT<sub>x</sub> 濃度との相関を解析した。

第 1 章にて構築した定量系を、糖尿病性腎臓病患者に対するコホート研究検体へ適用した結果、蛋白結合型 UT<sub>x</sub> であるフェニル硫酸 (phenyl sulfate, PS) が、糖尿病性腎臓病の病因及び予後予測マーカーであること、並びに PS の血中濃度の制御が、腎障害の新規治療法に繋がる可能性も見出した<sup>46</sup>。したがって、今後の腎疾患治療においては、臨床にて血中 PS 濃度を簡便かつ継続的に観察できる汎用性の高い定量法が求められる。しかし、地域医療施設を含む臨床現場において、LC-MS による PS 測定は、価格や汎用性などの点で容易ではない。故に、第 2 章では、抗 PS モノクローナル抗体の作製と Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) による血液中濃度定量手法の構築を行った。各節において、より特異性の高い抗体を得るためのハプテンデザインの、PS 類似体を用いた構造特異性の検証、及びヒト血清試料に対する ELISA の測定条件を精査したことを述べる。また、第 1 章で明らかにした CKD 患者血清中の PS 濃度を基にして、構築した ELISA の定量精度を検証した。

第 1 章及び第 2 章の研究を通じて、PS のような腸内細菌叢由来 UT<sub>x</sub> が、腎疾患病態に深く関わることを明らかにした一方で、筆者らは、GF-RF マウスが、腸内細菌叢由来 UT<sub>x</sub> の血中濃度が低下しているにも関わらず、通常の飼育環境 (specific pathogen free, SPF) 下で腎障害を呈したマウス (以下、SPF-RF マウスと称す) よりも腎機能障害が悪化しやすい、という逆説的な結果も得ていた<sup>42</sup>。Jang

らも、腎虚血再灌流による腎障害モデルにおいて、GF マウスが SPF マウスよりも腎機能が増悪するという同様の結果を報告している<sup>47</sup>。しかしながら、他の腎障害モデルでは、抗菌薬による腸管内の除菌を施すと、腎障害に起因する炎症物質の生成が抑えられ、腎組織障害の軽減効果があるという逆の結果も報告されている<sup>48,49</sup>。これらの所見は、腸内細菌叢が関連する代謝物が、宿主の腎機能に対して、増悪と保護の多彩な作用を有することを強く裏付けている。ここで筆者は、胆汁酸や馬尿酸、SCFAなどの、その化学構造中にカルボキシル基を持つ代謝物の生体内濃度が、GF-RF マウスにおいては顕著に抑制されることに注目した<sup>42</sup>。すなわち、腸内細菌叢が代謝に関与するカルボキシル基含有代謝産物が、病態に対して重要な生理機能を担う可能性があり、この仮説の検証には、生体中に存在するカルボキシル基含有代謝物の量的変動を精査する分析手法が必要であった。

そこで、第 3 章では、腸内細菌叢が、その産生に深く関与し、多彩な生理作用を有するカルボキシル基含有代謝物の包括的な相対定量手法の構築に挑んだ。より簡便、安価、迅速な方法を目指し、2-ピコリルアミン (2-picolylamine, 2PA) 安定同位体を用いる化学的同位体標識 (chemical isotope labeling, CIL)-LC-MS/MS を開発した。各節では、2-PA 安定同位体の合成法及び分析条件の精査結果と、定量精度、真度についての検証結果を述べる。さらに、GF-RF マウスと SPF-RF マウス間の胆汁酸や脂肪酸などの血中及び腸内量を比較解析し、腸内細菌叢が関わるカルボキシル基含有代謝物が、CKD 病態にもたらす役割について推察した。

## 第 1 章 ミックスドモードカラムを用いた LC-MS/MS による UTx 一斉定量系の構築

### 第 1 節 序

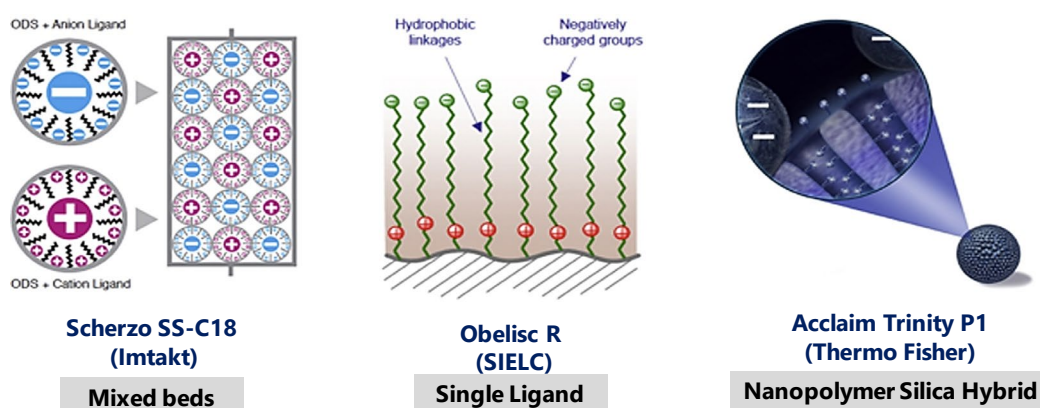
緒論でも述べたように、UTx は、「腸腎連関」の鍵となる分子であり、CKD 病態に生じる負の循環形成の中心的な位置にある (Fig. 2)。特に TMAO や InS などの腸内細菌由来 UTx は、生存予後や CVD との関連性が多くの研究によって明らかにされたため<sup>15-21</sup>、腸内細菌叢と CKD の関連をより詳細に追及していく上で、その定量評価が欠かせない。InS と同じく、蛋白結合型に分類される PS は、CKD の早期診断マーカーとなる可能性が、報告されている<sup>50,51</sup>。また、PS と同様にチロシンを原料として産生される 4-エチルフェニル硫酸 (4-ethylphenyl sulfate, 4-EPS) は、自閉症モデルマウスのメタボローム解析によって見出された化合物であり、腎機能障害時にも上昇する<sup>52</sup>。正常マウスへ 4-EPS を投与すると不安様行動が惹起されるため<sup>53</sup>、脳と UTx の関係性を繋ぐ化合物として意義深い。一方で、水溶性低分子型の UTx に属する 血清クレアチニン (creatinine, Cre) のように、現在最も確立された腎機能指標との併せた評価が、病態を解析する上で必要となる。Cre と同様に水溶性低分子型に属する 1-メチルアデノシン (1-methyladenosine, m1A) は、早期腎障害を反映するバイオマーカーや<sup>7</sup>、細胞ストレスの早期検出マーカーとして期待できるため<sup>54</sup>、宿主の全身状態の指標としても有用となる。したがって、これらの UTx の同時評価は、CKD の病態と腸内細菌叢由来 UTx の体内動態を詳細に結びつけることが可能となる。しかし、これら UTx は、食習慣や残存腎機能により、個体間で大きく濃度の変動するため<sup>55</sup>、堅牢、かつ精度の高い絶対定量法の開発が必要であった。また、化学構造が多岐に渡るため、選択性に優れた分析系が求められ

る。

近年の UTx 分析は、LC-MS/MS が主流であるが<sup>43-45</sup>、最も汎用されているオクタデシルシリル基 (octadecylsilyl, ODS) などを用いた逆相クロマトグラフィーでは、Cre や TMAO などの高極性化合物には不向きである。高極性化合物への選択性を向上させる手法としては、イオンペア試薬の使用が挙げられるが、MS のイオン検出部の汚染や感度の低下、カラムの劣化が問題となる。これまでに、高極性の UTx に対しては、親水性相互作用液体クロマトグラフィー (hydrophilic interaction liquid chromatography, HILIC)、又はアミドカラムを用いた LC-MS/MS 分析系が報告されている<sup>56-58</sup>。しかしながら、それらの分析系では、疎水性の高い UTx の保持能が悪く、化合物選択性に係る問題は解決されない。de Loor らは、ODS とは異なる保持メカニズムを有するフッ化フェニル固定相の分析カラムを用いて、ヒト血漿中の TMAO や InSなどを測定対象とした一斉測定法を報告した<sup>56</sup>。しかし、高極性化合物である TMAO のカラム保持時間は 0.27 分と極めて短く、他の化合物においても十分なピーク分離が達成しているとは言い難い分析条件であった。不十分なカラム保持やピーク分離は、デットボリュームなどの影響を受けやすく、また再現性や定量性も欠けやすい<sup>59</sup>。すなわち、類似極性 UTx の同時分析は、比較的容易であるが、広範囲の物理化学的性質を有する UTx の高精度一斉分析系の確立が困難であった。

そこで筆者は、上述の課題を解決するために、カラム固相に複数の異なる保持機構を有する充填剤を使用した、ミックスドモードカラムに着目した<sup>60,61</sup>。近年、Fig. 4 に示すような疎水性相互作用とイオン交換作用を組み合わせたタイプが、多く報告されている<sup>62,63</sup>。



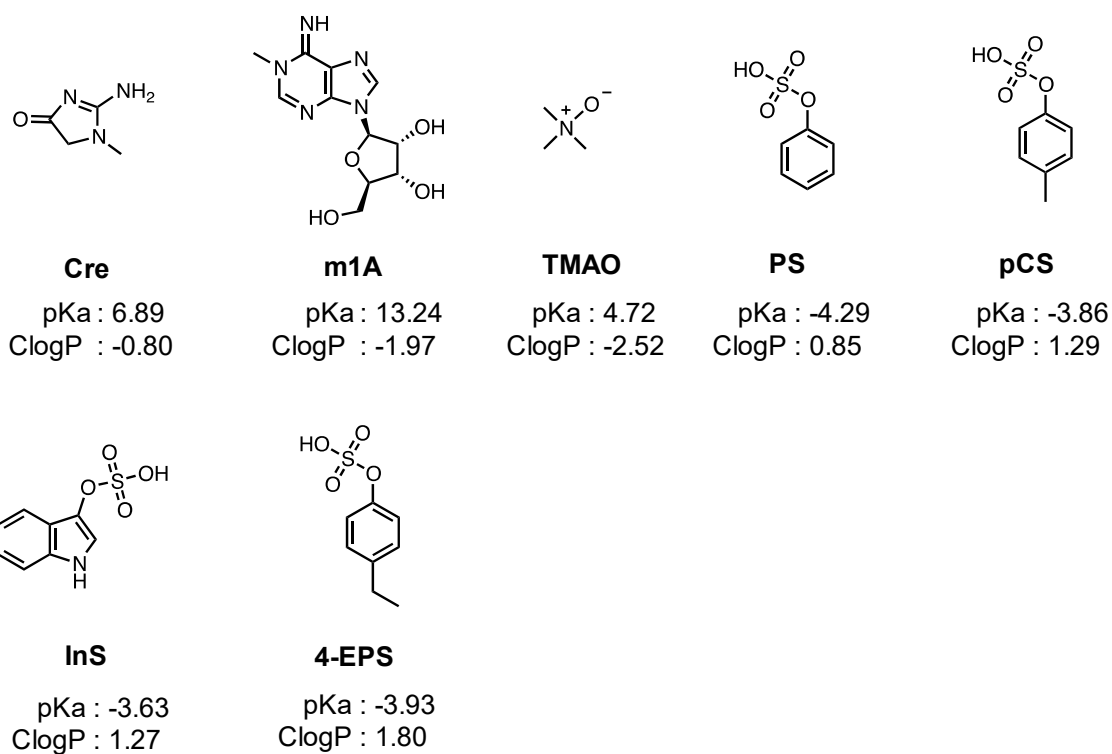


Zhang K *et al.* J Pharm Biomed Anal. (2016)

**Figure 4 Reversed-phase/ anion-exchange/ cation-exchange trimodal mixed-mode phases.**

このタイプの分離カラムの一つである Scherzo SS-C18 カラム（以下、SS-C18 と称す）は、ODS 基に強イオン交換基を多量に導入した固定相を有するため、疎水性相互作用に加えてアニオン性及びカチオン性の高極性化合物に対するイオン性相互作用も期待できる<sup>64,65</sup>。したがって、カチオン性化合物である TMAO などと、アニオン性化合物である InS などを含む様々な UTx の同時測定系に応用できると考えた。

このような背景から本章では、分析対象化合物の物理的極性に制限されにくい、包括的な UTx 分析系の確立を目指し、SS-C18 を用いた計 7 種の UTx (Cre、m1A、TMAO、PS、InS、pCS、及び 4-EPS) を分析対象とする一斉定量系を構築した (Fig. 5)。

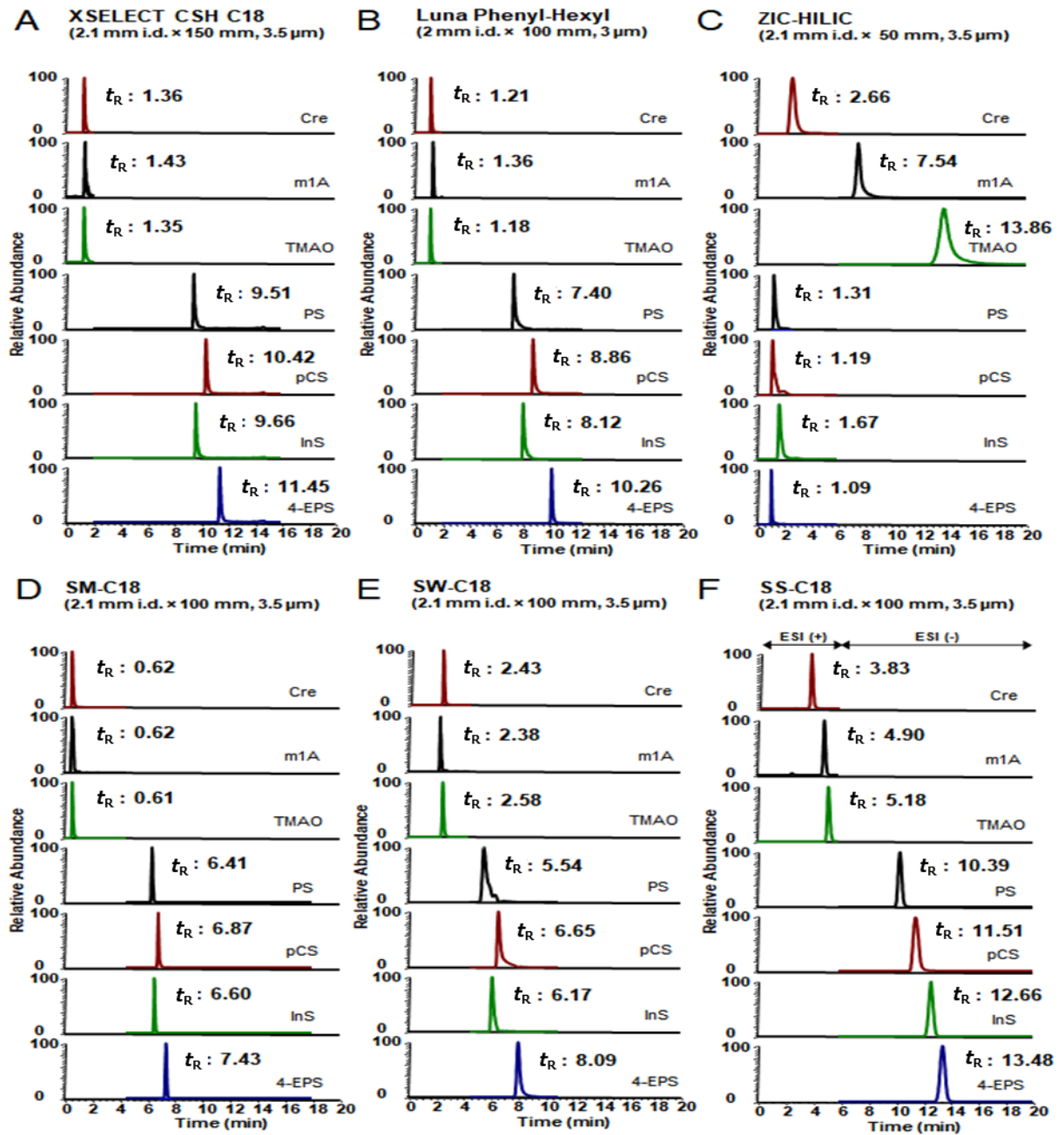


**Figure 5** Chemical structures, pKa, and ClogP of Cre, m1A, TMAO, PS, pCS, InS, and 4-EPS. pKa and ClogP are given with reference to SciFinder (American Chemical Society).

## 第 2 節 分析カラムの選定

Fig. 5 に示した分析対象化合物のオクタノール/水分配係数の予測値 (ClogP) から推察すると、Cre、m1A、及び TMAO は疎水性が低い化合物であることが判る。一方で、PS などの芳香環を有するサルフェート化合物は、比較的疎水性が高い化合物であるが、ClogP 値が近似しており、化学構造も類似しているため、通常の逆相クロマトグラフィーによって、これらをピーク分離させることは難しいと予想された。実際に逆相系カラム、順相カラム及びミックスドモードカラムを用いた際の分析対象化合物標品の SRM クロマトグラムを Fig. 6 に示した。逆相系の ODS 又は、Phenyl-Hexyl カラムを用いた場合、Cre、m1A、及び TMAO が殆ど保持されずに共溶出した。さらに、サルフェート化合物は、保持されるものの、良好なピーク分離を達成するためには、より長時間のグラジエント溶出を検討する必要がある (Fig. 6A, B)。一方で、主に親水性分配の作用により化合物を保持させる SeQuant ZIC-HILIC カラムを用いると、逆相系とは反対に、サルフェート化合物の保持が困難であった (Fig. 6C)。次いで、ODS/アニオン交換/カチオン交換混合モードのミックスドモードカラムである、Scherzo C18 ファミリーカラムが、本分析に適するか否かを調べた。Scherzo C18 ファミリーカラムには、弱イオンリガンドが導入された SM-C18 カラム、強イオンリガンドが少量に導入された SW-C18 カラム、強イオンリガンドが大量に導入された SS-C18 カラムの三種類のカラムが市販されており、これらを比較した (Fig. 6D, E, F)。その結果、Cre、m1A、及び TMAO をカラム保持させ、ピーク分離させるためには、強いイオン性相互作用を有する、SS-C18 が最適であることが判った。また、PS などのサルフェート化合物については、イオン性相互作用よりも ODS 基との相互作用が、その保持機序に強く影響していることが明らかになった。注目したい点は、他の ODS カラムや Scherzo C18 ファミリーカラムを用いた場合と比較して、SS-C18 を用いた

場合のみ、InS と pCS の溶出順序が逆転したことである。これは、InS のカラム保持には、ODS との相互作用に加えて、イオン性相互作用が強く関与していることを示唆しており、SS-C18 カラムが、サルフェート化合物の分離にも適していることを支持した。SS-C18 を用いた場合、ピーク幅が他のカラムよりも広くなる欠点があるが、再現性良く、対称性の高いピーク形状が得られた。したがって、UTx の同時定量分析に SS-C18 カラムを選択した。



(caption on next page)

**Figure 6 Selected reaction monitoring chromatograms obtained from a standard solution of creatinine (Cre), 1-methyladenosine (m1A), trimethylamine *N*-oxide (TMAO), phenyl sulfate (PS), p-cresyl sulfate (pCS), indoxyl sulfate (InS), and 4-ethylphenyl sulfate (4-EPS) using the (A) XSELECT CSH C18, (B) Luna Phenyl-Hexyl, (C) SeQuant ZIC-HILIC, (D) SM-C18, (E) SW-C18, and (F) SS-C18 columns.**

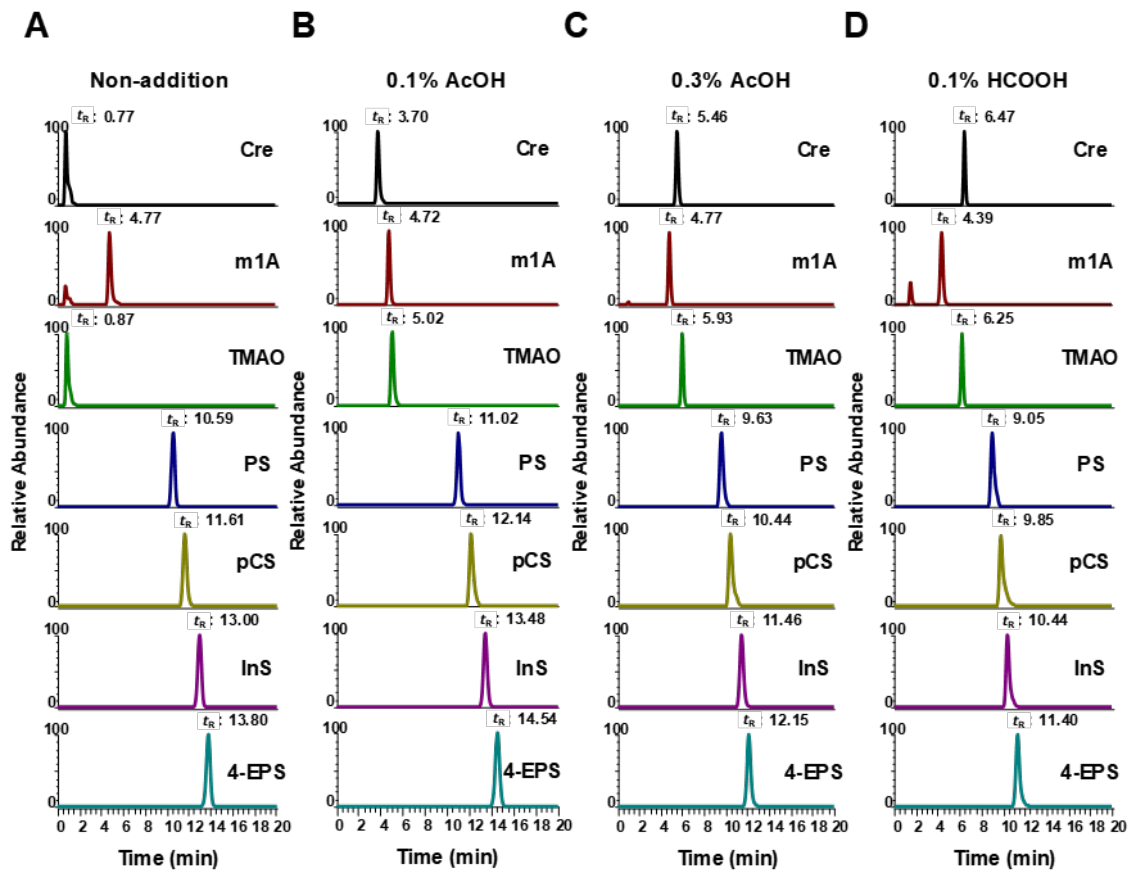
Each sample (1  $\mu$ L) was injected onto the column at a flow rate of 0.2 mL/min.

### 第 3 節 LC 条件の検討

SS-C18 カラムは、ODS 基に強イオン交換基を多量に導入した固定相を有するため、疎水性相互作用に対しては有機相の種類・割合が影響し、イオン結合に対しては、pH 及びイオン強度（塩濃度）がそれぞれ影響を受ける<sup>66</sup>。分析対象 UT<sub>x</sub> の物理化学的性質を考慮すると、Cre、m1A、及び TMAO は、カチオン交換基に保持され、PS などのサルフェート化合物は、アニオン交換基と ODS 基に保持されると予想される。本節では、それらの影響を精査して、全ての測定対象化合物での良好なピーク形状・分離を達成し得る最適な移動相選択とそのグラジエント条件設定を試みた。

ミックスドモードカラムは、ODS カラムと比較して、より高い有機溶媒比率下での分離、保持が可能となる。そのため、カラム圧力を考慮して、有機溶媒にアセトニトリル (MeCN) を選択した。また、データは示していないが、酢酸アンモニウムなどの塩を添加しない移動相条件の場合、全ての分析対象 UT<sub>x</sub> が溶出されなかった。したがって、イオン性相互作用が、本測定対象化合物の分離と保持に強く影響していると考えられた。移動相中の塩濃度を増加させると、ピーク幅を狭めることができたが、分離やピークの形状が悪化したため、最終的に、10 mmol/L の酢酸アンモニウム緩衝液を含む 80%MeCN を移動相 B として選定した。次いで、移動相 A の pH の影響を検討した。Cre や TMAO をカチオン交換基と強く結合させるためには、移動相液中の pH を pKa より低く保つことが有効な手法と考えられる。そこで、移動相 A の酸の強さが、カラム保持に与える影響について検討した。移動相に酸を添加しない場合、予想通り、Cre と TMAO は保持されなかった (Fig. 7A)。移動相に 0.1%の酢酸を添加すると、全ての分析対象 UT<sub>x</sub> を良好に保持、分離させることに成功した (Fig. 7B)。一方で、溶媒中の酢酸濃度を 0.3%に増加させた場合、若しくは、0.1%ギ酸に変更させた場合は、Cre と TMAO が、より強く保持されたが、それらのピーク分離が

困難となり、さらにサルフェート化合物のピーク形状が悪化した (Fig. 7C, D)。また、m1A 及びサルフェート化合物の保持時間は、酸の強さによって大きな変動がなかった。これは、それぞれ極めて高い pKa と低い pKa を有するため、検討した pH 範囲内では、化合物の解離状態の変化が小さく、カラム保持挙動に影響を与えなかったと考えられる。すなわち、本分析系においては、移動相の初期条件として、弱酸と低い塩濃度を選択することが最適であり、塩と有機溶媒によるグラジエント溶出によって、ODS と両イオン交換基の相互作用を効率的に活かした、カラム保持・分離が達成できることが判った。



**Figure 7** Comparison of SRM chromatograms of analytes obtained from standard solutions. The experimental conditions were as follows: (A) Without acidic eluent as the mobile phase A, (B) 0.1% acetic acid added to the mobile phase A, (C) 0.3% acetic acid added to the mobile phase A, and (D) 0.1% formic acid added to the mobile phase A.

#### 第 4 節 MS/MS 条件の検討

MS における electrospray ionization (ESI) 法では、まず、液体の流れるステンレスニードルに高電圧を印加し、液滴の表面を帯電させる。帯電した液滴において、同極性電荷のクーロン力が液体の表面張力を上回った際に、液滴が爆発してより小さな微粒子となる。この現象を繰り返すことで脱溶媒を行い、最終的に目的化合物を気相イオンとして MS 内部に導入する<sup>67</sup>。したがって、移動相中の揮発性有機溶媒比率を高めることで、表面張力を押さえ、検出感度の向上を図ることが期待できる。そこで、本節では、より高感度なイオン化条件を得るために、ポストカラムインフュージョンシステムを導入し、最適な有機溶媒の種類について検討を行った。

LC の移動相として汎用されている、メタノール (MeOH)、MeCN、及び イソプロパノール (IPA) を流速 400  $\mu\text{L}/\text{min}$  で上乘せした際に得られた分析対象物のピーク面積を比較した結果を Table 1 に示した。非添加の場合と比べて、m1A は比較した溶媒全てにおいて、感度が 10 倍以上向上した。

**Table 1 Comparison of peak area ratio (with vs. without post-column addition).**

Analyte	Peak area ratio (vs. without post-column addition)		
	MeOH	MeCN	IPA
Creatinine (2 $\mu\text{mol}/\text{L}$ )	0.8	2.3	0.9
1-Methyladenosine (0.007 $\mu\text{mol}/\text{L}$ )	10.9	15.9	12.9
Trimethylamine <i>N</i> -oxide (0.4 $\mu\text{mol}/\text{L}$ )	2.0	2.6	1.3
Phenyl sulfate (0.4 $\mu\text{mol}/\text{L}$ )	1.1	2.2	1.1
<i>p</i> -Cresyl sulfate (2.7 $\mu\text{mol}/\text{L}$ )	1.2	2.1	1.0
Indoxyl sulfate (0.8 $\mu\text{mol}/\text{L}$ )	1.1	4.8	1.1
4-Ethylphenyl sulfate (0.1 $\mu\text{mol}/\text{L}$ )	1.9	2.6	1.1



MeCN を用いた場合のみ、全ての分析対象物の感度が 2 倍以上向上したため、本分析系では、MeCN を選択した。カラム分離後に溶媒が添加されるため、ピーク分離や形状には全く影響しなかった (Fig. 8)。

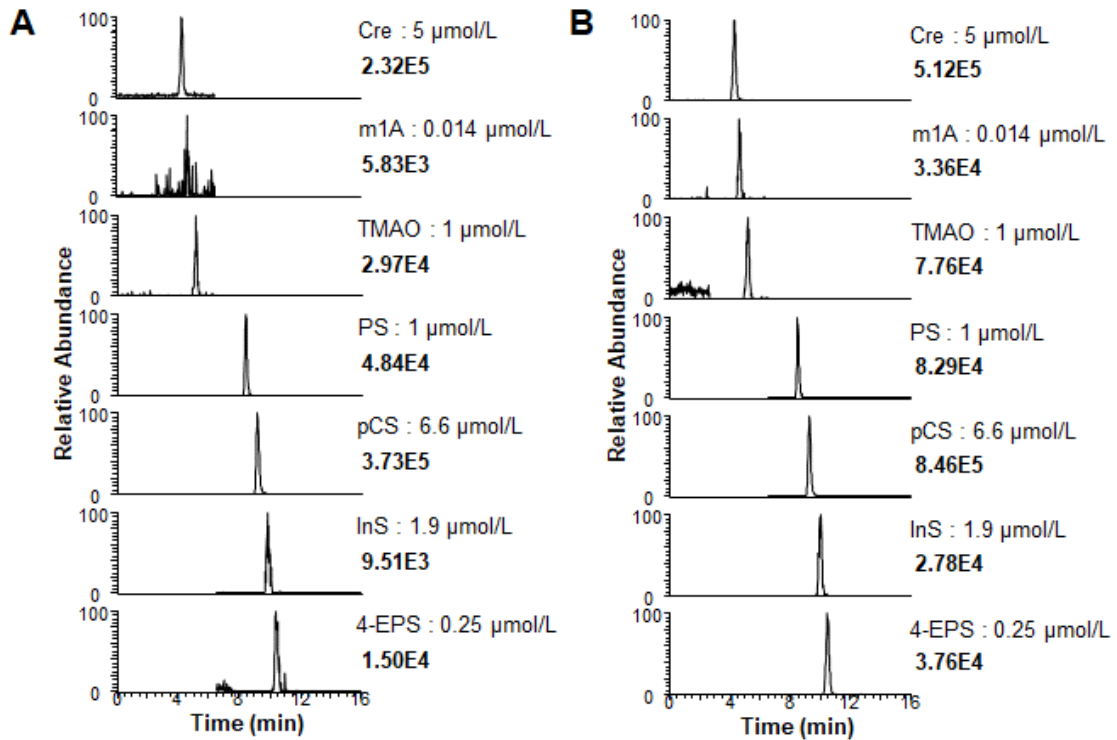


Figure 8 SRM chromatograms and signal intensities obtained (A) without and (B) with post-column addition of acetonitrile.

## 第 5 節 m1A- $d_5$ 、pCS- $d_5$ 及び 4-EPS- $d_4$ の合成

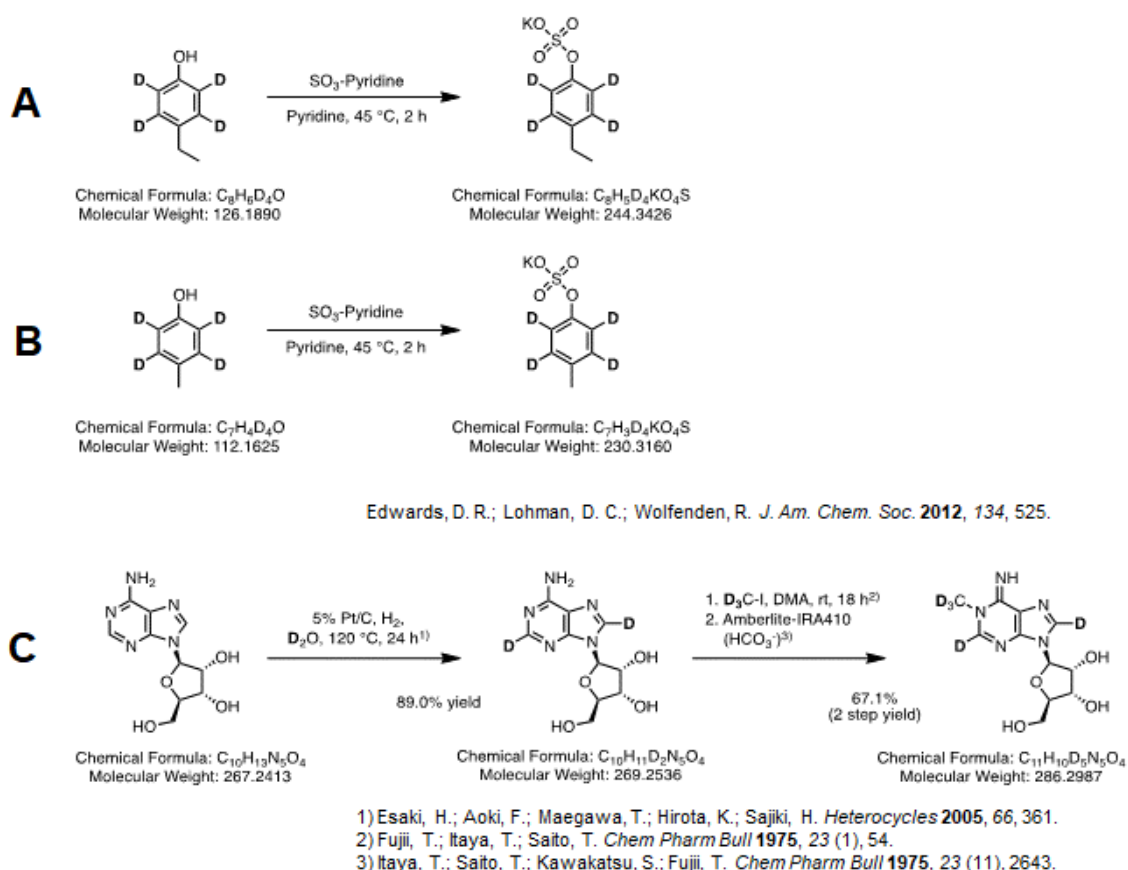
内標準定量法において構造類似体を内標準物質 (internal standard, IS) として用いた場合、マトリックス効果によるイオン化抑制の影響を補正しきれないことから、信頼性の高い定量系の構築は困難である<sup>68,69</sup>。マトリックス効果とは、共溶出するイオンにより測定対象のイオン化が促進されたり抑制されたりする現象の総称である<sup>70</sup>。生体試料の場合の多くは、イオン抑制効果が、測定誤差やばらつきの要因となる。マトリックス効果を補正するためには、対象化合物と同一な保持時間、イオン化効率をもち、かつ対象化合物と異なる  $m/z$  を持つ化合物が必要となる。多くの場合、 $^2\text{H}$  (D) や  $^{13}\text{C}$  で標識された安定同位体が、その要件を満たす。すなわち安定同位体を IS として用いることが望ましい。m1A、pCS 及び 4-EPS の重水素標識体は、安定同位体の入手が困難であったため、独自で有機合成を行い、全ての測定対象化合物に対する安定同位体を内標準物質として用意した。

pCS 及び 4-EPS の重水素標識合成においては、それぞれ *p*-クレゾール及び 4-エチルフェノールの重水素標識体を出発原料とし、Edwards らの方法に基づいた合成ルートを計画した<sup>71</sup> (Fig. 9A, B)。すなわち、各原料をピリジン溶媒下、硫酸・ピリジンとともに攪拌することで、フェノール性水酸基がサルフェート基へと穏和な条件で効率的に変換される反応を利用して、pCS- $d_4$  及び 4-EPS- $d_4$  を合成した。

次いで、m1A の重水素標識化合物を合成することとした。合成アプローチとして、まず、Sajiki らによって開発された、不均一白金族触媒を用いた重水素置換反応を用いた<sup>72-74</sup>。この方法は、不均一白金族触媒存在下で、重水 ( $\text{D}_2\text{O}$ ) を重水素源とし、水素ガス ( $\text{H}_2$ ) とともに攪拌することで、不活性な炭素-水素 (C-H) 結合を炭素-重水素 (C-D) 結合へと比較的穏和な条件で効率的に変換する反応に基づくものである。この重水素化置換反応自体も非常に簡便、低コストで完遂できる利点を有する。こ

の方法は適用できる化合物が多岐にわたり、m1A の合成原料となるアデノシンにも応用されていた<sup>75</sup>。既報どおり、Pt/C 触媒下にてアデノシンの 2 位と 8 位が効率良く重水素置換された。その後、標識したアデノシンをジメチルアセトアミド条件で重水素ヨウ化メチルと反応させることによって、1 位へ選択的に重水素メチル基を導入し、m1A-*d*<sub>5</sub> を合成した(Fig. 9C)。

pCS-*d*<sub>4</sub> 及び 4-EPS-*d*<sub>4</sub> については、元素分析にて純度を確認し、内部標準物質としての利用妥当性を確認した。m1A-*d*<sub>5</sub> は、nuclear magnetic resonance (NMR) 及び 高分解能質量分析計 (high-resolution mass spectrometry, HRMS) にて重水素標識率を確認し、内部標準物質としての利用妥当性を確認した。



**Figure 9** Synthesis of deuterated internal standards. (A) Synthesis of 4-EPS-*d*<sub>4</sub> from 4-ethyl phenol-*d*<sub>4</sub>, (B) synthesis of pCS-*d*<sub>4</sub> from *p*-cresol-*d*<sub>4</sub>, and (C) synthesis of m1A-*d*<sub>5</sub> from adenosine.

