慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	メタボロミクスによる急性腎障害(AKI)発症に対する尿中バイオマーカー探索
Sub Title	
Author	松浦, 亜里沙(Matsuura, Arisa)
Publisher	慶應義塾大学湘南藤沢学会
Publication year	2014
Jtitle	生命と情報 No.21 (2014.) ,p.54- 65
JaLC DOI	
Abstract	通常, 様々な外科的手術の後は集中治療室にて患者の経過観察を行う。その際, 少数の患者は急性腎障害(acute kidney injury ; AKI)を発症する。AKIとは腎機能が低下している状態を指し, 比較的侵襲の大きな手術を行った後に, 敗血症や多臓器不全, 薬剤などを原因として引きおこされる病態である。末期腎不全に陥ることを阻止するために, 腎臓に障害が加わった最も早期の段階を捉えようとする新しい概念として提唱された。現在のAKIの診断には多くの時間を必要とするため治療の開始が遅れ, 重症化に陥るリスクが高くなる。従って, 早期にAKIを予測出来るバイオマーカーが必要とされている。尿中にはアミノ酸等の低分子代謝物が豊富に含まれており, イオン性代謝物を網羅的に測定出来るキャピラリー電気泳動- 質量分析法(capillary electrophoresis-mass spectrometry ; CE-MS)とも非常に相性が良い。 本研究では, 手術後にAKIを発症しなかった患者23人(non-AKI), 軽度のAKIを発症した患者24人(mild-AKI), そして重度のAKIを発症した患者14人(severe-AKI)の尿をCE-MSを用いて測定した。その結果, 143のイオン性代謝物を同定した。AKIの早期介入マーカーを見つけるために, ICUに入室した時点に焦点を置いて統計解析を行った。最終的にbeta-AlanineとAlanineが, non-AKIとsevere-AKIを判別できるバイオマーカー候補として同定された。また, non-AKIとmild-AKIはほぼ全ての代謝物で同程度尿中に存在することが分かった。しかしながら, Trimethylamine N-oxideとCysteine S-sulfateの比をとることで, non-AKIとmild- AKIを判別できる可能性が示唆された。これらのバイオマーカー候補が臨床現場で適用され, AKIの予後不良改善や死亡率の低下につながることを期待する。
Notes	慶應義塾大学湘南藤沢キャンパス先端生命科学研究会 2014年度学生論文集 修士論文ダイジェスト
Genre	Technical Report
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KO92001004-00000021-0054

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

メタボロミクスによる急性腎障害（AKI）発症に対する尿中バイオマーカー探索

慶應義塾大学大学院　政策・メディア研究科　修士課程2年
松浦亜里沙

要旨

通常，様々な外科的手術の後は集中治療室にて患者の経過観察を行う．その際，少数の患者は急性腎障害（acute kidney injury; AKI）を発症する．AKIとは腎機能が低下している状態を指し，比較的侵襲の大きな手術を行った後に，敗血症や多臓器不全，薬剤などを原因として引きおこされる病態である．末期腎不全に陥ることを阻止するために，腎臓に障害が加わった最も早期の段階を捉えようとする新しい概念として提唱された．現在のAKIの診断には多くの時間を必要とするため治療の開始が遅れ，重症化に陥るリスクが高くなる．従って，早期にAKIを予測出来るバイオマーカーが必要とされている．尿中にはアミノ酸等の低分子代謝物が豊富に含まれており，イオン性代謝物を網羅的に測定出来るキャピラリー電気泳動－質量分析法（capillary electrophoresis-mass spectrometry; CE-MS）とも非常に相性が良い．

本研究では，手術後にAKIを発症しなかった患者23人（non-AKI），軽度のAKIを発症した患者24人（mild-AKI），そして重度のAKIを発症した患者14人（severe-AKI）の尿をCE-MSを用いて測定した．その結果，143のイオン性代謝物を同定した．AKIの早期介入マーカーを見つけるために，ICUに入室した時点に焦点を置いて統計解析を行った．最終的にbeta-AlanineとAlanineが，non-AKIとsevere-AKIを判別できるバイオマーカー候補として同定された．また，non-AKIとmild-AKIはほぼ全ての代謝物で同程度尿中に存在することが分かった．しかしながら，Trimethylamine N-oxideとCysteine S-sulfateの比をとることで，non-AKIとmild-AKIを判別できる可能性が示唆された．これらのバイオマーカー候補が臨床現場で適用され，AKIの予後不良改善や死亡率の低下につながることを期待する．

Keywords：AKI，メタボロミクス，キャピラリー電気泳動-質量分析法（CE-MS），
バイオマーカー，尿

1. 研究背景

1.1 急性腎障害（acute kidney injury; AKI）

脳や心臓などの様々な外科的手術の後，患者は集中治療室（intensive care unit; ICU）にて加療される．その際，少数の患者がAKIを発症する．AKIは急激な腎機能低下を示している状態を指し，末期の腎不全となる事態を阻止するために，侵襲が加わった最も早期の段階を捉えることを目的として提唱された概念である（Mehta *et al.*, 2007）．AKIは，胸腹部などの侵襲の大きな手術に伴って見られることが多い．AKIの直接的な原因としては，手術中の虚血，敗血症，薬剤性腎臓障害などがあげられる．ICUにおけるAKIの発生頻度は1980年代で約30%，その内死亡率は64%と高値であった（Hou SH *et al.*, 1983）．2000年代では5.7%まで低下したが，その内73.5%の患者においては透析療法を余儀なくされている．AKIを発症した場合の死亡率は，血液浄化療法により80%から30～50%まで改善されたが，その後数十年間この数字は変化していない（Mehta *et al.*, 2004）．

