

消化器障害バイオマーカーとしての  
尿素サイクル関連代謝物の有用性に関する研究

2020年1月

齊藤 航

消化器障害バイオマーカーとしての  
尿素サイクル関連代謝物の有用性に関する研究

筑波大学大学院

生命環境科学研究科

生物機能科学専攻

博士（生物工学）学位論文

齊藤 航

## 目次

第一章 序論	3
第二章 急性肝障害モデルにおける血中アルギニンの変動	10
第一節 小序	10
第二節 実験材料及び方法	11
第三節 実験結果	15
第四節 考察	19
第五節 小括	22
第三章 消化管障害モデルにおける血中シトルリンの変動	31
第一節 小序	31
第二節 実験材料及び方法	32
第三節 実験結果	38
第四節 考察	41
第五節 小括	44
第四章 アルギニン及びシトルリンの有用性検証	58
第一節 アルギニン及びシトルリンのバイオマーカーとしての有用性	58
第二節 消化器バイオマーカーの現状と課題	65
第三節 メタボローム解析による代謝性バイオマーカーの展望	73
第四節 小括	76
総括	80
謝辞	84
参考文献	85

## 略語表

本論文では、以下の略語を用いた。

AGAT	アルギニン・グリシンアミジノ基転移酵素
ALT	アラニンアミノトランスフェラーゼ
ANIT	$\alpha$ -ナフチルイソチオシアネート
ARG2	アルギナーゼ 2
ASL	アルギニノコハク酸分解酵素
ASS	アルギニノコハク酸合成酵素
ConA	コンカナバリン A
EDTA	エチレンジアミン四酢酸
EMA	欧州医薬品庁
FDA	米国食品医薬品局
GC/MS	ガスクロマトグラフィー/質量分析法
GLDH	グルタミン酸脱水素酵素
GLS	グルタミナーゼ
HMGB1	高移動度グループボックス 1
I-FABP	腸型脂肪酸結合タンパク
iPS	人工多能性幹細胞
LC/MS	液体クロマトグラフィー/質量分析法
LC/MS/MS	液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法
MC	メチルセルロース
MCT	モノクロタリン
miRNA	マイクロ RNA
OAT	オルニチンアミノトランスフェラーゼ
OCT	オルニチンカルバミルトランスフェラーゼ
P5CS	ピロリン-5-カルボン酸合成酵素
PMDA	独立行政法人医薬品医療機器総合機構
PRODH	プロリンデヒドロゲナーゼ
RT-qPCR	定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応
TCA	トリカルボン酸
TMPD	テトラメチル-p-フェニレンジアミン
UPLC/MS	超高速液体クロマトグラフィー/質量分析計
UPLC/MS/MS	超高速液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析計

## 第一章 序論

未充足の医療ニーズを満たす医薬品を継続的に創出するためには、科学の進歩と研究開発のプロセス改善が欠かせない。医薬品の研究開発では、探索研究から製造販売承認取得までに平均 10 年以上の歳月を要し、その成功確率は 4.9%と報告されている(1)。近年、疾患と関連する標的分子の枯渇に加え、規制当局による承認や保険者による償還の厳格化を背景に、医薬品の成功確率は低下し、研究開発費は上昇している。そのため、製薬会社には成功確率の向上と研究開発費の抑制が求められている(2)。

研究開発を効率化する取組みとして、製薬会社はトランスレーショナルリサーチ、すなわち非臨床と臨床の橋渡し研究に注力している。従来の医薬品開発では、動物を用いた非臨床試験で有効性や安全性を検証してきたが、必ずしも動物とヒトで一貫した臨床試験成績が得られなかった。そこでヒトの有効性や安全性の予測性を向上させるため、人工多能性幹細胞 (iPS) 細胞、血液や組織等の臨床サンプル、日常の診療記録から構成されるリアルワールドデータ、ゲノム情報等のヒト由来の試料や情報を用いた研究が進められている (Fig. 1)。バイオマーカー研究は、このようなトランスレーショナルリサーチの 1 つである。動物とヒト共通の指標を用いて、医薬品の有効性や安全性を早期に評価し、医薬品の研究開発を効率化することが期待されている(3)。

バイオマーカーとは、『通常の生物学的過程、病理学的過程、又は治療的介入に対する薬理的応答の指標として、客観的に測定され評価される特性』と定義されている(4)。その測

定には遺伝子 (DNA、RNA)、タンパク、ペプチド、内因性代謝物、イメージング等が用いられ、臨床での疾患の診断、患者層別化、薬理作用や安全性評価などの様々な目的で利用されている (Table 1)。その一例として、腎毒性の安全性バイオマーカー研究が挙げられる。これまで腎毒性評価では、血中クレアチニンや尿素窒素が用いられてきたが、感度が低く、早期の腎毒性を検出できないことが知られていた。近年、Kim-1、クラスタリン、アルブミンなどの複数の尿中タンパクが、感度及び特異度の高い新規の安全性バイオマーカーであると報告されている(5, 6)。現在、国内外の製薬会社は安全性バイオマーカーのコンソーシアムを形成し、米国食品医薬品局 (FDA)、欧州医薬品庁 (EMA)、独立行政法人医薬品医療機器総合機構 (PMDA) などの規制当局やアカデミアと連携しながら、腎臓、肝臓、骨格筋などの臓器毒性に対する新規バイオマーカーの利活用に向けた検討を進めている(7)。

医薬品の非臨床安全性試験においても、バイオマーカーの活用が期待されている(3)。病理組織検査は臓器毒性の確定診断として有用であるが、同一動物の経時的な評価はできない。また、標本作成から鏡検まで時間を要するため、効率が求められるスクリーニングには不向きである。一方、バイオマーカーによる安全性評価では、血液や尿などの低侵襲性サンプルを経時的に採取して、迅速な測定を行い、毒性を早期に検出できる。医薬品開発において、臨床試験開始直前の非臨床試験や臨床の第一相試験の成功率は低く、その開発中止理由の約 4~5 割は安全性に起因すると報告されている(8, 9)。そのため、感度及び特異性の高いバイオマーカーを用いて、安全性の高い医薬品候補を早期に取得できれば、医薬品開発の成

功確率向上及び費用削減に貢献できると考えられる。

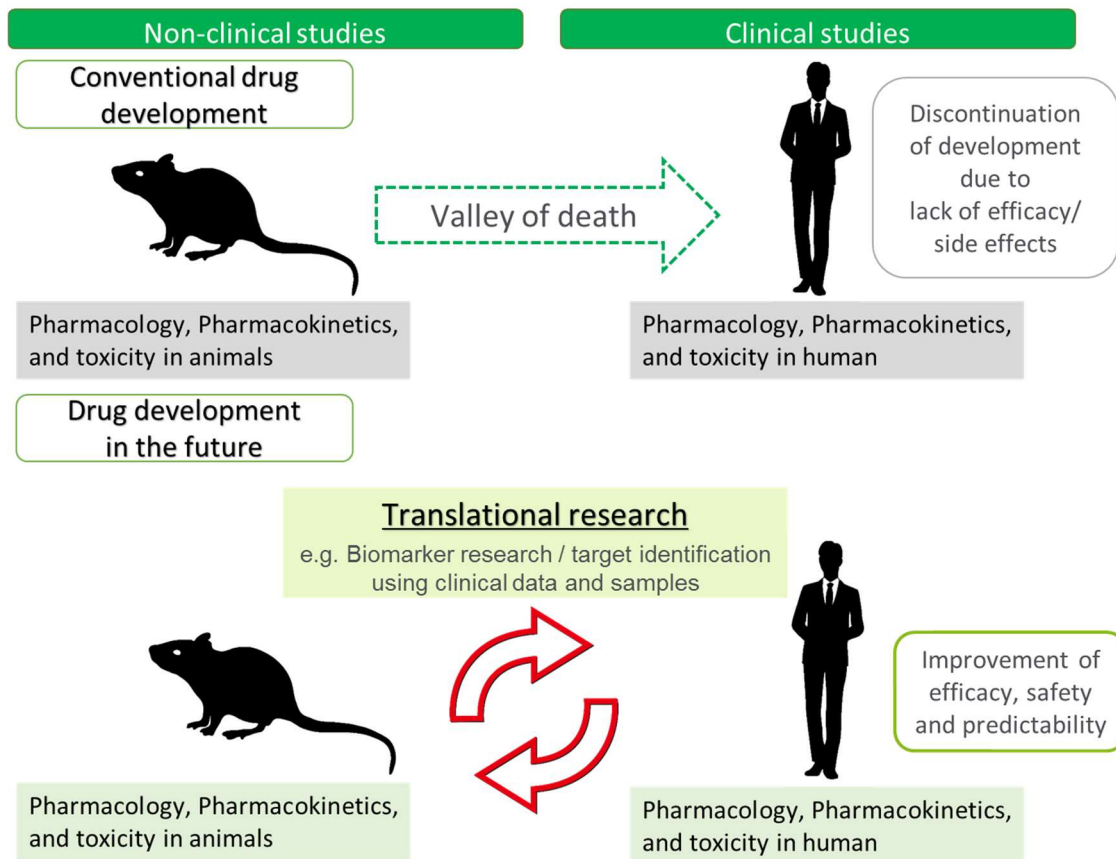
肝臓及び消化管を含む消化器は、食物を体内に取り入れて貯蔵、消化、吸収及び不消化物の排泄を行うだけでなく、医薬品の代謝、毒性、生体防御の点で関連する。経口摂取された医薬品の多くは肝臓で代謝されるが、消化管でも肝臓の 1/10 程度の薬物代謝酵素を発現し、薬物の血中濃度に影響を与える。また、腸内細菌も薬物の活性化や不活性化に関与する。例えば、肝臓で抱合され胆管から排泄された薬剤が、腸内細菌叢により脱抱合され、消化管毒性を誘発することが知られている(10)。さらに、腸内細菌、エンドトキシン、又は細菌成分が腸管上皮を通過して体内に侵入し、肝硬変等の肝疾患を増悪させることが報告され(11)、肝臓と消化管は腸管軸として生体防御で重要な役割を果たしていると考えられている。