## 第 6 節 分析バリデーション

次いで、構築した系について、分析バリデーションを実施した。まず、分析物濃度が前処理時間や温度によって影響されないことを確認にするために、除タンパク処理を施した試料と未処理試料を対象に、各温度における安定性を調べた (Table 2)。

**Table 2 Results of stability test (n = 4; mean ± standard deviation, %).**

Analyte	Condition	Bench-top stability test				Processed sample stability test	
		0.5 h	1 h	3 h	24 h	1 h	3 h
Creatinine	on ice	91.3±1.7	89.2±4.5	96.2±2.3	102.5±3.5		
	room temp.	93.2±3.3	95.0±4.7	98.1±4.1	94.7±7.4		
	60°C	92.2±2.0	98.2±1.4	101.8±2.6	91.8±4.2	99.2±3.5	86.8±1.5
1-Methyladenosine	on ice	105.3±2.9	101.9±0.9	96.9±3.2	93.4±5.8		
	room temp.	100.3±3.1	97.1±1.7	93.3±5.7	80.3±1.7		
	60°C	69.2±1.8	47.5±0.6	7.5±3.2	2.3±6.8	100.5±4.1	109.9±3.0
Trimethylamine <i>N</i> -oxide	on ice	90.8±1.3	91.5±3.2	100.9±1.8	103.3±3.7		
	room temp.	91.9±0.8	90.7±2.3	96.6±3.8	94.3±6.9		
	60°C	92.0±2.1	94.3±1.7	103.5±6.0	93.6±3.8	99.1±3.3	110.3±0.8
Phenyl sulfate	on ice	118.1±1.7	111.3±1.7	88.2±3.2	92.7±1.4		
	room temp.	116.1±2.5	113.3±1.7	94.3±9.0	96.8±1.6		
	60°C	109.7±7.1	113.1±3.6	109.3±1.9	95.1±5.8	101.3±2.2	110.4±1.6
<i>p</i> -Cresyl sulfate	on ice	100.6±1.3	102.5±1.9	107.6±1.9	100.7±1.5		
	room temp.	101.5±0.9	103.5±1.4	108.0±2.3	100.0±1.8		
	60°C	99.0±2.3	104.2±3.1	104.5±0.7	103.7±2.9	98.9±3.6	95.3±1.3
Indoxyl sulfate	on ice	108.9±2.1	103.7±2.6	103.3±4.5	92.2±2.5		
	room temp.	109.7±2.7	103.8±2.5	100.2±5.5	100.9±6.8		
	60°C	102.1±3.1	97.9±5.7	93.5±4.0	102.7±1.7	102.3±3.6	106.3±2.8
4-Ethylphenyl sulfate	on ice	103.2±0.9	91.7±10.8	93.7±3.6	87.9±2.4		
	room temp.	105.8±1.5	102.1±1.3	94.7±2.3	99.6±6.0		
	60°C	105.1±1.1	99.2±3.5	97.8±1.9	103.5±3.0	100.2±5.7	129.6±1.8

本測手系における測定検体は、凍結保存したものを融解後に直ちに前処理を実施している。また、10  $\mu\text{L}$  という極めて少量の検体に対して、MeCN 添加による簡便な除タンパク法を採用しており、1 検体は、30 分以内に処理が完了する。血漿中の m1A は、60°C 下で時間依存的に分解したが、室温では、少なくとも 3 時間程度は安定であった。除タンパク処理後は、60°C 下、3 時間でも安定であった。他の分析対象化合物は、すべての試験条件下において、濃度に変動は無かった。したがって、通常の前処理条件下では、分析物の濃度に影響されないことが判った。

次いで、検量線試料における代替マトリックス使用の妥当性について評価した。分析物は、ヒト血漿及び血清中に存在する内因性化合物あるため、ブランクマトリックス溶媒を用意することは困難である。そのため、代替マトリックスとして水を用いた際の検量線とヒトプール血漿へ標準液を添加して作成した検量線とを比較し、recovery factor (血漿添加時の傾き/水中の傾き) を算出した (Table 3)。少なくとも 6 点の濃度点、及び 1 濃度につき 4 回の繰り返し測定点を検量線用データに用いた。検量線の相関係数は、すべての分析対象物に対して 0.99 以上であり、良好な直線性を示した。すべての分析対象化合物の recovery factor は、0.92—1.06 の範囲であり、ほぼ一致してた。これらのデータより、代替マトリックスとして、水を用いることが可能であると判断した。

**Table 3 Regression equations, LOQs, and recovery factors of the seven analytes.**

Analyte	Linear range ( $\mu\text{mol/L}$ )	Point	Regression equation	Correlation coefficient	LOQ ( $\mu\text{mol/L}$ )	Recovery factors <sup>a</sup>
Creatinine	5 - 1000	8	$Y = 0.0628 X + 0.0380$	0.993	5	1.00
1-Methyladenosine	0.0178 - 3.56	8	$Y = 0.0128 X - 0.0087$	0.998	0.0178	1.05
Trimethylamine <i>N</i> -oxide	0.4 - 200	9	$Y = 0.1562 X - 0.0021$	0.998	0.4	0.92
Phenyl sulfate	1 - 200	8	$Y = 0.0611 X - 0.0054$	0.999	1	1.03
<i>p</i> -Cresyl sulfate	2.7 - 132.8	6	$Y = 0.4107 X - 0.0196$	0.999	2.7	0.99
Indoxyl sulfate	1.9 - 194.6	7	$Y = 0.1208 X - 0.0203$	0.998	1.9	1.00
4-Ethylphenyl sulfate	0.1 - 25	8	$Y = 0.0891 X - 0.0025$	0.995	0.1	1.06

<sup>a</sup>: Recovery factor = Slope<sub>spiked plasma</sub>/Slope<sub>solution</sub>.

続いて、日内及び日間の定量精度及び真度を、複数ロットのヒトプール血漿及び単一ロットのヒトプール血清に標準溶液添加した試料を用いて評価した (Table 4、Table 5)。厚生労働省の「医薬品開発における生体試料中薬物濃度分析法のバリデーションに関するガイドライン」に則り、全ての分析対象化合物に対する真度・精度は、各濃度 15%以内 (定量下限においては 20%) であった。これらの結果は、本分析系が、正確で信頼性があり、そして再現性があることを示す。また、本分析対象化合物すべての安定同位体標識体を IS として用いた分析系はこれまでに報告されておらず、様々なヒト血液のマトリックス効果を補正できる堅牢な分析系が構築できた。

**Table 4 Intra- and inter-day precision and accuracy.**

Analyte	Spiked level ( $\mu\text{mol/L}$ )	Intra-day		Inter-day	
		Accuracy (%)	Precision (%)	Accuracy (%)	Precision (%)
Creatinine	20	6.2	8.6	2.6	12.3
	50	-6.0	4.4	-3.8	9.3
	500	-1.6	2.4	-0.3	3.6
	1000	0.6	1.8	-1.5	3.6
1-Methyladenosine	0.0711	0.4	16.4	3.6	14.2
	0.178	-0.1	5.2	-4.8	9.1
	1.78	5.6	2.3	-2.5	6.7
	3.56	3.3	1.8	-3.6	5.6
Trimethylamine <i>N</i> -oxide	4	-13.9	9.0	-11.9	7.2
	10	3.4	6.5	-5.3	8.1
	100	9.2	7.6	-3.5	10.7
	200	9.2	3.7	-2.3	8.8
Phenyl sulfate	1	-18.2	7.9	-10.8	10.2
	4	-11.4	3.2	-6.5	6.7
	100	0.8	1.2	0.7	2.2
	200	2.8	0.8	0.1	2.3
<i>p</i> -Cresyl sulfate	6.64	-8.4	2.5	-4.8	6.7
	13.3	-3.0	1.9	-7.4	4.4
	26.6	1.0	2.2	-1.5	5.7
	66.4	-3.6	2.1	-1.7	6.6
Indoxyl sulfate	1.95	-8.3	5.5	-7.2	9.4
	7.79	-8.2	2.4	-10.0	3.8
	19.5	-8.8	1.4	-8.6	2.9
	195	0.6	0.6	-1.7	3.5
4-Ethylphenyl sulfate	0.25	11.3	3.6	7.6	3.8
	0.5	-8.1	3.8	-8.0	6.0
	2.5	3.1	2.3	-3.6	5.5
	25	11.6	3.3	1.7	8.0

**Table 5 Inter-day precision and accuracy.**

Analyte	Spiked level ( $\mu\text{mol/L}$ )	Plasma (Lot. #2)		Plasma (Lot. #3)		Serum	
		Intra-day		Intra-day		Intra-day	
		Accuracy (%)	Precision (%)	Accuracy (%)	Precision (%)	Accuracy (%)	Precision (%)
Creatinine	20	-5.6	8.5	-8.3	10.3	9.8	14.5
	50	-6.2	5.2	-5.9	8.2	-5.0	6.5
	500	-3.0	2.0	-8.5	4.8	-6.2	11.6
1-Methyladenosine	0.0711	13.8	4.0	9.9	7.9	1.2	4.8
	0.178	4.3	6.8	-6.8	6.6	0.76	2.6
	1.78	0.8	4.3	-7.3	1.8	0.17	1.8
Trimethylamine <i>N</i> -oxide	4	-6.7	5.3	3.6	5.3	-8.5	6.0
	10	-0.1	5.6	7.8	5.9	-5.2	5.0
	100	0.2	4.6	9.4	2.5	-1.0	4.4
Phenyl sulfate	1	-7.0	5.6	-10.7	10.6	-3.1	9.2
	4	-12.3	9.3	-3.6	3.2	-5.6	3.2
	100	-4.0	2.1	-6.5	4.5	-13.1	7.7
<i>p</i> -Cresyl sulfate	6.64	-0.8	6.7	7.0	5.6	-3.1	7.0
	26.6	4.0	11.0	-5.4	2.0	-13.3	1.9
	66.4	-0.9	2.9	-12.0	6.0	-6.8	9.9
Indoxyl sulfate	1.95	-13.4	8.2	-14.8	4.6	2.5	7.9
	19.5	-2.3	2.2	7.2	4.4	6.2	4.4
	195	7.1	2.0	-1.4	2.1	10.2	1.8
4-Ethylphenyl sulfate	0.25	11.9	3.8	4.3	1.4	14.5	6.6
	2.5	-11.1	1.5	-9.0	2.4	-11.2	1.1
	25	-12.7	1.6	-7.8	0.9	-14.2	1.4



## 第 7 節 CKD 患者血漿中の UTx 濃度と腎機能との相関解析

構築した分析系を用いて、新松戸病院に通院されていたステージ 2—5 に属する計 19 名の CKD 患者血清中の各 UTx 濃度を明らかにした (Table 6)。尚、本節の研究は、東北大学大学院医学研究科倫理委員会による承認を経て、実施した。

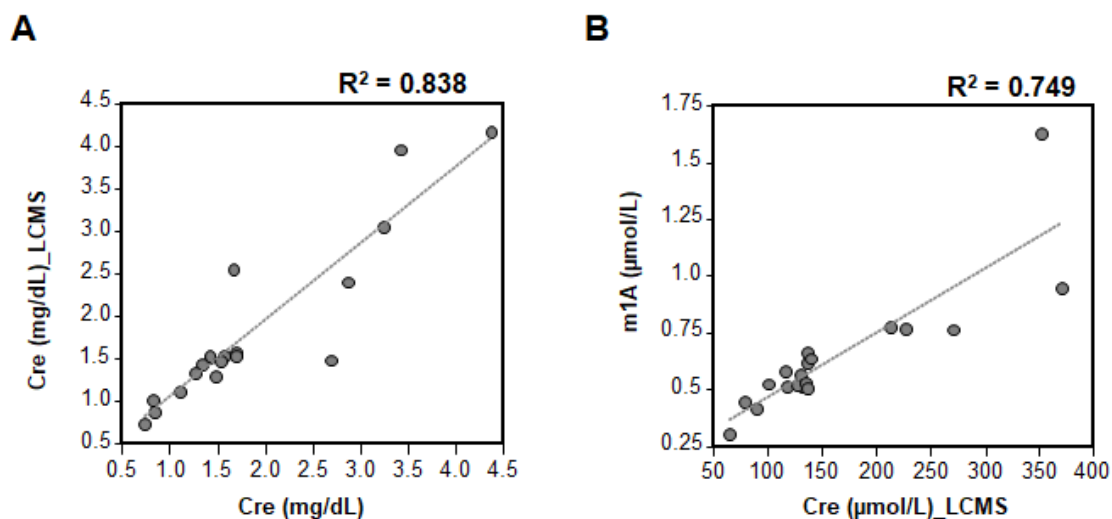
**Table 6 Quantitative analyte concentrations in serum samples from stage 2–5 CKD patients.**

Analyte (μmol/L)	n	Mean	SD	Min	Max	n < LOQ
Creatinine	19	161	86.0	64.9	370	0
1-Methyladenosine	19	0.643	0.282	0.305	1.63	0
Trimethylamine <i>N</i> -oxide	19	39.7	39.6	3.81	158	0
Phenyl sulfate	19	20.3	23.9	1.22	104	0
<i>p</i> -Cresyl sulfate	16	29.0	21.4	<LOQ (2.66)	80.6	3
Indoxyl sulfate	18	21.3	20.5	<LOQ (1.95)	73.3	1
4-Ethylphenyl sulfate	12	1.59	1.52	<LOQ (0.1)	4.73	7

分析物のうち、pCS、InS、及び 4-EPS は、数名の患者において定量下限 (limit of quantification, LOQ) を下回ったが、その他については、全検体の濃度を算出できた。本測定によって得られた CKD 患者血清中の各 UTx 濃度は、既告の様々なカラムを用いて測定された血清濃度範囲と、ほぼ一致しており<sup>17,76,77</sup>、ミックスドモードクロマトグラフィーを用いた本分析系の信頼性が裏付けられた。

次いで、腎機能指標となる、Cre 及び m1A に着目した。臨床における血清 Cre 濃度は、酵素学的手法による算出が最も一般的である。そこで、本測定系で得られた Cre 濃度と酵素法で得られた Cre 濃度とを比較した結果、高い相関性が認められた (Fig. 10A)。また、早期の腎障害マーカーとして期待される血清 m1A 濃度につ

いて、同様に Cre 濃度との相関を解析した結果、こちらも既報どおり<sup>54</sup>、高い相関性が認められた (Fig. 10B)。



**Figure 10** (A) Correlations between Cre concentrations measured by LC-MS/MS and those determined using an optical enzymatic technique. (B) Correlations between m1A and Cre concentrations in 19 patients with stage 2–5 CKD, as determined by LC-MS/MS.

これらの結果は、本分析系が、腎機能の状態と CKD 病態との関連性が高い複数の血中 UTx 濃度の両者を、同時に把握可能であり、病態解析や治療薬開発において、有用なツールとなることを示した。

続けて、Fig. 11 に本分析系で求めた血清 Cre 濃度と各 UTx 濃度の相関関係を示す。InS と PS は、Cre と正の相関があったが、他の UTx の間には相関性は認められなかった。重要なことに、数名の CKD 患者は、Cre が低いにもかかわらず、死亡のリスク因子となり得る TMAO や pCS が比較的高濃度を示していた。したがって、本分析系は、このような潜在的なリスクを有する CKD 患者の早期発見に繋がるスクリーニング法としての活用が期待できる。

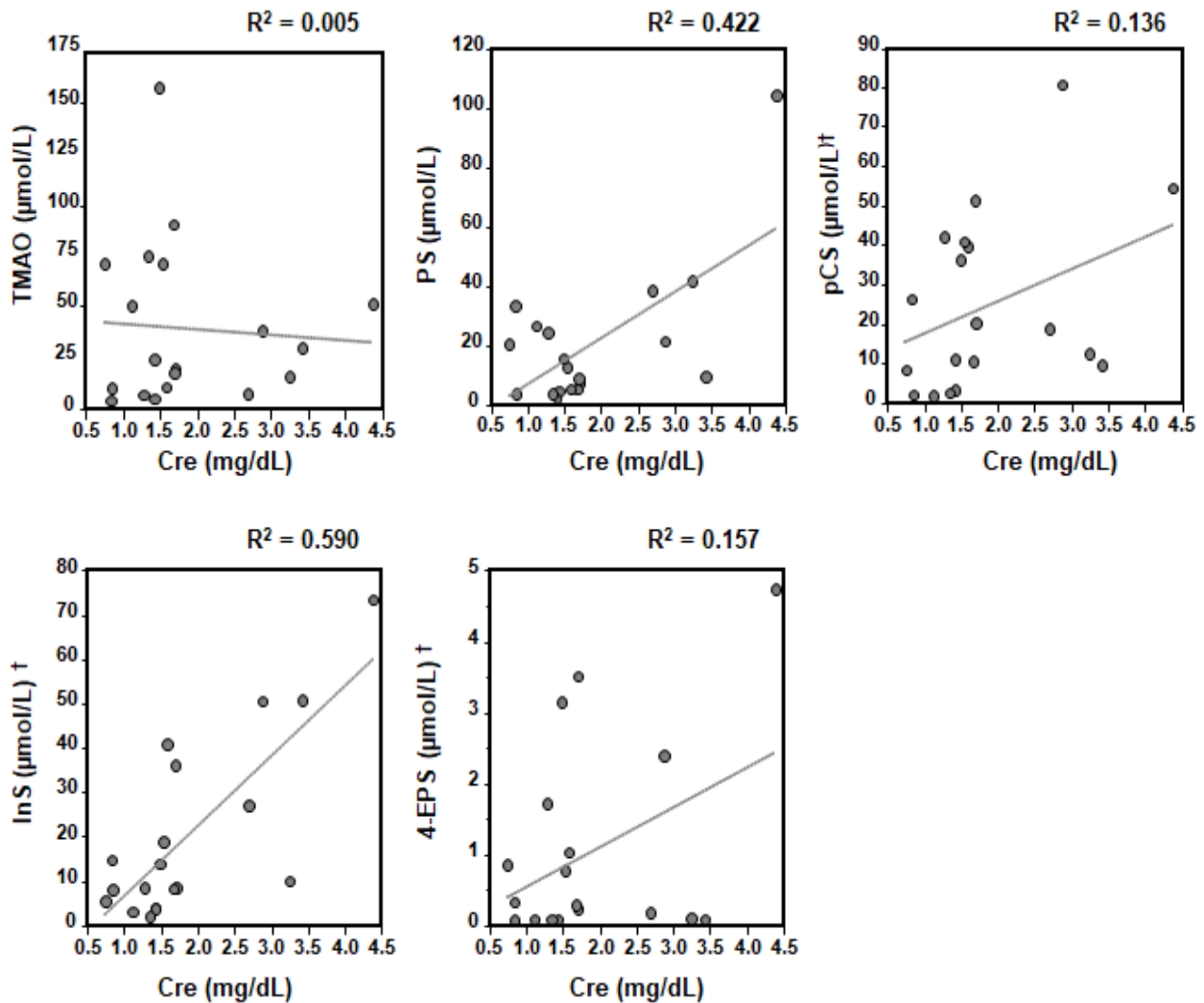


Figure 11 Correlations between serum Cre (SCr) concentrations, determined using an optical enzymatic technique, and uremic toxin (UTx) levels, determined by liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), in 19 patients with stage 2–5 chronic kidney disease (CKD).

†includes lower than the limit of quantification (LOQ).

同様に、CKD 患者における推算糸球体濾過値 (estimated glomerular filtration rate, eGFR) 又は血清尿素窒素 (blood urea nitrogen, BUN) と各 UTx との相関性を分析した (Fig. 12, Fig. 13)。

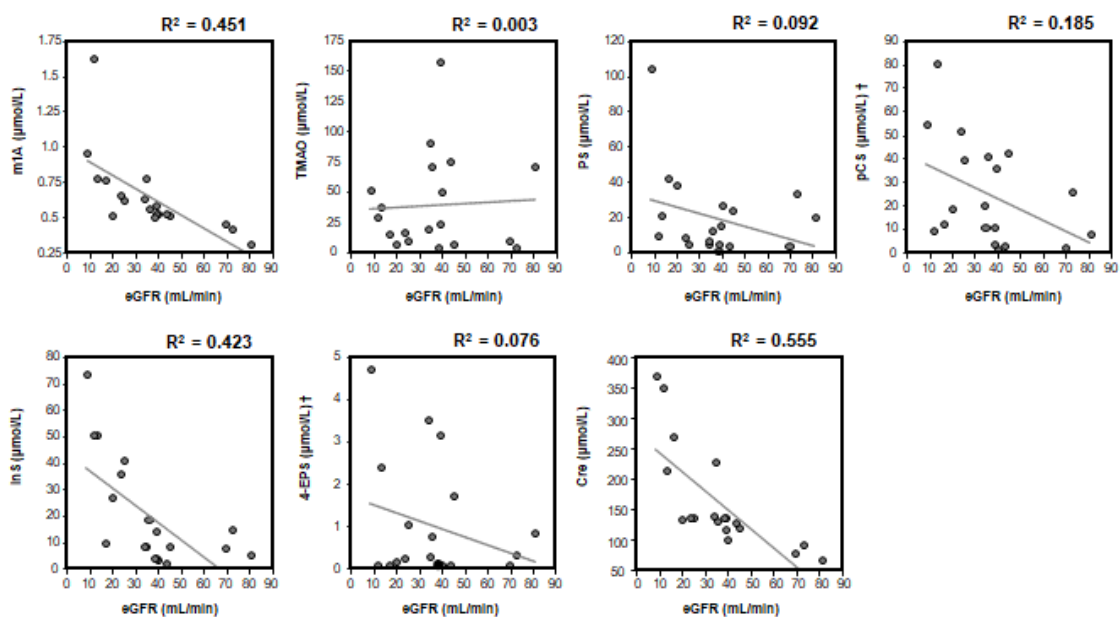


Figure 13 Correlations between estimated glomerular filtration rate (eGFR), based on the Japanese population, and concentrations of analytes in 19 patients with stage 2–5 CKD, as determined by LC-MS/MS. The formula is as follows:  $eGFR = 194 \times SCr^{-1.094} \times age^{-0.287}$ , where age is in years, SCr is in mg/dL, and the GFR is in mL/min/1.73 m<sup>2</sup> body surface area. †includes lower than the LOQ.

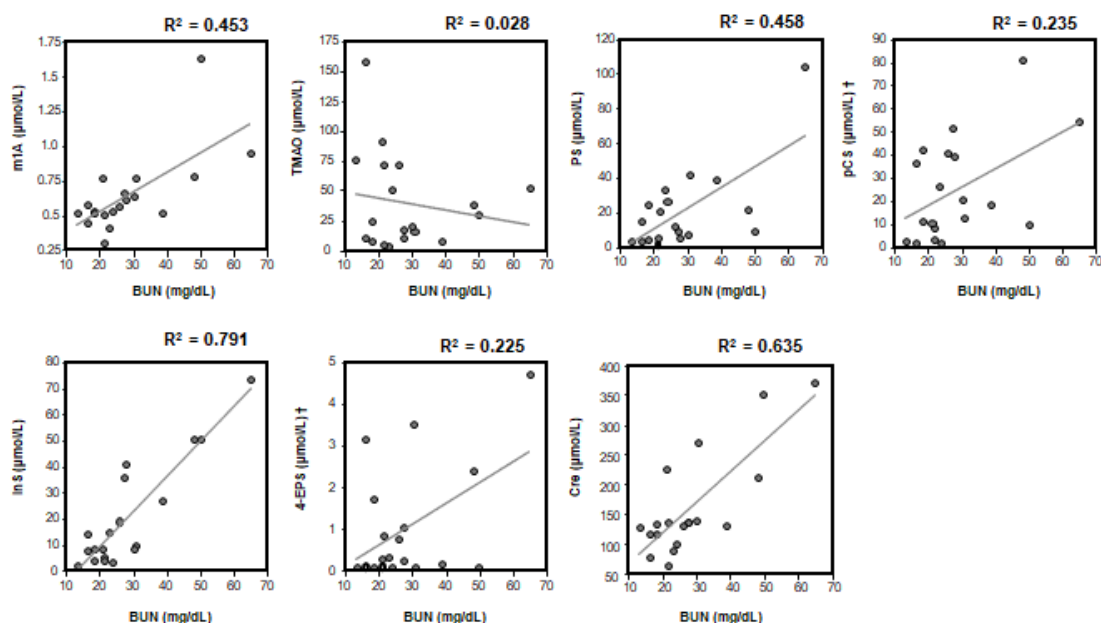


Figure 12 Correlations between blood urea nitrogen concentrations, determined using an enzymatic optical technique, and analyte concentrations in 19 patients with stage 2–5 CKD, as determined by LC-MS/MS. †includes lower than the LOQ.

eGFR とは、m1A に続いて、InS が負の相関性が高かった。InS との相関性の程度は、Shu らによる既報と同程度であった<sup>45</sup>。一方で、TMAO は、他の UTx と比べて腎機能指標との相関が低かった。これは、腎機能指数が低いにもかかわらず、一部の患者が著しく高い血中濃度を示したことに起因した。この原因として、InS や pCS などの産生は、腸内細菌叢に完全に依存しているが、TMAO は、食事にも含まれているため<sup>42</sup>、その摂取量の差によるものと考えられる。このように、CKD 患者の診療において、既存の腎機能指標に加えた、TMAO などの UTx の包括的なモニターが、各 UTx の生理機能の解明と、それに続く診断法や食事療法、治療薬開発に繋がる可能性がある。

## 第 8 節 結語

本章では、腸内細菌叢と CKD 病態の関連性を追及するために、計 7 種の UTx を測定対象とする包括的かつ高精度な LC-MS/MS 同時定量系の構築を行った。LC 分析における逆相カラム及び HILIC カラムの化合物選択性の限界を克服するために、SS-C18 カラムによるミックスドモードクロマトグラフィーを利用した結果、これまで達成できなかった幅広い物理化学的性質の UTx 同時分析が達成できた。さらに、全ての分析対象 UTx について、その安定同位体を IS として用意したことにより、多様なヒト血液のマトリックス効果を補正し得る堅牢な分析系構築できた。

本分析系を、CKD 患者の血清に適用した結果、高精度に血清 UTx が定量可能であること、並びに一部の患者では、血清クレアチニン値が低いにも関わらず、トリメチルアミン-*N*-オキシドなどの UTx が高い血中濃度を示すことが明らかになった。このことは、CKD 患者に対し、既存の腎機能指標と併せた、UTx の包括的な同時モニターの重要性を示唆している。

近年、CKD 患者血中の UTx を低減させるために、腸内細菌叢や腸管を標的とした新たな治療方法が注目されている。例えば、生体に有益な作用を示す生きた微生物やその微生物を含む食品を摂取する（プロバイオティクス）、消化管上部で分解・吸収されない生体に有益な腸内細菌叢の増殖を促進させる食品成分を摂取する（プレバイオティクス）、両者を併用したシンバイオティクス<sup>78,79</sup>、尿毒素の前駆体を吸着し排出させる球形吸着炭 AST-120 の投与<sup>52,80</sup>、そして尿毒症物質合成に関わる酵素を阻害する低分子化合物投与などが含まれる<sup>81</sup>。本章により構築した手法は、それらの効果指標となる UTx と腎機能指標とを同時に定量評価可能なため、治療法開発研究においても有用なツールとして活用できる。例えば、筆者らは、この分析系を用いて、糖尿病の治療に用いられる SGLT 阻害薬の一種であるカナグリフロジンが、腸

内細菌叢の変化をもたらすことで UTx の減少効果を有することを示した<sup>82</sup>。また、糖尿病性腎臓病患者に対するコホート研究検体を測定した結果、血中の PS を、新たな予後予測マーカーとして見出した<sup>46</sup>。その他にも、多様な腎疾患関連研究に活用しており、本章の研究は、これらの基盤となる重要な成果であった。

SS-C18 カラムは、化合物選択性に富むため、より網羅的な UTx 同時分析系の開発にも貢献できるが、それと同時にミックスドモードクロマトグラフィーのより深い理解、すなわちカラム分離のメカニズムとカラム効率の両方についても、さらなる研究が必要である。分析対象物の ClogP と pKa より、ある程度のカラム溶出挙動を予測可能であったが、カラムの化学的性質と保持作用をより詳細に解明することで、適切な移動相条件の選択が簡単になり、UTx のみならず、周辺代謝物を含めた同時分析の開発に繋がると期待できる。

## 第 2 章 抗 PS モノクローナル抗体の作製と競合 ELISA によるヒト血中 PS 測定系の構築

### 第 1 節 序

CKD は、進行性の病態であるが、早期の診断・治療によってその進行の抑制が可能である<sup>83,84</sup>。日本において、慢性透析患者の原疾患で最も多いのは、糖尿病性腎臓病<sup>‡</sup>であるため、糖尿病患者の中から、その発症リスクが高い患者の早期発見は、極めて重要である。現在、臨床で用いられる腎機能評価指標としては、血清クレアチニン値、クレアチニークリアランス、糸球体濾過量、血液尿素窒素、尿中アルブミン量、シスタチン C などが挙げられる。しかしながら、これらの腎機能指標が増加している状態は、既に糸球体の濾過機能が破綻していることを意味し、早期の腎機能異常鑑別に用いるには不十分な指標である。尿中アルブミン濃度が正常であるにもかかわらず、腎機能が低下する症例が存在するため、尿中アルブミン濃度では鑑別できない機序の腎障害の存在も示唆されている。すなわち、予後予測に資する新たなバイオマーカーの開発が必要である。

筆者は、前章までの研究を通じて、腎障害において腸内細菌叢由来代謝物の生体内濃度が、顕著に変動することを明らかにしてきた。近年、筆者らの研究グループは、ヒトの腎臓毒素排泄を模した遺伝子改変ラット (SLCO4C1 トランスジェニックラット) にストレプトゾドシンによって糖尿病性腎障害を誘発させ、網羅的メタボローム解析を施行したところ、糖尿病性腎臓病に関わる重要な代謝物質として、腸内細菌叢由来 UTx の一つである PS を同定した<sup>46</sup>。さらに第 1 章において構築した UTx の一斉定量系を動物実験、及び糖尿病性腎臓病患者 (362 人) 検体に適用した結果、

---

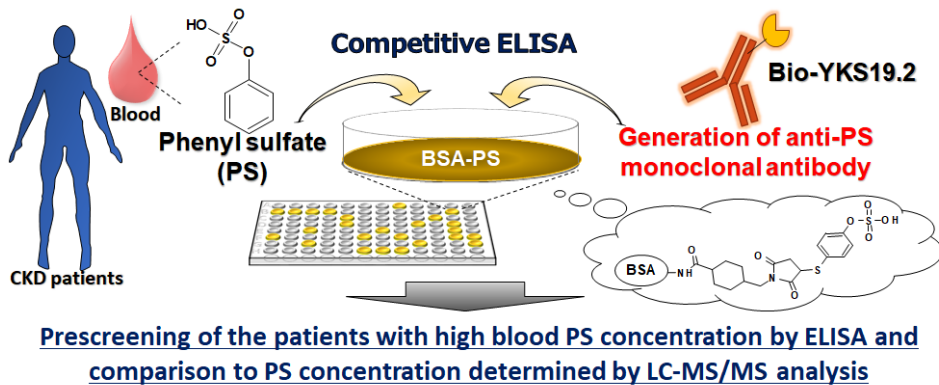
<sup>‡</sup>「CKD 診療ガイドライン 2018」より典型的な“糖尿病性腎症”に加え、顕性アルブミン尿を伴わないまま GFR が低下する非典型的な糖尿病関連腎疾患を含む概念として、“糖尿病性腎臓病”が提唱されている



血中 PS が、尿中アルブミン増加に最も関連し、糖尿病性腎臓病の原因因子かつ予後予測マーカーとなり得ることを明らかにした<sup>46</sup>。また、PS の血中濃度を制御することが、腎障害の新規治療法に繋がる可能性も見出した<sup>46</sup>。PS の前駆物質であるフェノールは、ある特定の腸内細菌が有するチロシンフェノールリアーゼによって、チロシンから生成する<sup>85,86</sup>。チロシンフェノールリアーゼは、周囲のチロシン濃度に依存して活性を示す酵素である。2 型糖尿病患者では、健常者と比べてチロシンを含む数種のアミノ酸の血中濃度が増加していることから<sup>87</sup>、これらの病態と PS の血中濃度に何らかの関連性が疑われるが、その詳細は不明な点が多く、さらなる解析が必要とされる。

臨床において、PS の血中濃度を把握するためには、迅速かつ簡便に定量可能とする技術が求められる。これまでに報告されている PS の定量技術としては、前章で確立した LC-MS/MS のほか、ガスクロマトグラフィーや ultraviolet (UV) 検出器を用いた方法もある<sup>43,76,88-90</sup>。これらの手法は、高感度かつ正確ではあるが、高額な機器及び分析カラムや検体前処理の煩雑さが問題となる。一方で、抗原に対する特異的抗体を利用した免疫学的手法による定量手法、すなわち ELISA などは、費用、簡便性、迅速性、同時検体処理能力に優れ、幅広い臨床施設で実施できる利点を有する。例えば、ステロイドやホルモン、がん特異的糖鎖抗原など様々な化合物に適応されており、臨床においてスクリーニング検査や診断などに大きく貢献している。UTx においては、尿中や血中の InS を簡便に検出する方法が報告されているが<sup>91</sup>、PS に対する手法は存在していなかった。

そこで本章では、より汎用的な PS の分析手法の臨床提供を目指し、抗 PS モノクローナル抗体を作製し、ELISA によるヒト血中 PS 測定系の開発を行った (Fig. 14)。



**Figure 14 Overview of the phenyl sulfate analysis in human blood.**

PS に対する抗原特異性は、様々な PS 構造類似体との競合 ELISA によって明らかにした。さらにリン酸緩衝生理食塩水 (phosphate buffered salts, PBS) 中と血中における抗原特異性の違いを明らかにし、ヒト血液試料に対して最適な抗原抗体反応条件を精査した。最後に、CKD 患者血中の PS 濃度を本研究で開発した ELISA で算出し、前章にて構築した LC-MS/MS によって算出した濃度との比較により、定量値の妥当性について検討を加えた。

## 第 2 節 ハプテンのデザインと調製

フェノールの硫酸抱合体である PS は、分子量約 174 の低分子化合物であるため、それ自体の免疫原性は極めて低い。抗原として用いるためには、まずはキャリアとなるタンパク質との結合体（以下、PS コンジュゲートと称す）を作製する必要があった。筆者は、PS の硫酸基が、重要な抗原決定基であると推測した。免疫学において、抗原決定基から最も離れた位置にキャリアタンパク質を結合させることが、特異性の高い抗体を作製する上での定法となっている。したがって、PS のベンゼン環のパラ位にチオール基を有する 4-メルカプトフェニル硫酸（以下、PS-SH と称す）を先に合成し、ヘテロ二価性の架橋剤である *N*-(11-maleimidoundecanoyloxy)succinimide<sup>§</sup>（以下、KMUS と称す）を用いて、キャリアタンパク質と結合させた（Fig. 15）。

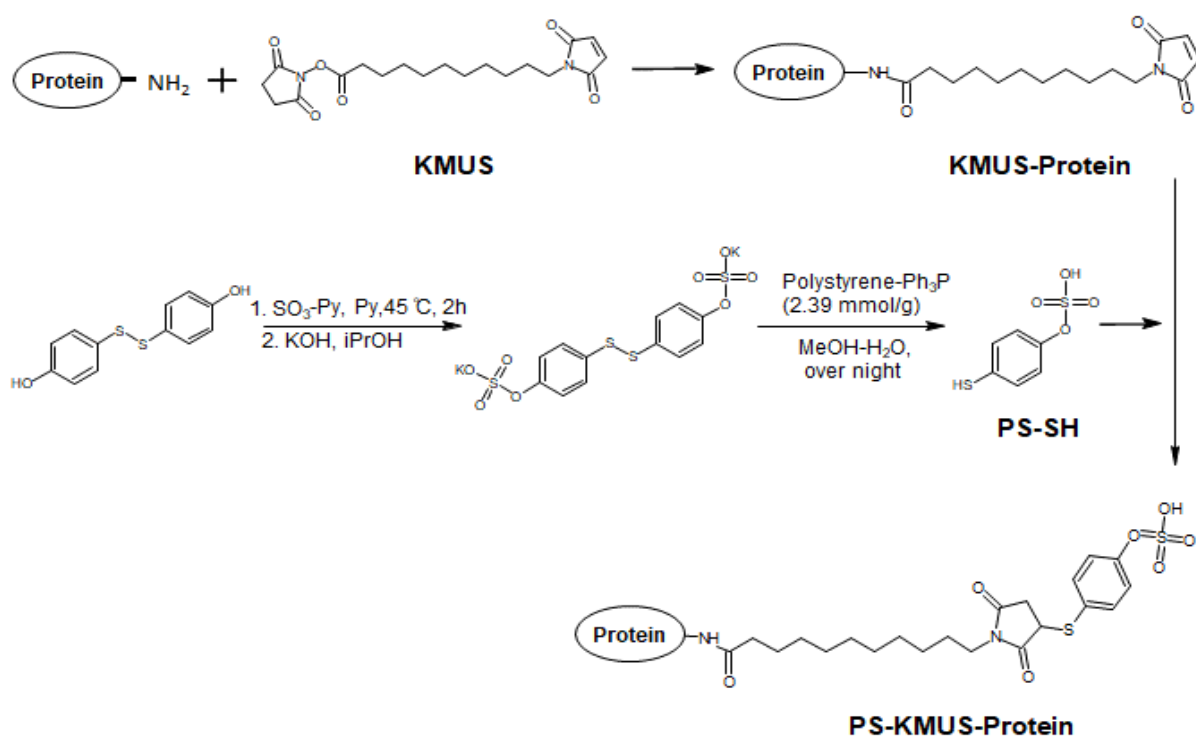


Figure 15 Synthesis of PS-SH and conjugation with KMUS-activated carrier proteins.