現在AKIは，RIFLE（risk of dysfunction, injury to kidney, failure of kidney function, loss of kidney function and end-stage kidney disease）とAKIN（acute kidney injury network）を組み合わせた，KDIGO（kidney disease: improving global outcomes）と呼ばれる国際基準を基に医師が慎重に診断を下している（Mehta *et al.*, 2007; Bellomo *et al.*, 2004）（表1）．しかし，これらは精度が悪く，患者がICUに入室してから最低でも48時間は血清Cr値や尿量をモニタリングしなければならないため，早期の治療開始が難しい．AKIを早期に診断し，対策することで少しでも重症化を防ぐことがICUでの現代の課題である．先行研究においては，タンパク質のバイオマーカーを探索する研究も行われ，NGAL（neutrophil gelatinase-associated lipocalin）やKIM-1（kidney injury molecule-1）といったマーカーが見つかっている．しかし，これらは他の病態でも尿中に増加すること，ICUにおいて実際にバイオマーカーとして機能するかどうかが未検討であり，臨床応用には至っていない（Nguyen *et al.*, 2008）．

表1　RIFLEとAKIN分類（KDIGOガイドライン）

RIFLE	AKIN
・血清Cr値基線から1.5倍以上上昇 ・GFR(糸球体濾過量) 25%低下 ・尿量 0.5 ml/kg/hrが6時間以上持続	・血清Cr値 0.3 mg以上の上昇 もしくは1.5倍以上の上昇 (48時間以内) ・尿量0.5 ml/kg/hrが6時間以上持続

1.2 メタボロミクスとキャピラリー電気泳動質量分析法（capillary electrophoresis-mass spectrometry; CE-MS）

メタボロミクスとは，メタボロームを網羅的に分析し，代謝に関する定量的な解釈を与える研究手法である．メタボローム解析において，現在よく用いられている分離手法はガスクロマトグラフィー（gas chromatography; GC），液体クロマトグラフィー（liquid chromatography; LC）とCEである．これらの機器は一般にMSと組み合わせることで分離－検出機器として利用され，高い定量性能を有している．全てにそれぞれ長所と短所が存在し（表2），目的代謝物質の性質に合わせて使い分ける必要がある．

CE-MSは慶應義塾大学の曽我朋義の研究グループによって開発されたメタボローム解析装置である（Soga *et al.*, 2002）．低分子代謝物の多くはイオン性であり，CEはこれらの分離を最も得意とするた

め，解糖系のような主要代謝パスウェイを調査する際や，バイオマーカー探索の高度な定量性が求められる場合には極めて有用な測定手法である．

尿中には無機物や種々の代謝物等，腎機能を評価する情報が豊富に含まれている．上述したCE-MSとも相性が良く，さらには前処理が大変な臓器組織や血液に比べて尿は希釈するだけで測定が可能である．本研究では，このCE-MSを用いて尿中の代謝物を定量し，未だ発見されていないメタボロミクス分野でのAKIの早期介入マーカーを探った．

表2　メタボロミクスで用いられる分離法の特徴*

	CE	GC	LC
対象代謝物	イオン性	揮発性	中性・脂溶性
サンプル誘導体化	不要	必要	不要
理論段数	10^5～10^6	10^4～10^5	104
構造異性体の分離	可能	可能	困難
MSとの接合適合性	良好	良好	測定メソッド依存
測定時間	30～45分	30～60分	測定メソッド依存
サンプル分画	不可能	不可能	可能

*「The PROCEEDINGS OF METABOLOMICS 2nd Edition」（ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ株式会社）より引用

2.　対象と手法

2.1　サンプル収集と患者情報

本研究に用いた尿は名古屋大学付属病院に入院していた患者121名から採取されたものである．全ての患者からインフォームドコンセントを得た上で，尿を下記の6点で提供して頂いた（図1）．これら121名の患者を，手術を受けた後にAKIを発症しなかった患者（non-AKI），軽度のAKIを発症した患者（mild-AKI），重度のAKIを発症した患者（severe-AKI）の3群に分けた．軽度と重度の判別はKDIGOに基づき，ICU入室までの30日間で測定した血清Cr値のベースラインに比べて，手術後1日～7日目までに測定した血清Cr値のピーク値が1.5～2倍までの上昇でmild-AKI，2倍以上の上昇でsevere-AKIとした．最初に61名（non-AKI: 23，mild-AKI: 24，severe-AKI: 14）の尿をCE-MSで測定し，追加で60名（non-AKI: 40，mild-AKI: 20）の尿を測定した．それぞれの患者の臨床情報も下記に示した（表3および4）．尿サンプルは測定に使用するまで−80°Cで保管した．