消化器毒性は医薬品の開発でよく見られる副作用であるが、これらの毒性に対して万能な安全性バイオマーカーは存在しない。肝毒性は、臨床試験中の副作用により開発中止に至る主な原因の 1 つである(9)。従来の低分子医薬品に加え、近年、研究開発が活発化している遺伝子発現を制御する核酸医薬品も、非特異的な肝障害を生じさせることが知られている(12, 13)。アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) は、主に肝臓の細胞質中に存在する代謝酵素であり、肝毒性バイオマーカーとして非臨床や臨床で広く用いられている。しかし、ALT は骨格筋障害でも軽度上昇し、その特異性に課題がある(14)。消化管毒性は、抗がん剤や非ステロイド性消炎鎮痛薬でみられ、用量制限が必要となる毒性である。また、経口投与後の薬物の吸収にも影響を与え、疾患の管理に影響を与えることがある。消化管毒性は主

に病理組織学的検査で評価されており、現時点で感度及び特異性の優れたバイオマーカーは確立されていない。このような背景から、肝臓や消化管の病理組織変化を感度よく反映し、既存のバイオマーカーより特異性の高い新規のバイオマーカーが求められている。

血中に存在するアミノ酸のうち、尿素サイクル関連代謝物であるアルギニン及びシトルリンが、消化器障害を反映する代謝性バイオマーカーとなる可能性が報告されている (Fig. 2) (15, 16)。一方で、代謝性バイオマーカーを非臨床安全性試験で利用するために、病理組織変化や既存のバイオマーカーと比較し、その感度及び特異性を詳細に検討した研究はない。そこで本研究では、消化器障害時の血中の尿素サイクル関連代謝物の変動とその変動機序を検証した。第二章では、肝障害と血中アルギニンの関連を調べるため、肝障害物質又は骨格筋障害物質をラットに単回経口投与し、血中アルギニン及び ALT の測定と病理組織検査を実施した。また、肝障害時のアルギニンの変動機序を調べるため、血中アルギナーゼ濃度の測定と *in vitro* での血中アルギナーゼ活性を調べた。第三章では、軽度の消化管障害時の血中シトルリンの変動を調べるため、消化管障害物質をラットに反復静脈内投与し、血中シトルリンの測定及び病理組織検査を実施した。さらに、消化管障害時の血中シトルリン低下の機序を確認するため、消化管中のシトルリン合成に関与する酵素の遺伝子発現と内因性代謝物の測定を行った。第四章では、これらより得られた知見と最近の文献情報を基に、アルギニンやシトルリンの安全性評価での有用性を総合的に考察した。

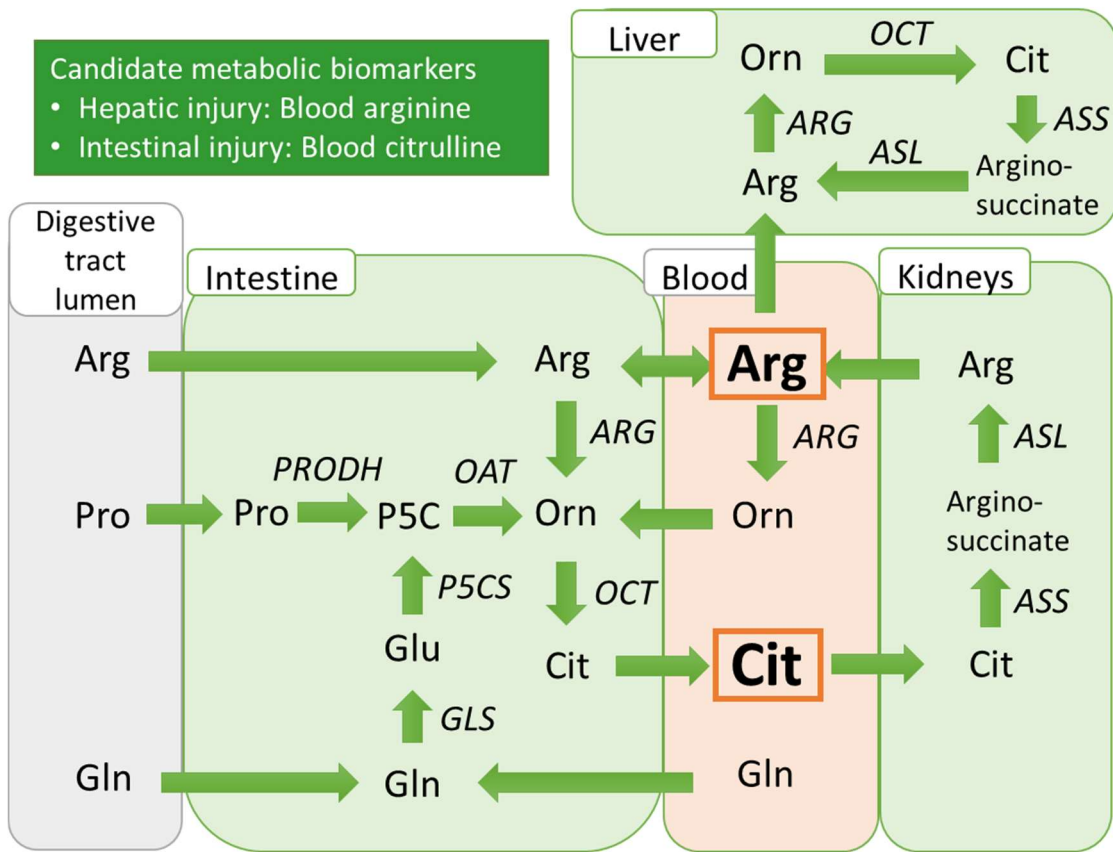




**Fig. 1 Role of translational research in drug development**

**Table 1. Classification and example of biomarkers**

Category	Explanation	Examples of Biomarkers
Diagnostic marker	Diagnose disease	Blood sugar, HbA1c
Prognostic marker	Predict the course of illness without specific treatment	C-reactive protein
Pharmacodynamic marker	Confirm the mechanism of action of the drug	Blood pressure
Predictive marker	Predict response to specific treatments	BRCA1/2 mutations
Surrogate marker	Substitute true clinical trial endpoints	Progression free survival
Monitoring marker	Determine extent of disease and response to treatment	Prostate-specific antigen (PSA)
Patient stratification marker	Select patients expressing specific drug-related molecules	Her2 expression
Safety/toxicity marker	Evaluate drug safety and toxicity	ALT, Kim-1, Albumin



**Fig. 2** Metabolic pathways of urea cycle-related metabolites in the liver, intestinal tract, and kidneys

Gln: glutamine, Glu: glutamic acid, Pro: proline, Arg: arginine, Orn: ornithine, Cit: citrulline, GLS: glutaminase, P5CS: pyrroline-5-carboxylate synthase, OAT: ornithine aminotransferase, OCT: ornithine carbamoyltransferase, PRODH: proline dehydrogenase, ARG: arginase, ASS: argininosuccinate synthase, ASL: argininosuccinate lyase

## 第二章 急性肝障害モデルにおける血中アルギニンの変動

### 第一節 小序

血中 ALT は、臨床及び非臨床で感度及び特異度の高い肝障害のバイオマーカーとして利用されている。しかし、ALT 上昇は骨格筋障害とも関連し、肝臓の病理組織変化を伴わず変動することが示唆されている(14)。肝臓由来以外の ALT 上昇による擬陽性のリスクを低減するため、ALT より特異度の高い肝障害のバイオマーカーが求められている(17)。

血中アルギニンはチオアセトアミドや四塩化炭素による肝障害で低下し、肝障害との関連が示唆されている(16, 18)。アルギニンは ALT と共に肝臓に存在するアルギナーゼによりオルニチンと尿素に代謝される(19)。血中アルギニンは、複数の肝障害モデルで血中オルニチン及びアルギナーゼの上昇と関連し、血中アルギナーゼがアルギニン代謝で重要な役割を果たすことが示唆されている(18, 20-22)。一方で、アルギニンは動物で多彩な役割を持つアミノ酸であり、オルニチンや尿素だけでなく、一酸化窒素やシトルリン、クレアチンの前駆体でもある。さらに血中のアルギニンは、摂餌、腎臓を介したアルギニン供給、タンパクやアミノ酸の異化により影響を受ける(23)。そのため、肝障害時の血中アルギニンの低下には、複数因子の寄与を考慮する必要がある。

肝障害モデルの内因性代謝物プロファイルを理解するため、メタボローム解析が毒性研究に用いられている(24, 25)。この技術の利点は、血中や尿中の複数の内因性代謝物を一度に評価できることである。代謝物プロファイルを明らかにすることで肝障害に関連する生

体ネットワークを明らかにできる。最近のメタボローム解析では、幅広い分子種を分離、イオン化、検出できる液体クロマトグラフィー/質量分析法 (LC/MS) が標準的な技術となっている(26-28)。

本章では、代表的な肝障害物質であるモノクロタリン (MCT)、コンカナバリン A (ConA)、 $\alpha$ -ナフチルイソチオシアネート (ANIT)、又は骨格筋障害物質テトラメチル-p-フェニレンジアミン (TMPD) を投与したラットにおける血中アルギニンと ALT の関係を調べた。次にアルギニン代謝におけるアルギナーゼの関与を調べるため、血中アルギナーゼ濃度及び *in vitro* でのアルギナーゼ活性を調べた。さらに肝障害に関与する内因性代謝物プロファイルを調べるため、肝障害又は骨格筋障害時の血中メタボローム解析を LC/MS 及びガスクロマトグラフィー/質量分析法 (GC/MS) を用いて行った。