<sup>§</sup> 構造はマレイミド基と *N*-ヒドロキシスクシンイミド活性エステルを分子の両端にもち、アミノ基に対しては活性エステルが反応し SH 基とはマレイミド基が選択的に反応する。

PS-SH は、ビス (4-ヒドロキシフェニル) ジスルフィドを出発原料とし、ピリジン・硫酸によってフェノール性水酸基を硫酸基へ変換させた後、トリフェニルホスフィンのレジン担持等価体によって、ジスルフィド結合を還元させ、簡便に合成、精製が可能であった。

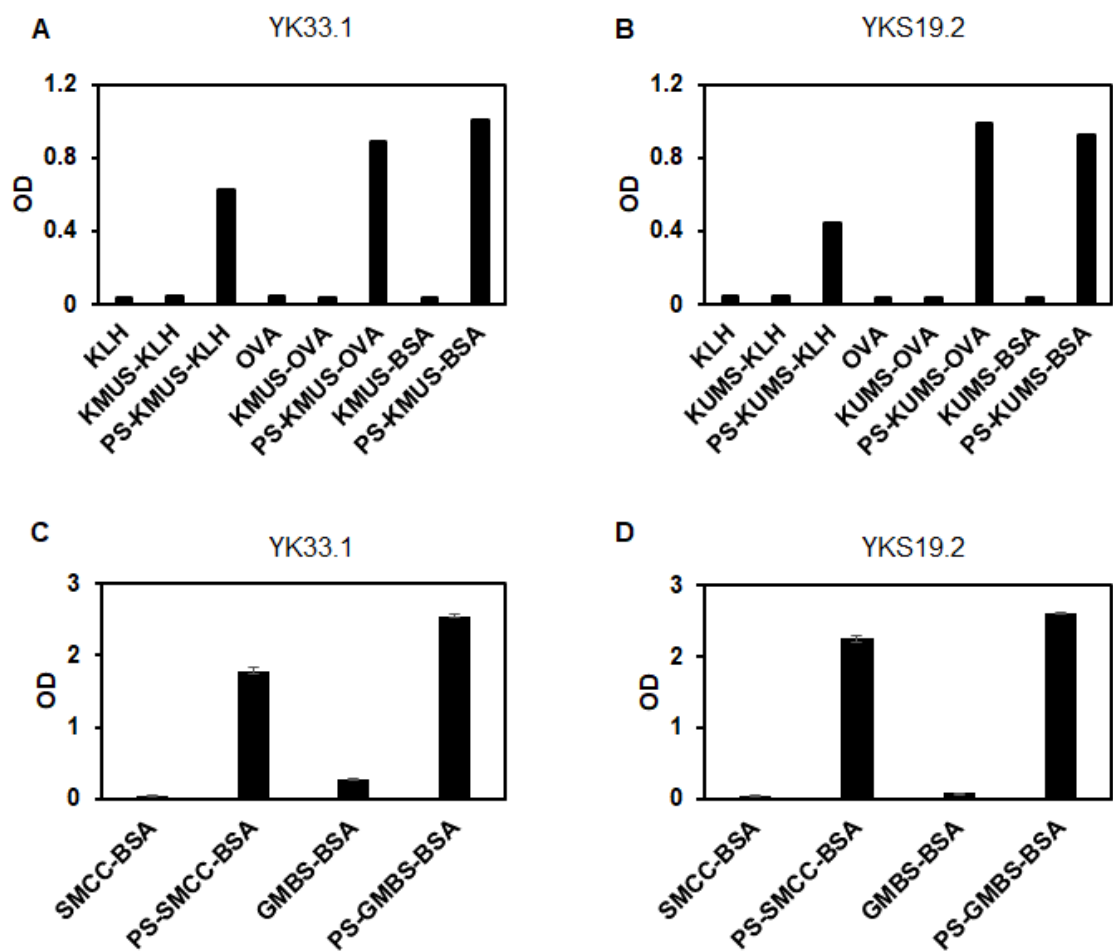
キャリアタンパク質には、キーホールリンペットヘモシアニン (keyhole limpet hemocyanin, KLH)、ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin, BSA)、及びオボアルブミン (ovalbumin, OVA) をそれぞれ用い、計 3 種の PS コンジュゲートを作製した。本章では、それぞれを PS-KMUS-KLH、PS-KMUS-BSA、及び PS-KMUS-OVA と称し、以降の免疫抗原又は、スクリーニング ELISA 用の固相抗原として使用した。

### 第 3 節 抗 PS モノクローナル抗体の作製

前節で作製した 3 つのコンジュゲートのうち、免疫原性が最も高い PS-KMUS-KLH を抗原として選定し、Th2 型免疫反応を引き起こしやすいとされる BALB/c マウスを免疫宿主として選択した。完全及び不完全フロイントアジュバントを用いた二重免疫後、腹腔内へ PS-KMUS-KLH を追加免疫した。アジュバント不使用のブースト免疫を含めて、計 3 回の免疫を実施したところ、各 PS コンジュゲートに対する血清抗体価の上昇を確認した（データ非掲載）。この免疫したマウスの脾臓細胞を摘出し、マウスミエローマ細胞とのハイブリドーマを作製した。Hypoxanthine-aminopterin-thymidine (HAT) 培地培養による選択後、培地上清を用い、間接 ELISA によってスクリーニングを実施した。KLH に反応する抗体を除くために、PS-KMUS-BSA、及び PS-KMUS-OVA を ELISA の固相抗原に用いた。この工程を、独立して 2 回実施した結果、計 721 well の候補が得られた。そのうち、反応性を指標にして 1 回目のスクリーニングからは計 96 well、2 回目のスクリーニングから計 24 well を選定し、さらに 3 種の PS コンジュゲート及びキャリアやリンカーとの反応性を明らかにした。その結果、計 12 well は、PS コンジュゲートに対してのみ、強く反応することが判明した。次いで、これらのコロニーを限界希釈クローニングに附した後、各培地上清を用いた阻害 ELISA によって、各クローンが産生する抗体の PS に対する特異性を明らかにした。最終的に、2 つのハイブリドーマクローンに絞り込み、それぞれが産生するモノクローナル抗体をそれぞれ YK33.1 及び YKS19.2 と命名した。両抗体をアイソタイピングした結果、両抗体のサブクラスはマウス IgG1/ $\kappa$  であった。

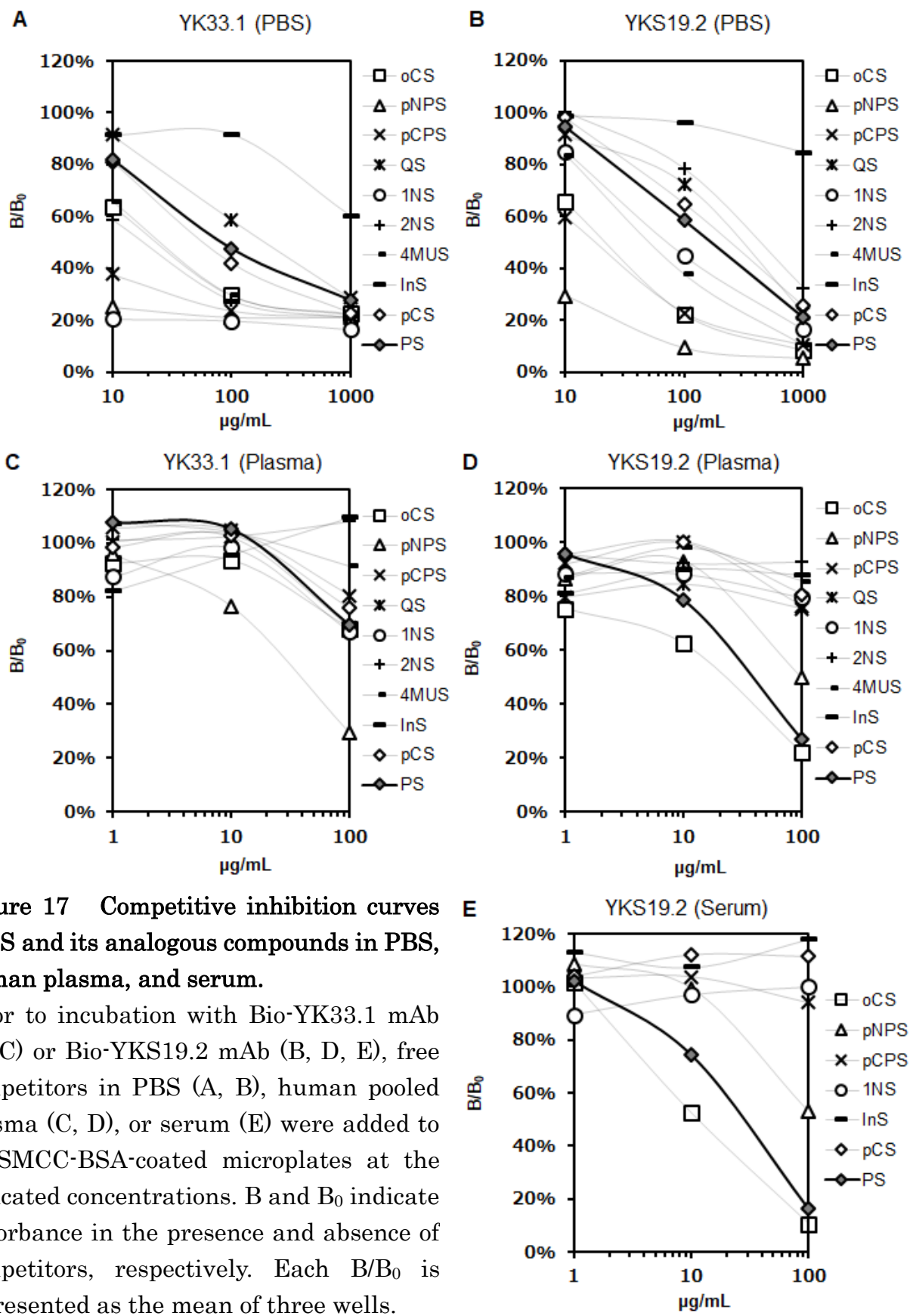
#### 第 4 節 競合 ELISA における抗 PS モノクローナル抗体の特異性評価

プロテイン G カラムにて精製した YK33.1 及び YKS19.2 の、抗原特異性を評価した。まず、3 種の PS コンジュゲート及び、KMUS リンカー結合有り無しのキャリアタンパク質に対する結合性を間接 ELISA にて明らかにした (Fig. 16A, B)。両抗体共に、PS コンジュゲートに対してのみ強い結合性を示し、キャリアタンパク質又はリンカーを結合したキャリアタンパク質とは、ほとんど結合しないことが判った。次いで、PS とリンカー部位が、抗原認識部位となっている可能性を除くために、PS とキャリアタンパク質とのリンカーをシクロアルカン構造及び KMUS より短いアルキル直鎖構造をそれぞれ有する succinimidyl trans-4-(maleimidylmethyl) cyclohexane-1-carboxylate (SMCC) 又は 4-maleimidobutyric acid *N*-hydroxysuccinimide ester (GMBS) に変更した PS コンジュゲートを作製した。YK33.1 及び YKS19.2 は、共にリンカーのスペーサーアーム構造とは無関係に、PS コンジュゲートと強い結合を示した (Fig. 16C, D)。これらの結果から、PS コンジュゲートにおける PS 構造部が、両抗体にとって、必須の抗原認識部位と示唆された。



**Figure 16 Reactivity of hybridoma culture supernatant (clone YK33.1 and clone YKS19.2) with PS conjugates with various carrier proteins and linkers.** Hybridoma culture supernatants (50  $\mu$ L; A, C, clone YK33.1; B, D, clone YKS19.2) were incubated with various PS conjugates (A, B, 10  $\mu$ g/mL, n = 1; C, D, 5  $\mu$ g/mL, n = 3) coated on 96-well microplates in 50  $\mu$ L volume followed by an HRP-conjugated polyclonal antibody. Bound mAbs were visualized using TMB substrates and measured on a plate reader. Bars indicate means  $\pm$  SE (C, D).

次に、阻害 ELISA によって、PS に対する結合性を調べた。ビオチンラベル化した両抗体（以下、Bio-YK33.1 及び Bio-YKS19.2 と称す）に対して、PBS 中の各濃度 PS 下、PS-SMCC-BSA コンジュゲートとの阻害曲線を算出した (Fig. 17A, B)。

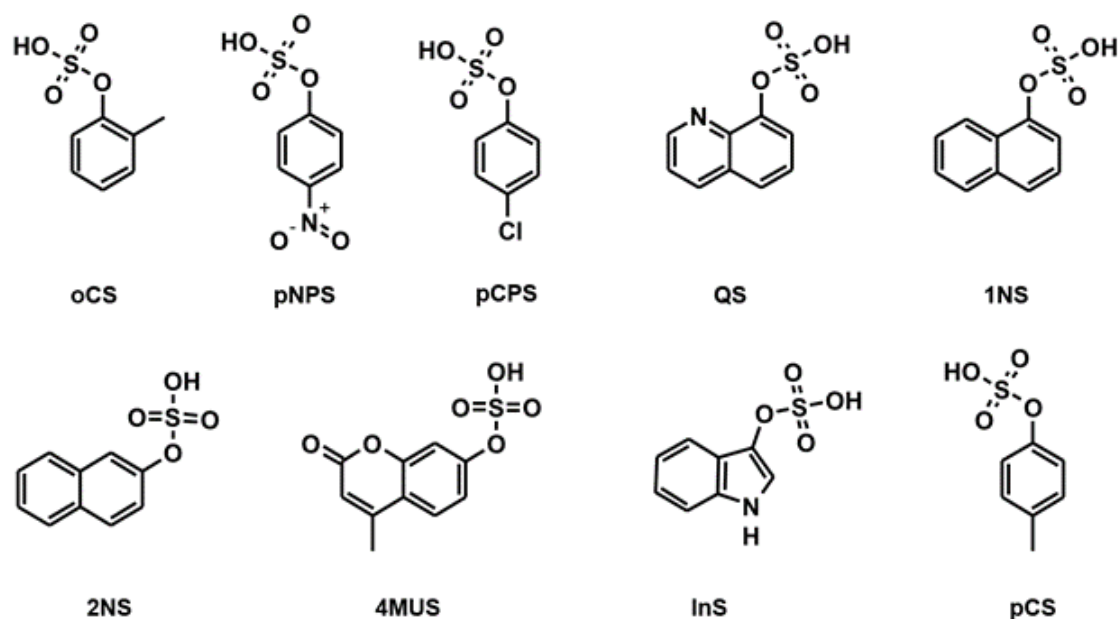


**Figure 17 Competitive inhibition curves of PS and its analogous compounds in PBS, human plasma, and serum.**

Prior to incubation with Bio-YK33.1 mAb (A, C) or Bio-YKS19.2 mAb (B, D, E), free competitors in PBS (A, B), human pooled plasma (C, D), or serum (E) were added to PS-SMCC-BSA-coated microplates at the indicated concentrations. B and B<sub>0</sub> indicate absorbance in the presence and absence of competitors, respectively. Each B/B<sub>0</sub> is represented as the mean of three wells.



PS に対する阻害曲線は、PS 濃度 10—1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の範囲で直線性を示し、 $\text{IC}_{50}$  は、Bio-YK33.1 及び Bio-YKS19.2 それぞれ 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  及び 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  であった。次に、両抗体の PS に対する抗原特異性のより詳細な解析のため、Fig. 18 に示す PS 構造類似体と InS に対する PBS 中の交差反応性を阻害 ELISA により調べた (Fig. 17A, B)。



**Figure 18 Molecular structures of PS and its analogous compounds.**

oCS, *o*-cresyl sulfate; pNPS, *p*-nitrophenyl sulfate; pCPS, *p*-chlorophenyl sulfate; QS, quinolinol sulfate; 1NS, 1-naphthol sulfate; 2NS, 2-naphthol sulfate; 4MUS, 4-methylumbelliferyl sulfate; InS; indoxyl sulfate; pCS, *p*-cresyl sulfate

その結果、両抗体とも、*p*-ニトロフェニル硫酸 (*p*-nitrophenyl sulfate, pNPS)、*p*-クレジル硫酸 (*p*-cresyl sulfate, pCS)、*o*-クレジル硫酸 (*o*-cresyl sulfate, oCS)、4-メチルウンベリフェリル硫酸 (4-methylumbelliferyl sulfate, 4MUS)、及び 1-ナフトール硫酸 (1-naphthol sulfate, 1NS) に対して交差反応性を示し、PS よりも低い

IC<sub>50</sub>であった (Fig. 17A, B)。Bio-YK33.1 の場合、2-ナフトール硫酸 (2-naphthol sulfate, 2NS)、pCS、及び *p*-クロロフェニル硫酸 (*p*-chlorophenyl sulfate, pCPS) に対しても交差反応性を示した。一方で、InS とキノリノール硫酸 (quinolinol sulfate, QS) に対しては、反応性が低いことが判った。これらの知見は、両抗体が、PS の構造 (ベンゼン環及び硫酸基) を有する化合物を認識し、インドール環やナフトレンの構造とは区別可能である特性を示唆した。

## 第 5 節 ヒト血漿又は血清測定における抗原特異性に関する検討

イムノアッセイでは、生体試料中の様々な物質が、抗原-抗体反応に影響する可能性がある<sup>92,93</sup>。臨床応用を考慮し、ヒト血清及び血漿マトリックス下における、PS 及び前節の類似化合物に対する反応性の変化を阻害 ELISA によって調べた。Bio-YKS19.2 は、PBS 中と比較して、ヒト血漿及び血漿中において、PS に対する特異性が、劇的に向上した (Fig. 17D, E)。PS よりも低い IC<sub>50</sub> を示したものは、ヒトの内因性化合物としては報告されていない oCS に対してのみであった (Table 7)。

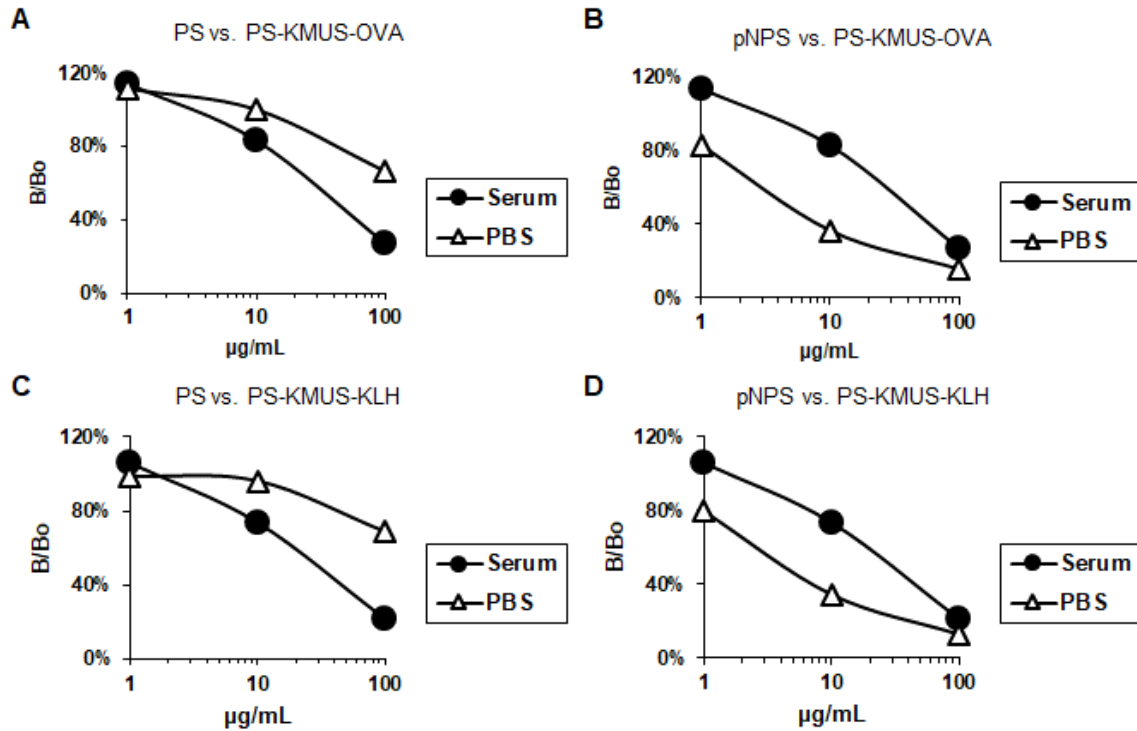
**Table 7 Cross-reactivity of YKS19.2 mAb with PS and its analogous compounds**

Compound	IC <sub>50</sub> (µg/mL)	
	PBS	Plasma
<i>o</i> -Cresyl sulfate	54.3	13.0
<i>p</i> -Nitorophenyl sulfate	7.5	>100
<i>p</i> -Chlorophenyl sulfate	48.3	>100
Quinolinol sulfate	434.7	>100
Phenyl sulfate	275.9	29.7
1-Naphthol sulfate	179.4	>100
2-Naphthol sulfate	>500	>100
4-Methylumbelliferyl sulfate	139.3	>100
Indoxyl sulfate	>500	>100
<i>p</i> -Cresyl sulfate	278.1	>100

The IC<sub>50</sub> of PS and its analogs was determined by inhibition ELISA (Fig. 3) using Bio-YKS19.2 mAb in PBS and plasma matrix (n = 3) in the range of 1, 10, 50, 100, 250, and 500 µg/mL or 1, 5, 10, 25, 50, and 100 µg/mL, respectively.

一方で、Bio-YK33.1 の PS に対する特異性は、ヒト血漿中で大きく変化しなかった (Fig. 17C)。さらに、YKS19.2 の血清中における PS 特異性向上の変化は、キャリアタンパク質が異なる固相抗原 (PS-KMUS-OVA 及び PS-KMUS-KLH コンジ

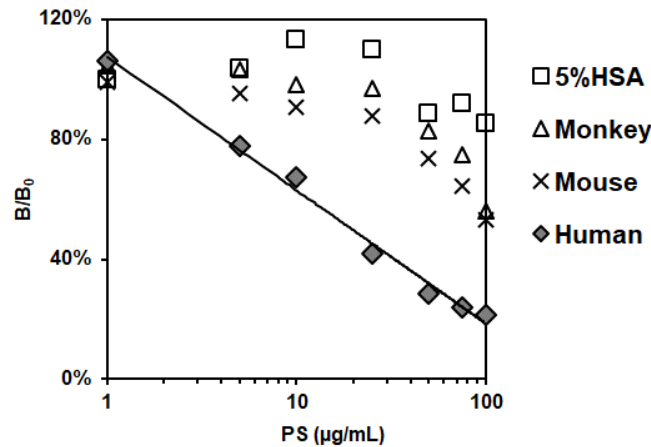
ユゲート) を使用した場合でも、観察された (Fig. 19A, C)。PBS 中において、最も強い反応性を示した pNPS との反応性は、血清中では低下した (Fig. 19B, D)。



**Figure 19 Effect of matrixes on competitive inhibition curves of PS and pNPS.**

Prior to the incubation with Bio-YKS19.2 mAb, free competitors (A, C, PS; B, D, pNPS) in human pooled serum were added in PS-KMUS-OVA (A, B) or -KMUS-KLH (C, D)-coated microplates at indicated concentrations. B and B<sub>0</sub> indicate the absorbance in the presence and absence of competitors, respectively. Each B/B<sub>0</sub> is represented as the mean of three wells.

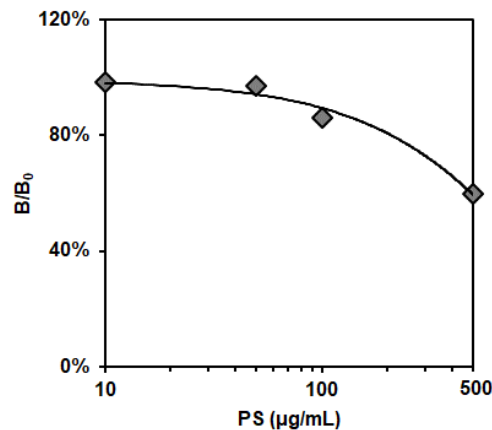
続いて、Bio-YKS19.2 におけるこの特異性変化が、種特異的なマトリックスによるものかどうかを調べた。その結果、PS に対する特異性向上効果は、ヒト血清及び血漿に固有のものであり、サルとマウス血漿も特異性に影響を及ぼさなかった (Fig. 20)。



**Figure 20 Competitive inhibition curves of PS in 5%human serum albumin (HSA)-containing PBS, monkey, mouse, and human plasma as assayed in inhibition ELISA using Bio-YKS19.2 mAb.**

Assayed using Bio-YKS19.2 mAb as in Figure 3, except for 5%HSA, monkey, and mouse plasma.

この効果を生む責任分子を探索するために、有機溶媒による除タンパク処理をしたヒト血漿マトリックスを用意し、同様に阻害曲線を作製した。Fig. 21 に示したように、除タンパク処理した血漿については、PS 特異性が向上する効果が著しく減少した。



**Figure 21 Competitive inhibition curve of PS in protein-depleted human plasma as assayed in inhibition ELISA using Bio-YKS19.2 mAb.**

Assayed using Bio-YKS19.2 mAb as in Figure 3, except for protein-depleted human plasma.

この結果は、PS 及びその類似体と血中タンパク質との相互作用が、Bio-YKS19.2 の PS 特異性向上に重要な役割を担っていることを示唆した。したがって、血清及び血漿中に最も豊富に含まれるタンパク質の 1 つであるアルブミンが、特異性向上に寄与し得るかどうかを検証した。Fig. 20 に示した通り、5%ヒト血清アルブミン (human serum albumin, HSA) 含有 PBS 溶液中では、特異性を変化させないため、アルブミンが、Bio-YKS19.2 の PS 特異性向上に寄与するタンパク質である可能性は低いと考えられる。他のタンパク質を含め、今後さらなる解析が必要である。

次いで、高感度化に向けた検討を行った。これまでに抗原-抗体反応を増強する手段として、非イオン性界面活性剤を血液試料に添加する方法が知られている<sup>94</sup>。したがって、本節では、Tween 20 添加血清試料における Bio-YKS19.2 の PS 特異性に対する効果を検討した。非添加時と比べて、終濃度 0.05%及び 0.1% Tween 20 血清は、IC<sub>50</sub> をそれぞれ 14.3 及び 15.3 µg/mL まで減少させた (Table 8)。最大吸光度 (B<sub>0max</sub>) は、終濃度 0.1%濃度において最大値を示したことから、以降の検討にはこの濃度を用いた。Tween 20 が検出感度に与える詳しい機序は、定かではないが、抗体やプレートに生じる非特異的吸着の軽減に起因すると考えられた。

**Table 8 Effect of Tween 20 on the sensitivity of ELISA using Bio-YKS19.2 mAb**

Tween 20 final Conc. %	IC <sub>50</sub> μg/mL	B <sub>0max</sub>
0	76.8	0.1211
0.01	23.8	0.2571
0.05	14.3	0.4015
0.1	15.3	0.5420
0.5	20.9	0.4733
1	22.6	0.4034
2.5	30.1	0.3747
5	43.9	0.4096

The IC<sub>50</sub> and B<sub>0max</sub> were determined in human pooled serum by inhibition ELISA using Bio-YKS19.2 mAb in the range of 5, 10, and 100 μg/mL PS as in Figure 3 (n = 3), except for the addition of Tween 20 in a reaction buffer of Bio-YKS19.2 mAb at the indicated concentration.

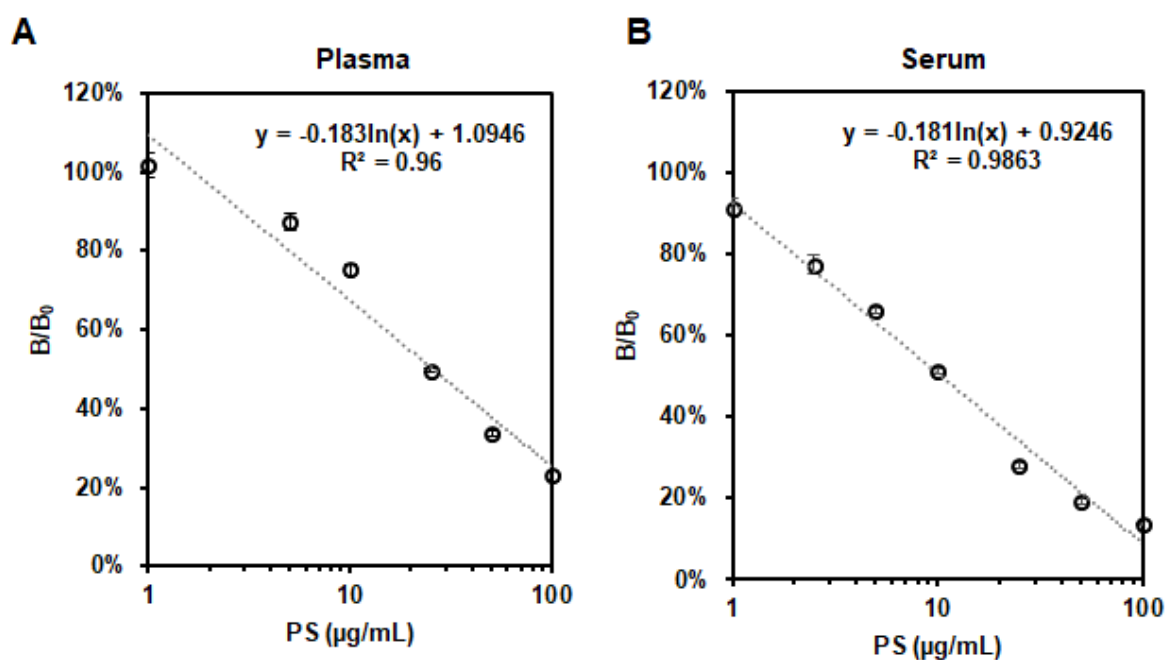
血漿においても同様の効果が認められ、また血清と共に PS に対する特異性向上効果には負の影響を与えなかった (Table 9)。

**Table 9 Cross-reactivity of YKS19.2 mAb with PS and its analogous compounds**

Compound	IC <sub>50</sub> (μg/mL)	
	Plasma + Tween20	Serum + Tween20
<i>o</i> -Cresyl sulfate	8.0	4.4
<i>p</i> -Nitrophenyl sulfate	52.1	57.2
<i>p</i> -Chlorophenyl sulfate	>100	>100
Quinolinol sulfate	>100	>100
Phenyl sulfate	24.4	10.4
1-Naphthol sulfate	>100	>100
2-Naphthol sulfate	>100	>100
4-Methylumbelliferyl sulfate	>100	>100
Indoxyl sulfate	>100	>100
<i>p</i> -Cresyl sulfate	>100	>100

The IC<sub>50</sub> was determined by inhibition ELISA in human pooled serum and plasma using Bio-YKS19.2 mAb in the range of 1, 5, 10, 25, 50, and 100 μg/mL PS as in Figure 3 (n = 3), except for the addition of 0.1% Tween 20 in a reaction buffer of Bio-YKS19.2 mAb.

Bio-YKS19.2 の血漿及び血清における PS に対する阻害曲線を Fig. 22 に示した。血漿中 PS の検出限界は、 $2.5 \mu\text{g} / \text{mL}$  (スチューデントの  $t$  検定、 $n = 3$ 、 $p < 0.05$  vs.  $B_0$  値) と算出された。



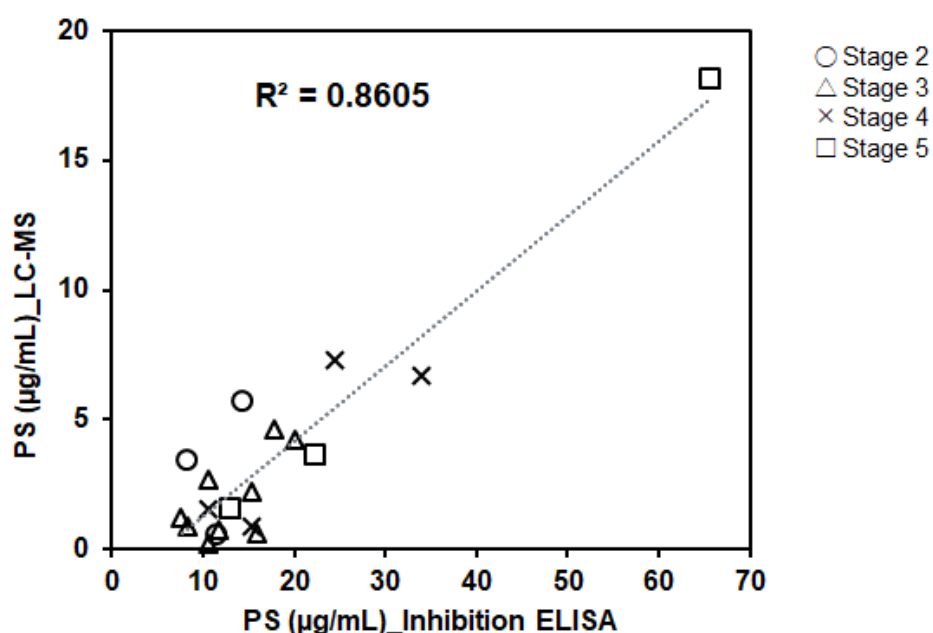
**Figure 22 Calibration curve of indirect ELISA using Bio-YKS19.2 mAb for PS.**

(A) Result from using PS-spiked plasma samples as a competitor. Plates were coated with 25 ng PS-SMCC-BSA per well and Bio-YKS19.2 mAb was diluted at  $0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$  in 1% Tween20. (B) Result from using PS-spiked serum samples as a competitor. Plates were coated with 25 ng PS-SMCC-BSA per well and Bio-YKS19.2 mAb was diluted at  $0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$  in 0.2% Tween20. Each point represents the mean  $\pm$  SE ( $n = 3$ ).



## 第 6 節 CKD 患者血清中の PS 定量精度の評価

Bio-YKS19.2 をヒト血清中 PS 測定法に適応させるために、前章で用いた 19 名の CKD 患者血清を用いて、阻害 ELISA にて算出した PS 濃度と LC-MS/MS で算出した濃度との比較を行った (Fig. 23)。

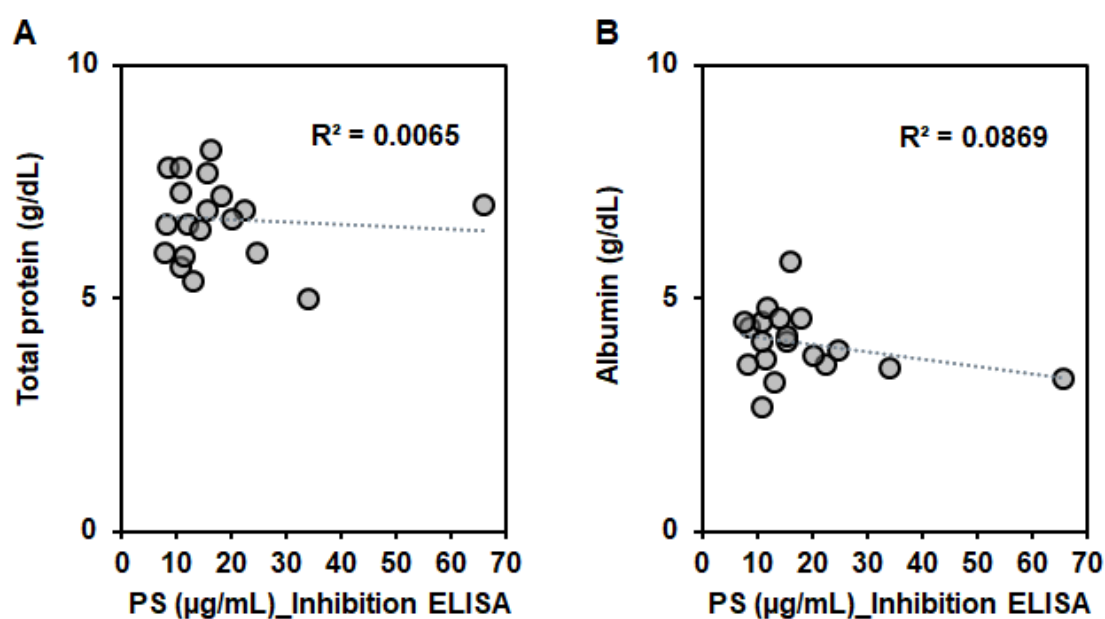


**Figure 23 Correlation of serum PS levels determined by both a developed ELISA and a validated LC-MS/MS method.**

The same serum samples from 19 stage 2–5 CKD patients were determined by inhibition ELISA using Bio-YKS19.2 mAb (x-axis) and an LC-MS/MS method (y-axis). The correlation coefficient ( $R^2$ ) was 0.8605 ( $p < 0.001$ ).

両手法で求めた PS 濃度は、良好な相関関係が得られた ( $R^2 = 0.86$ )。しかし、阻害 ELISA で求めた PS 濃度は、LC-MS/MS で求めた値よりもおよそ 4 倍高い値となった。この原因の詳しい理由は、明らかではないが、Bio-YKS19.2 が PS と同一挙動を示す未知の血中分子に対して、交差反応を示した可能性が考えられる。若しくは、前節の結果より、血中のタンパク質が Bio-YKS19.2 と PS の反応性に影

響することが示唆されているため、CKD 患者の栄養状態（低たんぱく血症）が、測定に影響した可能性も考えられた。このことを詳細に検証するために、栄養状態指標の一つである血清総タンパク質濃度及びアルブミン濃度と PS 測定濃度とを解析したが、関連性は認められなかった (Fig. 24)。



**Figure 24 Correlation of serum PS levels determined by a developed ELISA and the levels of serum total protein or albumin in CKD patient serum.**

(A) Serum PS levels in CKD patients were determined by inhibition ELISA using Bio-YKS19.2 mAb (x-axis) and the serum total protein levels were determined by FUJI DRI-CHEM system (y-axis). (B) Serum PS levels in CKD patients were determined by inhibition ELISA using Bio-YKS19.2 mAb (x-axis) and the serum albumin levels were determined by FUJI DRI-CHEM system (y-axis).