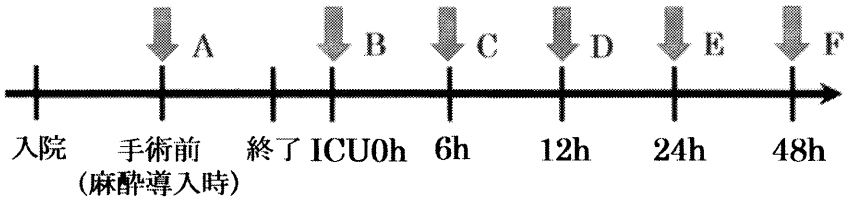


図1　尿採取ポイント

手術前は麻酔を導入した際に尿を採取した．ICU 0hは入室時点，その後6時間，12時間，24時間，48時間それぞれで尿を採取した．

表3　患者の臨床情報（初期サンプル）

	non-AKI (n=23)	mild-AKI (n=24)	severe-AKI (n=14)
性別	男: 16 女: 7	男: 19 女: 5	男: 9 女: 5
年齢（中央値）	52-83 (68.0)	47-84 (71.0)	53-76 (67.0)
診療科			
心臓	12	10	4
消化器	7	9	6
乳腺	1	0	1
整形	1	1	0
呼吸器	2	1	0
移植	0	0	1
血管	0	3	1
泌尿器	0	0	1

表4　患者の臨床情報（追加サンプル）

	non-AKI (n=40)	mild-AKI (n=20)
性別	男：34 女：6	男：19 女：1
年齢(中央値)	40-83 (68.0)	31-81 (72.5)
診療科		
心臓	14	3
消化器	7	11
脳	6	1
整形	1	0
呼吸器	2	2
移植	1	1
血管	4	2
口腔	2	0
耳鼻咽喉	5	0

2.2 尿サンプルの前処理

−80°Cで保管しておいた尿サンプルを室温に戻して20 μLを1.5 mLチューブに移した．これに濃度2 mMの内部標準（internal standards; IS） cation: methionine sulfone, 3-aminopyrroridine, anion: trimesate, D-camphor-10-sulfonic acid sodium salt（CSA），2-(N-morpholino)ethane sulfonic acid（MES）を含んだMilli-Q水と，酵素法で測定した尿中Cr値を基に希釈用のMilli-Q水を加えた（表5）．限外濾過チューブに移し，10,000 *g*で30〜50分，4 °Cで遠心分離した．この内の7 μLを測定用バイアルに注入し，測定に使用した．

表5 尿中Cr値に基づくサンプル希釈量

希釈倍率（Cr値）*	尿（μL）	IS入りMilli-Q水（μL）	Milli-Q水（μL）	合計（μL）
20（100~300）	20	40	340	400
10（50~100）	20	20	160	200
5（25~50）	20	10	70	100
2（10~25）	20	4	16	40
1（0~10）	90	10	0	100

*Cr値の単位はmg/dL.

2.3 Cation代謝物の測定

CE-MSはアジレント・テクノロジー株式会社の装置（CE: Agilent 7100 CEシステム，MS: Agilent 6224 MSシステム）を使用した．代謝物はヒューズドシリカキャピラリー（内径50 μm，全長100 cm）で分離した．キャピラリー内部に流すバッファーは1 Mのギ酸溶液を用いた．サンプルは5 kPaで5秒間注入し，+30 kVの電圧を印加した．シース液は0.01 μMのHexakisを含んだメタノール/水（50% v/v）で，10 μL/minで送液した．ESI-TOFMSは陽イオンモードで測定した．キャピラリーの電圧は4 kV，窒素ガス（ヒーター温度300°C）の流速は10 L/minとした．TOFMSのfragmenter voltage, skimmer voltage, および octapole radio frequency voltageはそれぞれ75, 50, 500 Vとした．Reference Massは2つの参照標準: [^{13}C isotopic ion of the protonated methanol dimer (2MeOH + H)]$^{+}$, *m/z* 66.06306と，[protonated Hexakis (M + H)]$^{+}$, *m/z* 622.02896を用いた．

2.4 Anion代謝物の測定

CE-MSはアジレント・テクノロジー株式会社の装置（CE: Agilent 7100 CEシステム，MS: Agilent 6230 MSシステム）を使用した．代謝物は陽イオン性ポリマーで化学的に被覆されたCOSMO（+）キャピラリーで分離した．キャピラリー内部に流すバッファーは50 mMの酢酸アンモニウム溶液（pH 8.5）を用いた．サンプルは5 kPaで30秒間注入し，−30 kVの電圧を印加した．シース液は0.01 μMのHexakisと5 mMの酢酸アンモニウムを含んだメタノール/水（50% v/v）で，10 μL/minで送液した．ESI-TOFMSは陰イオンモードで測定した．キャピラリーの電圧は3.5 kV，窒素ガス（ヒーター温度300°C）の流速は10 L/minとした．TOFMSのfragmenter voltage, skimmer voltageおよびoctapole radio frequency voltageはそれぞれ100, 50, 500 Vとした．Reference Mass は2つの参照標準: [^{13}C isotopic ion of deprotonated acetic acid

dimer $(2CH_3COOH\text{-}H)]^-$, *m/z* 120.03834と，[Hexakis + deprotonated acetic acid $(M + CH_3COOH\text{-}H)]^-$, *m/z* 680.03554を用いた．