## 第二節 実験材料及び方法

### 1. 試薬及び調製方法

MCT、ConA、及び TMPD は Sigma から、ANIT は和光純薬工業から購入した。MCT 及び TMPD は 0.5%メチルセルロース (MC、#400、ナカライテスク) 溶液に懸濁した。ConA は生理食塩液 (大塚製薬工場) に、ANIT はコーン油 (和光純薬工業) にそれぞれ懸濁した。アルギニンと *N*-hydroxy-nor-L-arginine はそれぞれ Sigma 及び Merck KGaA から購入した。

## 2. 実験動物及び飼育方法

8 週齢の雄性 Fischer 344 ラットを日本チャールス・リバー株式会社から購入した。ラットは個別にステンレス製のブラケットケージで飼育した。飼育環境は、室温 20-26°C、湿度 30-70%、12 時間の明暗サイクルとした。げっ歯類用の固形飼料（CRF-1、オリエンタル酵母工業株式会社）と水道水を自由に摂取させた。実験開始前に 1 週間の馴化期間を設けた。実験計画は第一三共株式会社の動物実験倫理審査委員会により承認され、動物実験は第一三共の動物実験委員会のガイドラインに従い実施した。

## 3. 実験条件

MCT は、0 (0.5% MC)、30、100、又は 300 mg/kg の用量でラットに単回強制経口投与し、投与後 3、8、又は 24 時間後に各群 5 例ずつ剖検した。ConA は、0 (生理食塩液)、3、20、又は 30 mg/kg の用量でラットに単回尾静脈投与し、投与後 3、8、又は 24 時間後に各群 5 例ずつ剖検した。ANIT は、0 (コーンオイル)、25、50、又は 100 mg/kg の用量でラットに単回強制経口投与し、投与後 24、48、又は 72 時間後に各群 5 例ずつ剖検した。TMPD は、0 (0.5% MC)、3、又は 9 mg/kg の用量でラットに単回強制経口投与し、投与後 24 時間後に各群 5 例ずつ剖検した。各被検物質の投与用量及びサンプリングの時点は、これまでに報告されている肝臓及び骨格筋障害の病理変化に基づき設定した(29-32)。血液サンプルはイソフルラン麻酔下で腹大動脈から採取した。血液の一部は 30 分間室温で放置後、遠心分離

(3000 rpm, 4°C, 10 min) を行い、血液化学的検査及びアルギナーゼ濃度測定に用いた。残りの血液はエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) 入りチューブ及びヘパリンリチウム入りチューブに分注し、それぞれメタボローム測定用の EDTA 血漿及び *in vitro* でのアルギナーゼ活性測定用のヘパリン血漿を採取した。血清及び血漿サンプルは使用まで-80°C で保管した。採血後、動物を放血安楽死させ、各動物の肝臓 (全群) 及び骨格筋 (ヒラメ筋及び前頸骨筋、TMPD 投与群のみ) を病理組織検査用に採取した。

#### 4. 血液化学的検査及び病理組織検査

血中 ALT 活性は自動分析装置 (TBA-200RF、東芝メディカルシステムズ株式会社) で測定した。肝臓と骨格筋サンプルはホルマリン固定後にパラフィン包埋した。薄切後、ヘマトキシリン・エオジン染色を施し、この染色標本の病理組織検査を行った。

#### 5. 血中アルギニンレベルの測定

血中アルギニンレベルは超高速液体クロマトグラフィー/質量分析計 (UPLC/MS, Waters) を用いて測定した。分析条件の詳細は文献を参考にした(27)。マススペクトロメトリーのデータは MZmine 2 ソフトウェアで処理した(33)。イオンの特徴を標準物質のリファレンスライブラリーの保持時間と分子量 (m/z) の値と比較し、内因性代謝物を同定した。血液サンプル中の各代謝物の質量は Human Metabolome Database (<http://www.hmdb.ca/>)を参照した。

## 6. 血中アルギナーゼ濃度の測定と *in vitro* でのアルギナーゼ活性測定

血中アルギニン低下の変動機序を調べるため、アルギニンの代謝酵素であるアルギナーゼの血中濃度と *In vitro* でのアルギナーゼ活性を測定した。血中アルギナーゼ濃度の測定には、血中アルギニン低下と ALT 上昇が顕著であった MCT 又は ConA の投与 8 時間後の血清サンプルと ANIT 投与 24 時間後の血清サンプルを用いた。血中のアルギナーゼ濃度は、酵素免疫測定法 (ELISA、ヤマサ醤油株式会社) で既報と同様に測定した(34)。*In vitro* でのアルギナーゼ活性測定には、肝障害モデルでアルギナーゼ濃度が最高値を示した ConA の 30 mg/kg 投与群の投与 8 時間後のサンプルを用いた。85  $\mu$ L の 60  $\mu$ M アルギニン溶液に 10  $\mu$ L の 1 mM *N*-hydroxy-nor-L-arginine 又は 10  $\mu$ L の蒸留水を加え、さらに 5  $\mu$ L の血漿サンプルを混ぜて室温で 10 分間静置した。300  $\mu$ L のメタノールを添加して除タンパクした後、遠心分離 (15000 g、10 分間) した。その上清中アルギニン及びオルニチンレベルを前述の LC/MS 法で測定した。

## 7. メタボローム解析

メタボローム解析は Metabolon Inc. で実施し、塩基性分子又は酸性分子に最適化した UPLC/タンデム質量分析 (UPLC/MS/MS)、又はガスクロマトグラフィー/質量分析 (GC/MS) を使用した。解析には明らかな肝障害又は骨格筋障害がみられた各化合物とその対照群



(MCT : 0、100 mg/kg、ConA : 0、20 mg/kg、ANIT : 0、50 mg/kg、TMPD : 0、9 mg/kg) の投与 24 時間後の血漿サンプルを用いた。Metabolon Inc.による分析条件の詳細は既報に記載されている(27)。

## 8. データ解析

定量的データは平均と標準偏差で示した。メタボローム解析の各代謝物のデータは、対照群と被検物質投与群の値の比で示した。全データは Student's t-test (等分散データ)、Aspin Welch's t-test (不等分散データ)、又は Dunnett's multiple comparison test で統計学的に解析した。血中アルギニンと ALT の相関、又は血中アルギニンとアルギナーゼの相関はスピアマンの順位相関分析により評価した。これらの統計解析は SAS System Release 8.2 (SAS Institute Inc.) で行った。P < 0.05 の場合に統計学的に有意とした。

## 第三節 実験結果

### 1. 肝障害モデル又は骨格筋障害モデルでの血中 ALT 活性と病理組織変化

各肝障害モデルの血中 ALT は、MCT の 100 mg/kg 以上の投与群、ConA の 3 mg/kg 以上の投与群、ANIT の 50 mg/kg 以上の投与群で上昇した (Fig. 3)。ALT の最大値は、MCT の 300 mg/kg 群の投与 24 時間後、ConA の 30 mg/kg 群の投与 8 時間後、ANIT の 100 mg/kg 群の投与 48 時間後に観察された。病理組織検査では、各被検物質で異なった肝障害がみられ

た。すなわち、MCT の 100 mg/kg 以上の群では、肝細胞壊死及び小葉中心性の出血がみられた。ConA の 3 mg/kg 以上の群ではリンパ管の拡張が、20 mg/kg 以上の群では肝細胞壊死がみられた。ANIT の 50 mg/kg 以上の群では、肝細胞及び胆管上皮の壊死がみられた。肝細胞壊死は、MCT の 100 mg/kg 以上の群、ConA の 20 mg/kg 以上の群、ANIT の 50 mg/kg 以上の群で共通しており、これらの変化はいずれも ALT の上昇を伴っていた。

骨格筋障害モデルでは、TMPD の 9 mg/kg 群で投与 24 時間後に対照群の ALT (32 U/L) と比較して ALT の有意な高値 (77 U/L) が観察された。TMPD 投与群の病理組織検査では骨格筋の筋線維の変性がみられたが、肝障害は観察されなかった (Table 2)。

## 2. 肝障害モデル又は骨格筋障害モデルでの血中アルギニンの変化

血中アルギニンレベルは、MCT の 100 mg/kg 以上の群、ConA の 3 mg/kg 以上の群、ANIT の 50 mg/kg 以上の群で上昇した (Fig. 4)。アルギニンレベルの最小値は、MCT の 300 mg/kg 群で投与 8 時間後、ConA の 20 mg/kg 群で投与 3 時間後、ANIT の 100 mg/kg 群で投与 24 時間後にそれぞれ観察された。3 つの肝障害モデルすべてで、血中アルギニンと血中 ALT の有意な相関がみられ、相関係数は MCT:  $r = -0.746$  ( $P < 0.05$ ,  $n = 60$ )、ConA:  $r = -0.795$  ( $P < 0.05$ ,  $n = 60$ )、ANIT:  $r = -0.787$  ( $P < 0.05$ ,  $n = 60$ ) であった (Fig. 5)。骨格筋障害モデルでは血中アルギニンの変動はなく、血中アルギニンと血中 ALT の相関係数は  $r = 0.116$  ( $P > 0.05$ ,  $n = 15$ ) であり、肝障害モデルのような有意な相関は観察されなかった。