PS に対する特異性がヒトの血液成分によって向上するという知見は、測定系を構築する上で有用であったが、これに関わる責任分子や機序については、さらなる研究が必要である。

## 第 7 節 結語

本章では、糖尿病性腎症の予後予測や、CKD の早期診断マーカーとして期待される腸内細菌由来 UT<sub>x</sub> の PS について着目し、その血中濃度を把握できる免疫学的手法の構築を目的とした。抗 PS 抗体を得るために、効果的なハプテンをデザインし、PS 構造を抗原決定基とする 2 種のモノクローナル抗体、YK33.1 と YKS19.2 を作製した。様々な PS 類似体との競合 ELISA によって、YKS19.2 が、ヒト血中においてのみ、PS に対する特異性が向上する特性を示した。また、競合 ELISA における一次競合反応の際に、非イオン性界面活性剤である Tween 20 を終濃度 0.1%濃度で添加すると、検出感度が 7—8 倍に増加した。血清中 PS に対する Bio-YKS19.2 を用いた競合 ELISA の阻害曲線は、1—100 µg/mL の範囲で良好な直線性を示し (IC<sub>50</sub> : 10.4 µg/mL)、CKD 患者血中の PS 濃度測定が可能な検出感度と推定した。LC-MS/MS で求めた PS 定量値との比較により、本系定量値の妥当性について検証した結果、両知は強く相関するものの、絶対値が、およそ 4 倍程度高く算出されることが判った。この原因は明らかにされていないが、YKS19.2 が PS と同一挙動を示す未知の血中分子に対して、交差反応を示した可能性が考えられる。仮に交差反応物が影響していたとしても、PS 血中濃度の把握が可能であることから、本抗体は、それらを包括して検出できる「抗 PS 類似体抗体」として、血中 PS 値概算把握などの臨床利用が可能である。また、前章で構築した LC-MS/MS による精密な UT<sub>x</sub> 分析を積極的に適用すべき糖尿病患者を、早期発見するための予試験法としての応用が期待できる。今後は、臨床使用においてさらに好ましいキット化や、迅速、高感度化に繋がる検出方法の開発を進めていくことで、PS 又は PS 類似体スクリーニングをより広く普及可能とし、糖尿病性腎臓病の予後診断や CKD と腸内細菌叢の関係性の解析にも役立つと期待される。しかし、YKS19.2

のヒト血中における PS 特異性の変化とその責任分子については、さらなる解析が必要となる。この同定には、免疫沈降法やそれに続くプロテオミクス、分子間相互作用解析装置を用いたより網羅的な交差反応性化合物解析などが、有用な手法と考えられた。

### 第 3 章 2PA 安定同位体標識 LC-MS/MS を用いた腸内細菌関連カルボキシル基含有代謝物の網羅的相対定量法の構築

#### 第 1 節 序

腸内細菌叢は、PS を含む第 1 章の分析対象物のような有害な UTx を産生する一方で、約 1,000 種、100 兆個もの細菌数から形成されることから<sup>2</sup>、一つの臓器と称されるほどの宿主のエネルギー代謝や免疫能に重要な役割を担っている<sup>1,4</sup>。また、二次胆汁酸ならびに SCFA 及びインドール-3-酢酸 (indole-3-acetic acid, IAA) を産生するだけでなく、宿主の脂肪酸代謝にも深く関与している<sup>26,95-97</sup>。胆汁酸、脂肪酸、及び IAA は、それぞれ多くの代謝経路で重要な役割を担う分子であるため、ディスバイオーシスなどによる代謝変化は、腎疾患を含む様々な疾患に寄与し得る<sup>40,96,98</sup>。筆者は、これらの構造中にカルボキシル基を有する共通点があることに着目した (Fig. 25)。

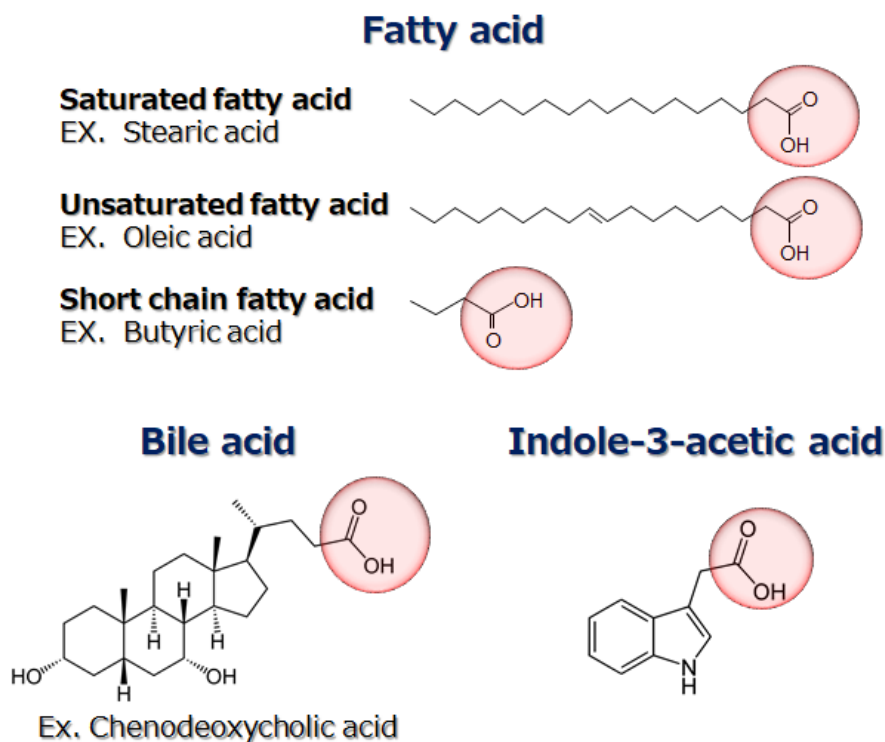


Figure 25 Chemical structures of fatty acids, bile acids, and indole-3-acetic acid

近年、筆者らは、アデニン食誘発性 SPF-RF マウスのメタボローム解析によって、コール酸 (cholic acid, CA) などの胆汁酸のほか、馬尿酸、及びフェナセツル酸などの構造中にカルボキシル基を持つ代謝物の、腎障害による顕著な血漿中濃度増加を明らかにしている<sup>42</sup>。一方で、GF-RF マウスにおいては、これらの血中濃度の増加が認められず、また腎機能障害の程度もより重篤化した<sup>42</sup>。これらの知見は、カルボキシル基含有代謝産物が、腎障害の進行、若しくは保護において、何かしらの生理機能を果たすことを示唆している。したがって、カルボキシル基含有代謝物を包括的に捉える分析手法は、腎機能と腸内細菌叢との関係性のさらなる追求に有用と考えた。

LC-MS/MS は、低分子化合物に対して、優れた感度と広い選択性を有するため、メタボロミクス研究の標準的な手法となりつつある<sup>99,100</sup>。しかしながら、メタボロームは、各代謝物のダイナミックレンジと物理的性質が、非常に多様なため、網羅性と正確な定量精度を兼ねた分析系の構築は、非常に困難である。特に、MS 検出は、分析物をイオン化させる必要があるが、その際に生じるマトリックス効果が、定量結果に影響を及ぼすことが問題となる。そのため、LC-MS を用いた定量法を構築する場合、内因性・外因性を問わず、多くの定量法で、安定同位体を内部標準物質とした方法が採用される。しかし、市販の安定同位体は、非常に高価であり、また全ての化合物について安定同位体が市販されているわけではないため、入手が困難なこともある。また、マトリックス効果を抑制する方法として、LC カラムによる分離溶出も重要となるが、最も一般的な逆相クロマトグラフィーでは、構造異性体の分離や高極性化合物の保持が、困難となる。

上述した問題に対処する手法の一つとして、分析対象化合物の官能基に対する特異的な化学反応を利用した CIL-LC-MS/MS がある<sup>101-104</sup>。この方法では、標識試薬とその安定同位体を、それぞれ比較する試料に適用し、その混和試料を LC-MS/MS に附すことで、互いのマトリックス効果を補正した包括的な相対定量が可能と

なる<sup>101</sup>。さらに、プロトン親和性基の付与に伴うイオン化（感度）の向上とともに、疎水性を高めることで、逆相クロマトグラフィーにおける保持と分離能の改善効果も期待できる<sup>101</sup>。これまでに、カルボキシル基を対象とした CIL-LC-MS が、複数知られている<sup>105-110</sup>。しかしながら、安定同位体標識試薬が市販されていない、若しくは非常に高額であり、標識反応に最大で 2 時間を要するため、多検体処理には不向きであった。一方で、簡便、安価、かつ迅速にカルボキシル基を誘導体化できる試薬として、2PA が有用と考えられるが<sup>111-113</sup>、その安定同位体試薬については、論文や市販品も報告もされていなかった。

そこで本章では、まず 2PA の安定同位体を用いた CIL-LC-MS/MS を構築し、腸内細菌叢が代謝に深く関わる胆汁酸、脂肪酸、IAA の包括的な相対定量法を開発した。続いて、本法の有用性検証のため、4 群のマウス（SPF コントロール、SPF-RF、GF コントロール、及び GF-RF）の血漿、糞、盲腸内容物を分析し、CKD と腸内細菌叢それぞれが宿主の代謝にもたらす影響について明らかにした（Fig. 26）。尚、本章の測定対象化合物の化学構造式については、実験項を参照されたい。

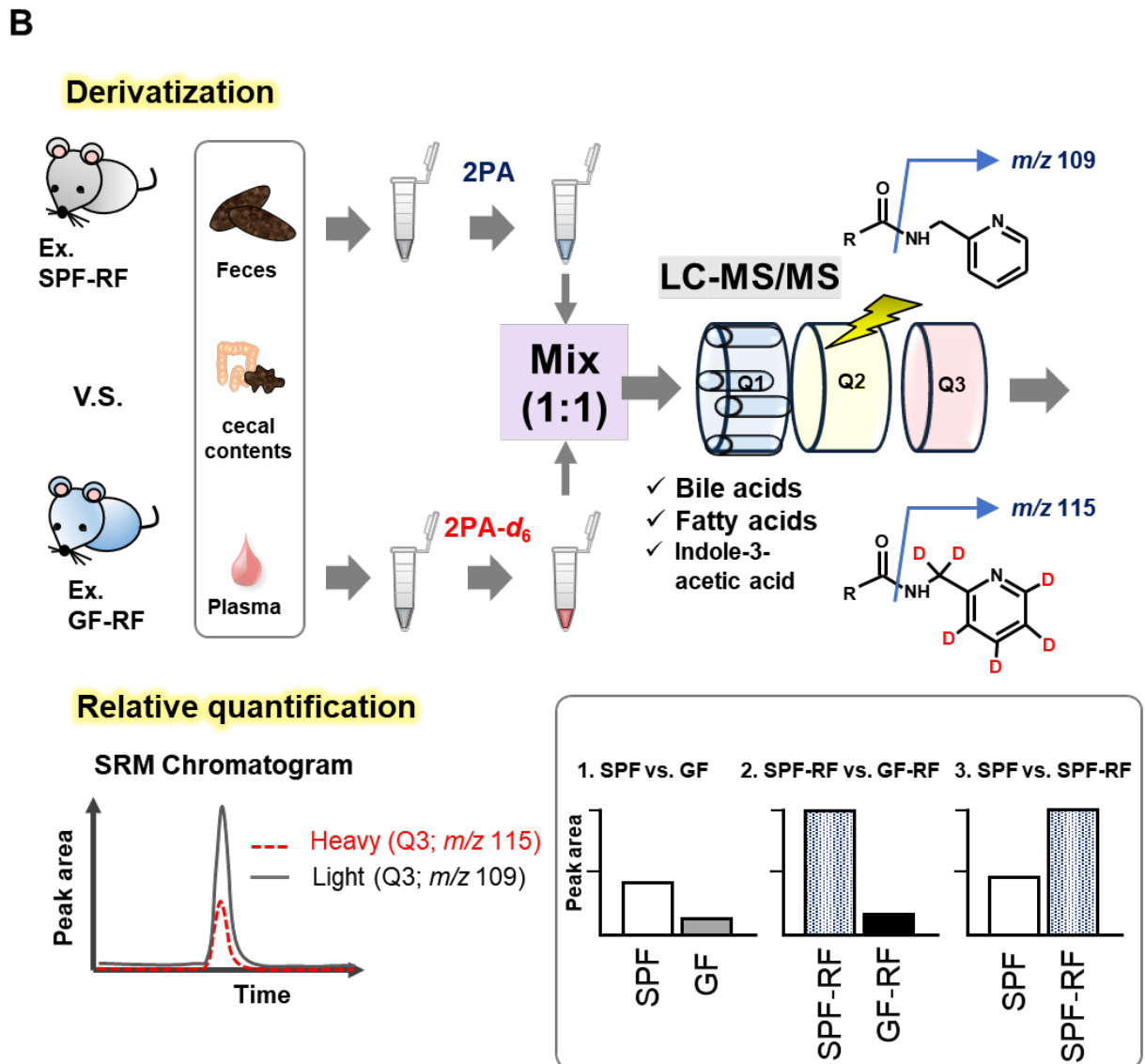
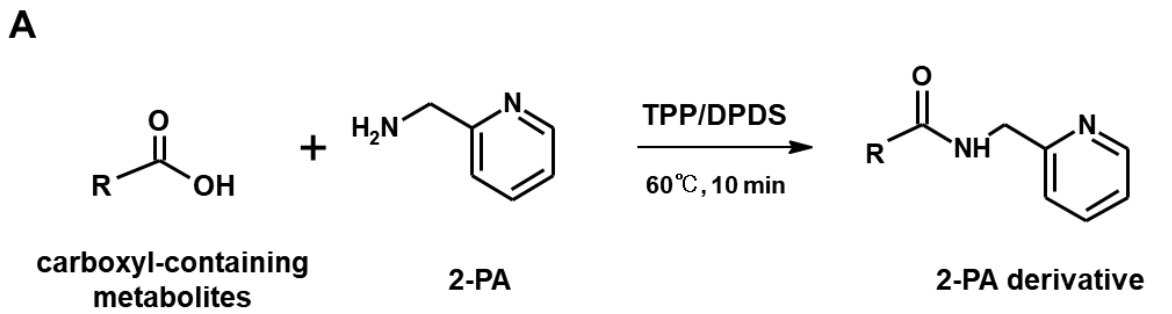


Figure 26 (A) 2PA derivatization reaction of carboxylic acid-containing metabolites. TPP: triphenylphosphine, DPDS: 2,2'-dipyridyl disulfide (B) Workflow of differential analysis of carboxyl-containing metabolites for plasma, feces, and cecal contents from 4 groups of mice.



## 第 2 節 2PA 重水素標識体の合成

簡便、迅速かつ安価な CIL-LC-MS/MS が、多検体試料を測定する場合には特に有用となる。2PA は、これまでに内因性及び外因性の様々なカルボキシル基含有化合物に対する誘導体化 LC-MS に適用されている<sup>111-113</sup>。2PA は、10 分でカルボキシル基含有化合物との反応が完了する、試薬単価がおよそ 0.16 ¥/mg と非常に安価である、などの利点から、理想的な CIL 試薬と考えられた。しかし、これまでに 2PA の重水素標識体を用いた、CIL-LC-MS/MS は報告されておらず、また重水素標識体も入手が困難であった。そこで、本章では、第 1 章の m1A- $d_6$  合成と同様に Sajiki らによって開発された、不均一白金族触媒を用いた重水素置換反応を用いて<sup>72-74</sup>、2-picolyamine- $d_6$  (以下、2PA- $d_6$  と称す) の合成を行った。特に、ピリジン化合物への適応した既報を<sup>74</sup>、2PA- $d_6$  の合成に適用できると推測した。

立体障害のある芳香族水素の H-D 交換反応に用いる白金族触媒として、Pd/C と Pt/C の混合使用が有効であるとの報告に基づき<sup>114</sup>、一段目の反応には、2PA に対して、10%Pd/C と 5%Pt/C を、それぞれ 10 wt%と 20 wt%の割合で混合したものを使用した。データは示していないが、反応温度を 120°C、160°Cと上昇させると、主たる生成物が  $d_3$  体、 $d_4$  体へと変化していき、180°Cにおいて目的化合物である  $d_6$  体が生成した (これ以上の温度は、反応容器が破損する恐れがあったため、検討しなかった)。しかし、反応後の、MS イオンスペクトル強度を確認したところ、 $d_4$  体及び  $d_5$  体がそれぞれ約 5%及び約 20%程度残存しており、重水素置換反応を繰り返す必要があった。混合触媒を用いると、反応を繰り返す毎に 2PA- $d_6$  のイオンピーク強度が減少し、副生物 ( $m/z$  125—126) と推定されるイオンピーク強度が増加した。そこで、二段目の反応には、5%Pt/C のみを触媒として用いた結果、95%以上の重水素標識率を有する  $d_6$  体が生成し、副生成物の影響を最小限に抑えることができた

(Fig. 27)。すなわち、2PA- $d_6$  を、安価な試薬による計 2 回の繰り返し反応で容易に合成できた。さらに、反応に用いた白金族触媒は、フィルター濾過後に回収、再利用可能であることも、この方法の利点であった。この反応は、他の CIL 試薬を含め、LC-MS 用の様々な内標準物質合成にも応用可能と考えられる。

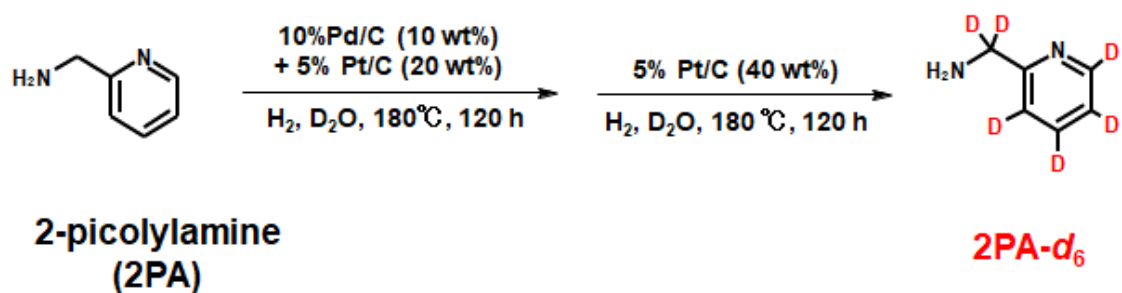
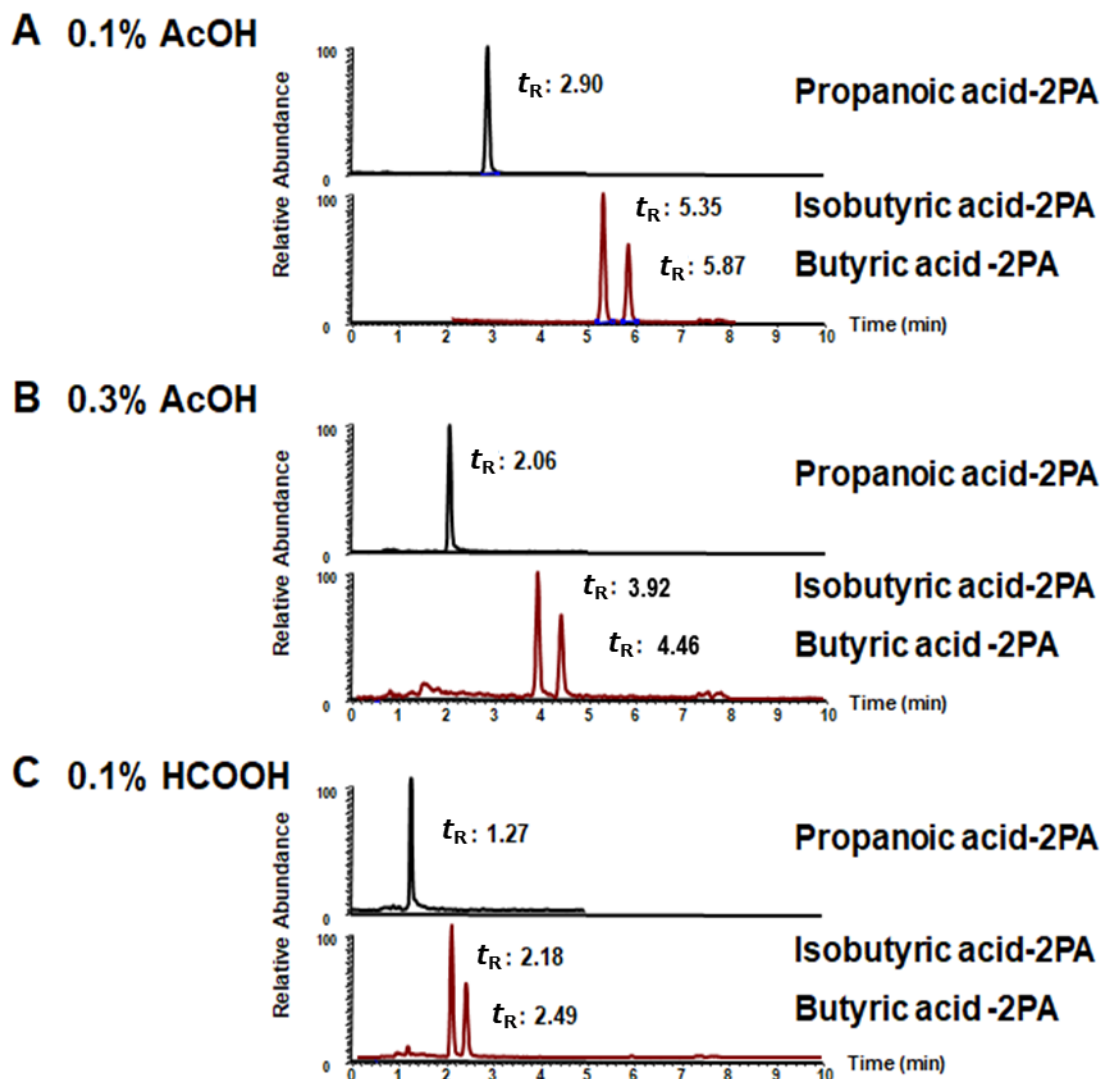


Figure 27 Synthesis of 2-picolylamine- $d_6$  from 2-picolylamine.

### 第 3 節 LC 条件の検討

脂肪酸や胆汁酸は、生体中に構造異性体が多く存在するため、クロマトグラフィー分離が重要となる。本節では、分析対象化合物の中で、逆相カラムに対する保持力が最も弱い、プロピオン酸と酪酸、及びその構造異性体であるイソ酪酸について、LC 移動相のイオン強度、pH、及び溶出勾配条件を精査し、分離効率を評価した。既報に倣い<sup>115</sup>、有機溶媒には、MeCN と IPA の混液を用いた。移動相に 0.1%酢酸 (v/v) を添加すると、より対称的なピークが得られ、分離能が向上した (Fig. 28)。これ以上の酸、すなわち、0.3%の酢酸添加や 0.1%のギ酸添加は、カラムからの溶出が早まるが、ピーク分離が悪化した。これは、2PA のイオン型の割合増加に起因するものと考えられた。保持時間、ピーク形状、再現性を考慮し、最終的に移動相 A を 10 mmol/L 酢酸アンモニウム (AcONH<sub>4</sub>) を含む 0.1%酢酸水溶液、移動相 B を 0.1%酢酸 MeCN/IPA (v/v = 1:1) に決定し、以降の検討を行った。



**Figure 28 Comparison of SRM chromatograms of propanoic acid and butyric acid obtained from pooled mouse plasma.**

The experimental conditions were as follows: (A) 0.1% acetic acid added to the mobile phase, (B) 0.3% acetic acid added to the mobile phase, and (C) 0.1% formic acid added to the mobile phase.

#### 第 4 節 MS/MS 条件の検討

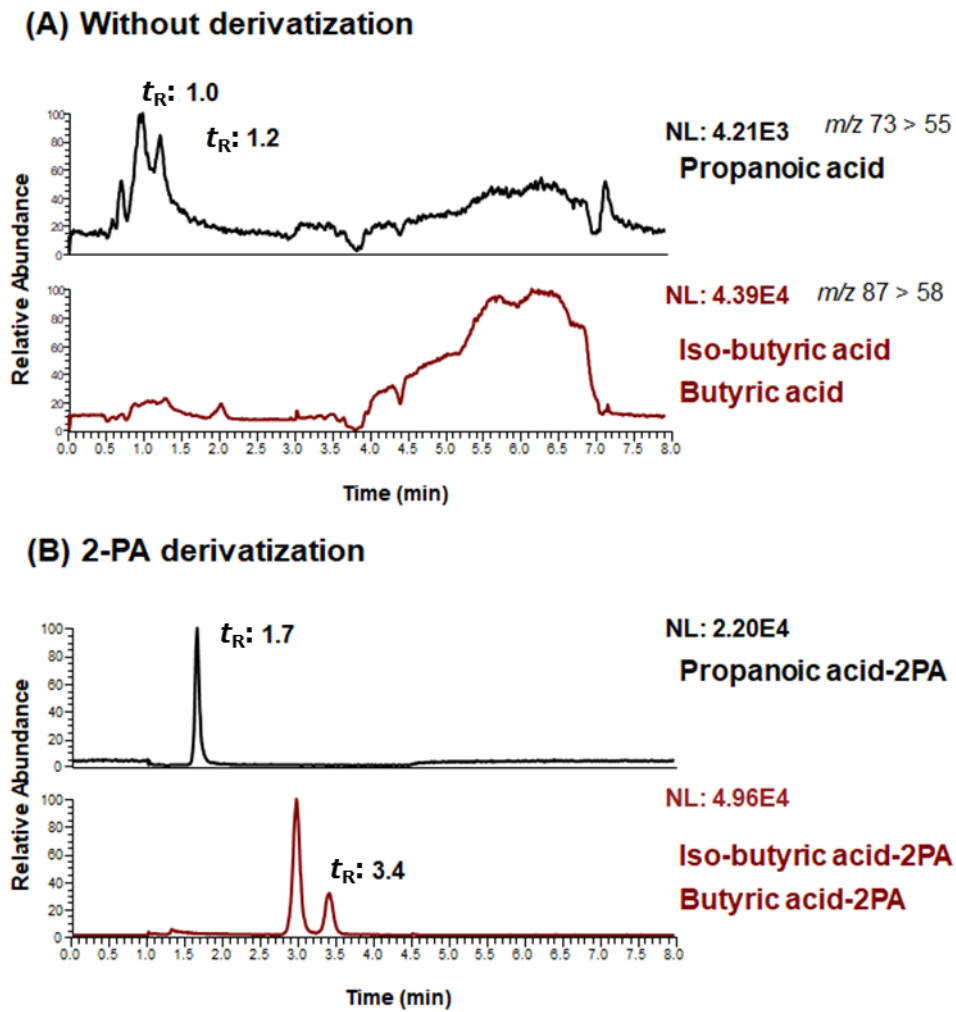
2PA は、プロトン親和力の高いピリジン骨格を有し、またカルボキシル基と容易に反応して、アミド結合を形成する<sup>111</sup>。アミド基は、MS/MS 検出において、低いエネルギーの衝突誘起解離 (collision-induced dissociation, CID) にて特徴的なフラグメントイオンを生成するため、三連四重極型 MS の 選択的反応モニタリング (selected reaction monitoring, SRM) 検出において適している。Table 10 に示したように、誘導体化された分析対象物はすべて、プロトン化分子がペアレントイオンとして検出された。また、2PA 及び 2PA-*d*<sub>6</sub> 標識体は、それぞれアミド基が開裂したフラグメントイオン、すなわち *m/z* 109 又は *m/z* 115 が、高感度に検出された。ただし、プロピオン酸と酪酸の重水素標識の 2PA 及び 2PA-*d*<sub>6</sub> 標識体のフラグメントイオンはそれぞれ、D 付加体 (*m/z* 110 又は *m/z* 116) が最も強く検出され、これは既報と同様であった<sup>113</sup>。

**Table 10 SRM transitions and compound-dependent parameters for CIL-LC-MS/MS analyses of the analytes**

Analyte (abbreviation)		M+2PA				M+2PA- <i>d</i> <sub>5</sub>			
		Q1 ( <i>m/z</i> )	Q3 ( <i>m/z</i> )	CE (V)	S-lens (V)	Q1 ( <i>m/z</i> )	Q3 ( <i>m/z</i> )	CE (V)	S-lens (V)
Cholic acid	(CA)	499.5	109.0	20	180	505.5	115.0	20	180
α-muricholic acid	(aMCA)	499.5	109.0	20	180	505.5	115.0	20	180
β-muricholic acid	(bMCA)	499.5	109.0	20	180	505.5	115.0	20	180
ω-muricholic acid	(wMCA)	499.5	109.0	20	180	505.5	115.0	20	180
Hyochoolic acid	(HCA)	499.5	109.0	20	180	505.5	115.0	20	180
Hydoxychoolic acid	(HDCA)	483.5	109.0	20	180	489.5	115.0	20	180
Chenodeoxychoolic acid	(CDCA)	483.5	109.0	20	180	489.5	115.0	20	180
Ursodeoxychoolic acid	(UDCA)	483.5	109.0	20	180	489.5	115.0	20	180
Deoxychoolic acid	(DCA)	483.5	109.0	20	180	489.5	115.0	20	180
Lithocholic acid	(LCA)	467.5	109.0	20	180	473.5	115.0	20	180
Glycocholic acid	(GCA)	556.6	109.0	20	180	562.6	115.0	20	180
Glyco-α-muricholic acid	(GaMCA)	556.6	109.0	20	180	562.6	115.0	20	180
Glyco-β-muricholic acid	(GbMCA)	556.6	109.0	20	180	562.6	115.0	20	180
Glychoxychoolic acid	(GHCA)	556.6	109.0	20	180	562.6	115.0	20	180
Glychoxydoxychoolic acid	(GHDCA)	540.6	109.0	20	180	546.6	115.0	20	180
Glycochenodeoxychoolic acid	(GCDCA)	540.6	109.0	20	180	546.6	115.0	20	180
Glycoursodeoxychoolic acid	(GUDCA)	540.6	109.0	20	180	546.6	115.0	20	180
Glycodeoxychoolic acid	(GDCA)	540.6	109.0	20	180	546.6	115.0	20	180
Glycolithocholic acid	(GLCA)	524.6	109.0	20	180	530.6	115.0	20	180
Propanoic acid	(C3:0)	165.1	109.0	12	55	171.1	115.0	12	55
Propanoic acid- <i>d</i> <sub>5</sub>	(C3:0- <i>d</i> <sub>5</sub> )	170.1	110.0	14	55	176.2	116.0	14	55
Butyric acid	(C4:0)	179.1	109.0	12	66	185.1	115.0	12	66
Butyric acid- <i>d</i> <sub>7</sub>	(C4:0- <i>d</i> <sub>7</sub> )	186.2	110.0	14	66	192.2	116.0	14	66
Lauric acid	(C12:0)	291.1	109.0	18	120	297.2	115.0	18	120
Myristic acid	(C14:0)	319.3	109.0	18	119	325.3	115.0	18	119
Palmitic acid	(C16:0)	347.3	109.0	18	119	353.3	115.0	18	120
Palmitoleic acid	(C16:1)	345.3	109.0	18	120	351.2	115.0	18	100
Stearic acid	(C18:0)	375.3	109.0	18	145	381.4	115.0	18	147
Oleic acid	(C18:1)	373.1	109.0	18	140	379.4	115.0	18	148
Arachidic acid	(C20:0)	403.4	109.0	18	151	409.4	115.0	18	150
Lignoceric acid	(C24:0)	459.4	109.0	18	164	465.5	115.0	18	174
Nervonic acid	(C24:1)	457.4	109.0	18	180	463.5	115.0	18	190
Linoleic acid	(C18:2)	371.3	109.0	18	136	377.3	115.0	16	120
α-Linolenic acid	(C18:3 n-3)	369.3	109.0	19	90	375.2	115.0	22	100
γ-Linolenic acid	(C18:3 n-6)	369.3	109.0	19	90	375.2	115.0	22	100
Stearidonic acid	(C18:4)	367.3	109.0	18	130	373.1	115.0	18	110
Dihomo-γ-Linolenic acid	(C20:3)	397.3	109.0	18	150	403.4	115.0	18	147
Arachidonic acid	(C20:4)	395.3	109.0	18	105	401.3	115.0	18	82
Eicosapentaenoic acid	(C20:5)	393.2	109.0	18	130	399.3	115.0	18	110
Adrenic acid	(C22:4)	423.4	109.0	18	156	429.4	115.0	16	160
Docosapentaenoic acid	(C22:5)	421.3	109.0	18	152	427.4	115.0	16	150
Docosahexaenoic acid	(C22:6)	419.3	109.0	18	153	425.4	115.0	16	145
Indole-3-acetic acid	(IAA)	266.1	109.0	19	100	272.2	115.0	19	108

CE; Collision energy

次いで、2PA 標識化が検出感度に与える影響を調べた。非標識のプロピオン酸と酪酸をネガティブイオンモードにて検出した場合と比較して、2PA 標識体の検出感度は、レスポンスで 100 倍以上、S/N 比で 1000 倍以上の改善が見られた (Fig. 29)。これは、一般的に、ポジティブイオンモードの方が検出感度は高いことと、プロトン親和力の高いピリジン骨格付与に起因すると考えられた<sup>101</sup>。



**Figure 29 SRM chromatograms and signal intensities of propanoic acid and butyric acid.**

(A) The QC sample (1  $\mu\text{mol/L}$  in human plasma) was analyzed without any derivatization (negative-ion mode), and (B) the same standard solutions were analyzed with the 2PA-derivatization (positive-ion mode).

## 第 5 節 相対定量法の確立

前節及び本節の検討を行うに先立ち、筆者は、サンプルチューブから数  $\mu\text{mol/L}$  相当量のプロピオン酸と酪酸が溶出することに気が付いた (Fig. 30A)。使い捨ての研究用プラスチック製品からは、潤滑油などに使用される脂肪酸や脂肪酸アミド、脂肪酸エステルが溶出することが知られており<sup>116,117</sup>、本現象も同様の影響によるものと考えられた。ガラスチューブや、シリコンコート処理したチューブを標識反応容器に用いた場合、それらの影響は、試料測定に無視できる程度まで抑えられることが判った (Fig. 30B, C)。したがって、本分析系では、シリコンコート処理したチューブを用いることにした。

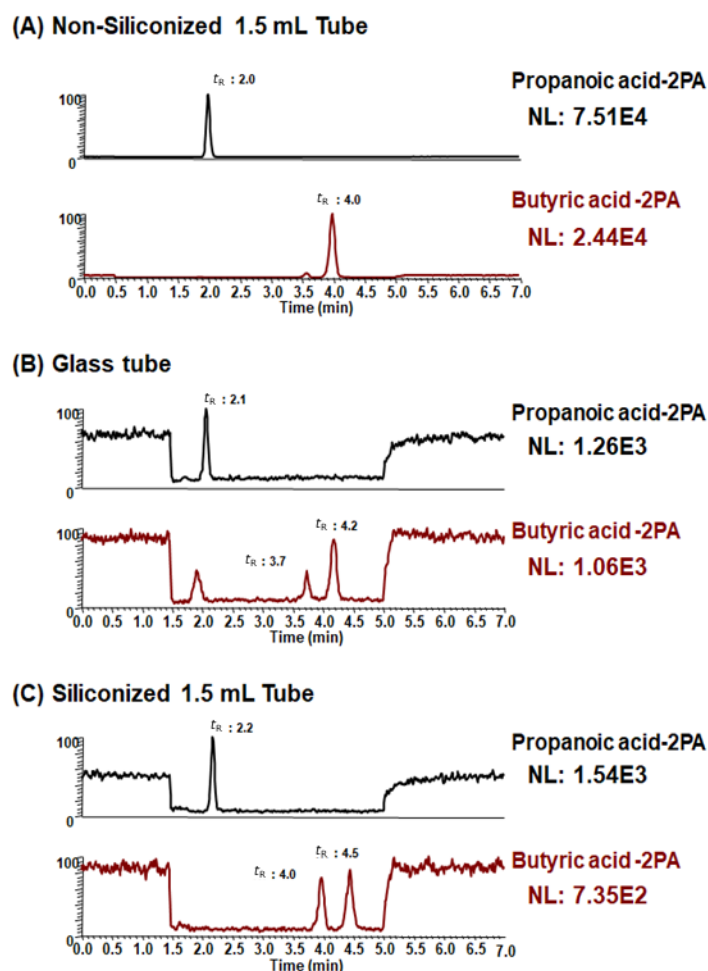
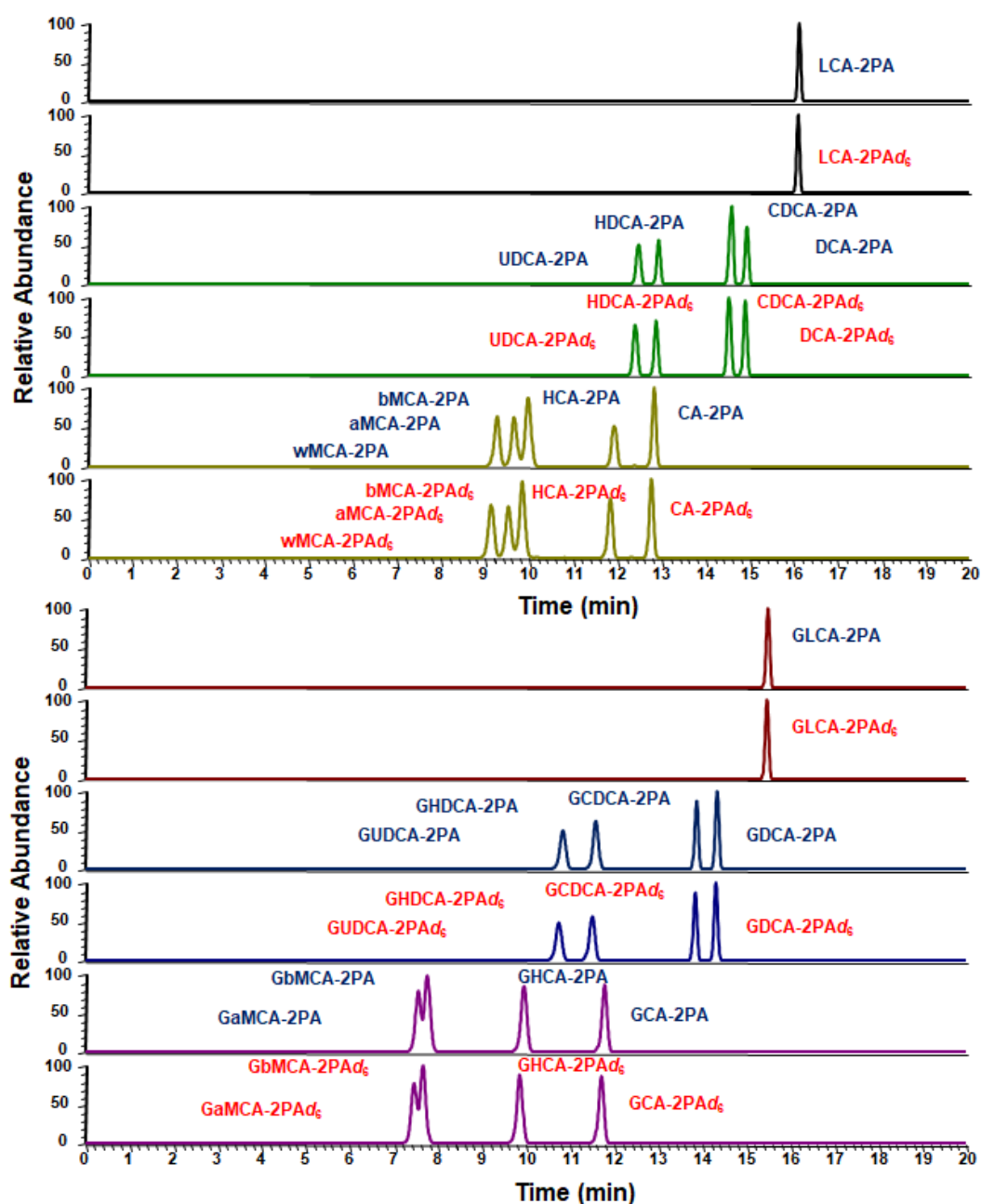


Figure 30 SRM chromatograms and signal intensities obtained by using (A) non-siliconized plastic 1.5 mL tube, (B) glass tube, and (C) siliconized 1.5 mL tube.