2.5 データ処理と統計解析

ＣＥ-ＭＳで測定した生データを慶應義塾大学先端生命科学研究所が開発した解析ソフトウェア，MasterHands Version 2.16.0.15を用いて解析し，各代謝物の濃度（μM）を算出した（Hirayama et al., 2009; Sugimoto et al., 2010）．続いて，以下の式を用いてCrで補正した各代謝物の尿中量（urinary amounts; UA）を算出した（式1）．

$$\text{代謝物の尿中量 UA（μmol/mmol Cr）} = \frac{\text{代謝物の濃度} \times \text{希釈倍率}}{\dfrac{\text{Cr 値} \times 10}{113.118*}}$$

*Crの分子量（113.118 g/mol）である．

統計解析として，最初に主成分分析（principal component analysis; PCA）を実施した． PCAは，umetrics社製の多変量解析ソフトウェア，SIMCA 13を使用した．次に，尿を採取した6点の内のBポイント（ICU 0h）で3群でのkruskal-wallis検定を実施した．そこで有意差が得られた代謝物について，さらに受診者動作特性曲線（receiver operating characteristic curve; ROC curve）を算出し，AKIのマーカーとしてより信頼度の高い代謝物を決定した．これらの代謝物について尿採取ポイント6点の経時的変化を観察し，さらに手術時間や患者のバックグランドの影響について調査した．これにより，ＡＫＩのマーカー候補をさらに絞り込んで，追加サンプルを用いてのバリデーション研究を実施した．最後に各代謝物でのふるまいがほとんど同じであったnon-AKIとmild-AKIについて，判別できる代謝物があるかどうかを調査するため，2群でのmann-whitneyのU検定を実施した．全検定は，GraphPad Software社が開発したソフトウェア，Graphpad Prism 5を用いた．

3. 結果と考察

3.1 主成分分析（principal component analysis; PCA）

尿サンプルをCE-MSで測定した結果，cationおよびanion合わせて143の代謝物を同定した．これら全代謝物についてnon-AKI，mild-AKI，severe-AKIの3群でPCAを行った（図2）．この図から分かるように，明確な分離は見られなかった．本研究の目的は，早期にAKIを予測出来るマーカーを探索することなので，ICU 0h（尿採取ポイント6点のうちのB）に焦点を当てて，3群での検定を行った．

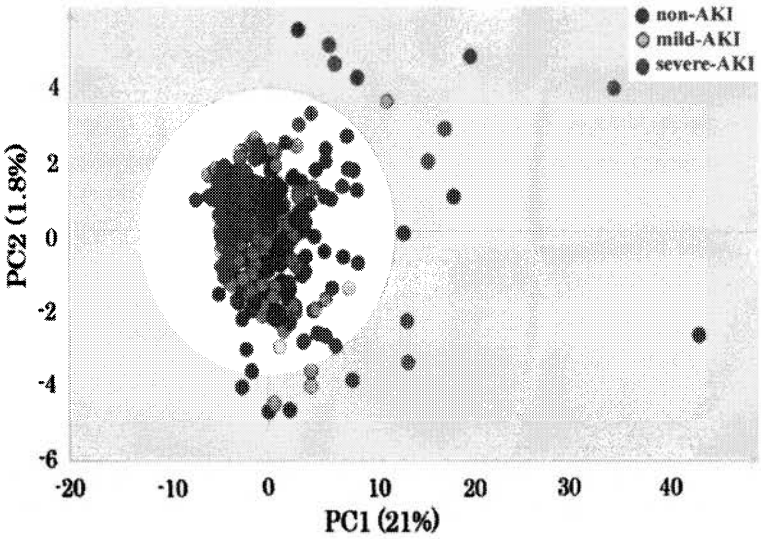
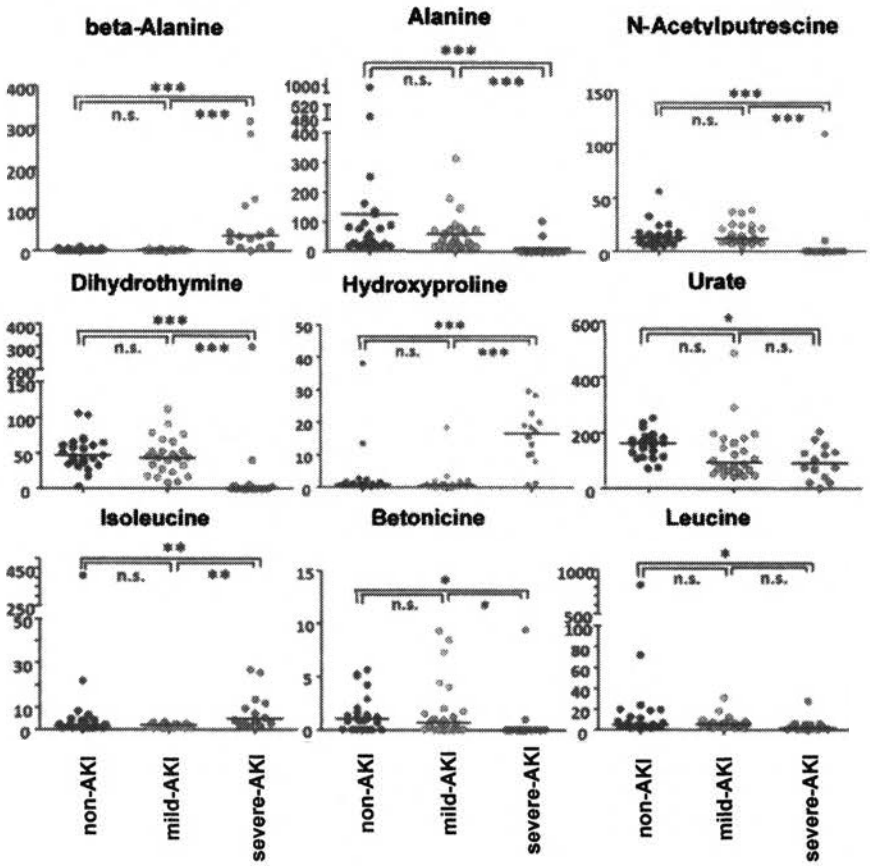