### 3. 血中のアルギニン代謝へのアルギナーゼの関与

血中アルギナーゼ濃度は、MCT の 300 mg/kg 群、ConA の 20 mg/kg 以上の群、ANIT の 50 mg/kg 以上の群で上昇した (Fig. 6A)。3 つの肝障害モデルすべてで、血中アルギナーゼと血中アルギニンの有意な相関がみられ、その相関係数は MCT:  $r = -0.605$  ( $P < 0.05$ ,  $n = 15$ )、ConA:  $r = -0.808$  ( $P < 0.05$ ,  $n = 15$ )、ANIT:  $r = -0.672$  ( $P < 0.05$ ,  $n = 15$ ) であった (Fig. 6B)。  
*In vitro* でのアルギナーゼの活性測定では、ConA の 30 mg/kg 群の血漿は溶液中のアルギニンを 69%減少させ、オルニチンを 39 倍に増加させた (Fig. 6C、6D)。アルギナーゼ阻害剤 *N*-hydroxy-nor-L-arginine 存在下では、アルギニンレベルは対照群と比較して有意差はなく、オルニチンレベルの増加も抑制された (Fig. 6C、6D)。

### 4. 肝障害モデル又は骨格筋障害モデルでの血中メタボローム解析

各モデルの血液サンプルから同定された約 450 の内因性代謝物のうち、肝障害モデルでは、アルギニン、脂質関連代謝物、及びビリルビンが変動した (Table 3)。アルギニン代謝に関連で同定された 13 の代謝物のうち、オルニチンの上昇が MCT 及び ANIT 投与群でアルギニンの低下と共に観察された。一方で、ConA 投与群ではアルギニンは低下したが、オルニチンの上昇は観察されなかった。

脂質関連の代謝物では、3-ヒドロキシ酪酸とアシルカルニチンの高値が MCT 及び ConA

投与群でみられ、胆汁酸の高値が MCT 及び ANIT 投与群でみられた。さらに、中鎖脂肪酸の高値が ANIT 投与群で、長鎖脂肪酸の高値が MCT 投与群で観察された。

尿素、シトルリン、及び糖原性アミノ酸（アラニン、アスパラギン酸、ヒスチジン、プロリン等）について、3 つの肝障害モデルで共通した傾向は観察されなかった。クレアチン、グルタミン、フェニルアラニン、3-メチルヒスチジン、3-ヒドロキシ酪酸、アシルカルニチンは、肝障害モデルと同様に、骨格筋障害モデルでも上昇した。

#### 第四節 考察

血中のアルギニンとアルギナーゼは、チオアセトアミドや四塩化炭素など複数の化合物による肝障害に関与していることが報告されているが(16, 18, 34, 35)、アルギニン代謝を含む内因性代謝物の変動について網羅的には検討されていない。そこで本章では、異なるタイプの肝障害誘発物質、又は骨格筋障害誘発化合物を使用し、アルギニン代謝と肝障害の関係を調べた。肝障害モデルでは、肝細胞壊死に伴って血中アルギニンの低下と血中 ALT の上昇がみられ、アルギニンと ALT の有意な相関が確認された。一方、骨格筋障害モデルでは、肝細胞壊死や血中アルギニンの変動はみられなかったが、骨格筋に由来すると思われる軽度の ALT 上昇が観察された(14)。これらの結果から、血中アルギニンは ALT に比べ肝障害への特異性が高いことが示された。

肝障害モデルでの血中アルギニンレベルは、血中アルギナーゼ濃度と負の相関を示し、この結果は Houdijk らの報告(20)と一致していた。さらに、ConA 群から採取した血漿サンプルには、アルギニンをオルニチンに代謝する酵素活性があり、この反応はアルギナーゼ阻害剤である *N*-hydroxy-nor-L-arginine 存在下で完全に阻害された。そのため、血中で増加したアルギナーゼが肝障害後のアルギニン減少に主要な役割をしていると考えられた。

LC/MS 又は GC/MS を用いたメタボローム解析では、3 つの肝障害モデル及び 1 つの骨格筋障害モデルの血漿中に存在する約 450 の代謝物を同定した。これらのうち、いくつかの内因性代謝物が肝障害モデルで共通して変動した。これらの代謝物には、肝胆導系の指標とし

て知られる胆汁酸やビリルビンの上昇(36)、 $\beta$ 酸化の誘導と関連のある脂肪酸、アシルカルニチン、3-ヒドロキシ酪酸の軽度の上昇(37)、筋線維のタンパク分解と関連する3-メチルヒスチジンの軽度上昇が含まれていた(38)。アシルカルニチン、3-ヒドロキシ酪酸、3-メチルヒスチジンの上昇傾向は骨格筋障害モデルでもみられ、 $\beta$ 酸化や筋線維のタンパク分解は肝障害と骨格筋障害に共通することが示唆された。また、アルギニン以外のアミノ酸の減少は、肝障害モデルでは観察されなかった。ラットへの制限給餌はアラニン、ヒスチジン、プロリンを含む糖原性アミノ酸を減少させることが知られているが(39-41)、肝障害モデルでの血中アルギニン減少は、他のアミノ酸の減少は伴わないことから、摂餌量の減少やタンパクの異化亢進とは関係しないと推察された。

アルギニン代謝に関与する同定された13の代謝物のうち、アルギニン低下を伴ったオルニチンの上昇がMCT及びANITによる肝障害モデルでみられ、前述のように肝障害に続く血中アルギナーゼが血中アルギニンを制御していることが示唆された。一方で、ConAによる肝障害モデルでは、血中アルギニンレベルは減少したが、オルニチンレベルの上昇は観察されなかった。3つの肝障害モデルでの不一致の理由は明らかでないが、メタボローム解析に用いたサンプルの時点で部分的には説明できるかもしれない。本研究での血中アルギニンは、ConA投与3時間後に最低値を示し、メタボローム用サンプルを採材した投与24時間後には回復傾向を示した。血中アルギナーゼ濃度はConA投与4時間後に最大値を示し、オルニチンを代謝するオルニチンカルバミルトランスフェラーゼ(OCT)の血中濃度は、投

与 24 時間後に最大値を示すことが報告されている(35)。そのため、ConA 投与 24 時間後では、血中アルギナーゼによるオルニチン生成に比べ、血中 OCT によるオルニチン分解が上回った可能性が考えられた。つまり、血中アルギニンレベル低下とオルニチンレベル上昇は、肝障害の初期を反映すると推察された。実際、MCT 及び ConA 誘発肝障害モデルでは、ALT が最大になる前に血中アルギニンレベルは最小値を示した。これらは ALT に比べ、アルギナーゼの漏出が早いことや半減期が短いことに起因していると考えられた(35)。

興味深いことに、血中クレアチンレベルは 3 つの肝障害モデルで上昇した。クレアチンの合成は、アルギニンとグリシンをオルニチンとグアニジノ酢酸に変換するアルギニン・グリシンアミジノ基転移酵素 (AGAT) により始まる(23)。AGAT は肝臓に存在することが報告されており(42, 43)、クレアチンの上昇も肝障害時のアルギニンとオルニチンの変動に寄与しているかもしれない。一方で、クレアチンの上昇はアルギニンやオルニチンの変動を伴わない骨格筋障害モデルでもみられ、この上昇はアルギニン代謝とは関係なく、主に骨格筋からの漏出と考えられた。

血中シトルリンレベルは、肝障害モデルで一貫した変動傾向を示さなかった。すなわち、血中シトルリンは ConA モデルで有意に減少したが、MCT や ANIT モデルでは変動しなかった。これまでに ConA は肝障害に加えて小腸の形態変化を惹起し(44)、血中シトルリンは消化管障害時に減少することが報告されている(45)。よって、本研究の ConA モデルでの血中シトルリンの減少は、消化管障害に起因した変化と推察された。四塩化炭素による肝障害

モデルでは、血中シトルリンの上昇が報告されているが(18)、四塩化炭素は肝障害に加えて腎障害も惹起すること(46)、また、血中シトルリンは腎障害時に上昇することが知られている(45)。そのため、四塩化炭素による血中シトルリンの上昇は、腎障害に起因した変化と推察された。したがって、血中シトルリンの変動は、肝障害と関連しないと考えられた。

結論として、これらの結果は、アルギニン代謝のうちアルギニンからオルニチンへの経路が急性肝障害と関連して変動すること、及び血中アルギニンとオルニチンが肝臓の代謝性バイオマーカーとなることを支持すると考えられた。

## 第五節 小括

アルギニン代謝と肝障害との関係を明らかにするため、3種類の代表的な肝障害誘発化合物である MCT、ConA、ANIT、又は骨格筋障害誘発化合物である TMPD をラットに投与し、その血液を用いたメタボローム解析を行った。

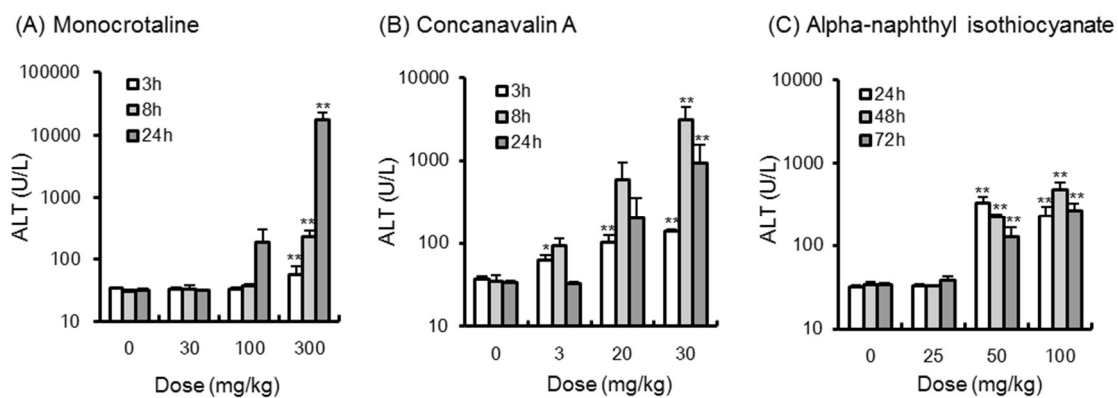
MCT、ConA、又は ANIT の単回投与は用量依存的に肝細胞壊死を誘発し、血中 ALT 及びアルギナーゼの増加を伴った血中アルギニンの減少が観察された。いずれの肝障害モデルでも血中アルギニンと ALT (MCT、ConA、ANIT でそれぞれ  $r = -0.746$ 、 $-0.795$ 、 $-0.787$ )、又は血中アルギニンとアルギナーゼ (MCT、ConA、ANIT でそれぞれ  $r = -0.605$ 、 $-0.808$ 、 $-0.672$ ) の間に有意な負の相関がみられた。一方、骨格筋障害モデルでは ALT はわずかに増加したが、肝細胞壊死及びアルギニン低下は認められなかった。