次に、合成した 2PA- $d_6$  を用いた CIL-LC-MS/MS の相対定量精度を検証した。同一被検試料に対して、それぞれ 2PA 及び 2PA- $d_6$  で標識した後に等量混合し、各分析対象化合物の 2PA- $d_6$ /2PA 標識体のピーク面積比を算出した。試料には、標準溶液、ヒトプール血漿、マウスプール血漿、ヒトプール血漿に対して標準溶液を添加して調製した (quality control, QC) 試料及びマウス QC 試料の計 5 種類を用いた。胆汁酸と脂肪酸及び IAA の標準溶液から得られた SRM クロマトグラムをそれぞれ Fig. 31 と Fig. 32 に示した。また、全試料における分析物のピーク面積比を Table 11 に示した。マウスプール血漿中のいくつかの胆汁酸は、内因性の濃度が非常に薄いため検出されなかった。また、ミュリコール酸やヒオコール酸はヒトには存在しないため、ヒト血漿中からは非検出であった。しかし、これらについても、標準溶液や QC 試料では、ほぼ等しい 2PA- $d_6$ /2PA 標識体のピーク面積比が得られた。さらに、脂肪酸、IAA も同様に、全試料においてほぼ等しい面積比となった。SRM クロマトグラムで示されているとおり、2PA と 2PA- $d_6$  標識体のカラム保持時間はほぼ一致しており、大部分のマトリックス効果を補正していると考えられた。ただし、重水素標識体は、僅からながら ODS カラムとの疎水性相互作用が弱まることにより、保持時間が若干早くなる。このため、マトリックス効果の完全な補正は難しく、誤差やバラツキの原因となっていると考えられた。

この検証から、化合物によっては、およそ 0.8 以下又は 1.4 倍以上の変化を捉える定量精度であるが、血中のカルボキシル基含有代謝物の包括的な相対定量手法としての有用性が示された。



**Figure 31 Selected reaction monitoring (SRM) chromatograms of mixture of 18 bile acid standards.**

The standard mixture was labeled with either 2PA or 2PA- $d_6$ , and 1:1 mixture of the labeled compounds was analyzed by RPLC triple-quadrupole mass spectrometry. LCA: lithocholic acid, UDCA: ursodeoxycholic acid, HDCA: hyodeoxycholic acid, CDCA: chenodeoxycholic acid, DCA: deoxycholic acid, wMCA:  $\omega$ -muricholic acid, aMCA:  $\alpha$ -muricholic acid, bMCA:  $\beta$ -muricholic acid, HCA: hyocholic acid, CA: cholic acid, GLCA: glycolithocholic acid, GUDCA: glyco-ursodeoxycholic acid, GHDCA: glycohyodeoxycholic acid, GCDCA: glycochenodeoxycholic acid, GDCA: glycodeoxycholic acid, GaMCA: glyco- $\alpha$ -muricholic acid, GbMCA: glyco- $\beta$ -muricholic acid, GHCA: glychohyocholic acid, GCA: glychocholic acid

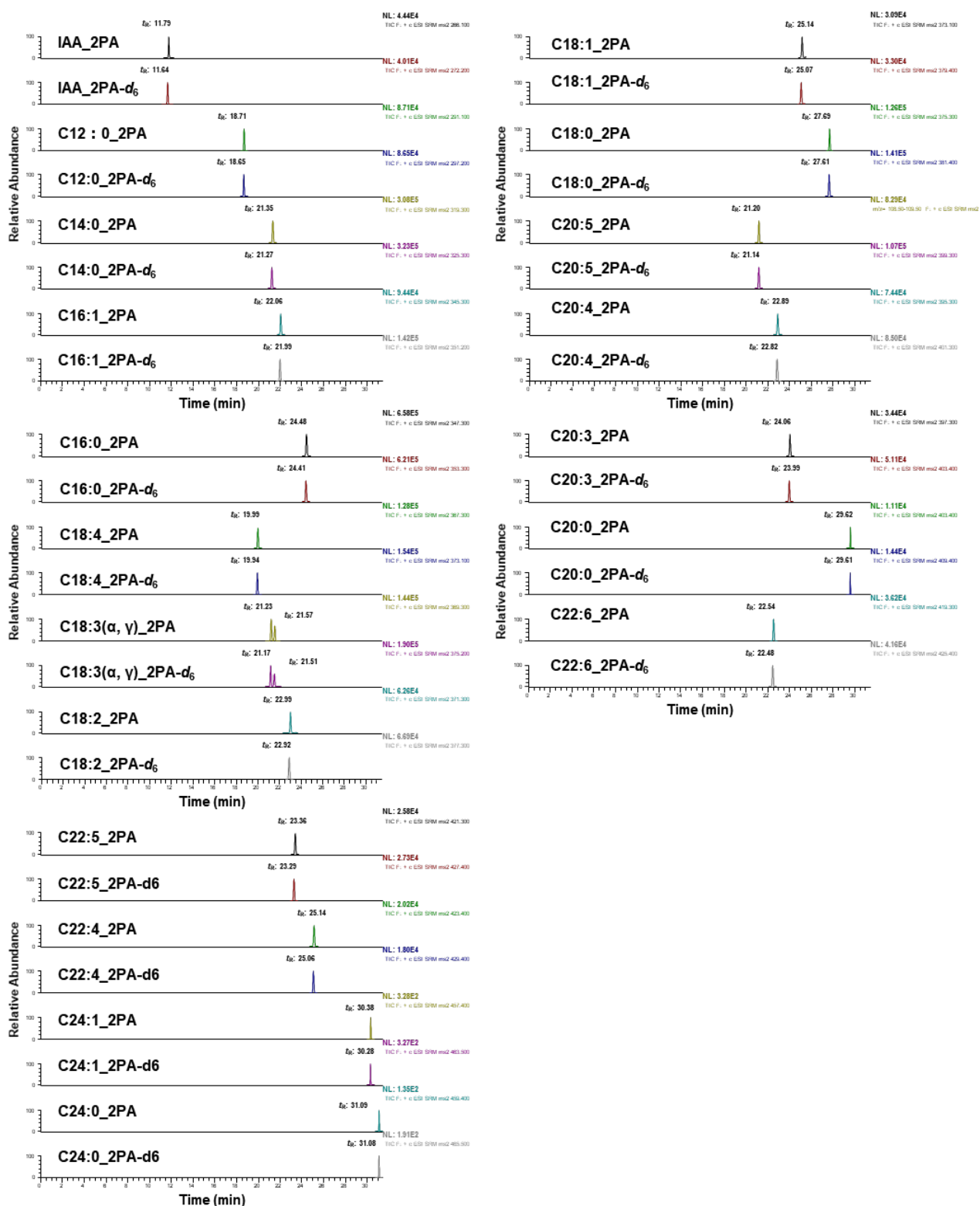


Figure 32 . SRM chromatograms of 21 fatty acids and IAA

The standard mixture was labeled with either 2PA or 2PA-d<sub>6</sub>, and 1:1 mixture of the labeled compounds was analyzed by RPLC triple-quadrupole mass spectrometry.

**Table 11 Results of peak area ratio (2PA- $d_6$ /2PA) (n = 3; mean  $\pm$  standard deviation, %).**

Analyte	$m/z$ (2PA)	$m/z$ (2PA- $d_6$ )	Retention Time (min)	Std. mixture	Human plasma	Mouse plasma	QC plasma (human)	QC plasma (mouse)
Cholic acid	499.5	505.5	12.5	0.96 $\pm$ 0.04	0.87 $\pm$ 0.06	0.79 $\pm$ 0.05	0.84 $\pm$ 0.03	0.89 $\pm$ 0.04
$\alpha$ -muricholic acid	499.5	505.5	9.1	1.00 $\pm$ 0.05	ND	ND	0.88 $\pm$ 0.04	0.87 $\pm$ 0.04
$\beta$ -muricholic acid	499.5	505.5	9.4	0.90 $\pm$ 0.03	ND	0.82 $\pm$ 0.12	0.85 $\pm$ 0.02	0.83 $\pm$ 0.04
$\omega$ -muricholic acid	499.5	505.5	8.7	0.91 $\pm$ 0.03	ND	ND	0.84 $\pm$ 0.06	0.85 $\pm$ 0.01
Hyocholic acid	499.5	505.5	11.5	0.91 $\pm$ 0.04	ND	ND	0.90 $\pm$ 0.10	0.88 $\pm$ 0.04
Hyodeoxycholic acid	483.5	489.5	12.6	0.84 $\pm$ 0.01	0.92 $\pm$ 0.16	ND	0.82 $\pm$ 0.03	0.84 $\pm$ 0.03
Chenodeoxycholic acid	483.5	489.5	14.1	0.97 $\pm$ 0.05	0.88 $\pm$ 0.03	ND	0.87 $\pm$ 0.03	0.91 $\pm$ 0.02
Ursodeoxycholic acid	483.5	489.5	12.1	0.95 $\pm$ 0.04	0.95 $\pm$ 0.11	ND	0.86 $\pm$ 0.04	0.87 $\pm$ 0.01
Deoxycholic acid	483.5	489.5	14.8	0.97 $\pm$ 0.04	0.90 $\pm$ 0.06	0.99 $\pm$ 0.10	0.92 $\pm$ 0.06	0.93 $\pm$ 0.04
Lithocholic acid	467.5	473.5	16	0.90 $\pm$ 0.03	0.91 $\pm$ 0.04	ND	0.89 $\pm$ 0.08	1.00 $\pm$ 0.14
Glycocholic acid	556.6	562.6	11.3	1.04 $\pm$ 0.05	1.24 $\pm$ 0.31	ND	1.05 $\pm$ 0.13	1.00 $\pm$ 0.04
Glyco- $\alpha/\beta$ -muricholic acid	556.6	562.6	7.3	0.88 $\pm$ 0.04	ND	ND	0.82 $\pm$ 0.06	0.88 $\pm$ 0.03
Glycohyocholic acid	556.6	562.6	9.4	0.95 $\pm$ 0.05	ND	ND	0.97 $\pm$ 0.06	0.89 $\pm$ 0.07
Glycohyodeoxycholic acid	540.6	546.6	11.1	1.01 $\pm$ 0.04	ND	ND	0.91 $\pm$ 0.12	0.93 $\pm$ 0.02
Glycochenodeoxycholic acid	540.6	546.6	14.1	1.08 $\pm$ 0.15	0.55 $\pm$ 0.20	ND	0.87 $\pm$ 0.10	0.71 $\pm$ 0.12
Glycoursodeoxycholic acid	540.6	546.6	11.1	1.04 $\pm$ 0.06	ND	ND	0.9 $\pm$ 0.12	0.93 $\pm$ 0.02
Glycodeoxycholic acid	540.6	546.6	14.1	0.98 $\pm$ 0.04	0.93 $\pm$ 0.04	ND	0.91 $\pm$ 0.07	0.93 $\pm$ 0.03
Glycolithocholic acid	524.6	530.6	15.3	1.03 $\pm$ 0.06	0.82 $\pm$ 0.10	ND	0.86 $\pm$ 0.07	0.89 $\pm$ 0.10
Propanoic acid	165.1	171.1	2.5	0.95 $\pm$ 0.11	0.92 $\pm$ 0.04	0.98 $\pm$ 0.04	0.88 $\pm$ 0.04	0.87 $\pm$ 0.01
Butyric acid	179.1	185.1	5.1	0.92 $\pm$ 0.13	0.87 $\pm$ 0.04	1.04 $\pm$ 0.11	0.83 $\pm$ 0.07	0.88 $\pm$ 0.02
Lauric acid	291.1	297.2	18.6	0.99 $\pm$ 0.03	0.96 $\pm$ 0.03	1.29 $\pm$ 0.18	0.91 $\pm$ 0.12	1.02 $\pm$ 0.09
Myristic acid	319.3	325.3	21.3	0.96 $\pm$ 0.05	1.03 $\pm$ 0.12	0.95 $\pm$ 0.11	0.84 $\pm$ 0.19	0.80 $\pm$ 0.19
Palmitic acid	345.3	351.2	24.4	0.96 $\pm$ 0.10	0.90 $\pm$ 0.09	0.78 $\pm$ 0.07	0.92 $\pm$ 0.27	0.81 $\pm$ 0.18
Palmitoleic acid	345.3	351.2	22	1.46 $\pm$ 0.03	1.18 $\pm$ 0.05	1.04 $\pm$ 0.14	1.19 $\pm$ 0.22	1.20 $\pm$ 0.26
Stearic acid	375.3	381.4	27.6	1.04 $\pm$ 0.07	1.13 $\pm$ 0.29	0.83 $\pm$ 0.07	1.16 $\pm$ 0.43	0.91 $\pm$ 0.24
Oleic acid	373.1	379.4	25.1	1.11 $\pm$ 0.10	0.79 $\pm$ 0.06	0.71 $\pm$ 0.11	0.82 $\pm$ 0.22	0.74 $\pm$ 0.21
Arachidic acid	403.4	409.4	29.6	1.39 $\pm$ 0.16	1.20 $\pm$ 0.27	0.83 $\pm$ 0.04	1.26 $\pm$ 0.45	0.94 $\pm$ 0.23
Lignoceric acid	459.4	465.5	31.1	1.20 $\pm$ 0.28	0.75 $\pm$ 0.28	0.82 $\pm$ 0.04	0.88 $\pm$ 0.29	0.79 $\pm$ 0.11
Nervonic acid	457.4	463.5	30.3	1.02 $\pm$ 0.08	0.72 $\pm$ 0.09	0.60 $\pm$ 0.11	0.71 $\pm$ 0.18	0.62 $\pm$ 0.15
Linoleic acid	371.3	377.3	22.9	1.05 $\pm$ 0.03	0.93 $\pm$ 0.04	0.90 $\pm$ 0.11	0.93 $\pm$ 0.2	0.91 $\pm$ 0.24
$\alpha$ -Linolenic acid	369.3	375.2	21.2	1.37 $\pm$ 0.04	1.12 $\pm$ 0.05	0.94 $\pm$ 0.15	1.12 $\pm$ 0.18	1.10 $\pm$ 0.25
$\gamma$ -Linolenic acid	369.3	375.2	21.5	1.28 $\pm$ 0.05	1.08 $\pm$ 0.03	0.89 $\pm$ 0.16	1.06 $\pm$ 0.18	1.06 $\pm$ 0.27
Stearidonic acid	367.3	373.1	19.9	1.27 $\pm$ 0.07	1.18 $\pm$ 0.02	1.09 $\pm$ 0.14	1.17 $\pm$ 0.13	1.22 $\pm$ 0.25
Dihomo- $\gamma$ -Linolenic acid	397.3	403.4	24	1.46 $\pm$ 0.03	1.10 $\pm$ 0.09	0.88 $\pm$ 0.08	1.13 $\pm$ 0.28	1.06 $\pm$ 0.35
Arachidonic acid	395.3	401.3	22.8	1.21 $\pm$ 0.06	1.10 $\pm$ 0.04	0.97 $\pm$ 0.06	1.11 $\pm$ 0.25	1.12 $\pm$ 0.35
Eicosapentaenoic acid	393.2	399.3	21.1	1.37 $\pm$ 0.06	1.09 $\pm$ 0.03	0.99 $\pm$ 0.17	1.10 $\pm$ 0.17	1.14 $\pm$ 0.30
Adrenic acid	423.4	429.4	25	0.92 $\pm$ 0.12	0.69 $\pm$ 0.08	0.61 $\pm$ 0.10	0.70 $\pm$ 0.19	0.63 $\pm$ 0.24
Docosapentaenoic acid	421.3	427.4	23.3	1.06 $\pm$ 0.07	0.78 $\pm$ 0.06	0.74 $\pm$ 0.13	0.78 $\pm$ 0.2	0.77 $\pm$ 0.26
Docosahexaenoic acid	419.3	425.4	22.5	1.20 $\pm$ 0.06	0.84 $\pm$ 0.06	0.74 $\pm$ 0.06	0.85 $\pm$ 0.17	0.86 $\pm$ 0.27
Indole-3-acetic acid	266.1	272.2	11.6	0.92 $\pm$ 0.16	1.33 $\pm$ 0.13	1.37 $\pm$ 0.10	1.25 $\pm$ 0.17	1.16 $\pm$ 0.15

ND; Non-detected

続いて、本系の相対定量真度を検証するために、まず、プロピオン酸と酪酸の 2PA 誘導体化絶対定量法を構築した。プロピオン酸と酪酸の絶対定量値は、プロピオン酸- $d_5$  及び酪酸- $d_7$  を IS として用い、内標準法によって算出した。Table 12 に示したとおり、両化合物の検量線は、血中濃度を算出するために十分な LOQ、定量範囲において、良好な直線性を示した。

**Table 12 Regression equations and Correlation coefficient of propanoic acid and butyric acid**

Analyte	Linear range ( $\mu\text{mol/L}$ )	Regression equation	Correlation coefficient
Propanoic acid	0.1 - 100	$Y = 0.04782 X + 0.0057$	0.999
Butyric acid	0.1 - 25	$Y = 0.04494 X + 0.0142$	0.992

この絶対定量法の真度、精度を、ヒト及びマウス血漿を用いた添加回収試験により調べた結果、厚生労働省の「医薬品開発における生体試料中薬物濃度分析法のバリデーションに関するガイドライン」\*\*に則り、全ての分析対象化合物に対する真度・精度は、各濃度 15%以内（定量下限においては 20%）であることを確認した（Table 13）。このことから、2PA 誘導体化絶対定量法が、血中におけるプロピオン酸や酪酸の正確な濃度を測定可能であることが示された。

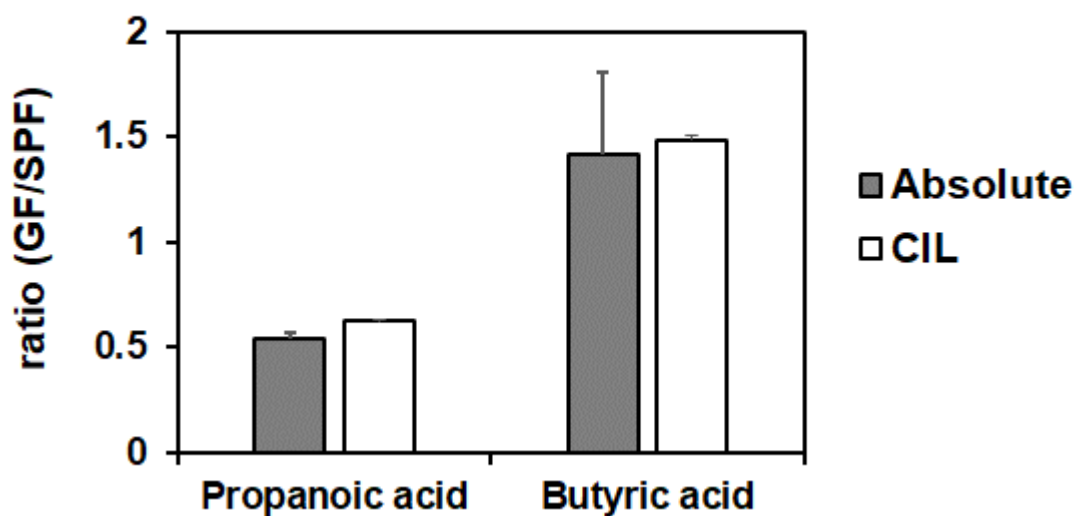
\*\* <https://www.pmda.go.jp/files/000157722.pdf>

**Table 13 Intra-day precision and accuracy (n = 6).**

Analyte	Spiked level ( $\mu\text{mol/L}$ )	Human plasma†		Mouse plasma‡	
		Accuracy (%)	Precision (%)	Accuracy (%)	Precision (%)
Propanoic acid	0.5	-10.6	6.9	-	-
	1	3.5	7.5	-1.6	2.9
	5	-2.4	3.5	-	-
	10	3.4	1.7	-4.8	2.4
	75	2.6	1.7	-	-
Butyric acid	0.5	4.0	3.2	-	-
	1	-4.5	3.4	4.8	6.1
	5	-9.8	2.4	-	-
	10	0.6	1.5	-3.9	1.7

†; propanoic acid: 2.86  $\mu\text{mol/L}$ , butyric acid: 0.76  $\mu\text{mol/L}$ . ‡; propanoic acid: 4.11  $\mu\text{mol/L}$ , butyric acid: 1.17  $\mu\text{mol/L}$ . -; unexecuted

この 2PA 誘導体化絶対定量法と CIL-LC-MS/MS による相対定量法を、SPF マウス及び GF マウスの同一検体に適用し、血中のプロピオン酸と酪酸量についての比 (GF/SPF) を算出し、比較した (Fig. 33)。その結果、CIL-LC-MS/MS によって算出されたピーク面積比は、絶対定量法から算出した比と同等であった。すなわち、2PA- $d_6$  を用いた CIL-LC-MS/MS の、高い相対定量真度が示された。



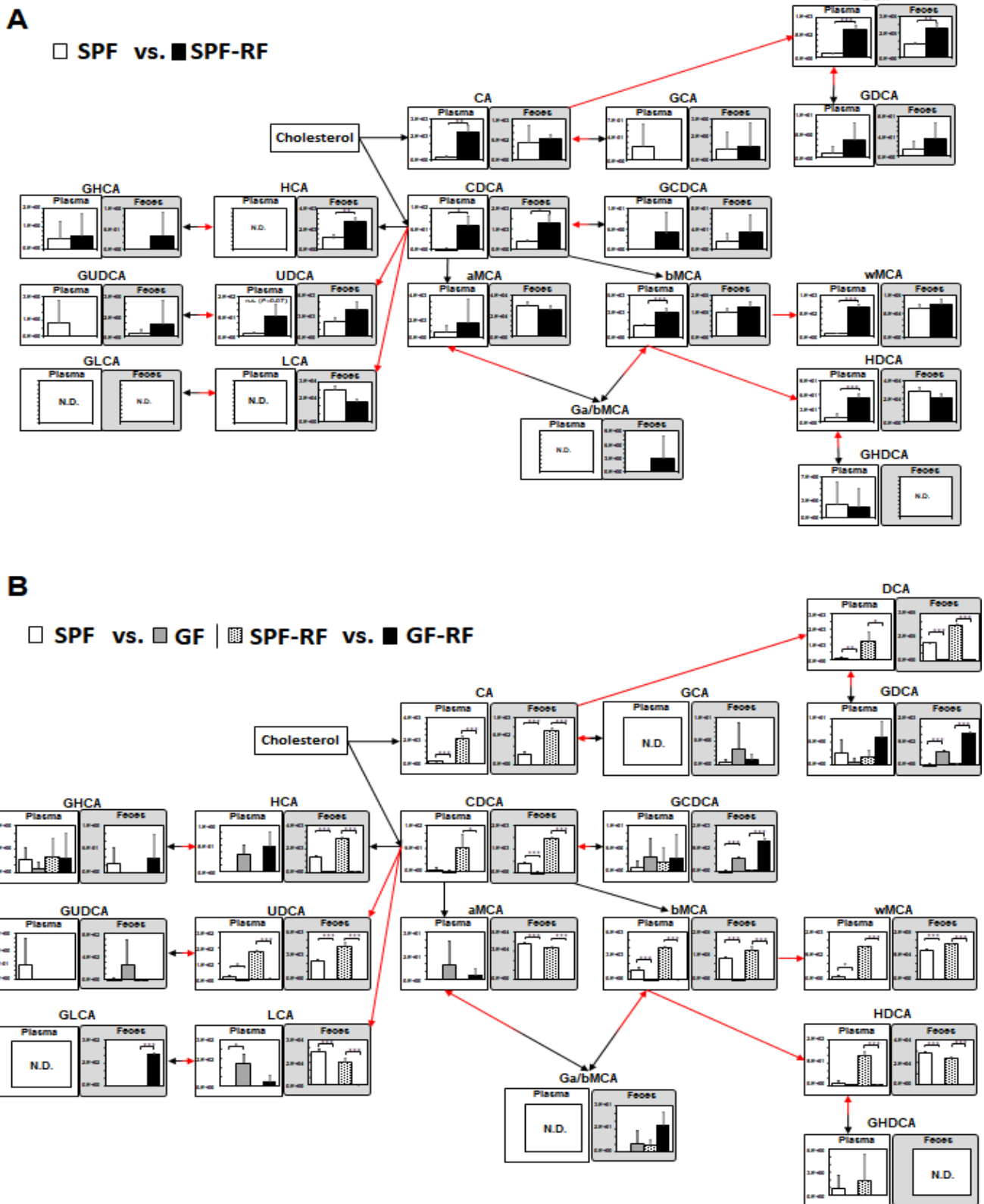
**Figure 33** GF-to-SPF ratios of propanoic acid and butyric acid determined by the 2PA derivatization LC-MS/MS method (Absolute) and by the CIL-LC-MS/MS method (CIL). Bars indicate means  $\pm$  SD. Gray bars indicate the ratio was obtained from absolute quantitation method; Three independent plasma samples were prepared for each group mice and separately labeled by 2PA. GF/SPF ratios of propanoic acid and butyric acid were calculated by mean of the absolute concentrations. White bars indicate the ratio was obtained from CIL-LC-MS/MS method; The plasma samples were obtained by combining equal volume ( $n = 3$ ) of each group mice. The pooled plasma was labeled with 2PA (for SPF) and 2PA- $d_6$  (for GF), respectively. Then labeled samples were mixed (1:1) and subjected to the differential analysis. GF/SPF ratios of propanoic acid and butyric acid were calculated by the mean of ion peak area in triplicate measurements.

## 第 6 節 通常飼育又は無菌飼育マウスの腎障害有無における血液、糞及び盲腸内容物中の胆汁酸、脂肪酸、IAA の解析

第 1 節でも述べたように、腸内細菌由来カルボキシル基含有代謝産物が、腎障害の進行、若しくは保護において、何かしらの生理機能を果たす可能性がある。本節では、CKD における腸内細菌叢の影響の一端を明らかにするために、まず、4 群のマウス (SPF コントロール、SPF-RF、GF コントロール、及び GF-RF) の血漿、糞、盲腸内容物を用意した。次いで、これらの胆汁酸、脂肪酸、及び IAA などの計 40 のカルボキシル基含有代謝産物を CIL-LC-MS/MS にて比較した。18 種の胆汁酸測定結果から作成した、代謝経路マップを Fig. 34 及び Fig. 35 に示した。Fig. 34 及び Fig. 35 は、それぞれ血漿及び糞便中と盲腸内容物中の結果をまとめたものである。

CA、ケノデオキシコール酸 (CDCA)、デオキシコール酸 (DCA)、 $\beta$ -ミュリコール酸 (bMCA)、 $\omega$ -ミュリコール酸 (wMCA)、及びヒオデオキシコール酸 (HDCA) の SPF-RF 群の血漿中濃度は、SPF コントロール群と比較して有意に増加したが (Fig. 34A)、腸内細菌叢が欠失している GF コントロール及び GF-RF では、ほとんど検出されなかった (Fig. 34B)。さらに、糞便中と盲腸内容物のウルソデオキシコール酸 (UDCA) 及びリトコール酸 (LCA) も、GF コントロール群及び GF-RF 群から非検出、又はほとんど検出されなかった (Fig. 34B, Fig. 35B)。すなわち、腎障害によって一部胆汁酸の腸内濃度が増加することと、腸内細菌叢が欠失している場合は、その生体中濃度を大きく減少させることが判った。

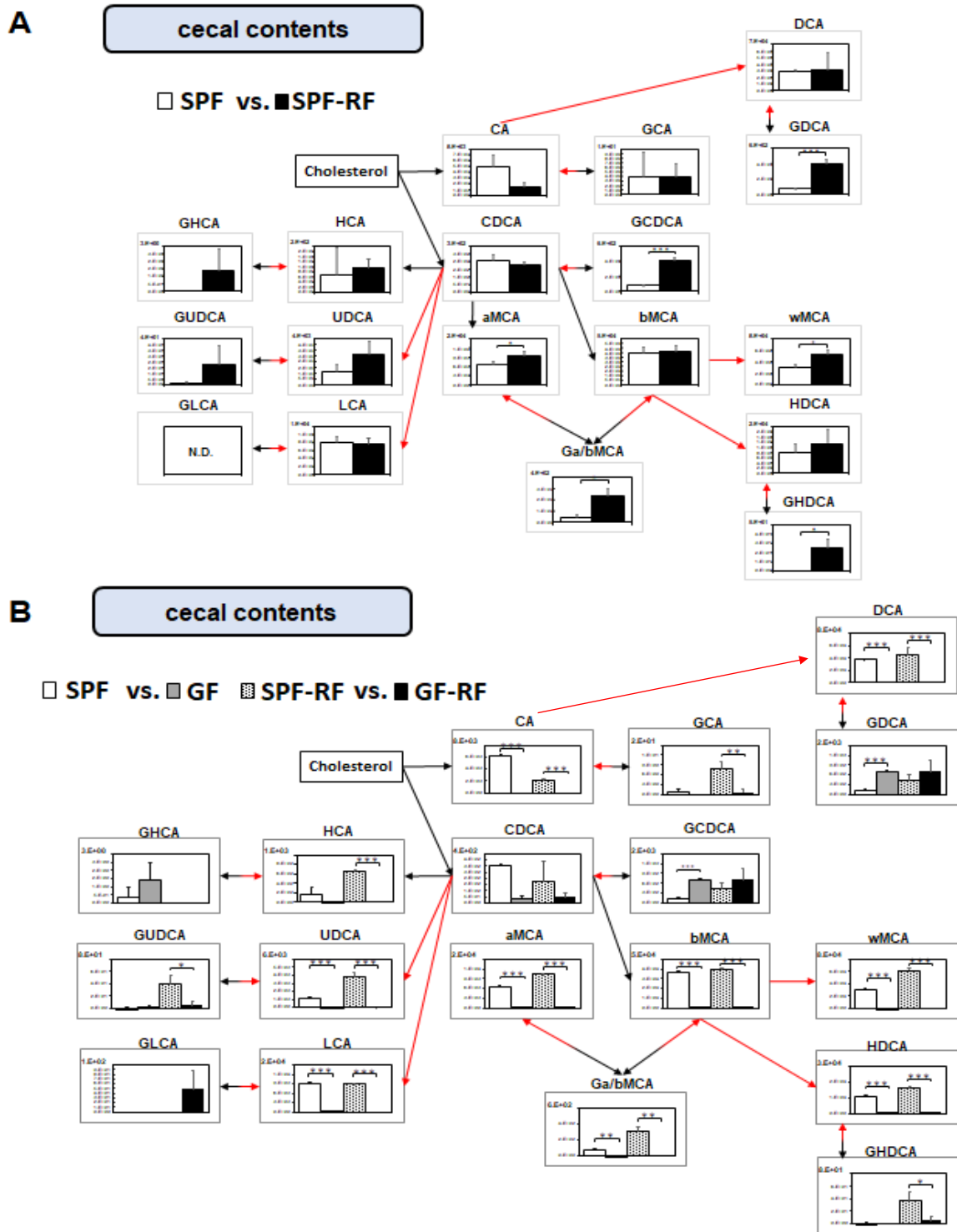




**Figure 34 Reconstruction of bile acid metabolic pathways from 18 bile acids**

Relative quantitative analysis of the bile acids in plasma and feces between (A) SPF and SPF-RF groups. (B) SPF and GF groups, SPF-RF and GF-RF groups.

Metabolic pathways are involved in host and microbiota as indicated by black arrows and red arrows, respectively. Bars indicate means  $\pm$  SD of ion peak area in triplicate measurements. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  compared between indicated groups (Student's *t* test). The pooled samples were prepared from each groups of mice;  $n = 4$  in SPF control (SPF) and GF control (GF), and  $n = 3$  in SPF renal failure (SPF-RF), and  $n = 5$  GF renal failure (GF-RF) mice.



**Figure 35 Reconstruction of bile acid metabolic pathways from 18 bile acids**

Relative quantitative analysis of the bile acids in cecal contents between (A) SPF and SPF-RF groups. (B) SPF and GF groups, SPF-RF and GF-RF groups.

Metabolic pathways are involved in host and microbiota as indicated by black arrows and red arrows, respectively. Bars indicate means  $\pm$  SD of ion peak area in triplicate measurements. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  compared between indicated groups (Student's t test). The pooled samples were prepared from each groups of mice;  $n = 4$  in SPF control (SPF) and GF control (GF), and  $n = 3$  in SPF renal failure (SPF-RF), and  $n = 5$  GF renal failure (GF-RF) mice.

興味深いことに、宿主肝臓において、コレステロールから合成される CA と CDCA も、GF コントロール及び GF-RF 両群において検出されなかった。一方で、グリコケノデオキシコール酸 (GCDCA) などのグリシン抱合体量が、糞便 (Fig. 34B) 及び盲腸内容物中で上昇した (Fig. 35B)。これは、グリシン抱合体が、腸内細菌による脱抱合体代謝を受けられないことに起因すると考えられた。したがって、宿主で生合成された胆汁酸のほとんどは、グリシン又はその他の抱合体として腸内に存在することが示唆された。このような、腸管内における胆汁酸組成の変化が、腎機能にどのように影響するかは、未解明であるが、二次胆汁酸による、宿主のグルコース及び脂質代謝の恒常性への寄与が報告されており<sup>118</sup>、CKD の全身性病態へ何かしらの影響をもたらしている可能性は高いと考えられた。今後、腎障害時における生体内胆汁酸濃度や組成の是正が、病態へどのように影響するか、などの追及が必要である。

通常、食事性脂肪の消化や吸収促進のために、胆汁酸が腸管へ分泌されることを踏まえると、腎障害や腸内細菌の欠失における胆汁酸ホメオスタシスの劇的な変動は、脂肪酸代謝にも影響をもたらすと推定できる。また近年、Kindt らは、腸内細菌叢が、マウス肝臓での脂肪酸の不飽和化や伸長反応を促進することを明らかにしている<sup>119</sup>。さらに、腸内細菌由来尿毒症物質である IAA は、芳香族炭化水素受容体 (AhR) を介して、宿主の脂質代謝に影響することが知られている<sup>25,76,120,121</sup>。したがって、筆者は GF-RF 群と SPF-RF 群とでは、生体内脂肪酸や IAA の量や組成が変化し、それが CKD の病態進行に寄与するのではないかと考えた。この仮説検証のために、本節では、胆汁酸分析と同じく 4 群マウス試料に対し、SCFA、飽和脂肪酸、一価不飽和脂肪酸、 $\omega$ -6 (n-6)、及び  $\omega$ -3 (n-3) 多価不飽和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acids, PUFA) を含む 21 種類の脂肪酸と IAA について、開発した CIL-LC-MS/MS を用いて測定を行った。

まず、SPF 環境下腎機能障害における生体内濃度の変化を明らかにした。Fig. 36 に有意な差を示した IAA 及び脂肪酸を抜粋して示した。

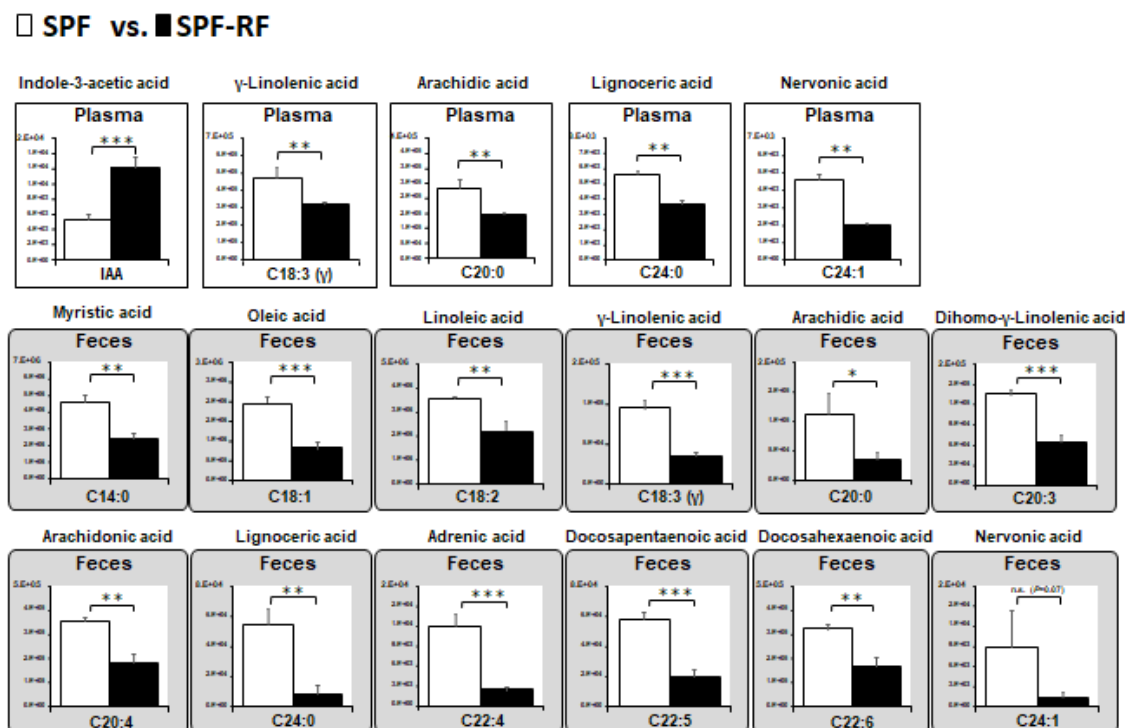


Figure 36 A panel of statistically significant fatty acids and IAA in plasma and feces between SPF and SPF-RF groups

Bars indicate means  $\pm$  SD of ion peak area in triplicate measurements.