図2　全代謝物のPCAプロット

楕円はHoteling T2（0.95）を示す．寄与率はPC1，PC2それぞれ21%，1.8%である．

3.2　3群での比較解析

ICU　0h（尿採取ポイントのB）において，non-AKI，mild-AKI，そしてsevere-AKIの3群で差がある代謝物を探った．その結果，11の代謝物で有意差が得られた（図3）．しかし，ほとんどの代謝物がnon-AKIに対してsevere-AKIでのみ有意差が得られ，mild-AKIで有意差のある代謝物は1つだけであった．そして，同定された代謝物ほとんどでnon-AKIとmild-AKIはほぼ同じ値を示していた．



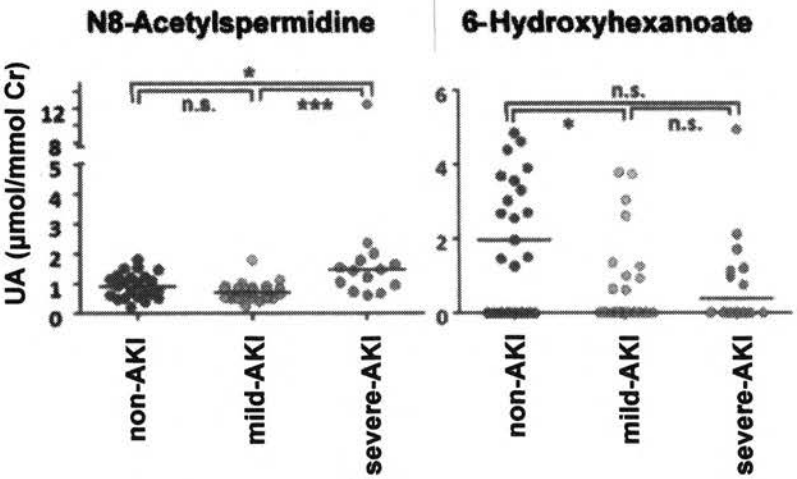


図3　ICU 0hにおいて有意差が得られた代謝物

青，緑，赤のドットはそれぞれnon-AKI，mild-AKI，severe-AKIを示す．縦軸はCr値で補正した尿中量（urinary amount；UA）である．***，**，*はそれぞれp<0.001，p<0.01，p<0.05を示す．n.s.は有意差無し（not significant）である．図中のバーは平均値を示す．

3.3　受診者動作特性曲線（receiver operating characteristic curve; ROC curve）

non-AKIに対してsevere-AKIで有意差の得られた10の代謝物について，ROC曲線を作成した．これは，検査の診断特性の評価や新しい検査法がどのくらい有効であるかを示す指標となる系統的グラフである．ここで得られる面積値（area under the curve; AUC）は0.5～1.0の値を示すが，一般的に0.8以上であれば有効性は高いと言われている．結果として，5代謝物において0.8以上のAUCが得られた（図4）．従って，AKIのバイオマーカーをこの5つに絞り，これらの経時的変化を観察した．