*In vitro* でのアルギナーゼ活性の測定では、アルギニン溶液への ConA 投与群の血漿サンプル添加により、オルニチンへの代謝が見られ、この反応はアルギナーゼ阻害剤によって完全に阻害された。これらの結果は、肝障害に関連するアルギニン代謝において血中アルギナーゼが重要な役割を果たすことを示唆した。

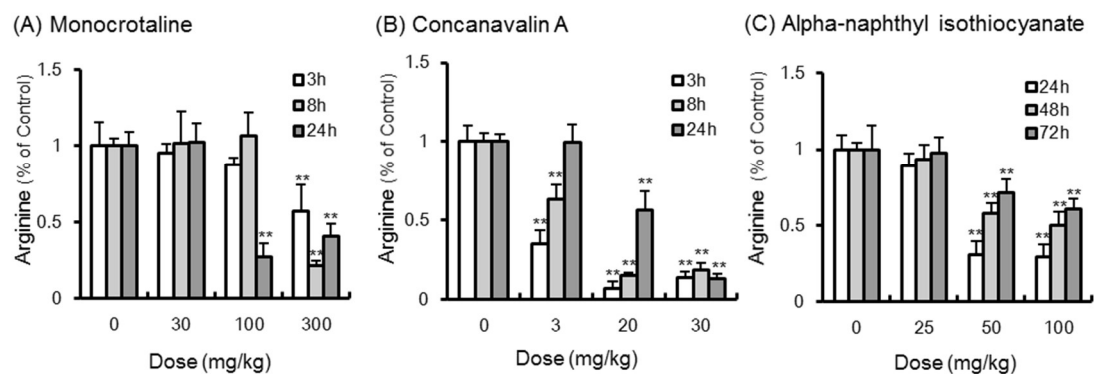
メタボローム解析では、各モデルから得られた血液中に存在する約 450 の内因性代謝産物が同定された。アルギニン代謝に関与する 13 の血中代謝物のうち、アルギニン減少とオルニチン増加は肝障害モデルで共通して生じたが、シトルリン及び他の代謝物の変化はみられなかった。

以上の結果から、アルギニン代謝、特にアルギニンからオルニチンへの経路が肝障害に関連して変動すること、及び血中アルギニン及びオルニチンが肝障害の代謝性バイオマーカーとなることが示された。

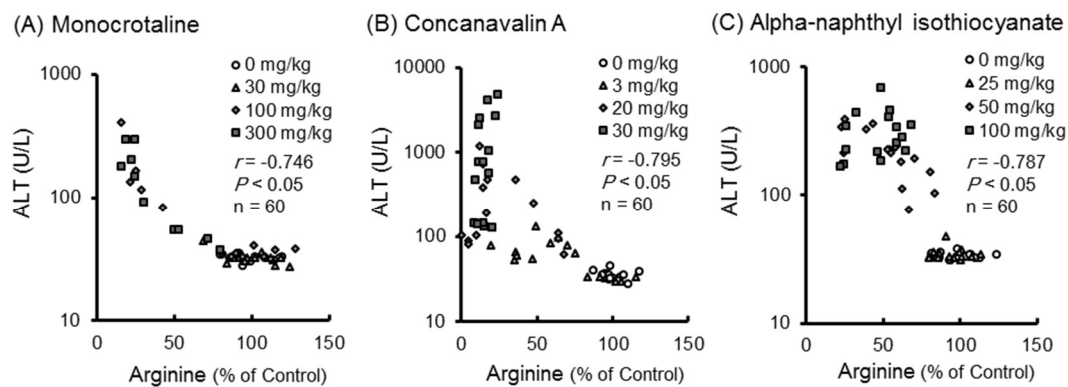


**Fig. 3** Serum ALT activity in hepatic injury models induced by monocrotaline, concanavalin A, or  $\alpha$ -naphthyl isothiocyanate. Data represent the mean  $\pm$  SD (n=5). \* $P$  < 0.05, \*\* $P$  < 0.01: Significantly different from the control group by Dunnett's test.

*Note.* Reprinted from "Metabolomic analysis of arginine metabolism in acute hepatic injury in rats." by Saitoh W. *et al.* 2014, *J. Toxicol. Sci.* 39, 41–50, Fig.1

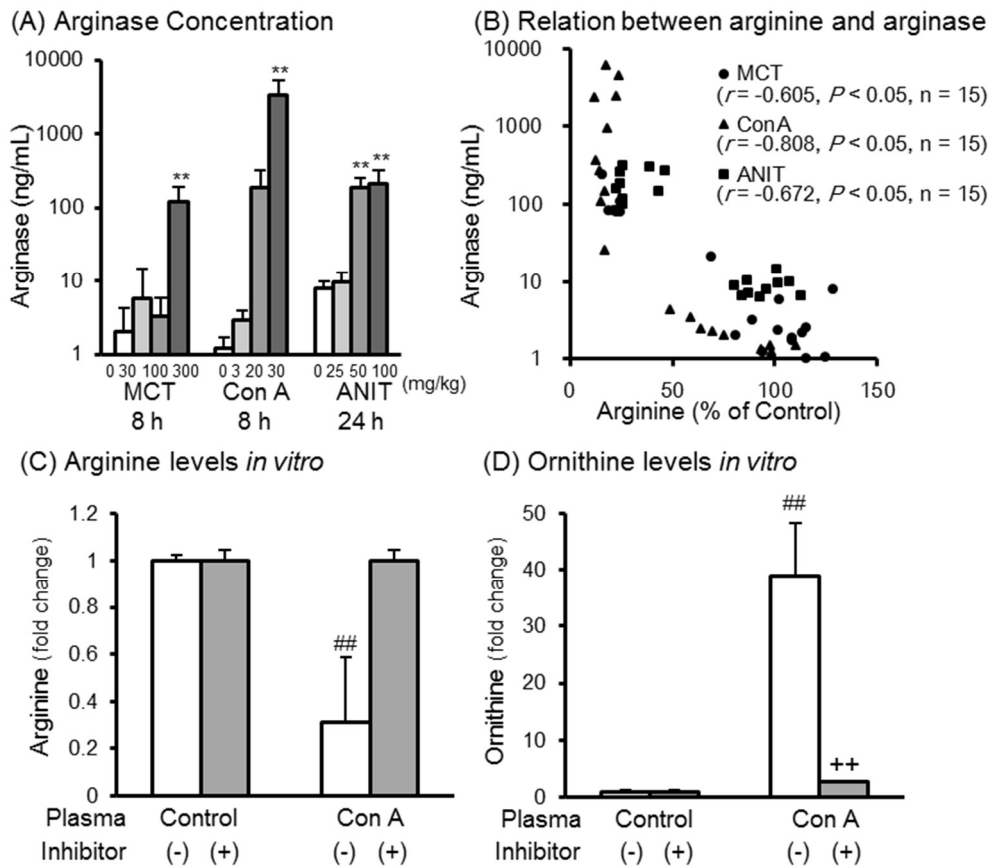


**Fig. 4** Plasma arginine levels in hepatic injury models induced by monocrotaline, concanavalin A, or  $\alpha$ -naphthyl isothiocyanate. Arginine levels are expressed as a ratio of the value relative to the mean value of the vehicle control group. Data represent the mean  $\pm$  SD of 5 samples. \*\* $P < 0.01$ : Significantly different from the control group by Dunnnett's test. *Note.* Reprinted from "Metabolomic analysis of arginine metabolism in acute hepatic injury in rats." by Saitoh W. *et al.* 2014, *J. Toxicol. Sci.* 39, 41–50, Fig.2



**Fig. 5** Relationship between plasma arginine levels and serum ALT activities in the hepatic injury models induced by monocrotaline, concanavalin A, or  $\alpha$ -naphthyl isothiocyanate. Correlations between serum ALT activities and plasma arginine levels were evaluated by Spearman's correlation coefficient statistical analysis.