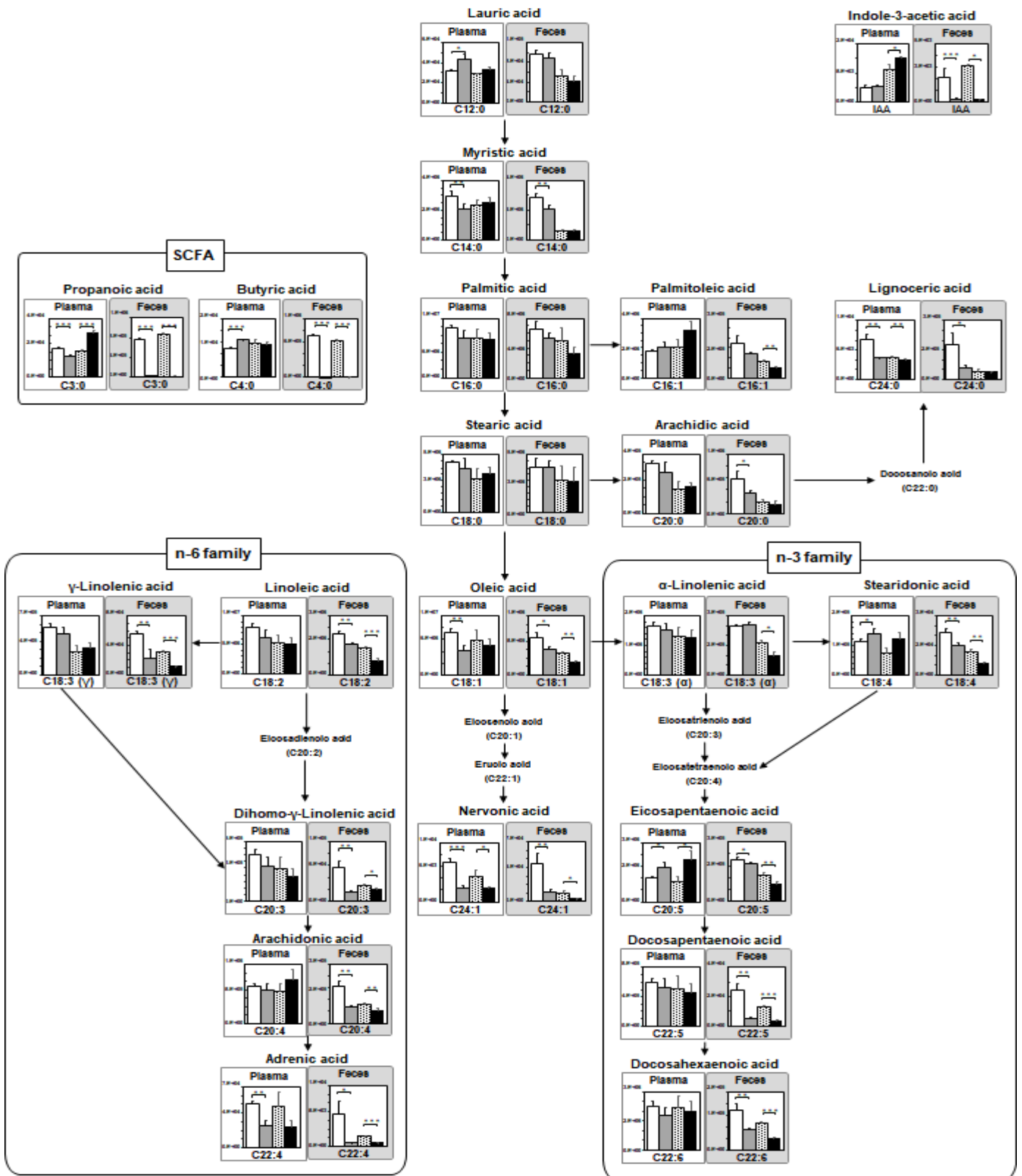
\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  compared between indicated groups (Student's t test).

腎障害によって血中の IAA は増加したが、脂肪酸については、増加するものはない。それどころか、 $\gamma$ -リノレン酸 (C18:3 n-6)、アラキジン酸 (C20:0)、リグノセリン酸 (C24:0)、及びネルボン酸 (C24:1) は、腎障害によって有意に血中濃度が減少した。これら脂肪酸が減少する機序や意義は、不明ではあるが、 $\gamma$ -リノレン酸については、CKD 患者血漿で行われた既存報告と一致していた<sup>122</sup>。また、糞中のミスチン酸 (C14:0)、オレイン酸 (C18:1)、リノール酸 (C18:2)、C18:3 n-6、C20:0、ジホモ- $\gamma$ -リノレン酸 (C20:3)、アラキドン酸 (C20:4)、C24:0、アドレン酸 (C22:4)、ドコサペ

ンタエン酸 (C22:5)、及びドコサヘキサエン酸 (C22:6) は、SPF よりも SPF-RF に  
おいて有意に低下していた (Fig. 36)。続いて、通常状態又は腎障害時の腸内細菌  
叢の有無における変化を明らかにした (Fig. 37, Fig. 38)。注目すべき点として、腎障  
害に減少した脂肪酸とパルミトレイン酸 (C16:1) の糞及び盲腸内容物濃度は、SPF  
コントロール群よりも GF コントロール群の方が低いため、GF-RF 群が、4 群の中  
で最低レベルとなっていた。これらの結果から、腸内の脂肪酸レベルは、腎機能と腸  
内細菌叢の両方の影響を受けることが判った。

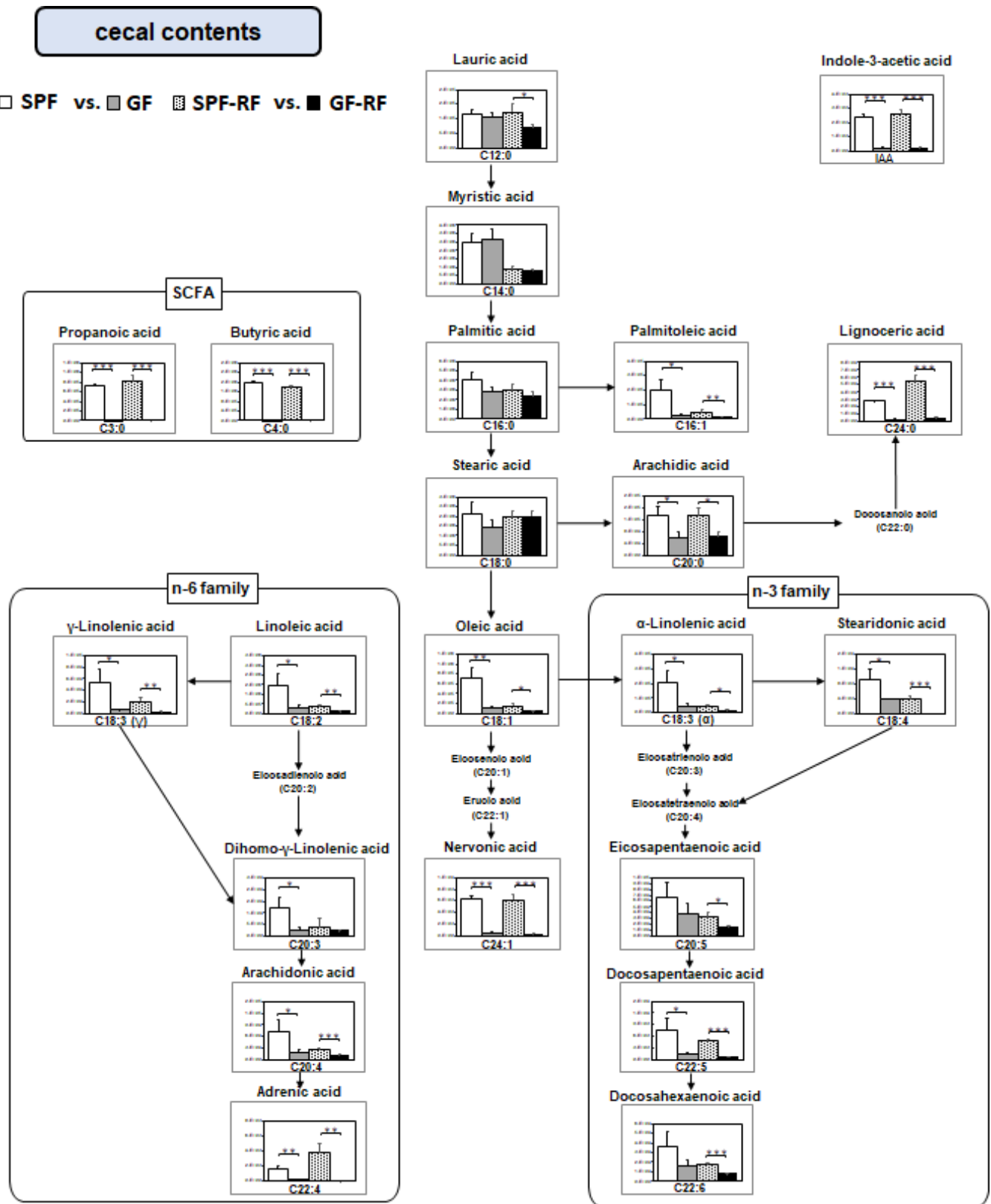
血漿中の、C 14:0、C 18:1、C 24:1、及び C 22:4 レベルは、SPF コントロール  
群と比較して、GF コントロール群で有意に低かった。反対に、ラウリン酸 (C12:0)、ス  
テアリドン酸 (C18:4)、及びエイコサペンタエン酸 (C20:5) は、GF コントロール群に  
おいて高かった (Fig. 37)。これらの知見は、腸内細菌叢が、脂肪酸の不飽和化や伸  
長などに影響を与え、宿主の血中脂肪酸プロファイルにも実質的な影響をもたらすこ  
とを示唆した。特定の乳酸菌が、多価不飽和脂肪酸の飽和化代謝能を有するため<sup>26</sup>、  
上述の結果の一部は、そのような菌種の欠失が影響したと考えられる。

□ SPF vs. ■ GF | ▨ SPF-RF vs. ■ GF-RF



**Figure 37 Reconstruction of integrate metabolic pathways from 19 fatty acids, SCFA, and IAA**

Relative quantitative analysis of the fatty acids and IAA in plasma and feces between SPF and GF groups, SPF-RF and GF-RF groups. Bars indicate means  $\pm$  SD of ion peak area in triplicate measurements. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  compared between indicated groups (Student's t test).



**Figure 38 Reconstruction of integrate metabolic pathways from 19 fatty acids, SCFA, and IAA**

Relative quantitative analysis of the fatty acids and IAA in cecal contents SPF and GF groups, SPF-RF and GF-RF groups. Bars indicate means  $\pm$  SD of ion peak area in triplicate measurements. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  compared between indicated groups (Student's t test).

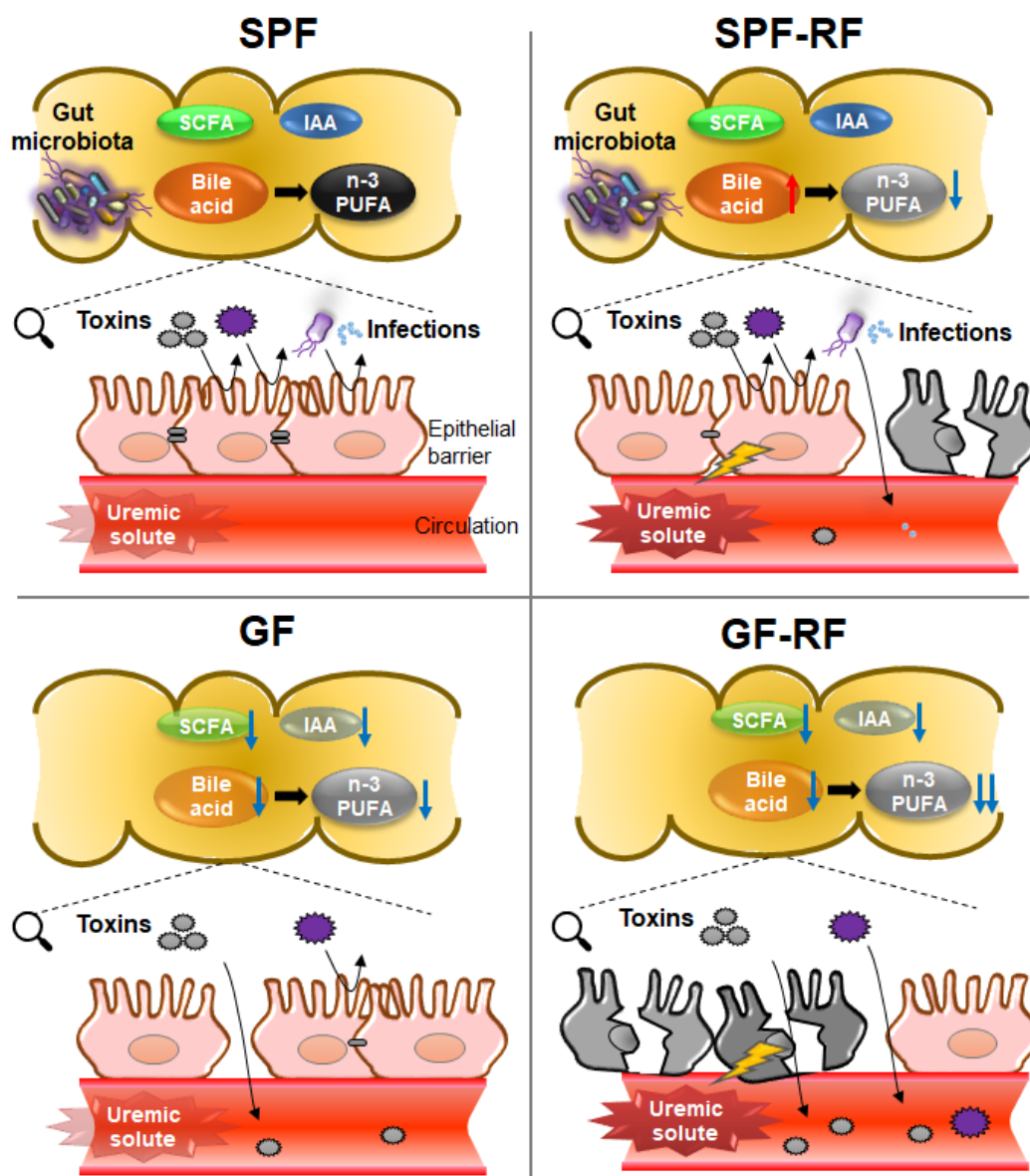
SCFA 及び IAA は、それぞれ腸内微生物叢によって、食物繊維及びトリプトファンから産生される<sup>28,76</sup>。したがって、これらの血中濃度は、腸内細菌叢に依存していると推定していた。しかしながら、Fig. 37 に示されるように、GF 群において、これらの血中レベルは大きな影響を受けないことが判った。すなわち、食事などによる他からの供給量が、血中濃度総量の大部分を占めると考えられる。過去に筆者らの研究グループが、キャピラリー電気泳動装置-飛行時間型質量分析法を用いて同一試料を測定した際は、酪酸については検出下限を下回ったため<sup>42</sup>、今回開発した CIL-LC-MS/MS が、より高感度に解析可能であることも判った。以前の研究と同様に、糞中及び盲腸内容物中のプロピオン酸や酪酸は、GF マウス群においてほとんど検出されず、腸内での SCFA 産生は、腸内細菌叢に完全に依存していた。同様に、糞中及び盲腸内容物中の IAA は、GF マウス群において顕著に減少しており、腸内濃度は腸内細菌叢に依存すると考えられた。

緒論でも述べたように、CKD は、ディスバイオーシスや腸管バリアの崩壊を引き起こし、それにより UTx や細菌の腸管への浸透が促進して、さらに CKD が進行する、という悪循環が存在する<sup>38,78,123</sup>。ここで、筆者が特記したいことは、本章で分析対象とした胆汁酸、n-3 PUFA、SCFA、及び IAA は、それぞれ腸管バリア機能を維持する生理機能を有する点である<sup>121,124,125</sup>。この機能に鑑みると、腎障害と腸内細菌叢の欠如の両方によって引き起こされる上述分子の腸内レベルの減少が、腸管に悪影響をもたらし、GF-RF マウスにおける CKD を進行させた可能性がある (Fig. 39)。

近年、CKD の進行に伴って血漿中濃度が低下する 5-メトキシトリプトファンを投与することで、抗炎症及び抗線維効果を介してマウスの腎障害を軽減することが報告されている<sup>32</sup>。同様にして、食事又はプレ、プロバイオティクスによる、IAA、SCFA、及び n-3 PUFA の腸内濃度増加は、CKD の病態進行に対する潜在的な保護効果にも繋がる可能性がある。したがって、CKD 患者生体中の腸内細菌叢由来のカルボキシル



含有代謝物を包括的にモニターすることは、「腸腎連関」及び CKD 治療において有用な知見が得られると考えられ、本手法が、大いに役立つものと期待される。



**Figure 39** A schematic model of the generation and protective effect of microbiota-derived carboxyl-containing metabolites in SPF, SPF-RF, GF, and GF-RF mice.

Gut microbiota produces bile acids, SCFA, PUFA and IAA. Fatty acid is also derived from dietary sources. Germ-free conditions have deleterious effects on the intestinal carboxyl-containing metabolites level. Loss of the intestinal bile acids, n-3 PUFA, SCFA, and IAA accelerates epithelial barrier disruption, and induces inflammatory processes and the progression of renal failure in GF-RF mice.

## 第 7 節 結語

本章では、腸内細菌叢が代謝に深く関与する、カルボキシル基含有代謝物に着目し、その包括的な分析手法として 2PA とその安定同位体を用いた CIL-LC-MS/MS を開発した。本手法は、脂肪酸、胆汁酸、IAA を高い相対定量精度のもと、高感度に検出できる利点を有した。さらに、他の CIL-LC-MS/MS と比較して、安価、迅速、簡便という点でも優れる。

この手法によって、腸内細菌叢の欠失および腎障害がそれぞれ独立して、特定の胆汁酸、脂肪酸、及び IAA の腸内濃度を著しく変化させることが判った。さらに、腎機能障害が、腸管バリア機能維持において重要な n-3 PUFA の腸内濃度の減少を助長させることを明らかにした。すなわち、無菌マウスにおいて、CKD 病態がより増悪した原因の一助に、これらの腸内濃度変化の関与が想定された。したがって、胆汁酸、脂肪酸、及び IAA は、CKD 患者宿主の腸の状態を反映する重要なモニター分子となることが期待され、今後、本手法の臨床応用が期待される。

本章の研究限界として、腎障害モデルの代謝物濃度は、腎クリアランスの低以外にも、飼育環境因子（個体数や相性）がマウスの腸内細菌叢に与える影響の個体差<sup>4</sup>、体重（体液量）、食事摂取量などの交絡因子が存在することが挙げられる。同様の交絡因子は、SPF-RF 群と GF-RF 群の比較においても存在している可能性がある。また、GF-RF において腸管バリア機能の崩壊が生じていた場合、アデニンの吸収が促進し、CKD を進行させた可能性もある。したがって、腎部分摘出など他の CKD モデルを用いた再現検証も必要と考えられる。

## 総括

本論文では、腎疾患に関連する腸内細菌叢由来代謝物に着目し、それらをマウスやヒト検体から選択的又は包括的に定量可能とする 3 つの手法を開発する研究を行い、以下の成果を得た。

第 1 章は、CKD 病態に負の側面をもたらす様々な腸内細菌叢由来 UTx と Cre などの腎機能指標の同時かつ高精度な絶対定量法を確立するため、MS 及び LC の測定条件を精査した。ODS/アニオン交換/カチオン交換基ミックドモードカラムを用いることで、従来の逆相又は順相クロマトグラフィーでは実現できなかったカラム保持とピーク分離を達成した。また、すべての分析対象化合物に対し、安定同位体を IS に用い、生体試料に対して堅牢かつ信頼性の高い分析系を構築できた。本分析系を、19 名の CKD 患者の血清に適用した結果、一部の患者では、Cre 値が低いにも関わらず、TMAO や pCS などが高い血中濃度を示すことを明らかにした。このことは、CKD 患者の診療において、既存の腎機能指標に加えた、UTx の包括的な同時モニターの重要性を示唆した。これまでに、本分析系は、新規予後予測バイオマーカー開発を目的とした大規模コホート研究や、腎疾患の新規治療法開発研究において活用され<sup>46,82,126</sup>、数多くの重要な知見を提供している。

第 2 章では、糖尿病性腎臓病の予後予測マーカーとして期待される腸内細菌叢由来タンパク結合型 UTx の PS について着目し、その血中濃度を把握可能とする免疫学的手法を構築した。ELISA の固相抗原用に数種の PS コンジュゲートを合成することで、反応性及び特異性の高い候補ハイブリドーマの選別が可能であった。計 1440 のコロニーから、PS 構造を抗原決定基とする 2 種のモノクローナル抗体 (YK33.1 と YKS19.2) を得た。さらに、PS 類似体を用いた交差反応性を検証した結果、YKS19.2 のみ、PBS 中よりもヒト血中において、PS に対する特異性が向上

する特性を示した。このユニークな特性には、アルブミン以外の血中タンパク質の影響が示唆されたが、同定までには至らなかった。Bio-YKS19.2 を用いた阻害 ELISA は、血清添加 PS 標準液 1—100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の範囲で直線性の高い阻害曲線を示し、CKD 患者血中 PS 値を算出可能であった。しかし、LC-MS/MS で求めた PS 定量値とは強く相関するものの、その絶対値がおよそ 4 倍程度高く算出されることが判った。この原因については、さらなる解析が必要であるが、YKS19.2 が PS と同一挙動を示す未知の UTx に対して、交差反応を示した可能性が考えられる。仮に交差反応物が影響していたとしても、PS 血中濃度の把握が可能であることから、本抗体は、それらを包括して検出できる「抗 PS 類似体抗体」としての臨床利用が可能である。このような、簡便で迅速な包括的な検出は、糖尿病性腎臓病患者のハイリスク患者のスクリーニングに有用となると考えられる。また、第 1 章で構築した LC-MS/MS による精密な UTx 一斉分析検査を臨床で積極的に適用すべき CKD 患者を、効率的に抽出する予試験法としても役に立つと考えられた。

第 3 章は、腸内細菌叢が、深く関与するカルボキシル基含有代謝物の包括的相対定量法の確立のために、2PA 用いた新規 CIL-LC-MS/MS を構築した。本法に必要な 2PA の安定同位体は、不均一白金族触媒を用いた重水素置換反応を用いて簡便に合成が可能であった。また、本法は、胆汁酸、脂肪酸、IAA を、迅速かつ精度よく相対定量評価できることが判った。4 群のマウス (SPF コントロール、SPF-RF、GF コントロール、及び GF-RF) の血漿、糞、盲腸内容物を分析した結果、腎障害と腸内細菌叢のそれぞれが独立して宿主の脂肪酸などの生体内濃度に影響することが明らかとなった。特に、GF-RF 群は、腸管バリア機能に重要な n-3 PUFA や IAA の腸管レベルが著しく低下していた。この減少と GF-腎障害マウスの病態増悪との関連性については、今後の研究課題であるが、腸管に対する負の関与が想定された。

胆汁酸、脂肪酸、IAA が持つ腸管への多彩な生理機能を考慮すると、本手法によ

る CKD 患者生体中のカルボキシル基含有代謝物の定量評価は、腸状態評価に繋がり、「腸腎連関」及び CKD 病態理解に有用な知見が得られると考えられた。

以上の結果より、腸内細菌由来代謝物を標的とした各分析手法構築に付随する、選択性や定量性の課題に対して、独自性の高い解決方法を提供した。また、腸内細菌叢由来代謝物の体内濃度は、腎障害によって顕著に変動すること、及びそれらの包括的な評価が、バイオマーカー開発や新しい治療法開発に結び付くことを明らかにした。

緒論でも述べたように、CKD 患者の多くが、腎不全や透析治療へ進んでいる現状は、予後予測に資するバイオマーカーの確立と、病因特異的な治療法へのパラダイムシフトの必要性を裏付けている。近年多くの研究から、腎疾患が腸内細菌叢とその関連する宿主代謝に関わることが明確になってきたことから<sup>127-130</sup>、筆者は、それらの詳細な理解、制御方法の開発研究が、腎臓病治療のブレイクスルーとなることを期待して止まない。しかし、腸内細菌の変化及び UTx が、どのような分子機序で腎疾患病態に関わっているかをさらに解明する必要がある、そのためには、研究用途に応じた様々な定量技術が、必然と求められるだろう。本論文で開発した 3 つの手法は、すべて腸内細菌叢が関与する代謝物を標的として腎疾患生体試料へ適用され、それぞれ選択的、汎用的、包括的であるという特色を有している。すなわち、「腸腎連関」に関わる分子を見つけ、精密に評価し、臨床応用に繋げる一連の研究アプローチにおいて、各手法の技術が活用できる。また、ミックストモードカラムによる分析系や 2PA を用いた CIL-LC-MS/MS は、測定対象化合物を拡張させる技術的余地を残しており、今後の検討如何では、関連代謝物を含めた、より網羅的な一斉定量に応用できる。さらに、抗 PS 抗体は、検出法の工夫や遺伝子組み換えによる改良を行うことで、さらなる迅速性と汎用性を備えることが可能である。現在、腸内細菌叢又はその代謝物の是正介入による、CKD 患者の生存予後や CVD 発症率などのハードエンドポイ

ント<sup>††</sup>を主要評価項目としたランダム化比較試験は存在しておらず、臨床応用への実現に向け、世界中で多くの研究が進められている状況にある。本研究の成果と分析技術が、腎疾患の新たな治療戦略開発や腸内細菌叢研究の発展に役立つものと期待する。

---

<sup>††</sup> 死亡や心筋梗塞発症、血圧値など、基準が明確に決まっており、だれが判断しても同じ結果が得られるもの

## 謝辞

本研究の機会を与えていただき、その遂行にあたり多大なる御厚情、御指導、御助言を賜りました東北大学大学院薬学研究科がん化学療法薬学分野教授 富岡佳久先生に謹んで深謝申し上げます。また本研究の遂行にあたり、日々、御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました同講師 松本洋太郎 先生、同助教 塚本宏樹 先生、東北メディカル・メガバンク機構講師 三枝大輔 先生、東北大学医学部医学系研究科腎高血圧内分泌学分野・東北大学大学院医工学研究科分子病態医工学分野教授 阿部高明 先生に心より感謝申し上げます。先生方には、終始暖かい激励と公私に渡りひとかたならぬご厚情を賜りました。重ねて御礼申し上げます。

本論文を御精読いただき、審査に際しては適切な御指導、御助言賜りました東北大学大学院薬学研究科教授 大江知行 先生、同教授 高橋信行 先生に厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり、多大なる御協力と貴重なご助言を頂きました東北大学医学部医学系研究科腎高血圧内分泌学分野 鈴木千登世 様、同助教 三島英換 先生、東北メディカル・メガバンク機構地域医療支援部門助教 菊地晃一 先生に深く御礼申し上げます。

本論文作成において、仕事との両立を快く承諾して頂き、貴重なご助言を頂きました東北大学病院教授・薬剤部長 眞野成康 先生、同准教授・副薬剤部長（現 山形

大学医学部附属病院教授・薬剤部長) 山口浩明 先生に厚く御礼申し上げます。先生方のご厚意なしでは成し遂げることができませんでした。

本研究の遂行にあたり、共同研究者として熱心な協力と数多くのご助言を賜りました東北大学病院准教授 前川正光 先生、同助教 小倉次郎 先生に心より御礼申し上げます。先生方には、研究に限らず様々な面で御懇篤なる便宜を図って下さいました。重ねて御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり、CKD 患者さんの血清を快く御恵与下さいました新松戸中央総合病院 副院長 中村司 先生に謹んで深謝申し上げます。

本研究の遂行にあたり、有機化学合成に必要な試薬・器材をご恵与下さいました東北大学大学院薬学研究科分子変換化学分野教授 根東義則 先生、同助教 熊田佳菜子 先生に深く感謝申し上げます。

研究の基礎を与えて下さり、また、東日本大震災の際には、終始この上ない温かい励ましを頂きました新潟大学医歯学総合病院准教授・副薬剤部長 鈴木直人 先生に心より感謝申し上げます。

本研究の遂行にあたり、多大なるご支援・ご協力をいただきました東北大学大学院薬学研究科がん化学療法薬学分野、病態分子薬学分野の皆様にご心より御礼を申し上げます。また、東北大学大学院薬学研究科講師 菊地正史 先生をはじめ、東北大学病院薬剤部の皆様には格別なご高配を賜りました。ここに厚く御礼申し上げます。



本論文作成において、仕事との両立を快く承諾して頂きました新潟大学医歯学総合病院臨床研究推進センターの皆様に謹んで深謝申し上げます。

研究の機会と勉学の場を与えて頂きました元東北大学大学院薬学研究科 教授 故菱沼 隆則 先生、元新潟薬科大学薬学部 教授 故宇田 裕 先生に心より御礼申し上げます。

最後に、社会人になってから学位取得を再挑戦するという私の身勝手な決断を理解し、常に温かい目で見守り、心の支えとなってくれた妻 美穂と長男 祥直、次男 悠臣、そして両親に限りない敬意と感謝を表します。

## 実験の部

### 試薬

飽和/単不飽和脂肪酸混合物及び多価不飽和脂肪酸混合物は、Cayman Chemicals (Ann Arbor, MI, USA) から購入した。白金/炭素 (Pt 5%)、デオキシコール酸、リトコール酸、IAA、プロピオン酸、酪酸、Cre、ウシ血清アルブミン、*p*-ニトロフェノール、*p*-クロロフェノール、及び LC/MS グレードの酢酸アンモニウム及び酢酸は、和光純薬品工業株式会社 (Osaka, Japan) から購入した。2PA、DPDS、TPP、TMAO 二水和物、ビス (4-ヒドロキシフェニル) ジスルフィド、ピリジン-三酸化硫黄錯体、 $\sigma$ -クレゾール、8-キノリノール、1-ナフトール、2-ナフトール、4-メチルウンベリフェロン、及び pCS カリウム塩は、東京化成工業株式会社 (Tokyo, Japan) から購入した。PS ナトリウム塩及び PS- $^{13}\text{C}_6$  ナトリウム塩は、Sundia MediTech Company (Shanghai, China) から購入した。m1A は、Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) から購入した。ウルソデオキシコール酸、グリコウルソデオキシコール酸、InS カリウム塩は、ナカライテスク株式会社 (Kyoto, Japan) から購入した。プロピオン酸- $d_5$  及び酪酸- $d_7$ 、4-EPS、Cre- $d_3$ 、及び InS- $d_4$  は、TRC (North York, Canada) より購入した。TMAO- $d_9$ は、Cambridge Isotope Laboratories (Tewksbury, MA, USA) から購入した。4-EPS- $d_4$ 、pCS- $d_4$ 、及び m1A- $d_5$  は、東北大学大学院薬学研究科がん化学療法薬学分野で合成したものをを用いた。グリココール酸、グリコチオコール酸、グリコケノデオキシコール酸、グリコデオキシコール酸、グリコリトコール酸、ヒオコール酸、ヒオデオキシコール酸、 $\alpha$ -ムリコール酸、 $\beta$ -ムリコール酸、 $\omega$ -ムリコール酸、グリコチオデオキシコール酸、グリコ- $\alpha$ -ムリコール酸、グリコ- $\beta$ -ムリコール酸は、東北大学大学院薬学研究科病態分子薬学分野

にて合成したものをを用いた。パラジウム/炭素 (Pd 10%)、コール酸、ケノデオキシコール酸、OVA、ヒト血清凍結乾燥粉末由来のアルブミン及びポリマー結合トリフェニルホスフィン、SIGMA-Aldrich (St. Louis, MO, USA) から購入した。LC/MS グレードのメタノール、2-プロパノール、及びアセトニトリル、重水は、関東化学株式会社 (Tokyo, Japan) から購入した。ヒトプール血漿は、Biopredic International (Rennes, France) と Innovative Research (Novi, MI, USA) より購入した。カニクイザル血漿、及びマウス血漿は、それぞれ、Valley Biomedical (Winchester, UK)、及び Rockland Immunochemicals Inc. (Limerick, PA, USA) から購入した。ヒトプール血清は、日水製薬株式会社 (Tokyo, Japan) から購入した。超純水は、オルガノ株式会社 (Tokyo, Japan) の PURELAB Ultra Genetic にて精製したものをを用いた。SMCC 及び EZ - Link NHS - LC-ビオチンは、Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) から購入した。KMUS 及び GMBS は、Dojindo Laboratories (Kumamoto, Japan) から購入した。キーホールリンペットヘモシアニン (KLH) は、MP Bio Japan (Tokyo, Japan) から購入した。西洋ワサビペルオキシダーゼ (horseradish peroxidase, HRP) 結合ヤギ抗マウス IgG Ab は、Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA, USA) から購入した。3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) 溶液 (1 ×) は、eBioscience (San Diego, CA, USA) から購入した。HRP 結合ストレプトアビジンは、BioLegend (San Diego, CA, USA) から購入した。

## 装置

第 1 章及び第 2 章では、イオン化部として、ESI プローブを装着した三連四重極型質量分析計 TSQ Quantum Ultra (Thermo Fisher Scientific) に高速液体クロマトグラフとして NANOSPACE SI-2 (Shiseido) を接続した装置を使用した。波

形解析及び内部標準法による定量計算は、Xcalibur (Thermo Fisher Scientific) により行った。第 3 章では、イオン化部として、ESI プローブを装着した三連四重極型質量分析計 TSQ Quantum Vantage (Thermo Fisher Scientific) に高速液体クロマトグラフとして Nexera シリーズ (Shimadzu) を接続した装置を使用した。

HRMS 測定には、Q Exactive (Thermo Fisher Scientific) 装置を使用した。NMR 測定には、ECA600 (JEOL) 装置を使用し、元素分析には、CHN コーダー MT-6 (ヤナコ) 装置をそれぞれ使用した。

吸光マイクロプレートリーダーは、Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific) 装置を使用した。

### 統計分析

全ての統計解析は、JMP ソフトウェア (SAS Institute) を用いて行った。

### 研究倫理

本研究は、東北大学大学院医学研究科倫理委員会の承認を受けた倫理申請書及びプロトコールに従った。CKD 患者血清は、説明文書、アセント及び同意文書を用いて説明して同意を得た後に、採取し、 $-80^{\circ}\text{C}$ で凍結保存した。また、動物実験は、東北大学動物実験専門委員会に承認された動物実験計画書に準拠し、「国立大学法人東北大学における動物実験等に関する規程」を遵守して実施した。

## 第 1 章 付属実験

### 分析カラム

この研究では以下のカラムを使用した。XSELECT CSH C18 (2.1 mm i.d. × 150 mm, 3.5 μm; Waters)、Luna Phenyl-Hexyl (2.0 mm i.d. × 100 mm, 3 μm; Phenomenex)、SeQuant ZIC-HILIC (2.1 mm i.d. × 50 mm, 3.5 μm; Merck)、Scherzo SM-C18 (2 mm i.d. × 50 mm, 3 μm; Imtakt)、Scherzo SW-C18 (2 mm i.d. × 50 mm, 3 μm; Imtakt)、Scherzo SS-C18 (2 mm i.d. × 50 mm, 3 μm; Imtakt)。XSELECT CSH C18 カラム及び Luna Phenyl-Hexyl カラムを用いた際の、LC 移動相は、A: 0.1% HCOOH in H<sub>2</sub>O、B: 0.1% HCOOH in MeCN を使用し、グラジエント溶出 (条件: 0–2 min: 5% 移動相 B; 2.1–12 min: 5–100% 移動相 B; 12.1–13 min: 100% 移動相 B; 13.1–16 min: 10% 移動相 B; カラム温度 40°C) にて測定を行った。ZIC-HILIC カラムを用いた際の、LC 移動相は、10 mmol/L AcONH<sub>4</sub> in H<sub>2</sub>O/MeCN (20/80, v/v) を使用し、アイソクラテック溶出 (カラム温度 55°C) にて測定を行った。Scherzo SW-C18 カラムを用いた際の、LC 移動相は、A: 0.1% AcOH in H<sub>2</sub>O/MeCN (80/20, v/v)、B: 10 mmol/L AcONH<sub>4</sub> in H<sub>2</sub>O/MeCN (20/80, v/v) を使用し、グラジエント溶出 (条件: 0–1 min: 5% 移動相 B; 1–4 min: 5–9% 移動相 B; 4–4.1 min: 9–20% 移動相 B; 4.1–14 min: 20% 移動相 B; 14–14.1 min: 20–60% 移動相 B; 14.1–15.5 min: 60% 移動相 B; 15.5–15.6 min: 65% 移動相 B; 15.6–18 min: 5% 移動相 B; カラム温度 55°C) にて測定を行った。Scherzo SM-C18 カラム及び Scherzo SS-C18 カラムを用いた際の LC 条件は、次項に示した。

Scherzo SS-C18 及び Scherzo SM-C18 を用いた LC-MS / MS 条件

**【LC】**

Mobile phase:	A: 0.1% AcOH in H <sub>2</sub> O/MeCN (80/20, v/v) B: 10 mmol/L AcONH <sub>4</sub> in H <sub>2</sub> O/MeCN (20/80, v/v) C: MeCN (Post-column solvent additions)
Gradient:	0.0—1.0 min: A/B = 75/25 1.0—4.0 min: A/B = 75/25 → 66/34 4.1—16.0 min: A/B = 40/60 16.1—17.5 min: A/B = 0/100 17.6—20.0 min: A/B = 75/25
Flow rate (pump A, B) :	0.0—16.0 min: 200 µL/min 16.1—18.5 min: 600 µL/min 18.6—20.0 min: 200 µL/min
Flow rate (pump C):	0.0—20.0 min: 200 µL/min
Oven temperature:	55°C
Injection volume:	1 µL
Needle wash solvent:	10%MeOH

**【MS】**

Ionization:	0—6.5 min: ESI (+), 6.5—20 min: ESI (-)
Spray voltage:	ESI (+): 4000 V, ESI (-): 2500 V
Heater temperature:	500°C

Sheath gas pressure: 60 psi  
 Auxiliary gas pressure: 60 psi  
 Capillary temperature: 350°C  
 Collision gas pressure: 2.0 mTorr

SRM Transitions:

	ESI mode	Q1 ( <i>m/z</i> )	Q3 ( <i>m/z</i> )	Collision energy (V)	Tube lens (V)
Creatinine	+	114.2	44.3	19	95
Creatinine- <i>d</i> <sub>3</sub>	+	117.2	47.3	19	95
1-Methyladenosine	+	282.1	150.1	20	95
1-Methyladenosine- <i>d</i> <sub>5</sub>	+	287.1	155.1	20	95
Trimethylamine <i>N</i> -oxide	+	76.1	58.2	21	65
Trimethylamine <i>N</i> -oxide- <i>d</i> <sub>9</sub>	+	85.1	66.3	21	65
Phenyl sulfate	-	173.0	93.3	24	52
Phenyl sulfate- <sup>13</sup> C <sub>6</sub>	-	179.0	99.1	24	52
<i>p</i> -Cresyl sulfate	-	186.8	106.9	26	73
<i>p</i> -Cresyl sulfate- <i>d</i> <sub>4</sub>	-	191.0	111.1	26	73
Indoxyl sulfate	-	212.1	131.9	24	95
Indoxyl sulfate- <i>d</i> <sub>4</sub>	-	216.0	136.0	24	95
4-Ethylphenyl sulfate	-	201.0	121.1	23	71
4-Ethylphenyl sulfate- <i>d</i> <sub>4</sub>	-	205.1	125.1	23	72

pCS-*d*<sub>4</sub> 及び 4-EPS-*d*<sub>4</sub> の合成

ネジ付試験管 (25 φ x150 mm) に攪拌子を入れ、*p*-クレゾール-*d*<sub>4</sub> 又は 4-エチルフェノール-*d*<sub>4</sub> (10 mmol) と、三酸化硫黄-ピリジン錯体 (11 mmol) とピリジン (5 mL) を混合し、キャップで封管し、45°Cで 2 時間攪拌した。室温に戻し、氷冷下にて反応液を水酸化カリウム水溶液 (1 mol/L、50 mL) 中にゆっくり滴下した。次に、イソプロパノールを約 200 mL 加えて、冷蔵庫に終夜静置した。析出物を桐山ロートで濾取し、イソプロパノールで洗った。得られた個体を 200 mL フラスコに移し、エタノール : 水 = 3 : 1 の溶液を約 100 mL 加え、超音波照射及び湯浴 (>80 °C) によ

る十分な加熱溶解を行った。不溶物を濾過し、濾液を冷蔵庫に終夜静置した。析出物を濾取し、前述の溶解・沈殿操作を繰り返すことにより目的の pCS- $d_4$  あるいは 4-EPS- $d_4$  が得られた。両者の再結晶品を元素分析にて確認したところ、炭素水素とも理論値から±0.3%以内の基準を満たし、純度 99%以上であることを確認した。元素分析データを下に示す。

#### 【pCS- $d_4$ 】

Anal. calcd. for  $C_7H_3D_4KO_4S$ : C, 36.50; H, 3.41. Found: C, 36.42; H, 3.19.