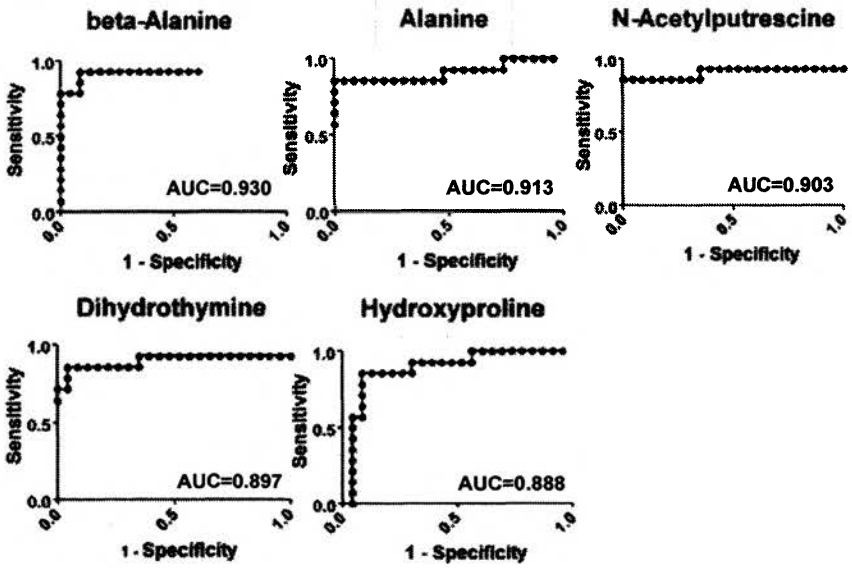


図4　non-AKIに対するsevere-AKIのROC曲線

縦軸は感度（sensitivity），横軸は偽陽性率（1-specificity）を示す．Urate，isoleucine，betonicine，leucine，N8-acetylspermidineのAUC値はいずれも0.8以下であった．

3.4 5代謝物の経時的変化

ROC曲線のAUCが高かった5つの代謝物について，経時的変化を観察した（図5）．mild-AKIは軽度のAKIを発症しているにも関わらず，AKIを発症しなかったnon-AKIとほぼ同じ変化を示していることが分かった．Alanineでは，手術前の時点で3群とも同程度尿中に存在しているが，severe-AKIではその後尿中から消失していた．そして，他の2群はICU入室直後に尿中量が増え，6時間後にはほぼ消失するという異なった傾向が見られた．N-AcetylputrescineとDihydrothymineにおいても，手術前からICU入室6時間後までの3点で，Alanineと同じような挙動を示していた．beta-AlanineとHydroxyprolineにおいては，severe-AKIがICUに入室した直後から早い段階で尿中に多量存在し，ICU入室12時間後には尿中から消失していた．一方でnon-AKIおよびmild-AKIは，同じような挙動がICU入室6時間後から始まっていた．

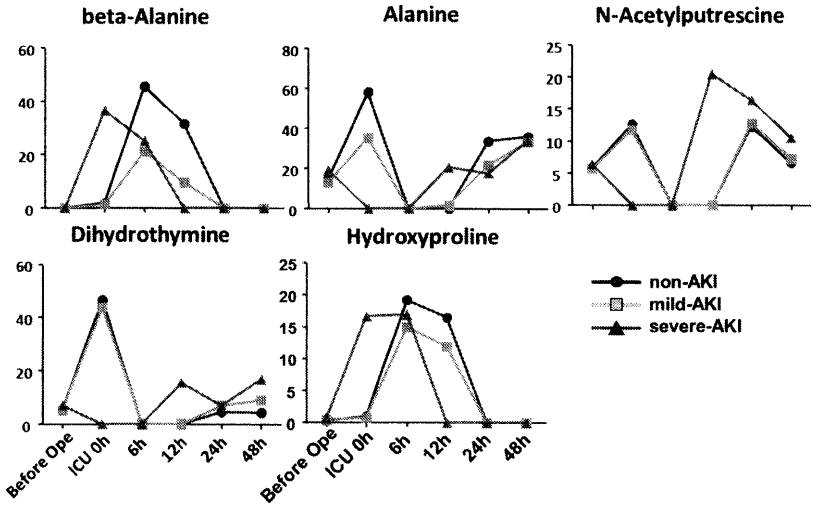


図5　5代謝物の経時的変化

縦軸は尿中量UA，横軸は尿を採取した6点を示している．青，緑，赤線はそれぞれnon-AKI，mild-AKI，severe-AKIを示す．外れ値の影響により，エラーバーを示すと視覚的に経時的変化を捉えることが難しいため，エラーバーは示していない．

3.5 手術時間，患者のバックグラウンドの影響

severe-AKIにおけるbeta-AlanineとHydroxyprolineの尿中量増加が，non-AKIに比べて少し早い段階から起こっている原因は，手術時間に関係しているのではないかと考え，その影響を調査した．severe-AKI患者の手術時間平均は10時間36分，non-AKIの手術時間平均は9時間46分で，両群共に10時間前後だった．その時間を基準とし，各代謝物のnon-AKIとsevere-AKIそれぞれで，平均手術時間よりも短い手術を行った群と長い群に分けてt検定を実施し，差があるかどうかを検討した．男女や年齢でも差があるかどうかを同様の方法で調査した．

平均手術時間で2群に分けた時のt検定において，beta-AlanineとAlanine，そしてDihydrothymineでは両群共に差は見られなかった．従って，手術時間による代謝物への影響は無いと考えられた．しかし，N-AcetylputrescineではnON-AKIで，Hydroxyprolineではsevere-AKIで有意差が得られた．そのため，この2代謝物は手術時間に影響を受けている可能性が示唆された．男女では全代謝物で有意差は無かったものの，年齢（66歳以下と67歳以上）では，Dihydrothymineのsevere-AKIで有意差が得られた．従って，Dihydrothymineは年齢に影響され得ることが示唆された．以上を踏まえると，手術時間，性別，年齢のどのファクターにも影響されなかったbeta-AlanineとAlanineがnon-AKIとsevere-AKIを判別できるAKIのバイオマーカー候補と考えられる．