*Note.* Reprinted from "Metabolomic analysis of arginine metabolism in acute hepatic injury in rats." by Saitoh W. *et al.* 2014, *J. Toxicol. Sci.* 39, 41–50, Fig.3



**Fig. 6** Involvement of blood arginase in blood arginine metabolism. (A) Serum arginase concentrations in the hepatic injury models induced by monocrotaline (MCT), concanavalin A (ConA), or  $\alpha$ -naphthyl isothiocyanate (ANIT). Data represent the mean  $\pm$  SD of 5 animals. \*\*  $P < 0.01$ : Significantly different from the control group by Dunnett's test. (B) Relationship between serum arginase concentrations and plasma arginine levels in the hepatic injury models induced by MCT, ConA, or ANIT. (C, D) Arginase activity *in vitro*. Plasma samples were incubated with external arginine in the absence (-) or presence (+) of *N*-hydroxy-nor-L-arginine. Open bar; arginase inhibitor (-), Shaded bar; arginase inhibitor (+). Arginine and ornithine levels were expressed as a fold change relative to vehicle control group. Data represent the mean  $\pm$  SD of 5 samples. ## $P < 0.01$ : Significantly different from the vehicle control group by Welch's t-test, ++ $P < 0.01$ : Significantly different from the vehicle control group by Student's t-test. *Note.* Reprinted from "Metabolomic analysis of arginine metabolism in acute hepatic injury in rats." by Saitoh W. *et al.* 2014, *J. Toxicol. Sci.* 39, 41–50, Fig.4

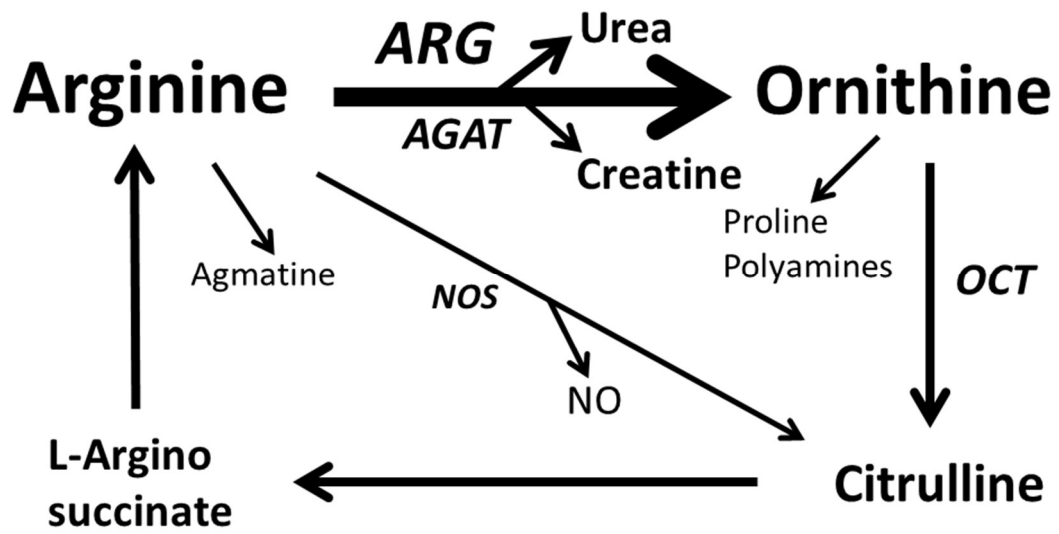


Fig. 7 Schematic illustration of pathways for arginine metabolism. ARG, arginase; OCT, ornithine carbamoyltransferase; NOS, nitric-oxide synthase; AGAT, arginine: glycine amidinotransferase. Roman and Italic typefaces show metabolites and enzymes, respectively. *Note.* Reprinted from “Metabolomic analysis of arginine metabolism in acute hepatic injury in rats.” by Saitoh W. *et al.* 2014, J. Toxicol. Sci. 39, 41–50, Fig.5

**Table 2. Histopathological findings in hepatic or skeletal muscle injury models**

Monocrotaline													
	Dose (mg/kg)	0			30			100			300		
		Time after dosing (hr)			Time after dosing (hr)			Time after dosing (hr)			Time after dosing (hr)		
		3	8	24	3	8	24	3	8	24	3	8	24
Liver													
Single cell necrosis of hepatocyte		-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-
											(+)		
Small necrotic foci of hepatocyte		-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	5	-
											(+)	(+)	
Necrosis of hepatocyte, centriloblar		-	-	-	-	-	-	-	-	5	-	-	5
										(+)			(++)
Hemorrhage, centriloblar		-	-	-	-	-	-	-	-	5	-	-	5
										(+)			(++)
Concanavalin A													
	Dose (mg/kg)	0			3			20			30		
		Time after dosing (hr)			Time after dosing (hr)			Time after dosing (hr)			Time after dosing (hr)		
		3	8	24	3	8	24	3	8	24	3	8	24
Liver													
Single cell necrosis of hepatocyte		-	-	-	-	-	-	5	4	5	5	5	5
								(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Multifocal necrosis of hepatocyte		-	-	-	-	-	-	4	4	4	5	5	5
								(+++)	(+++)	(+++)	(++)	(++)	(++)
Hemorrhage		-	-	-	-	-	-	3	1	-	1	2	4
								(+)	(+)		(+)	(+)	(+)
Leukopoiesis		-	-	-	-	-	4	1	5		5	5	5
							(+)	(+)	(++)		(+)	(++)	(++)
Dilatation of lymphatics		-	-	-	4	-	3	5	3	5	3	2	4
					(+)		(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Edema at perivascular interstitium		-	-	-	-	-	1	-	-	4	2	-	1
							(+)			(+)	(+)		(+)
Alpha-naphthyl isothiocyanate													
	Dose (mg/kg)	0			25			50			100		
		Time after dosing (hr)			Time after dosing (hr)			Time after dosing (hr)			Time after dosing (hr)		
		24	48	72	24	48	72	24	48	72	24	48	72
Liver													
Multifocal necrosis of hepatocyte		-	-	-	-	-	-	5	5	2	5	5	3
								(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Necrosis of bile duct epithelium		-	-	-	-	-	-	5	5	-	5	5	-
								(+)	(+)		(+)	(+)	(+)
Cell infiltration around bile duct		-	-	-	-	-	-	5	3	-	5	3	-
								(+)	(+)		(+)	(+)	
Bile duct fibrosis		-	-	-	-	-	-	-	2	4	-	2	5
									(+)	(+)		(+)	(+)
Regeneration of bile duct epithelium		-	-	-	-	-	-	-	5	5	-	5	5
									(+)	(+++)		(+)	(++)
Tetramethyl- <i>p</i> -phenylenediamine													
	Dose (mg/kg)	0			3			9					
		Time after dosing (hr)			Time after dosing (hr)			Time after dosing (hr)					
		24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	
Liver													
		-	-	-									
Soleus muscle													
Opaque fibers (hypercontracted fibers)		-	-	2									
				(+)									
Degeneration, vacuolar, muscle fiber		-	-	5									
				(+)									
Tibialis anterior muscle													
Opaque fibers (hypercontracted fibers)		-	2	5									
			(+)	(+)									
Degeneration, vacuolar, muscle fiber		-	-	5									
				(++)									

-: Within normal limits, +: Slight, +++: Slight to Moderate, ++: Moderate

**Note. Reprinted from “Metabolomic analysis of arginine metabolism in acute hepatic injury in rats.” by Saitoh W. *et al.* 2014, *J. Toxicol. Sci.* 39, 41–50, Table 1**

**Table 3. Endogenous metabolic profile of blood samples in hepatic or skeletal muscle injury models**

SUPER PATHWAY	SUB PATHWAY	BIOCHEMICAL NAME	Fold change			
			MCT 100 mg/kg	Con A 20 mg/kg	ANIT 50 mg/kg	TMPD 9 mg/kg
Amino acid	Urea cycle; arginine-, proline-, metabolism	arginine	0.15	0.54	0.03	0.90
		ornithine	1.46	0.66	1.50	1.19
		urea	1.06	1.11	0.81	0.84
		citrulline	0.87	0.53	0.92	1.01
		proline	0.94	0.72	0.63	0.86
		sarcosine (N-Methylglycine)	1.62	0.87	0.43	0.64
		dimethylglycine	1.25	0.90	0.45	0.73
		dimethylarginine (SDMA + ADMA)	0.91	0.66	0.92	1.12
		N-acetylornithine	1.13	1.08	1.06	0.96
		trans-4-hydroxyproline	1.05	0.79	0.81	1.18
		homocitrulline	0.91	1.16	0.92	0.88
		stachydrine	0.92	0.33	0.75	0.66
		homostachydrine	1.13	0.63	1.09	0.99
	Creatine metabolism	creatine	2.40	6.01	1.87	1.72
		creatinine	1.67	1.66	1.48	0.84
	Amino acid	glycine	1.34	1.11	0.88	0.98
		serine	1.71	1.05	0.52	0.94
		threonine	1.15	0.83	0.81	1.15
		alanine	1.05	0.92	0.92	0.61
		aspartate	2.20	1.68	0.69	0.87
		asparagine	1.03	0.79	0.92	0.90
		glutamate	1.88	1.35	0.99	1.06
		glutamine	1.19	1.22	1.30	1.21
		lysine	1.38	1.31	0.83	1.24
		phenylalanine	1.21	1.49	1.40	1.14
		tyrosine	1.64	0.83	0.77	0.96
		tryptophan	1.02	0.82	0.79	0.97
		isoleucine	0.96	1.00	1.02	0.97
		leucine	0.99	1.00	1.06	1.00
		valine	0.94	0.91	0.95	0.87
		cysteine	1.72	0.87	1.54	1.04
		methionine	1.19	1.02	0.77	0.89
	histidine	1.14	1.05	1.32	1.06	
3-methylhistidine	1.22	1.52	1.16	1.84		
Lipid	Ketone bodies	3-hydroxybutyrate	1.54	1.54	2.06	3.24
	Medium chain fatty acid	heptanoate (7:0)	0.76	1.12	1.41	0.76
		caprylate (8:0)	0.91	1.10	1.49	0.84
		pelargonate (9:0)	1.07	0.99	1.75	0.81
		caprate (10:0)	1.10	0.99	1.37	0.82
	Long chain fatty acid	myristoleate (14:1n5)	1.53	1.52	1.14	1.56
		pentadecanoate (15:0)	2.21	0.93	0.65	1.04
		palmitate (16:0)	1.34	1.13	1.17	1.15
	Carnitine metabolism	deoxycarnitine	1.31	1.56	0.87	1.10
		acetylcarnitine	1.36	1.84	0.81	1.56
		hexanoylcarnitine	1.84	2.57	0.99	1.60
		octanoylcarnitine	1.76	2.03	1.17	1.86
	Bile acid metabolism	cholate	45.94	2.18	96.15	2.09
glycocholate		24.73	1.72	53.22	8.92	
taurocholate		7.70	1.75	87.29	0.57	
Cofactors	Hemoglobin metabolism	heme	1.47	0.99	1.92	0.70
		bilirubin (Z,Z)	2.55	4.88	5.83	1.03

MCT, monocrotaline; ConA, concanavalin A; ANIT,  $\alpha$ -naphthyl isothiocyanate; TMPD, tetramethyl-*p*-phenylenediamine. Data are expressed as a ratio of the value relative to the mean value of the respective vehicle control group. Data represent the mean of 4 samples. Shaded cells indicate statistically significant increase (red) or decrease (blue) ( $P < 0.05$  by a Welch's t-test).