#### 【4-EPS- $d_4$ 】

Anal. calcd. for  $C_8H_5D_4KO_4S$ : C, 39.32; H, 3.71. Found: C, 39.64; H, 3.81.

#### m1A- $d_5$ の合成

50 mL ねじ口試験管に D<sub>2</sub>O (10 mL)、アデノシン (1.07 g, 3.99 mmol) 及び 10%Pd/C (5 wt%, 53.4 mg) を加え、封管中 H<sub>2</sub> 雰囲気下 140°Cで 24 時間加熱攪拌した。冷却後、反応混合物をフィルター (Millipore Millex - LG、0.20 mm) を通して触媒を除去した。濾過したフィルターを D<sub>2</sub>O で追洗浄し、回収した濾液をエバポレーターで濃縮することにより、アデノシン- $d_2$  (956 mg, 89.0% yield) が得られた。分子量及び化学構造、重水素標識率は、HRMS 及び <sup>1</sup>H NMR によって確認した。<sup>1</sup>H NMR データを下に示す。

<sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O, 600 MHz) δ 8.326 (s, 0.009 H), 8.228 (s, 0.008 H), 6.068 (d,  $J$  = 6.6 Hz, 1H), 4.437 (dd,  $J$  = 5.4, 3.6 Hz, 1H), 4.303 (dd,  $J$  = 7.2, 3.0 Hz, 1H), 3.935 (dd,  $J$  = 12.0, 2.4 Hz, 1H), 3.845 (dd,  $J$  = 12.6, 3.6 Hz, 1H). <sup>1</sup>H peak of ribose 2' position was laid over the water in D<sub>2</sub>O.

次いで、合成したアデノシン- $d_2$  (135 mg, 0.5 mmol) を 10 mL ねじ口試験管に入れ、窒素雰囲気下にて *N,N*-ジメチルアセトアミド (脱水、2 mL) を加えて溶解さ



せた。氷冷下、ヨウ化メチル- $d_3$  (4 eq. 124.5  $\mu$ L, 2 mmol) を滴下し、室温で 18 時間攪拌した。反応液をセライト約 1 g で濾過し、濾液にアセトンを約 10 mL 加え、冷蔵庫で 14 時間程度静置することで析出する 1-メチルアデノシン- $d_5$ ・ヨウ化水素塩をろ取り、アセトン 2 mL 及びジエチルエーテル 2 mL で洗い、超純水約 1 mL に溶解させた。飽和炭酸水素ナトリウム水溶液と超純水でコンディショニングしたイオン交換樹脂 (Amberlite IRA-410 ( $\text{HCO}_3^-$ ), 約 2 mL 容積分) を 5 mL シリンジに充填し、1-メチルアデノシン- $d_5$ ・ヨウ化水素塩の溶解液を滴下し、超純水 4 mL を 3 回流して回収した溶出液を濃縮、乾燥させ、1-メチルアデノシン- $d_5$  (96 mg, 67.1% yield) を得た。

分子量及び化学構造、重水素標識率は、HRMS 及び  $^1\text{H}$  NMR によって確認した。 $^1\text{H}$  NMR データを下に示す。

$^1\text{H}$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 600 MHz)  $\delta$  5.819 (m, 1H), 5.509-5.154 (m, 3H), 4.501 (m, 1H), 4.149 (m, 1H), 3.980 (m, 1H), 3.682 (m, 1H), 3.584 (m, 1H).

#### 標準溶液の作成

各標品を精秤し、それぞれ水/メタノール (1:1, v/v) に溶解させて、10 mmol/L Cre (11.4 mg/10 mL)、1 mg/mL m1A (10 mg/10 mL)、20 mmol/L TMAO (23 mg/10 mL)、20 mmol/L PS (42 mg/10 mL)、2.5 mg/mL pCS (31 mg/10 mL)、831  $\mu$ g/mL InS (9.8 mg/10 mL)、10 mmol/L 4-EPS (24mg /10 mL) の標準原液を調製した。

#### IS 溶液の作成

各標品を精秤し、それぞれ水/メタノール (1:1, v/v) に溶解させて、1 mg/mL Cre- $d_3$  (10 mg/ 10 mL)、1 mg/mL m1A- $d_5$  (10 mg/10 mL)、10 mmol/L TMAO- $d_9$  (12

mg/10 mL)、10 mmol/L PS-<sup>13</sup>C<sub>6</sub> (22 mg/10 mL)、1 mg/mL pCS-*d*<sub>4</sub> (10 mg/10 mL)、1.1 mg/mL InS-*d*<sub>4</sub> (1.1 mg/ 1mL)、7.85 mmol/L 4-EPS-*d*<sub>4</sub> (19 mg/10 mL) の安定同位体標準原液を調製した。

#### 検量線試料の調製

各標準原液を一定量採り、水で希釈することによって、1 mmol/L Cre、1 µg/mL m1A、200 µM TMAO、200 µM PS、250 µg/mL pCS、83.1 µg/mL InS、50 µM 4-EPS を含む標準混合溶液を調製した。これを 2、5、10、20、50、100、200、500 倍に希釈したものを検量点試料として調製した。各安定同位体標準原液を一定量採り、水/メタノール (1:1, v/v) で希釈することで、30 µL あたりに 10ng Cre-*d*<sub>3</sub>、200 fg m1A-*d*<sub>5</sub>、20 fmol TMAO-*d*<sub>9</sub>、200 fmol PS-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>、50 ng pCS-*d*<sub>4</sub>、100 ng InS-*d*<sub>4</sub>、100 pmol 4-EPS-*d*<sub>4</sub> を含む IS 混合溶液を調製した。検量点試料 10 µL に対して、IS 混合溶液を 30 µL ずつ添加し、1 µL を LC-MS/MS システムに注入して、検量線を作製した。横軸に濃度を取り、縦軸に IS に対する測定対象物のピーク面積比をとってプロットした後、1/x で重み付けした最小二乗法により近似式を求めた。

#### サンプル前処理

10 µL の血漿又は血清試料に対して、IS 混合溶液を 30 µL ずつ 1.5 mL サンプルチューブに入れ、0.1%ギ酸添加 MeCN 溶液 (100 µL) を加えた。攪拌後、超音波水浴中で 5 分間静置した。遠心分離 (16,500×g、15 min、4°C) 後、上清 100 µL を新しいサンプルチューブに集め、ヒーター (60°C) に静置し、15 min 窒素気流下にて蒸発乾固した。30%MeCN 20 µL で再溶解させた後、1 µL を LC-MS/MS システムに注入した。

## 分析バリデーション

### 【短期安定性試験】

ヒト血漿に 2 倍希釈した検量点試料をスパイクした試料をサンプルチューブに採取し、それぞれ 60°C、室温、氷上に 0.5、1、3 及び 24 時間放置した。その後、IS 混合溶液を添加して、上述した方法で前処理を行い、1 µL を LC-MS/MS システムに注入した。また除タンパク操作を行った後の上清試料も用意し、それぞれ 60°C、室温、氷上に 1 時間と 3 時間静置した後、1 µL を LC-MS/MS システムに注入した。対照群として、同濃度の検量点試料を測定した。それぞれの分析対象の IS に対する測定対象物のピーク面積比を算出し、対応する対照群のピーク面積比で除することで、残存率を求めた。

### 【添加回収試験】

ヒトプール血清又は複数のヒトプール血漿（各 10 µL）を用い、標準溶液非添加試料には純粋を添加し、標準溶液添加試料には各標準混合溶液を Table 4、Table 5 で示した濃度となるように添加した。上述の前処理により試料を調製し、1 µL を LC-MS/MS システムに注入した。回収率は添加試料の定量値より、非添加試料の定量値を引いた値を算出した。日内再現性試験では、各濃度 5 試料で同一日に試料の調製と測定を故尾内、相対誤差及び変動係数を算出した。また、日間再現性試験では、各濃度 3 日間異なった日に調製と測定を行い、同様に相対誤差及び変動係数を算出した。

$$\text{相対誤差} = [(\text{検出濃度} - \text{内因性濃度}) / \text{添加濃度} - 1] \times 100 (\%)$$

$$\text{変動係数} = (\text{検出濃度の標準誤差} / \text{検出濃度の平均値}) \times 100 (\%)$$

## CKD 患者血清の測定

新松戸中央総合病院に通院された 19 人の非透析 CKD 患者から得られた血清を融解し、10  $\mu$ L を用いて、上述した方法で前処理を行い、1  $\mu$ L を LC-MS/MS システムに注入した。

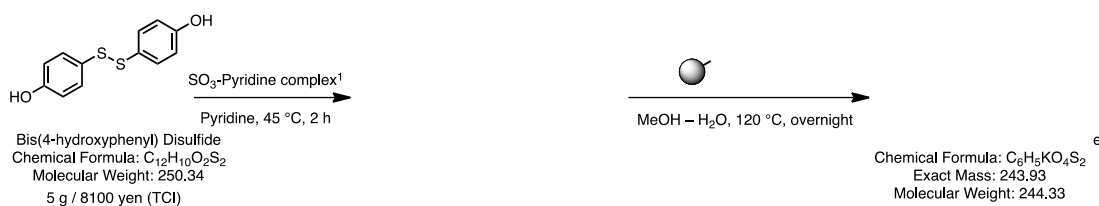
## 第 2 章 付属実験

### 動物及び細胞

BALB/c マウスは、日本クレア株式会社より購入した。飼育は、東北大学の動物施設の SPF 下で行った。マウス骨髄腫 SP2/0-Ag14 ミエローマ細胞 (CRL-1581) を American Type Culture Collection から購入し、10%FBS 及び 50  $\mu\text{mol/L}$  の  $\beta$ -メルカプトエタノールを添加した Roswell park memorial institute (RPMI)-1640 を用いて培養した。

### 4-メルカプトフェニル硫酸カリウム塩 (PS-SH) の調製

Synthesis of Potassium 4-mercaptophenyl sulfate



Edwards の方法に従って合成を行った<sup>71</sup>。すなわち、ビス (4-ヒドロキシフェニル) ジスルフィド (4 mmol) と  $\text{SO}_3$ -ピリジン (12 mmol) をピリジン (8 mL) 中に混合し、45°C で 2 時間攪拌した。反応後、氷冷下にて水酸化カリウム水溶液 (1 mol/L、20 mL) をゆっくり滴下し、イソプロパノールを約 100 mL 加えて冷蔵庫に終夜静置した。沈殿物をろ取り、エタノール : 水 = 3 : 1 の溶液を 160 mL 加え、超音波照射にて溶解させたのち、冷蔵庫に終夜静置した。沈殿物をろ取りすることにより中間体のジスルフィドジサルフェート体が得られた。得られた化合物は  $^1\text{H-NMR}$ 、HRMS により同定した。

次いで、中間体のジスルフィドジサルフェート体とポリスチレンビーズ担持トリフェニ

ルホスフィン (2.39 mmol/g) をメタノール-水 (1:1) 中に混合し、120°Cで終夜撹拌した。反応後、ビーズをろ過することで目的物の PS-SH カリウム塩を得た。生成物は、HRMS により確認した。

### PS コンジュゲートの作製

#### 【KLH-KMUS-PS の作製】

KLH 10 mg を 1 × PBS 溶液 1mL にて懸濁させ、室温下 20,400 × g にて 5 分間の遠心後その上清を分取した。Dimethyl sulfoxide (DMSO) にて 20 mg/mL に調製した KMUS を 25 μL 添加し (モル比 1:400)、室温にて 30 分間混合した。4°C条件下 20,400 × g にて 5 分間の遠心を行い、その上清を 1 × PBS 溶液で平衡化した PD-10 脱塩カラム (GE ヘルスケア) にて分離させ、フラクションコレクターによって分取した。ブラッドフォード法にてタンパク質濃度が高い分画溶液を回収して約 3 mL の溶液を得た。この溶液 1.5 mL に対して、上述で合成した 4-メルカプトフェニルサルフェートカリウム塩 15 μmol (KLH との推定モル比 1:10,000) を加えて、室温にて終夜混合した。セルロース膜内に封入し、1 × PBS 溶液中で透析処理を行い、0.22 μm フィルターにてろ過滅菌処理したものを抗原として使用した。この抗原を KLH-KMUS-PS と称した。

#### 【PS アルブミンコンジュゲートの作製】

ウシ血清アルブミン (Bovine serum albumin, BSA) 3 mg 及びオボアルブミン (Ovalbumin, OVA) 10 mg に対して、それぞれ KMUS をモル比 1:147, 1:40 の量を用いて上述と同様の方法を行い、それぞれの複合体を作製し、ELISA 用の固相抗原として用いた。この抗原をそれぞれ BSA-KMUS-PS、OVA-KMUS-PS と称した。

BSA については、10mg に対して、リンカーとして GMBS 又は SMCC をそれぞれモル比 1:100 の量を用いて上述と同様の方法を行い、各々の複合体を作製し、ELISA 用の固相抗原として用いた。この抗原をそれぞれ BSA-GMBS-PS、BSA-SMCC-PS と称した。

#### 抗 PS モノクローナル抗体の作製

##### 【免疫方法】

###### <YK33.1>

1. 2 匹の BALB/c マウス (8 週齢、雌) に、1 × PBS 溶液に溶解した KLH-KMUS-PS (100 µg) を Imject Freund's Complete Adjuvant (Thermo Fisher Scientific) との懸濁液 (200 µL) として腹腔内に免疫した。
2. 初回免疫 4 週間後、KLH-KMUS-PS (100 µg) を Imject Freund's Incomplete Adjuvant (Thermo Fisher Scientific) との懸濁液 (200 µL) として、初回免疫同様に腹腔内に追加免疫した。
3. 追加免疫 9 日後、KLH-KMUS-PS (100 µg) を PBS (200 µL) に溶解し、腹腔内に最終免疫した。
4. 最終免疫 3 日後、BALB/c マウス 2 匹から脾臓を摘出し、赤血球を溶血後に細胞融合に用いる脾臓細胞を調製した。

###### <YKS19.2>

1. 1 匹の BALB/c マウス (8 週齢、雌) に、1 × PBS 溶液に溶解した KLH-KMUS-PS (100 µg) を Imject Freund's Complete Adjuvant との懸濁液 (200 µL) として腹腔内に免疫した。
2. 初回免疫 4 週間後に、KLH-KMUS-PS (100 µg) Imject Freund's Incomplete Adjuvant との懸濁液 (200 µL) として、初回免疫同様に腹腔内に

追加免疫した。

3. 追加免疫 16 日後、KLH-KMUS-PS (100  $\mu\text{g}$ ) を PBS (200  $\mu\text{L}$ ) に溶解し、腹腔内に最終免疫した。
4. 最終免疫 3 日後、BALB/c マウス 1 匹から脾臓を摘出し、赤血球を溶血後に細胞融合に用いる脾臓細胞を調製した。

#### 【細胞融合】

2 匹又は 1 匹のマウスから調製した全ての脾臓細胞と SP2/0-Ag14 ミエローマ細胞 (およそ  $1 \times 10^8$  個) を polyethylene glycol 1500 (以下、PEG1500) (Roche) を用いて細胞融合した。具体的操作は以下の通りである。

1. 脾臓細胞と SP2/0-Ag14 を 50 mL 遠沈管に回収後、RPMI1640 培地で 2 回洗浄した。
2. 洗浄後、細胞に 37°C に加温した PEG1500 1 mL をゆっくり加えて攪拌後、37°C の水浴で 1 分間緩やかに攪拌、さらに 1 分間静置した。
3. 細胞に 37°C に加温した RPMI1640 培地を 1 mL、10 mL の順にゆっくり加えた後、50 mL まで RPMI1640 培地を加えた。
4. 細胞融合後、PEG1500 を含む RPMI1640 培地を遠心して除去した後、10% ウシ胎児血清と 100 unit/mL penicillin G、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  streptomycin、50  $\mu\text{M}$  2-mercaptoethanol を含む RPMI1640 培地 (RPMI 培養液) 80 mL に懸濁し、8 枚の 96-well microplate に 100  $\mu\text{L}/\text{well}$  となるように播種した。
5. CO<sub>2</sub> インキュベーターで 1 日培養後、2  $\times$  HAT (200  $\mu\text{M}$  sodium hypoxanthine, 0.8  $\mu\text{M}$  aminopterin, 32  $\mu\text{M}$  thymidine) を含む RPMI 培養液 (HAT 培地) を 100  $\mu\text{L}/\text{well}$  で添加し、およそ 1 週間、細胞を培養した。
6. HAT 培地による選別後、一部回収した培養液を用いて BSA、BSA-KMUS-

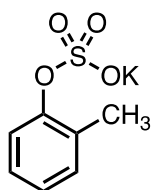


PS、OVA、OVA-KMUS-PS に対する反応性を ELISA で検討し、BSA-KMUS-PS 特異的に反応する陽性ハイブリドーマを選定した。

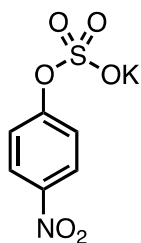
7. 陽性ハイブリドーマは、100  $\mu$ M sodium hypoxanthine, 16  $\mu$ M thymidine を含む RPMI 培養液、hypoxanthine-thymidine (HT) 培地 にマウス胸腺細胞と共に懸濁し、1 cell/well となるように 96-well microplate に播種し、CO<sub>2</sub> インキュベーターで 1 週間程度培養した。
8. 単一細胞にクローン化したハイブリドーマは、ELISA による BSA-KMUS-PS、BSA-GMBS-PS 及び BSA-SMCC-PS に特異的な反応性及び PS による阻害 ELISA (Inhibition assay) にて選別し、最終的な陽性ハイブリドーマクローン YK33.1 と YKS19.2 を取得した。

### PS 類似体の合成

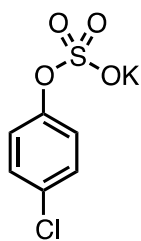
阻害 ELISA による抗原特異性検証に用いた *p*-ニトロフェニル硫酸、 $\sigma$ クレジル硫酸、4-メチルウンベリフェリル硫酸、*p*-クロロフェニル硫酸、キノリノール硫酸、1-ナフトール硫酸、及び 2-ナフトール硫酸は、それらの対応するフェノール誘導体から Edwards の方法に従って合成を行った<sup>71</sup>。具体的な操作は以下の通りである。フェノール誘導体 (10 mmol) と SO<sub>3</sub>・ピリジン (12 mmol) をピリジン (10 mL) 中に混合し、45°Cで 2 時間攪拌した。反応後、氷冷下にて水酸化カリウム水溶液 (1 mol/L、50 mL) をゆっくり滴下し、イソプロパノールを約 200 mL 加えて冷蔵庫に終夜静置した。沈殿物をろ取し、加温しながらメタノールに溶解させた。不溶物を除き、メタノール溶解液を加温・濃縮して再結晶することにより目的物のサルフェート体を得た。得られた化合物は <sup>1</sup>H-NMR、<sup>13</sup>C-NMR、HRMS により同定し、単一化合物であることを確認した。元素分析による測定精度は  $\pm 0.3$  以内であった。下に各化合物の機器データを示す。



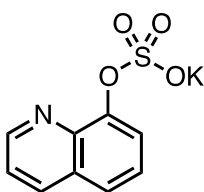
**Potassium *o*-cresyl sulfate:** According to the general procedure using *o*-cresol as a raw material, potassium *o*-cresyl sulfate was obtained in 21% yield as colorless plates; <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$ : 7.36 (dd, 2H,  $J$  = 8.2 Hz), 7.29 (t, 1H,  $J$  = 8.2, 7.6 Hz), 7.25 (t, 1H,  $J$  = 8.2, 7.6 Hz), 2.33 (s, 3H); <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 40.5, 115.0, 115.2, 120.5, 129.8, 130.6, 143.1, 144.4, 174.1; HRMS (ESI)  $m/z$  calcd. for [C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>KO<sub>4</sub>S-K]<sup>-</sup> ([M-K]<sup>-</sup>) 187.0071, found 187.0064; Anal. calcd. for C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>KO<sub>4</sub>S: C, 37.15; H, 3.12. Found: C, 37.04; H, 3.11.



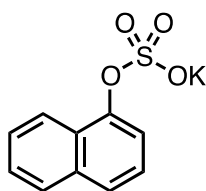
**Potassium *p*-nitrophenyl sulfate:** According to the general procedure using *p*-nitrophenol as a raw material, potassium *p*-nitrophenyl sulfate was obtained in 31% yield as pale yellow needles; <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$ : 8.34 (d, 2H,  $J$  = 8.9 Hz), 7.51 (d, 2H,  $J$  = 8.9 Hz); <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 121.6, 121.8, 125.7, 125.9, 144.9, 156.4; HRMS (ESI)  $m/z$  calcd. for [C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>KNO<sub>6</sub>S-K]<sup>-</sup> ([M-K]<sup>-</sup>) 217.9765, found 217.9761; Anal. calcd. for C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>KNO<sub>6</sub>S: C, 28.01; H, 1.57; N, 5.44. Found: C, 27.99; H, 1.65; N, 5.45.



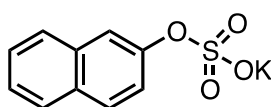
**Potassium *p*-chlorophenyl sulfate:** According to the general procedure using *p*-chlorophenol as a raw material, potassium *p*-chlorophenyl sulfate was obtained in 28% yield as white powders; <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$ : 7.47 (d, 2H,  $J$  = 8.9 Hz), 7.30 (d, 2H,  $J$  = 8.9 Hz); <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 123.1, 129.7, 131.0, 149.8; HRMS (ESI)  $m/z$  calcd. for [C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>ClKO<sub>4</sub>S-K]<sup>-</sup> ([M-K]<sup>-</sup>) 206.9524, 208.9494, found 206.9521, 208.9485; Anal. calcd. for C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>ClKO<sub>4</sub>S: C, 29.21; H, 1.63. Found: C, 29.15; H, 1.77.



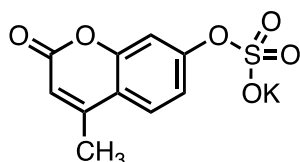
**Potassium 8-quinolinyl sulfate:** According to the general procedure using 8-quinolinol as a raw material, potassium 8-quinolinyl sulfate was obtained in 20% yield as white cotton-like crystals; <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$ : 8.91 (m, 1H), 8.46 (dd, 1H,  $J$  = 2.1, 8.2 Hz), 7.91 (d, 1H,  $J$  = 7.6 Hz), 7.87 (dd, 1H,  $J$  = 1.4, 7.6 Hz), 7.69-7.64 (m, 2H); <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 115.0, 115.2, 120.5, 129.8, 130.6, 143.1, 144.4, 174.1; HRMS (ESI)  $m/z$  calcd. for [C<sub>9</sub>H<sub>6</sub>KNO<sub>4</sub>S-K]<sup>-</sup> ([M-K]<sup>-</sup>) 224.0023, found 224.0020; Anal. calcd. for C<sub>9</sub>H<sub>6</sub>KNO<sub>4</sub>S: C, 41.05; H, 2.30; N, 5.32. Found: C, 40.8; H, 2.41; N, 5.24.



**Potassium 1-naphthyl sulfate:** According to the general procedure using 1-naphthol as a raw material, potassium 1-naphthyl sulfate was obtained in 28% yield as light brown crystalline cubes;  $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$ : 8.25 (d, 1H,  $J = 8.2$  Hz), 8.01 (d, 1H,  $J = 8.2$  Hz), 7.89 (m, 1H), 7.68-7.62 (m, 2H), 7.58 (m, 2H);  $^{13}\text{C-NMR}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 117.7, 121.9, 125.8, 126.2, 126.9, 127.0, 127.2, 127.9, 134.6, 147.0; HRMS (ESI)  $m/z$  calcd. for  $[\text{C}_{10}\text{H}_7\text{KO}_4\text{S-K}]^-$  ( $[\text{M-K}]^-$ ) 223.0071, found 223.0068; Anal. calcd. for  $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{KO}_4\text{S}$ : C, 45.79; H, 2.69. Found: C, 45.71; H, 2.74.



**Potassium 2-naphthyl sulfate:** According to the general procedure using 2-naphthol as a raw material, potassium 2-naphthyl sulfate was obtained in 21% yield as colorless plates;  $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$ : 8.01 (d, 1H,  $J = 8.9$  Hz), 8.01 (d, 1H,  $J = 8.2$  Hz), 7.97 (d, 1H,  $J = 8.2$  Hz), 7.84 (d, 1H,  $J = 2.1$  Hz), 7.63 (d, 1H,  $J = 8.0$  Hz), 7.59 (d, 1H,  $J = 8.0$  Hz), 7.50 (dd, 1H,  $J = 2.7, 8.9$  Hz);  $^{13}\text{C-NMR}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 118.4, 121.3, 126.2, 127.0, 127.7, 127.8, 129.9, 131.3, 133.6, 148.9; HRMS (ESI)  $m/z$  calcd. for  $[\text{C}_{10}\text{H}_7\text{KO}_4\text{S-K}]^-$  ( $[\text{M-K}]^-$ ) 223.0071, found 223.0068; Anal. calcd. for  $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{KO}_4\text{S}$ : C, 45.79; H, 2.69. Found: C, 45.75; H, 2.77.



**Potassium 4-methylumbelliferyl sulfate:** According to the general procedure using 4-methylumbelliferone as a raw material, potassium 4-methylumbelliferyl sulfate was obtained in 6% yield as white cotton-like crystals;  $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$ : 7.82 (d, 1H,  $J = 8.9$  Hz), 7.35 (s, 1H), 7.33 (d, 1H,  $J = 2.7$  Hz), 6.36 (d, 1H,  $J = 1.4$  Hz), 2.49 (d, 1H,  $J = 1.4$  Hz);  $^{13}\text{C-NMR}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 18.1, 109.4, 112.9, 117.9, 118.1, 126.7, 153.4, 153.9, 156.0, 164.3; HRMS (ESI)  $m/z$  calcd. for  $[\text{C}_{10}\text{H}_7\text{KO}_6\text{S-K}]^-$  ( $[\text{M-K}]^-$ ) 254.9969, found 254.9970; Anal. calcd. for  $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{KO}_6\text{S}$ : C, 40.81; H, 2.40. Found: C, 40.43; H, 2.52.

### 阻害 ELISA (Inhibition assay)

最適抗原抗体量はあらかじめタイトレーションを行い、抗体量が抗原量に比べ過剰にならない条件を選択した。また各抗体は、それぞれビオチン化処理を行ったものを用いた。YK33.1 については抗原として BSA-KMUS-PS (0.5  $\mu\text{g/mL}$ ) 若しくは

BSA-SMCC-PS (0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) を用い、YKS19.2 については抗原として BSA-KMUS-PS (0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 若しくは BSA-SMCC-PS (0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) を用いた。Nunc Maxisorp<sup>®</sup> 96-well microplate (Thermo Fisher Scientific) に各抗原を 50  $\mu\text{L}$  ずつ分注し 4 $^{\circ}\text{C}$ 、一昼夜放置し固相化した。抗原溶液を除いたのち 1  $\times$  PBS 150  $\mu\text{L}$  にて各ウェルを 4 回ずつ洗浄を行った。1%BSA 溶液 (溶媒:1  $\times$  PBS) を各ウェルに 200  $\mu\text{L}$  ずつ添加し、4 $^{\circ}\text{C}$ 、2 時間以上静置してブロッキングした。ブロッキング溶液を除いたのち 1  $\times$  PBS 200  $\mu\text{L}$  にて各ウェルを 1 回洗浄した。1  $\times$  PBS、5%BSA、ヒトプール血漿、ヒトプール血清各々に溶解させた PS 及び PS 類似体の 0, 1, 10, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  溶液をそれぞれ 25  $\mu\text{L}$  ずつ分注したのち YK33.1 (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、YKS19.2 (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 25  $\mu\text{L}$  を各ウェルへ加え攪拌し、4 $^{\circ}\text{C}$ 、1 時間反応させた。その後 0.05%Tween 20 (溶媒:1  $\times$  PBS) 170  $\mu\text{L}$  にて各ウェルを 5 回洗浄し、HRP 標識したstreptavidin (BioLegend) の 2000 倍希釈溶液を 50  $\mu\text{L}$  ずつ添加し、4 $^{\circ}\text{C}$ 、1 時間反応させた。その後 0.05%Tween 20 (溶媒:1  $\times$  PBS) 150  $\mu\text{L}$  にて各ウェルを 5 回洗浄し、基質溶液として 1  $\times$  TMB (eBioscience) を 50  $\mu\text{L}$  ずつ添加した。室温にて 15 分から 60 分間反応させたのちに 1 mol/L のリン酸溶液を 50  $\mu\text{L}$  ずつ加え反応を停止させた。反応が完全に停止したことを目視で確認し、450 nm における吸光度をプレートリーダーにて測定した。

#### 除タンパク質処理

血漿サンプル (25  $\mu\text{L}$ ) に 0.1%ギ酸を含む MeCN 75  $\mu\text{L}$  を加え、攪拌後、超音波水浴中で 15 分間静置した。遠心分離 (16,500  $\times$  g、15 min、4 $^{\circ}\text{C}$ ) 後、上清 90  $\mu\text{L}$  を新しいサンプルチューブに集め、60 $^{\circ}\text{C}$ で 45 min、SpeedVac 遠心濃縮機 (TOMY Digital Biotechnology) を用いて乾固させた。25  $\mu\text{L}$  の 1  $\times$  PBS に再溶解し、阻害 ELISA 用試料とした。

### CKD 患者血清の分析

CKD 患者血清は、第 2 章で用いたものと同一のものを使用した。すなわち、新松戸中央総合病院に通院された 19 人の非透析 CKD 患者から得られた血清 (25  $\mu\text{L}$ ) を用いた。

検量線用試料は、1  $\times$  PBS に溶解して調製した各濃度の PS 標準液をヒトプール血清に希釈 ( $v / v = 1:9$ ) して調製した。検量線は、1、2.5、5、10、25、50、100  $\mu\text{g} / \text{mL}$  の範囲、 $n = 4$  で作成した。横軸に濃度を取り、縦軸に 450 nm における吸光度をとってプロットした後、三次式による近似曲線を求めた。上述した阻害 ELISA によって得られた吸光度を近似曲線に当てはめることで、PS 濃度を算出した。

### CKD 患者血血清中総タンパク質濃度及びアルブミン濃度の測定

患者血清 10  $\mu\text{L}$  を用いて、富士ドライケム NX500 装置 (富士フイルム) 及び対応する測定キット (富士ドライケムスライド TP-PIII、富士ドライケムスライド ALB-P) により濃度を算出した。

### 第 3 章 付属実験

#### 動物とサンプル採取

GF 及び SPF マウスの血漿、糞便、及び盲腸内容物は、以前の研究（引用文献 35）で収集し、 $-80^{\circ}\text{C}$ で保存していたものを使用した。概要を述べると、GF 及び SPF IQI マウスは、Clea Japan (Tokyo, Japan) から購入した。7 週齢で、無作為にコントロール群と RF 群に分けた。GF 及び SPF コントロール群については、通常の CE-2 食餌を 5 週間続けた。RF 群については、0.2%アデニンを含む CE-2 食餌（和光純薬品工業株式会社）を 5 週間で与えた。RF 群については、5 週間の期間の最後の 2 週間は、1 週間に 2 日間通常の食餌を与えた。水は、新鮮水道水を自由摂取させた。イソフルラン吸入麻酔下で犠死させた後、回復して盲腸を採取した。血液は、腹大静脈より採取し、糞便は新鮮なものを回収した。各サンプルは、測定まで $-80^{\circ}\text{C}$ で長期保存した。

#### 糞便及び盲腸内容物からの代謝産物の抽出

糞便又は盲腸内容物 10 mg を 1.0 mL の氷冷 MeOH 中で 2 分間 (30 秒  $\times$  4) ホモジナイズし、次いで  $15,000 \times g$  で 10 分間遠心分離した。得られた上清を回収し、分析用のサンプルとした。ホモジナイズには、ビーズ破碎装置 (TAITEC) を用い、1 サンプルあたりステンレスビーズを 3 個使用した。

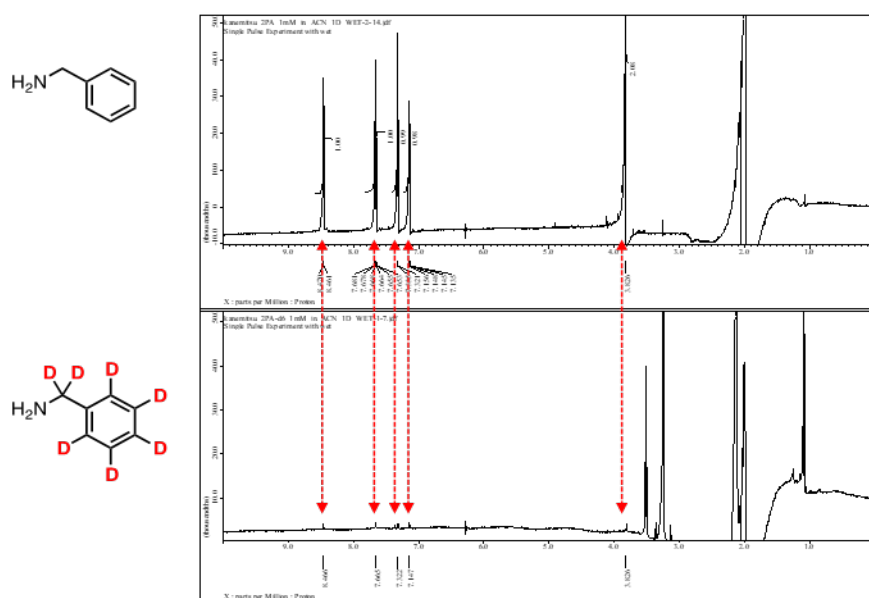
#### 2PA- $d_6$ の合成

50 mL ねじ口試験管に  $\text{D}_2\text{O}$  (18 mL)、2PA (540.7 mg、5.0 mmol) 及び 10%Pd/C (54.0 mg、10 wt%) 及び 5%Pt/C (108.1 mg、20 wt%) を加え、封管中  $\text{H}_2$  雰囲気下  $180^{\circ}\text{C}$ で 120 時間加熱攪拌した。冷却後、反応混合物をフィルター