3.6 追加サンプルによるバリデーション研究

ICUでの発症頻度が約5%と低いsevere-AKI患者の尿サンプルを採取することは非常に難しく，200人以上のICU入室患者でAKIを発症した患者は，初期サンプルで既に測定した14人のみであった．そのため，今回は新たにnon-AKI患者40人とmild-AKI患者20人分の尿をバリデーション研究に用い，beta-AlanineとAlanineについて，ICU　0hの時点で初期サンプルと同じような結果になるかどうかを検証した（図6）．beta-AlanineはICU　0hの時点において，non-AKIもmild-AKIも初期サンプルと同様，尿中にはほとんど存在していないことが明らかとなり，また，Alanineもnon-AKI，mild-AKI共に尿中に同程度存在していることが確認された．

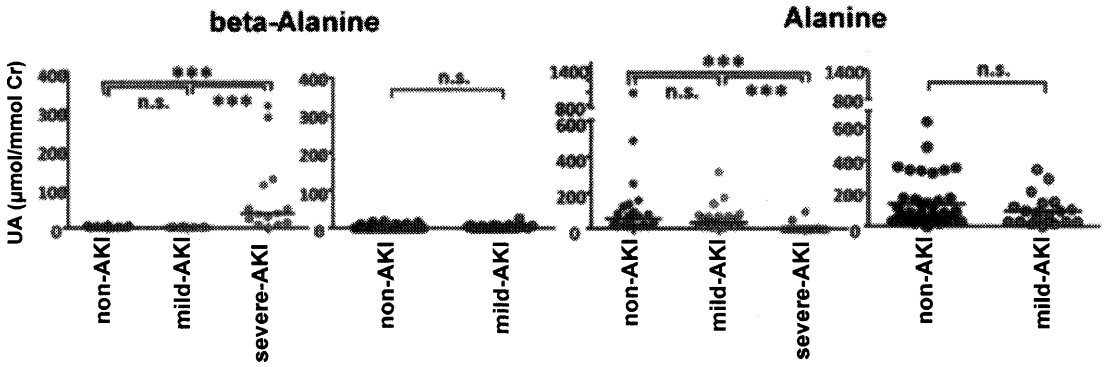


図6　beta-AlanineとAlanineのバリデーション研究

左側は初期サンプルの検定結果（図8），右側が追加サンプルの検定結果である．検定はmann-whitneyのU検定を用いた．***は，p<0.001を示す．n.s.は有意差無し（not significant）である．図中のバーは平均値を示す．

3.7 non-AKIとmild-AKIを判別できるマーカー探索

non-AKI（＋mild-AKI）とsevere-AKIはAKIのバイオマーカー候補，beta-Alanine，Alanineで判別することが可能である．しかし，現時点でnon-AKIとmild-AKIを区別することは出来ない．そこで，この両群を判別できる新たな代謝物を探索した．まず，non-AKIとmild-AKIの2群でmann-whitneyのU検定を実施し，有意差のある代謝物とROC曲線を算出した．結果として，10の代謝物，Urate，Trimethylamine N-oxide，Histidine，6-Hydroxyhexanoate，Glycine，Asymmetric dimethylarginine，Asparagine，Cysteine S-sulfate，Tryptophan，N-Acetylaspartateで有意な差が得られたが，AUC値は全て0.8以下であった．また，Trimethylamine N-oxideだけがnon-AKIに対してmild-AKIで尿中に多く存在していたが，他の代謝物ではnon-AKIよりも尿中量が少なかった．そこで患者毎に，Trimethylamine N-oxideをnon-AKIよりも尿中量が少なかった代謝物それぞれで割り，non-AKIとmild-AKIの比をとることで，よりAKI診断の有効性を高めることができないか検証した．その結果，Trimethylamine N-oxideをCysteine S-sulfateで割った場合のみが，AUC値0.8以上を示した（図7）．従って，Trimethylamine N-oxideとCysteine S-sulfateの比をとることでnon-AKIとmild-AKIを判別できる可能性が示唆された．

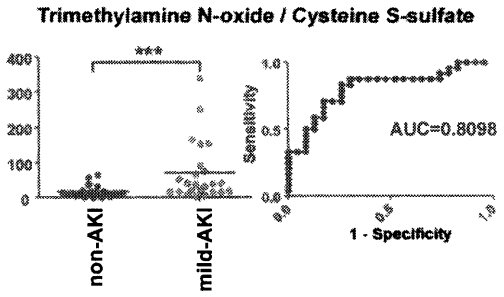


図7　Trimethylamine N-oxide / Cysteine S-sulfateのグラフとROC曲線

左側の図は患者毎，Trimethylamine N-oxideをCysteine S-sulfateの尿中量で割ったグラフで，青い丸はnon-AKI，緑の丸はmild-AKI群を示す．検定はmann-whitneyのU検定を用いた．***は，$p<0.001$を示す．右側の図はnon-AKIに対するmild-AKIのROC曲線である．図中のバーは平均値を示す．