*Note.* Reprinted from “Metabolomic analysis of arginine metabolism in acute hepatic injury in rats.” by Saitoh W. *et al.* 2014, *J. Toxicol. Sci.* 39, 41–50, Table 2



### 第三章 消化管障害モデルにおける血中シトルリンの変動

#### 第一節 小序

消化管障害はヒトへの抗がん剤や非ステロイド性抗炎症剤投与で誘発される用量制限毒性の1つである。非臨床試験において消化管障害は、病理組織検査により評価される。しかし、病理組織検査では解剖時点の消化管毒性のみの評価となり、薄切標本作成後の鏡検による組織評価には時間がかかる。消化管毒性を示す化合物を効率よく選別するため、高感度、非侵襲的、及び信頼性の高いバイオマーカーが不可欠である。これまでにジアミノオキシダーゼ、カルプロテクチン、マイクロRNA (miRNA) などの血中もしくは糞中の消化管障害バイオマーカー候補は報告されているが、消化管障害への感度が高く、非臨床から臨床まで使用可能なバイオマーカーはこれまでに確認されていない(47)。

シトルリンは非タンパク性のアミノ酸である。小腸では、ピロリン-5-カルボン酸合成酵素 (P5CS) 等のシトルリン合成に必須な酵素の活性が強く、アルギニノコハク酸合成酵素 (ASS) やアルギニノコハク酸分解酵素 (ASL) などのシトルリンを異化する酵素活性が低いことから、シトルリンは主に腸細胞でグルタミンから生成される(45, 48, 49)。腸細胞で生成され血中に放出されたシトルリンは、腎臓で主にアルギニンに代謝される。肝臓は尿素サイクルの場合であるが、シトルリンの肝臓からの放出あるいは取り込みによる影響は小さいと考えられている(50)。このため、小腸に由来する血中シトルリンは、小腸の腸細胞の量を反映する腸疾患のバイオマーカーになると考えられている(45)。

血中シトルリンは、短腸症や抗がん剤や放射線による消化管障害により低下することが臨床及び非臨床で報告されている(15, 47, 51-54)。しかし、このシトルリンの減少は明らかな絨毛萎縮や広域の外科的切除で認められているものであり、明らかな絨毛又は細胞の萎縮を伴わない、軽度の消化管障害における血中シトルリンの変動は明らかでない。

本章では、明らかな絨毛や細胞萎縮を伴わない軽度の消化管障害モデルラットにおける血中シトルリン濃度を調べた。消化管障害誘発化合物として腸細胞などの増殖速度の速い細胞への副作用が知られている、カンプトテシン由来の抗がん剤のイリノテカンを用いた(10)。血中シトルリンはラットで絶食又は制限給餌により減少することが知られている(39, 55)。さらに小腸はタンパクの代謝回転が速く、食事制限による影響を受けやすいことが知られている(56)。実際、ラットの小腸粘膜量は1日又は2日の絶食で減少する(57)。そのため、本研究ではイリノテカン投与群とイリノテカン投与群との同量給餌の Pair-fed 対照群の血中シトルリン濃度を比較した。続いて、血中のシトルリン濃度と小腸のシトルリン合成の関係を明らかにするため、シトルリン合成の場である小腸組織（空腸と回腸）及び血中の内因性代謝物、並びに小腸組織の遺伝子発現の変動を調べた。

## 第二節 実験材料及び方法

### 1. 試薬及び調製方法

イリノテカン点滴静注（イリノテカン塩酸塩、100 mg/5 mL、第一三共株式会社）を使用

した。イリノテカンの 3 mg/mL 又は 6 mg/kg 溶液は生理食塩液（大塚製薬工場）で希釈して調製した。シトルリン及びアルギニンは和光純薬工業から購入した。D<sub>6</sub>-シトルリンは、Toronto Research Chemicals Inc.から購入した。これらのアミノ酸は Milli-Q 水に溶解し、それぞれ 1 mM の保存用水溶液を調製した。LC/MS グレードのアセトニトリルとギ酸は関東化学から購入した。シトルリンの保存用水溶液は、1 μM から 200 μM のキャリブレーション用標準溶液を作るため、Milli-Q 水でさらに希釈した。

## 2. 実験動物及び飼育方法

8 週齢の雄性 Sprague Dawley ラットを日本チャールス・リバー株式会社から購入した。ラットは個別にステンレス製のブラケットケージで飼育した。飼育環境は、室温 20-26°C、湿度 30-70%、12 時間の明暗サイクルとした。げっ歯類用の粉末又は固形飼料（CRF-1、オリエンタル酵母工業株式会社）をイリノテカン投与群と飽食対照群には自由に摂取させた。投与期間中、イリノテカン投与群と同等量の飼料を Pair-fed 対照群に 6 日間与えた。1 ppm から 5 ppm の塩素を含む水道水をどの群にも自由に摂取させた。実験開始前には 1 週間の馴化期間を設けた。実験計画は第一三共株式会社の動物実験倫理審査委員会により承認され、動物実験は第一三共の動物実験委員会のガイドラインに従い実施した。

## 3. 実験条件

イリノテカンは、0（生理食塩液）、30、又は60 mg/kgの用量で各群5又は6例のラットに2、4、又は6日間反復静脈内投与した。投与は尾静脈から行い、投与速度は1.2 mL/minとした。動物は最終投与24時間後の3、5及び7日後（Day 3、5及び7と表記）に剖検を行った。用量及び採材時点は消化管障害がみられた文献を参考に設定した(10)。剖検後、血液サンプルはイソフルラン麻酔下で腹大動脈から採取した。血液は血液化学検査用にヘパリンリチウム入りチューブ（マイクロテイナ、日本ベクトン・ディッキンソン株式会社）、又は血中シトルリン測定やメタボローム解析用にEDTA入りチューブ（バキュテイナ、日本ベクトン・ディッキンソン株式会社）に分注した。血液サンプルを遠心分離（3000 rpm、4°C、10 min）して血漿を採取した。血漿サンプルは使用まで-80°Cで保存した。血液採取後、動物を放血安楽死させ、各動物の胃及び腸（十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸）を病理組織検査用に採取した。遺伝子発現解析及びメタボローム解析用に空腸及び回腸（各100 mg）を2サンプルずつ、Day 7の剖検時に採取し、生理食塩液（大塚製薬工場）で洗浄した。組織標本は液体窒素凍結させ、使用まで-80°Cで保存した。

#### 4. 血液化学的検査及び病理組織検査

肝障害及び腎障害は、アルギニンやシトルリン等の尿素サイクル関連代謝物に影響することが報告されていることから(45, 58)、血中のAST、ALT、クレアチニン、尿素窒素を自動分析装置（TBA-200RF）で測定した。病理組織検査用に、前胃、腺胃、十二指腸、回腸、空

腸、パイエル板、盲腸、結腸、及び直腸を 10% の中性緩衝ホルマリンで固定後にパラフィン包埋した。薄切後、ヘマトキシリン・エオジン染色を施し、この染色標本の病理組織検査を行った。

## 5. 血中シトルリンの濃度定量

血中シトルリン濃度を液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法 (LC/MS/MS) を用いて定量した。内部標準として D<sub>6</sub>-シトルリンを用いた。分析用サンプルは以下のように調製した。各 10  $\mu$ L の血漿に対し、100  $\mu$ M の D<sub>6</sub>-シトルリンを含む 2  $\mu$ L の内部標準溶液、178  $\mu$ L のアセトニトリル、10  $\mu$ L の 2N 塩酸を加え、遠心分離 (11000 rpm、1 min) した。上清を回収し、各サンプルから 8  $\mu$ L を注入した。キャリブレーション用標準サンプルを調製するため、血液の代わりに 1  $\mu$ M から 200  $\mu$ M の濃度のシトルリンの標準溶液を使用した。クロマトグラフ分離は、Acquity UPLC system (Waters) を使用した。カラムには 40°C に保持した Inertsil NH<sub>2</sub> カラム (2.1  $\times$  150 mm、3  $\mu$ M、GL Sciences Inc.) を用いた。移動相 A には 0.5% ギ酸水溶液、移動相 B には 0.5% ギ酸アセトニトリル溶液、洗浄溶媒には 0.5% ギ酸含有の 95% アセトニトリル溶液を用いた。分離は 0.4 mL/min の流速と以下の溶出条件で行った：5% の B (0 分~0.6 分)、100% の B へ線形の上昇 (0.6 分~3.5 分)、100% の B (3.5 分~5 分)。5 分時点で組成を初期状態 (5% の B) に戻し、10 分まで維持した。UPLC 装置は、Xeno TQ MS mass spectrometer (Waters) に連結した。検出はシトルリン (m/z 176>70) 及び D<sub>6</sub>-シト

ルリン ( $m/z$  182>76) の遷移を伴う、陽イオンモードのエレクトロスプレーイオン化を用いた選択反応モニタリング法で行った。シトルリンのクロマトグラフィーでは、アルギニンの M+1 同位体からの分離が確認された (Fig. 8)。他のパラメータは、キャピラリー電圧 2500 V、ソース温度 150°C、脱溶媒温度 550°C、コーンガス流量 50 L/h、脱溶媒ガス流量 1100 L/h とした。線形検量線の作成には MassLynx 4.1 ソフトウェア (Waters) を用い、1/x の重み係数を用いて、シトルリンと D<sub>6</sub>-シトルリンのピーク面積比に対する理論濃度をプロットした。真度は理論値からの偏差を逆算し、校正標準試料の理論値のパーセンテージとして表した。キャリブレーションの範囲は 1~200 μM であった (Fig. 9、Table 4)。定量法の日中及び日間の再現性は、2001 年のバイオ分析法バリデーションに関するガイダンス (米国食品医薬品局 2001 年、Table 5、6) の基準を満たした。