(Millipore Millex - LG, 0.20 mm) を通して触媒を除去した。濾過したフィルターを D<sub>2</sub>O (1 mL) で追洗浄した。新しい 50 mL ねじ口試験管に濾液を回収し、5%Pt/C (224.9 mg, 40 wt%) を加え、封管中 H<sub>2</sub> 雰囲気下 180°C で 120 時間加熱攪拌した。濾過したフィルターを D<sub>2</sub>O (1 mL) で追洗浄した後、回収した濾液をエバポレーターで濃縮した。次いで、マルチ分取 HPLC システム LC-Forte/R (YMC) を用いた逆相クロマトグラフィー (H<sub>2</sub>O/ MeOH) によって精製し、2PA-*d*<sub>6</sub> を得た。抽出物を濃縮乾固した後、MeCN に再溶解した。分子量及び化学構造、重水素標識率は、高分解能質量分析計及び <sup>1</sup>H NMR によって確認した。濃度は、LC-UV 分析により決定した。

#### 【no-D <sup>1</sup>H-NMR】

MeCN に溶解させた 1 mM の 2PA (標品) 及び 2PA-*d*<sub>6</sub> (合成品) を <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz) にて測定し、その NMR チャートを比較した。



プロトンピークの積分比より、2PA-*d*<sub>6</sub> は、98%以上の標識率であると算出した。

## LC 条件

分析移動相には、A 溶液として 10 mmol/L AcONH<sub>4</sub> を含む 0.1%AcOH 水溶液、B 溶液として 0.1%AcOH を含む MeCN/IPA 混液 (v/v = 1:1) を用いた。分析カラムには、Inertsil® ODS-3 (2.1 mm i.d. × 100 mm、2 μm; GL Science) を用いた。そのほかは、以下の条件で測定を実施した。

### 【脂肪酸と IAA】

Gradient:	0.0—1.0 min: A/B = 95/5
	1.0—10.0 min: A/B = 95/5 to 80/20
	10.0—15.0 min: A/B = 80/20 to 40/60
	15.0—28.0 min: A/B = 40/60 to 20/80
	28.0—32.0 min: A/B = 5/95
	32.0—35.0 min: A/B = 95/5
Flow rate:	430 μL/min
Oven temperature:	45°C
Injection volume:	10 μL

### 【胆汁酸】

Gradient:	0.0—10.0 min: A/B = 70/30 to 60/40
	10.0—15.0 min: A/B = 60/40 to 30/70
	15.0—17.5 min: A/B = 5/95
	17.5—20.0 min: A/B = 70/30
Flow rate:	450 μL/min
Oven temperature:	45°C
Injection volume:	30 μL



## MS 条件

Ionization:	ESI (+)
Spray voltage:	3000 V
Heater temperature:	500°C
Sheath gas pressure:	60 psi
Auxiliary gas pressure:	60 psi
Capillary temperature:	350°C
Declustering Voltage:	-10 V
Collision gas pressure:	1.5 mTorr

## 2PA 及び 2PA- $d_6$ によるサンプルの標識化反応

標準溶液試料については、シリコナイズド 1.5 mL サンプルチューブ (Watoson) に試料 20  $\mu$ L を用意し、200  $\mu$ L の MeCN と 10  $\mu$ mol/L のプロピオン酸- $d_5$  及び酪酸- $d_7$  を加えた。次いで、MeCN に溶解して作成した 10 mmol/L TPP (10  $\mu$ L)、10 mmol/L DPDS、10 mmol/L 2PA (10  $\mu$ L) 又は 10 mmol/L 2PA- $d_6$  (10  $\mu$ L) を加えた。この混合溶液を、60°C に加温したヒートブロック装置に 10 分間静置した。その後、真空遠心濃縮を用いて、40°C で乾固させた。残渣を 50  $\mu$ L の 50% MeOH 水溶液で再溶解した。LC-MS/MS 測定前に比較試料と等量混合し、測定用バイアルへ移した。

血液などの生体試料については、1.5 mL サンプルチューブに試料 20  $\mu$ L を用意し、200  $\mu$ L の MeCN を除タンパク質操作のために添加した。攪拌後、超音波水浴中で 5 分間静置した。遠心分離 (15,000  $\times$  g、10 min、4°C) 後、上清 200  $\mu$ L をシリコナイズド 1.5 mL サンプルチューブに移し、上述した標準溶液と同様の方

法で 2PA 又は 2PA- $d_6$  によるサンプルの標識化反応を行った。

#### プロピオン酸及び酪酸の絶対定量用標準溶液の調製

プロピオン酸及び酪酸とそれらに対応する IS (安定同位体標品) を精秤後、それぞれ水/メタノール (1:1, v/v) に溶解し、10 mmol/L の標準原液を調製した。プロピオン酸と酪酸の各標準原液を一定量採り、さらに水/メタノール (1:1, v/v) にて希釈して、0.1, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100, 500, 750  $\mu\text{mol/L}$  の標準混合溶液を調製した。IS については、MeCN を用いて希釈し、10  $\mu\text{mol/L}$  の標準混合溶液を調製した。

#### プロピオン酸及び酪酸の検量線試料の調製

プロピオン酸及び酪酸の各濃度の標準混合液を 20  $\mu\text{L}$  採り、10  $\mu\text{mol/L}$  の IS 混合液 30  $\mu\text{L}$  を添加して、0.1, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100  $\mu\text{mol/L}$  の検量線試料を調製した。上述したのと同じ手順に従って、2PA 標識化反応を行い、5  $\mu\text{L}$  を LC-MS/MS システムに注入して、検量線を作製した。横軸に濃度を取り、縦軸に IS に対する測定対象物のピーク面積比をとってプロットした後、 $1/x$  で重み付けした最小二乗法により近似式を求めた。

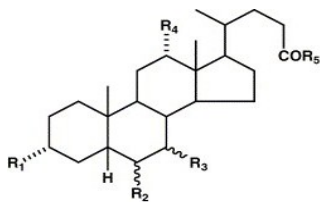
#### 添加回収実験

添加血漿試料は、混合標準溶液をマウスプール血漿及びヒトプール血漿で希釈 (v/v = 1:9) して調製した。ヒト血漿では、0.5, 1, 5, 10, 75  $\mu\text{mol/L}$  の濃度となるように調製し、マウス血漿では、1  $\mu\text{mol/L}$  及び 10  $\mu\text{mol/L}$  の濃度となるように調製した。各濃度試料 20  $\mu\text{L}$  に対し、上述したのと同じ手順に従って、除タンパク操作及び 2PA 標識化反応を行い、5  $\mu\text{L}$  を LC-MS/MS システムに注入した。各濃度 n = 6

で同一日に測定し、精度及び真度を算出した。精度は、独立した測定の相対標準偏差 (RSD) として定義され、一方、真度は、下のよう計算された相対誤差 (RE) として求めた： $[(\text{検出濃度} - \text{内因性濃度}) / \text{添加濃度} - 1] \times 100 (\%)$ 。

#### カルボキシル基含有代謝物の相対定量の評価

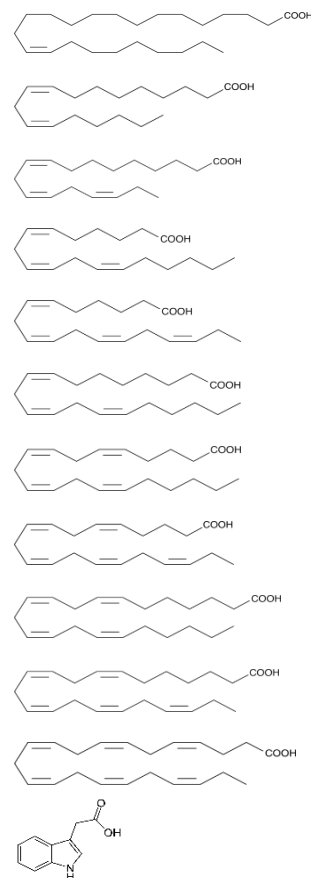
次項に化学構造を示す胆汁酸、脂肪酸及び IAA の各標準原液を一定量採り、19 種類の胆汁酸混合物 (30  $\mu\text{mol/L}$ )、9 種類の飽和一価不飽和脂肪酸混合物 (3.75  $\mu\text{g/mL}$ )、10 種類の多価不飽和脂肪酸混合物 (3.75  $\mu\text{g/mL}$ )、プロピオン酸 (20  $\mu\text{mol/L}$ )、酪酸 (20  $\mu\text{mol/L}$ )、IAA (50  $\mu\text{mol/L}$ ) を含む標準混合溶液を調製した。この混合溶液を、MeCN にて 10 倍希釈したものを標準溶液として使用した。また、QC 試料は、この混合溶液をマウスプール血漿及びヒトプール血漿で希釈 (v/v = 1:9) して調製した。混合標準液、ヒトプール血漿、マウスプール血漿、及び各血漿で作成した QC 試料をそれぞれ 40  $\mu\text{L}$  採り、さらにそれらを等量 (20  $\mu\text{L}$ ) ずつ別のサンプルチューブへ分注した。一方に 2PA 標識反応を行い、他方に 2PA- $d_6$  標識反応を行った。各標識後試料を等量混合して、10  $\mu\text{L}$  を LC-MS/MS システムに注入した。



Bile acids	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>
Cholic acid	OH	H	α-OH	OH	OH
α-muricholic acid	OH	β-OH	α-OH	H	OH
β-muricholic acid	OH	β-OH	β-OH	H	OH
ω-muricholic acid	OH	α-OH	α-OH	H	OH
Hyocholic acid	α-OH	α-OH	α-OH	H	OH
Hyodeoxycholic acid	OH	H	β-OH	OH	OH
Chenodeoxycholic acid	OH	H	α-OH	H	OH
Ursodeoxycholic acid	OH	H	H	OH	OH
Deoxycholic acid	OH	H	β-OH	H	OH
Lithocholic acid	OH	H	H	H	OH
Glycocholic acid	OH	H	α-OH	OH	NHCH <sub>2</sub> COOH
Glyco-α-muricholic acid	OH	β-OH	α-OH	H	NHCH <sub>2</sub> COOH
Glyco-β-muricholic acid	OH	β-OH	β-OH	H	NHCH <sub>2</sub> COOH
Glycohyocholic acid	α-OH	α-OH	α-OH	H	NHCH <sub>2</sub> COOH
Glycohyodeoxycholic acid	OH	H	β-OH	OH	NHCH <sub>2</sub> COOH
Glycochenodeoxycholic acid	OH	H	α-OH	H	NHCH <sub>2</sub> COOH
Glycoursodeoxycholic acid	OH	H	H	OH	NHCH <sub>2</sub> COOH
Glycodeoxycholic acid	OH	H	β-OH	H	NHCH <sub>2</sub> COOH
Glycolithocholic acid	OH	H	H	H	NHCH <sub>2</sub> COOH

Propanoic acid	
Propanoic acid-d <sub>5</sub>	
Butyric acid	
Butyric acid-d <sub>7</sub>	
Lauric acid	
Myristic acid	
Palmitic acid	
Palmitoleic acid	
Stearic acid	
Oleic acid	
Arachidic acid	
Lignoceric acid	

Nervonic acid	
Linoleic acid	
α-Linolenic acid	
γ-Linolenic acid	
Stearidonic acid	
Dihomo-γ-Linolenic acid	
Arachidonic acid	
Eicosapentaenoic acid	
Adrenic acid	
Docosapentaenoic acid	
Docosahexaenoic acid	
Indole-3-acetic acid	



## 引用文献

1. Nicholson, J. K. *et al.* Host-gut microbiota metabolic interactions. *Science* **336**, 1262–1267 (2012).
2. Sender, R., Fuchs, S. & Milo, R. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biol.* **14**, e1002533 (2016).
3. Wikoff, W. R. *et al.* Metabolomics analysis reveals large effects of gut microflora on mammalian blood metabolites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 3698–3703 (2009).
4. Laukens, D. *et al.* Heterogeneity of the gut microbiome in mice: Guidelines for optimizing experimental design. *FEMS Microbiol. Rev.* **40**, 117–132 (2015).
5. Clemente, J. C., Ursell, L. K., Parfrey, L. W. & Knight, R. The impact of the gut microbiota on human health: An integrative view. *Cell* **148**, 1258–1270 (2012).
6. Meijers, B. K. I. & Evenepoel, P. The gut-kidney axis: Indoxyl sulfate, p-cresyl sulfate and CKD progression. *Nephrol. Dial. Transplant.* **26**, 759–761 (2011).
7. Toyohara, T. *et al.* Metabolomic profiling of uremic solutes in CKD patients. *Hypertens. Res.* **33**, 944–952 (2010).
8. Kimura, T. *et al.* Identification of biomarkers for development of end-stage kidney disease in chronic kidney disease by metabolomic profiling. *Sci. Rep.* **6**, 26138 (2016).
9. Meyer, T. W. & Hostetter, T. H. Uremia. *N. Engl. J. Med.* **357**, 1316–1325 (2007).
10. Depner, T. A. Uremic Toxicity: Urea and Beyond. *Semin. Dial.* **14**, 246–251 (2008).
11. Liabeuf, S., Drüeke, T. B., Massy, Z. A. & Studies, C. Protein-bound uremic toxins: New insight from clinical studies. *Toxins (Basel)*. **3**, 911–919 (2011).
12. Vanholder, R., Schepers, E., Pletinck, A., Nagler, E. V & Glorieux, G. The Uremic Toxicity of Indoxyl Sulfate and p-Cresyl Sulfate: A Systematic Review. *J. Am. Soc. Nephrol.* **25**, 1897–1907 (2014).

13. Vanholder, R., Laecke, S. Van & Glorieux, G. What is new in uremic toxicity? *Pediatr. Nephrol.* **23**, 1211–1221 (2008).
14. Vanholder, R. *et al.* Review on uremic toxins: Classification, concentration, and interindividual variability. *Kidney Int.* **63**, 1934–1943 (2003).
15. Wang, Z. *et al.* Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature* **472**, 57–63 (2011).
16. Missailidis, C. *et al.* Serum Trimethylamine-N-Oxide Is Strongly Related to Renal Function and Predicts Outcome in Chronic Kidney Disease. *PLoS One* **11**, e0141738 (2016).
17. Stubbs, J. R. *et al.* Serum Trimethylamine- N -Oxide is Elevated in CKD and Correlates with Coronary Atherosclerosis Burden. *J. Am. Soc. Nephrol.* **27**, 305–313 (2016).
18. Wu, I. W. *et al.* P-cresyl sulphate and indoxyl sulphate predict progression of chronic kidney disease. *Nephrol. Dial. Transplant.* **26**, 938–947 (2011).
19. Barreto, F. C. *et al.* Serum Indoxyl Sulfate Is Associated with Vascular Disease and Mortality in Chronic Kidney Disease Patients. *Clin J Am Soc Nephrol* **4**, 1551–1558 (2009).
20. Liabeuf, S. *et al.* Free p-cresylsulphate is a predictor of mortality in patients at different stages of chronic kidney disease. *Nephrol. Dial. Transplant.* **25**, 1183–1191 (2010).
21. Lin, C. J., Wu, V., Wu, P. C. & Wu, C. J. Meta-analysis of the associations of p-cresyl sulfate (PCS) and indoxyl sulfate (IS) with cardiovascular events and all-cause mortality in patients with chronic renal failure. *PLoS One* **10**, 1–14 (2015).
22. Meyer, T. W. & Hostetter, T. H. Uremic solutes from colon microbes. *Kidney Int.* **81**, 949–954 (2012).
23. Tanaka, H., Sirich, T. L., Meyer, T. W., Sirich, L. & Meyer, T. W. Uremic Solutes Produced by Colon Microbes. *Blood Purif.* **40**, 306–311 (2015).
24. W.H. Wilson Tang, Zeneng Wang, Bruce S. Levison, Robert A. Koeth, Earl B. Britt, Xiaoming Fu, Yuping Wu, S. L. H. Intestinal microbial metabolism of phosphatidylcholine and cardiovascular risk. *New Engl. J. Med.* **368**, 1575–1584 (2013).
25. Poesen, R. *et al.* The influence of dietary protein intake on mammalian

- tryptophan and phenolic metabolites. *PLoS One* **10**, 1–12 (2015).
26. Kishino, S. *et al.* Polyunsaturated fatty acid saturation by gut lactic acid bacteria affecting host lipid composition. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 17808–17813 (2013).
  27. Miyamoto, T. *et al.* Argininosuccinate synthase 1 is an intrinsic Akt repressor transactivated by p53. *Sci. Adv.* **3**, e1603204 (2017).
  28. Maslowski, K. M. *et al.* Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. *Nature* **461**, 1282–1286 (2009).
  29. Vaziri, N. D. *et al.* High amylose resistant starch diet ameliorates oxidative stress, inflammation, and progression of chronic kidney disease. *PLoS One* **9**, e114881 (2014).
  30. Andrade-Oliveira, V. *et al.* Gut Bacteria Products Prevent AKI Induced by Ischemia-Reperfusion. *J. Am. Soc. Nephrol.* **26**, 1877–1888 (2015).
  31. Nakade, Y. *et al.* Gut microbiota-derived D-serine protects against acute kidney injury. *JCI Insight* **3**, e97957 (2018).
  32. Chen, D. Q. *et al.* Identification of serum metabolites associating with chronic kidney disease progression and anti-fibrotic effect of 5-methoxytryptophan. *Nat. Commun.* **10**, 1–15 (2019).
  33. Vaziri, N. D. *et al.* Chronic kidney disease alters intestinal microbial flora. *Kidney Int* **83**, 308–315 (2013).
  34. Yoshifuji, A. *et al.* Gut Lactobacillus protects against the progression of renal damage by modulating the gut environment in rats. *Nephrol. Dial. Transplant.* **31**, 401–412 (2016).
  35. Wong, J. *et al.* Expansion of urease- and uricase-containing, indole- and p-cresol-forming and contraction of short-chain fatty acid-producing intestinal microbiota in ESRD. *Am. J. Nephrol.* **39**, 230–237 (2014).
  36. Kaliannan, K., Wang, B., Li, X.-Y., Kim, K.-J. & Kang, J. X. A host-microbiome interaction mediates the opposing effects of omega-6 and omega-3 fatty acids on metabolic endotoxemia. *Sci. Rep.* **5**, 11276 (2015).
  37. Anders, H. J., Andersen, K. & Stecher, B. The intestinal microbiota, a leaky gut, and abnormal immunity in kidney disease. *Kidney Int* **83**, 1010–1016 (2013).

38. Vaziri, N. D. *et al.* Disintegration of colonic epithelial tight junction in uremia: A likely cause of CKD-associated inflammation. *Nephrol. Dial. Transplant.* **27**, 2686–2693 (2012).
39. Cosola, C. *et al.* Microbiota metabolites: Pivotal players of cardiovascular damage in chronic kidney disease. *Pharmacol. Res.* **130**, 132–142 (2018).
40. Just, S. *et al.* The gut microbiota drives the impact of bile acids and fat source in diet on mouse metabolism. *Microbiome* **6**, 1–18 (2018).
41. Koppel, N., Maini Rekdal, V. & Balskus, E. P. Chemical transformation of xenobiotics by the human gut microbiota. *Science* **356**, eaag2770 (2017).
42. Mishima, E. *et al.* Evaluation of the impact of gut microbiota on uremic solute accumulation by a CE-TOFMS-based metabolomics approach. *Kidney Int.* **92**, 634–645 (2017).
43. Itoh, Y., Ezawa, A., Kikuchi, K., Tsuruta, Y. & Niwa, T. Correlation between Serum Levels of Protein-Bound Uremic Toxins in Hemodialysis Patients Measured by LC/MS/MS. *Mass Spectrom. (Tokyo, Japan)* **2**, S0017 (2013).
44. Niwa, T. Update of uremic toxin research by mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* **30**, 510–521 (2011).
45. Shu, C. *et al.* LC-MS/MS method for simultaneous determination of serum p-cresyl sulfate and indoxyl sulfate in patients undergoing peritoneal dialysis. *Biomed. Chromatogr.* **30**, 1782–1788 (2016).
46. Kikuchi, K. *et al.* Gut microbiome-derived phenyl sulfate contributes to albuminuria in diabetic kidney disease. *Nat. Commun.* **10**, 1835 (2019).
47. Jang, H. R. *et al.* Early exposure to germs modifies kidney damage and inflammation after experimental ischemia-reperfusion injury. *Am. J. Physiol. Physiol.* **297**, F1457–F1465 (2009).
48. Emal, D. *et al.* Depletion of Gut Microbiota Protects against Renal Ischemia-Reperfusion Injury. *J. Am. Soc. Nephrol.* **28**, 1450–1461 (2017).
49. Andersen, K. *et al.* Intestinal Dysbiosis, Barrier Dysfunction, and Bacterial Translocation Account for CKD-Related Systemic Inflammation. *J. Am. Soc. Nephrol.* **28**, 76–83 (2017).
50. Kikuchi, K. *et al.* Metabolomic analysis of uremic toxins by liquid



- chromatography/electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **878**, 1662–1668 (2010).
51. Kobayashi, T. *et al.* Exploration of novel predictive markers in rat plasma of the early stages of chronic renal failure. *Anal. Bioanal. Chem.* **406**, 1365–1376 (2014).
  52. Kikuchi, K. *et al.* Metabolomic search for uremic toxins as indicators of the effect of an oral sorbent AST-120 by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **878**, 2997–3002 (2010).
  53. Hsiao, E. Y. *et al.* Microbiota modulate behavioral and physiological abnormalities associated with neurodevelopmental disorders. *Cell* **155**, 1451–1463 (2013).
  54. Mishima, E. *et al.* Conformational Change in Transfer RNA Is an Early Indicator of Acute Cellular Damage. *J. Am. Soc. Nephrol.* **25**, 2316–2326 (2014).
  55. van den Brand, J. A. J. G. *et al.* Uremic Solutes in Chronic Kidney Disease and Their Role in Progression. *PLoS One* **11**, e0168117 (2016).
  56. de Loor, H. *et al.* A liquid chromatography – tandem mass spectrometry method to measure a selected panel of uremic retention solutes derived from endogenous and colonic microbial metabolism. *Anal. Chim. Acta* **936**, 149–156 (2016).
  57. Boelaert, J. *et al.* Metabolic profiling of human plasma and urine in chronic kidney disease by hydrophilic interaction liquid chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry: a pilot study. *Anal. Bioanal. Chem.* **409**, 2201–2211 (2017).
  58. Ocque, A. J., Stubbs, J. R. & Nolin, T. D. Development and validation of a simple UHPLC-MS/MS method for the simultaneous determination of trimethylamine N-oxide, choline, and betaine in human plasma and urine. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **109**, 128–135 (2015).
  59. Fraselle, S. *et al.* Development and validation of an ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method to measure creatinine in human urine. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **988**, 88–97 (2015).
  60. Wang, L. *et al.* Recent advances in materials for stationary phases of

- mixed-mode high-performance liquid chromatography. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **80**, 495–506 (2016).
61. Qiu, H. *et al.* New poly(ionic liquid)-grafted silica multi-mode stationary phase for anion-exchange/reversed-phase/hydrophilic interaction liquid chromatography. *Analyst* **137**, 2553–2555 (2012).
  62. Cai, X. *et al.* Two-dimensional liquid chromatography separation of peptides using reversed-phase/weak cation-exchange mixed-mode column in first dimension. *J. Chromatogr. A* **1228**, 242–249 (2012).
  63. Biba, M. *et al.* Factors influencing the separation of oligonucleotides using reversed-phase/ion-exchange mixed-mode high performance liquid chromatography columns. *J. Chromatogr. A* **1304**, 69–77 (2013).
  64. Kazarian, A. A. *et al.* Comprehensive analysis of pharmaceutical products using simultaneous mixed-mode (ion-exchange/reversed-phase) and hydrophilic interaction liquid chromatography. *J. Sep. Sci.* **37**, 2138–2144 (2014).
  65. Choi, H. *et al.* Development of an analytical method for simultaneous detection of psychotropic phenylalkylamines in hair by LC-MS/MS with a multi-mode reversed-phase column using pH gradient elution. *Forensic Sci. Int.* **259**, 69–76 (2016).
  66. Ordoñez, E. Y. *et al.* Computer assisted optimization of liquid chromatographic separations of small molecules using mixed-mode stationary phases. *J. Chromatogr. A* **1238**, 91–104 (2012).
  67. Yamagaki, T. Fundamentals of Electrospray Ionization in LC/MS. *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.* **65**, 11–16 (2017).
  68. Taylor, P. J. Matrix effects: The Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *Clin. Biochem.* **38**, 328–334 (2005).
  69. Hewavitharana, A. K. Matrix matching in liquid chromatography-mass spectrometry with stable isotope labelled internal standards-Is it necessary? *J. Chromatogr. A* **1218**, 359–361 (2011).
  70. Annesley, T. M. Ion suppression in mass spectrometry. *Clin. Chem.* **49**, 1041–1044 (2003).
  71. Edwards, D. R., Lohman, D. C. & Wolfenden, R. Catalytic Proficiency: The Extreme Case of S–O Cleaving Sulfatases. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 525–531 (2012).
  72. Sajiki, H. *et al.* Complete replacement of H<sub>2</sub> by D<sub>2</sub> via Pd/C-catalyzed

- H/D exchange reaction. *Org. Lett.* **6**, 3521–3523 (2004).
73. Sajiki, H. *et al.* Aromatic ring favorable and efficient H-D exchange reaction catalyzed by Pt/C. *Tetrahedron Lett.* **46**, 6995–6998 (2005).
  74. Esaki, H. *et al.* General method of obtaining deuterium-labeled heterocyclic compounds using neutral D<sub>2</sub>O with heterogeneous Pd/C. *Tetrahedron* **62**, 10954–10961 (2006).
  75. Sajiki, H., Esaki, H., Aoki, F., Maegawa, T. & Hirota, K. Palladium-catalyzed base-selective H-D exchange reaction of nucleosides in deuterium oxide. *Synlett* **2005**, 1385–1388 (2005).
  76. Itoh, Y., Ezawa, A., Kikuchi, K., Tsuruta, Y. & Niwa, T. Protein-bound uremic toxins in hemodialysis patients measured by liquid chromatography/tandem mass spectrometry and their effects on endothelial ROS production. *Anal. Bioanal. Chem.* **403**, 1841–1850 (2012).
  77. Boelaert, J. *et al.* A novel UPLC-MS-MS method for simultaneous determination of seven uremic retention toxins with cardiovascular relevance in chronic kidney disease patients. *Anal. Bioanal. Chem.* **405**, 1937–1947 (2013).
  78. Sabatino, A. *et al.* Alterations of intestinal barrier and microbiota in chronic kidney disease. *Nephrol. Dial. Transplant.* **30**, 924–933 (2015).
  79. Rossi, M. *et al.* Synbiotics Easing Renal Failure by Improving Gut Microbiology (SYNERGY): A Randomized Trial. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **11**, 223–231 (2016).
  80. Yamamoto, S. *et al.* Continuous Reduction of Protein-Bound Uraemic Toxins with Improved Oxidative Stress by Using the Oral Charcoal Adsorbent AST-120 in Haemodialysis Patients. *Sci. Rep.* **5**, 14381 (2015).
  81. Wang, Z. *et al.* Non-lethal Inhibition of Gut Microbial Trimethylamine Production for the Treatment of Atherosclerosis. *Cell* **163**, 1585–1595 (2015).
  82. Mishima, E. *et al.* Canagliflozin reduces plasma uremic toxins and alters the intestinal microbiota composition in a chronic kidney disease mouse model. *Am. J. Physiol. Physiol.* **315**, F824–F833 (2018).
  83. James, M. T., Hemmelgarn, B. R. & Tonelli, M. Early recognition and prevention of chronic kidney disease. *Lancet* **375**, 1296–1309 (2010).
  84. Wouters, O. J., O'Donoghue, D. J., Ritchie, J., Kanavos, P. G. & Narva,

- A. S. Early chronic kidney disease: diagnosis, management and models of care. *Nat. Rev. Nephrol.* **11**, 491–502 (2015).
85. Bone, E., Tamm, A. & Hill, M. The production of urinary phenols by gut bacteria and their possible role in the causation of large bowel cancer. *Am. J. Clin. Nutr.* **29**, 1448–1454 (1976).
86. Smith, E. A. A. & Macfarlane, G. T. T. Formation of phenolic and indolic compounds by anerobic bacteria in the human large intestine. *Microb. Ecol.* **33**, 180–188 (1997).
87. Wang, T. J. *et al.* Metabolite profiles and the risk of developing diabetes. *Nat. Med.* **17**, 448–453 (2011).
88. Ogata, M. & Yamasaki, Y. High Performance Liquid Chromatography for the Quantitative Determination of Urinary Phenylsulfate and Phenylglucuronide as Indices of Benzene and Phenol Exposure in Rats. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **44**, 177–184 (1979).
89. Ogata, M. & Taguchi, T. Simultaneous determination of urinary creatinine and metabolites of toluene, xylene, styrene, ethylbenzene and phenol by automated high performance liquid chromatography. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **61**, 131–140 (1988).
90. Pierce, W. M. & Nerland, D. E. Qualitative and Quantitative Analyses of Phenol, Phenylglucuronide, and Phenylsulfate in Urine and Plasma by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. *J. Anal. Toxicol.* **12**, 344–347 (1988).
91. Miyazaki, T., Aoyama, I., Ise, M., Seo, H. & Niwa, T. An oral sorbent reduces overload of indoxyl sulphate and gene expression of TGF-beta1 in uraemic rat kidneys. *Nephrol. Dial. Transplant* **15**, 1773–1781 (2000).
92. Kohl, T. O. & Ascoli, C. A. Indirect Immunometric ELISA. *Cold Spring Harb. Protoc.* **2017**, pdb.prot093708 (2017).
93. Yang, F. *et al.* Competitive immunoassay for analysis of bisphenol A in children's sera using a specific antibody. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **23**, 10714–10721 (2016).
94. Zampieri, S. *et al.* The use of Tween 20 in immunoblotting assays for the detection of autoantibodies in connective tissue diseases. *J. Immunol. Methods* **239**, 1–11 (2000).
95. Ridlon, J. M., Kang, D. & Hylemon, P. B. Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *J. Lipid Res.* **47**, 241–259 (2006).

96. Koh, A., De Vadder, F., Kovatcheva-Datchary, P. & Bäckhed, F. From dietary fiber to host physiology: Short-chain fatty acids as key bacterial metabolites. *Cell* **165**, 1332–1345 (2016).
97. Spaepen, S., Vanderleyden, J. & Remans, R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiol. Rev.* **31**, 425–448 (2007).
98. Wahlström, A., Sayin, S. I., Marschall, H. U. & Bäckhed, F. Intestinal Crosstalk between Bile Acids and Microbiota and Its Impact on Host Metabolism. *Cell Metab.* **24**, 41–50 (2016).
99. Want, E. J. *et al.* Global metabolic profiling procedures for urine using UPLC-MS. *Nat. Protoc.* **5**, 1005–1018 (2010).
100. Saigusa, D. *et al.* Establishment of protocols for global metabolomics by LC-MS for biomarker discovery. *PLoS One* **11**, 1–18 (2016).
101. Higashi, T. & Ogawa, S. Isotope-coded ESI-enhancing derivatization reagents for differential analysis, quantification and profiling of metabolites in biological samples by LC/MS: A review. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **130**, 181–193 (2016).
102. Yuan, B. F. *et al.* Comprehensive Profiling of Fecal Metabolome of Mice by Integrated Chemical Isotope Labeling-Mass Spectrometry Analysis. *Anal. Chem.* **90**, 3512–3520 (2018).
103. Guo, N., Peng, C. Y., Zhu, Q. F., Yuan, B. F. & Feng, Y. Q. Profiling of carbonyl compounds in serum by stable isotope labeling - Double precursor ion scan - Mass spectrometry analysis. *Anal. Chim. Acta* **967**, 42–51 (2017).
104. Lu, Y., Yao, D. & Chen, C. 2-Hydrazinoquinoline as a Derivatization Agent for LC-MS-Based Metabolomic Investigation of Diabetic Ketoacidosis. *Metabolites* **3**, 993–1010 (2013).
105. Guo, K. & Li, L. High-performance isotope labeling for profiling carboxylic acid-containing metabolites in biofluids by mass spectrometry. *Anal. Chem.* **82**, 8789–8793 (2010).
106. Han, J., Lin, K., Sequeira, C. & Borchers, C. H. An isotope-labeled chemical derivatization method for the quantitation of short-chain fatty acids in human feces by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **854**, 86–94 (2015).
107. Leng, J. *et al.* A highly sensitive isotope-coded derivatization method and its application for the mass spectrometric analysis of analytes

- containing the carboxyl group. *Anal. Chim. Acta* **758**, 114–121 (2013).
108. Cai, T., Ting, H., Xin-Xiang, Z., Jiang, Z. & Jin-Lan, Z. HPLC-MRM relative quantification analysis of fatty acids based on a novel derivatization strategy. *Analyst* **139**, 6154–6159 (2014).
109. Zhu, Q. F. *et al.* Analysis of liposoluble carboxylic acids metabolome in human serum by stable isotope labeling coupled with liquid chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1460**, 100–109 (2016).
110. Zhu, Y., Deng, P. & Zhong, D. Derivatization methods for LC-MS analysis of endogenous compounds. *Bioanalysis* **7**, 2557–2581 (2015).
111. Higashi, T. *et al.* Simple and practical derivatization procedure for enhanced detection of carboxylic acids in liquid chromatography–electrospray ionization–tandem mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **52**, 809–818 (2010).
112. Joo, K. M. *et al.* A rapid and highly sensitive UPLC-MS/MS method using pre-column derivatization with 2-picolyamine for intravenous and percutaneous pharmacokinetics of valproic acid in rats. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **938**, 35–42 (2013).
113. Nagatomo, R., Okada, Y., Ichimura, M., Tsuneyama, K. & Inoue, K. Application of 2-Picolyamine Derivatized Ultra-high Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry for the Determination of Short-chain Fatty Acids in Feces Samples. *Anal. Sci.* **34**, 1031–1036 (2018).
114. Maegawa, T., Ito, N., Oono, K., Monguchi, Y. & Sajiki, H. Bimetallic Palladium-Platinum-on-Carbon-Catalyzed H-D Exchange Reaction: Synergistic Effect on Multiple Deuterium Incorporation. *Synthesis (Stuttg)*. **2009**, 2674–2678 (2009).
115. Zeng, M. & Cao, H. Fast quantification of short chain fatty acids and ketone bodies by liquid chromatography-tandem mass spectrometry after facile derivatization coupled with liquid-liquid extraction. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **1083**, 137–145 (2018).
116. McDonald, G. R. *et al.* Bioactive contaminants leach from disposable laboratory plasticware. *Science (80- )*. **322**, 917 (2008).
117. Stewart, J., Drexler, D. M., Leet, J. E., McNaney, C. A. & Herbst, J. J. Labware additives identified to be selective monoamine oxidase-b inhibitors. *J. Biomol. Screen.* **19**, 1409–1414 (2014).

118. Kuno, T., Hirayama-Kurogi, M., Ito, S. & Ohtsuki, S. Reduction in hepatic secondary bile acids caused by short-term antibiotic-induced dysbiosis decreases mouse serum glucose and triglyceride levels. *Sci. Rep.* **8**, 1253 (2018).
119. Kindt, A. *et al.* The gut microbiota promotes hepatic fatty acid desaturation and elongation in mice. *Nat. Commun.* **9**, 3760 (2018).
120. Tanos, R., Murray, I. A., Smith, P. B., Patterson, A. & Perdew, G. H. Role of the Ah receptor in homeostatic control of fatty acid synthesis in the liver. *Toxicol. Sci.* **129**, 372–379 (2012).
121. Krishnan, S. *et al.* Gut Microbiota-Derived Tryptophan Metabolites Modulate Inflammatory Response in Hepatocytes and Macrophages. *Cell Rep.* **23**, 1099–1111 (2018).
122. Shearer, G. C., Carrero, J. J., Heimbürger, O., Barany, P. & Stenvinkel, P. Plasma Fatty Acids in Chronic Kidney Disease: Nervonic Acid Predicts Mortality. *J. Ren. Nutr.* **22**, 277–283 (2012).
123. Nallu, A., Sharma, S., Ramezani, A., Muralidharan, J. & Raj, D. Gut microbiome in chronic kidney disease: challenges and opportunities. *Transl. Res.* **179**, 24–37 (2017).
124. Veldhoen, M. & Brucklacher-Waldert, V. Dietary influences on intestinal immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **12**, 696–708 (2012).
125. Turolo, S. *et al.* Fatty Acids in Nephrotic Syndrome and Chronic Kidney Disease. *J. Ren. Nutr.* **28**, 145–155 (2018).
126. Nanto-Hara, F. *et al.* The guanylate cyclase C agonist linaclotide ameliorates the gut-cardio-renal axis in an adenine-induced mouse model of chronic kidney disease. *Nephrol. Dial. Transplant* 1–14 (2019). doi:10.1093/ndt/gfz126
127. Transl, J. *et al.* Aryl hydrocarbon receptor activation mediates kidney disease and renal cell carcinoma. *J. Transl. Med.* **2**, 1–14 (2019).
128. Jia, W. *et al.* Melamine-induced renal toxicity is mediated by the gut microbiota. *Sci. Transl. Med.* **5**, 1–10 (2013).
129. De Angelis, M. *et al.* Microbiota and metabolome associated with Immunoglobulin A Nephropathy (IgAN). *PLoS One* **9**, (2014).
130. Feng, Y.-L. *et al.* Microbiome–metabolomics reveals gut microbiota associated with glycine-conjugated metabolites and polyamine metabolism in chronic kidney disease. *Cell. Mol. Life Sci.* **76**, 4961–4978 (2019).