4.　結論

AKIの早期介入バイオマーカーを探索するべく，non-AKI，mild-AKI，severe-AKIの尿サンプルをCE-MSで測定した．その結果，non-AKIとsevere-AKIを判別できる代謝物の候補は11発見されたが，ROC曲線や手術時間，性別，年齢といった因子の影響を考慮すると，最終的にbeta-AlanineおよびAlanineが最もAKIのバイオマーカー候補として有力であることが示唆された．また，Trimethylamine N-oxideとCysteine S-sulfateの比をとることで，non-AKIとmild-AKIを判別できる可能性も示唆された．

本研究ではAKIのバイオマーカー候補がいくつか示されたが，1つの病院で採取された尿だけを用いての結果である．他の病院でも，同様な手法を用いてのバリデーション研究をすることが望ましいだろう．最後に，これらのバイオマーカー候補がAKI患者の予後不良改善，また死亡率の低下に役立つことを期待している．

5.　謝辞

本研究を遂行するに当たり，大変多くの方々にご助力を賜りました．この場をお借りして厚く御礼を申し上げます．

先ず，慶應義塾大学先端生命科学研究所の平山明由氏に心から感謝いたします．分析の知識から，実験の基礎等，非常に多くのことをご教授くださいました．夜遅い時間でも対応して頂き，実験や論文の細部に至るまで細かくご指導をしてくださいました．また，サンプルチェックやCE-MS測定に関して様々なアドバイスを頂きました，慶應義塾大学先端生命科学研究所の技術員，鈴木麻子氏，畑山陽子氏にもこの場を借りてお礼申し上げます．統計解析を行うにあたり，ソフトウェアの使用方法を丁寧にご教授くださいました，佐藤尚美氏にも感謝しております．

尿サンプルや患者の臨床情報をご提供くださいました，名古屋大学付属病院　腎臓内科の秋山真一医師，丸山彰一医師，永田高信医師に謝意を申し上げます．それだけでなく，本研究の方向性について多くの議論を交わし，ご助言も賜りました．大変感謝しております．

先端生命科学研究所（Institute for advanced biosciences; IAB）の教員，研究スタッフ，事務員，そして学生などにも大変お世話になりました．最後に，IABの所長である冨田勝氏に深く御礼申し上げます．IABは先端生命科学を研究する最良の機関であり，IABが無ければ私は先端生命科学分野の研究に身を置くことはありませんでしたし，研究成果をここまでまとめることも出来ませんでした．このような

研究の場をお与え頂き，そして多大なご助力や励ましを賜りましたことを尊敬の念と共に深く感謝申し上げます．ありがとうございました．

参考文献

Bellomo, R., Ronco, C., Kellum, J.A., Mehta, R.L., and Palevsky, P. (2004); Acute Dialysis Initiative workgroup : Acute renal failure—definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs : the Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative(ADQI) Group. Crit Care 8, R204-212.

Hirayama A, Kami K, Sugimoto M, Sugawara M, Toki N, Onozuka H, Kinoshita T, Saito N, Ochiai A, Tomita M, Esumi H., and Soga T. (2009); Quantitative metabolome profiling of colon and stomach cancer microenvironment by capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry. Cancer Res 69(11): 4918–4925.

Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Acute Kidney Injury Work Group. KDIGO Clinical Practice Guideline for Acute Kidney Injury. Kidney inter., Suppl. 2012; 2: 1–138.

Mehta, R.L., Kellun, J.A., Shah, S.V., Molitoris, B.A., Ronco, C., Warnock, D.G., and Levin, A. (2007); Acute Kidney Injury Network : report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury. Crit Care 11, R31.

Mehta, R.L., Pascual, M.T., Soroko, S., Savage, B.R., Himmelfarb, J., Ikizler, T.A., Paganini, E.P., and Chertow, G.M. (2004); Spectrum of acute renal failure in the intensive care unit: the PICARD experience. Kidney Int 66: 1613-21.

Nguyen, M.T., and Devarajan, P. (2008); Biomarkers for the early detection of acute kidney injury. Pediatr Nephrol 23, 2151-2157.

Raghavan, M., and John, K. (2011); Acute kidney injury: what's the prognosis? Nat Rev Nephrol , 7(14), 209-217.

Soga, T., Ueno, Y., Naraoka, H., Ohashi, Y., Tomita, M., and Nishioka, T. (2002); Simultaneous determination intermediates for *Bacillus subtilis* metabolic pathways by capillary electrophoresis electrospray ionization mass spectrometry. Anal. Chem., 74:2233-2239.

Soga, T., Ueno, Y., Naraoka, H., Matsuda, K., Tomita, M., and Nishioka, T. (2002); Pressure-assisted capillary electrophoresis electrospray ionization mass spectrometry for analysis of multivalent anions. Anal. Chem., 74:6224-6229.

Sugimoto M, Wong DT, Hirayama A, Soga T., and Tomita M. (2010); Capillary electrophoresis mass spectrometry-based saliva metabolomics identified oral, breast and pancreatic cancer-specific profiles. Metabolomics 6(1): 78–95.