## 6. 遺伝子発現解析

Day 7 の空腸及び回腸におけるシトルリン合成に必要な酵素の遺伝子発現を、定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-qPCR) により解析した。Total RNA の抽出は、RNase-Free DNase Set (Thermo Fisher Scientific Inc.) と RNease Mini Kit (QIAGEN) を用い、製造元のプロトコールに従って行った。cDNA 試料は、High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific Inc.) を用いて合成した。グルタミナーゼ (GLS)、P5CS、オルニチンアミノトランスフェラーゼ (OAT)、OCT、プロリンデヒドロゲナーゼ (PRODH)、アルギナーゼ 2

(ARG2) 及び  $\beta$ -アクチン mRNA の定量を、TaqMan® Fast Advanced Master Mix (Thermo Fisher Scientific Inc.) と 7900 HT Fast Real Time PCR System (Thermo Fisher Scientific Inc.) を用いて実施した。qPCR 分析のためのプライマー及びプローブは、Thermo Fisher Scientific Inc. が設計したものを、TaqMan® Minor Groove Minder (MGB) プローブ、標識されていないフォワードプライマーとリバースプライマーの 20 倍混合液を含む TaqMan® Gene Expression Assay Mix を用いた。用いたアッセイ ID は、Rn00561285\_m1 (GLS)、Rn01411415\_m1 (P5CS)、Rn00755544\_m1 (OAT)、Rn00565169\_m1 (OCT)、Rn01404902\_m1 (PRODH)、Rn01469630\_m1 (ARG2)、及び Rn00667869\_m1 ( $\beta$ -アクチン) とした。qPCR 増幅は、50°C で 2 分間、95°C で 10 分間、続いて 90°C で 15 秒間、60°C で 1 分間の 40 サイクルのサーマルサイクル条件下で、各試料につき duplicate で行った。標的とする mRNA の各発現レベルは  $\beta$ -アクチンで補正し、遺伝子発現の平均値は飽食対照群の発現レベルに対する比として表した。

## 7. メタボローム解析

Day 7 の空腸、回腸、血漿中の内因性代謝物を網羅的に解析した。既知及び未知の代謝物のプロファイリングは、Metabolon Inc.において、3 つの独立したプラットフォーム：塩基性分子又は酸性分子用に最適化された UPLC/MS/MS、及びガスクロマトグラフィー/質量分析を用いて行った。Metabolon Inc.で実施された分析の条件及び方法は、以前に報告されている

方法に従った(27)。各代謝物の測定は、第二章のメタボローム解析と同様の方法で行った。

## 8. データ解析

定量データは指定のない限り、平均値及び標準偏差で示した。遺伝子発現やメタボローム解析のデータは、飽食対照群に対するイリノテカン投与群、又は Pair-fed 対照群に対するイリノテカン投与群の比として示した。Day 3 及び Day 5 のデータは Dunnett's multiple comparison test で統計学的に解析した。Day 7 のデータは F test (有意水準: 5%) で統計学的に解析し、分散の均一性を評価し、分散が均一である場合には Student's t-test で、不均一である場合には Welch's t-test を行った。これらの統計解析は、SAS System Release 9.2 (SAS Institute Inc.) を用いて行い、 $P < 0.05$  を統計的に有意とした。

## 第三節 実験結果

### 1. イリノテカン投与による小腸の病理組織変化

イリノテカンは、十二指腸、空腸、及び回腸において絨毛及び細胞萎縮、びらん、又は潰瘍を伴わない粘膜上皮の単細胞壊死及び再生を引き起こした (Fig 10A-H, Table 7)。イリノテカンによる小腸粘膜上皮の単細胞壊死の病理グレードはいずれの時点でも軽度であったが、単細胞壊死を示した動物数は用量及び期間の増加に伴い増加した。イリノテカンの 30 mg/kg 以上を 2 日間反復投与 (Day 3) した動物では、粘膜上皮の再生は軽度又は中等度



であったが、6日間反復投与 (Day 7) において明らかな悪化はみられなかった。Day 7 には、盲腸で同様の病理組織所見がイリノテカン投与群の 4/6 例に認められたが、前胃、腺胃、結腸、及び直腸は形態学的に正常であった。イリノテカン投与により、投与開始から剖検日までに摂餌量及び体重増加率を有意に減少させ (Fig. 11A、B、C)、体重増加率は Pair-fed 対照群とイリノテカン投与群で同程度であった。イリノテカンを投与した動物では、いずれの時点においても下痢や黒色便は観察されなかった。さらに、AST、ALT、クレアチニン、及び尿素窒素を含む血液化学パラメータの異常はいずれの群でも認められなかった。

## 2. イリノテカン投与による血中シトルリンの減少

イリノテカン投与群の血中シトルリン濃度は、Day 3、5、7 に飽食対照群又は Pair-fed 対照群よりも有意な低値を示した (Fig. 11D)。イリノテカンは Day 3 及び Day 5 に用量依存的に血中シトルリン濃度を低下させた。60 mg/kg 投与群でのシトルリン濃度低下の程度は各時点で同等であった。飽食対照群と Pair-fed 対照群との間に、血中シトルリン濃度の統計的有意差は認められなかった。

## 3. 小腸におけるシトルリン合成に関与する酵素の遺伝子発現の低下

シトルリン合成に関与する酵素のうち、イリノテカンは空腸及び回腸における P5CS 及び OAT の発現レベルを低下させた (Fig. 12)。また、イリノテカンは回腸における GLS 及び

OCT の発現レベルを低下させたが、空腸における低下は観察されなかった。PRODH 及び ARG2 の遺伝子発現レベルはイリノテカン投与で変化しなかった。

#### 4. 小腸におけるシトルリンレベルの低下

イリノテカンは、飽食対照群及び Pair-fed 対照群と比較して、回腸におけるシトルリンレベルを低下させた (Fig. 13)。空腸においても、イリノテカンは Pair-fed 対照群と比較してシトルリン濃度をわずかに低下させたが、飽食対照群との差は有意ではなかった。プロリン及びアルギニンもシトルリンと同様の変化が認められた。一方で、グルタミン、グルタミン酸、及びオルニチンレベルの低下は、空腸又は回腸のいずれでもみられなかった。

#### 5. 血中の内因性メタボロームプロファイルの変化

イリノテカンは、尿素サイクル及びトリカルボン酸 (TCA) 回路に関与する内因性代謝産物を減少させたが、解析したほとんどのアミノ酸、解糖系の代謝物、ケトン体、脂肪酸に明らかな変化は認められなかった (Table 8)。

シトルリン合成に関連するアミノ酸のうち、イリノテカンは飽食対照群及び Pair-fed 対照群と比較してシトルリン及びアルギニンレベルを低下させた。また、飽食対照群と比較してオルニチン及びプロリン濃度の低下がみられたが、イリノテカン投与群と Pair-fed 対照群との間に有意差は認められなかった。さらに、Pair-fed 対照群と比較してグルタミンの軽微な

増加がみられたが、血中グルタミン酸は変化しなかった。

その他のアミノ酸について、チロシン及びシステイン以外のアミノ酸の低下はみられなかった。解糖系の内因性代謝物では、乳酸の低下がみられたが、グルコース及びピルビン酸を含む他の代謝物は減少みられなかった。TCA 回路の代謝産物では、クエン酸、アコニチン酸、アルファケトグルタル酸、及びリンゴ酸の減少が認められた。ケトン体、中鎖脂肪酸、長鎖脂肪酸に明らかな変化は認められなかった。

#### 第四節 考察

本試験では、ラットにおける血中シトルリン濃度と軽度の消化管障害の関係を検討した。今回用いたイリノテカンによる消化管障害モデルでは、下痢、黒色便、あるいは重度の病理組織変化を伴わない軽度の消化管障害を示した。また、血中シトルリン濃度は、十二指腸、空腸、回腸、及び盲腸の軽微な粘膜上皮の単細胞壊死と共に低下した。小腸の粘膜上皮の再生は単細胞壊死と関連した変化と考えられた。一方、小腸での明らかな絨毛や細胞萎縮、潰瘍、びらん、顕著な粘膜壊死などの重度の変化は観察されなかった。イリノテカンは盲腸に重度の変化を誘発することが報告されているが(10)、本研究では部位による消化管障害の差は明らかではなく、イリノテカンは盲腸の病理組織変化に関係なく血中シトルリン濃度を低下させた。イリノテカン誘発消化管障害は、腸内細菌叢における  $\beta$ -グルクロニダーゼの抑制により、顕著に減少することが報告されている(10)。ラットの腸内細菌叢は、本試験で

使用した水道水中の塩素により影響される可能性があり、その結果として盲腸の傷害が軽減されたのかもしれない。興味深いことに、イリノテカンでは体重増加率と摂餌量を Pair-fed 対照群と同程度に減少させたが、Pair-fed 条件は血中シトルリン濃度に影響を与えなかった。したがって、血中シトルリン濃度は、明らかな絨毛及び細胞萎縮を伴わない軽度の小腸の障害を反映していることが示唆された。

イリノテカンは用量依存的に血中シトルリン濃度を低下させた。60 mg/kg での血中シトルリン濃度の低下は、イリノテカンを投与した動物の小腸における病理組織変化の程度と同様に、各時点で同等であった。Day 7 の平均血中シトルリン濃度は、イリノテカン誘発の消化管障害モデルにおいて 63.9  $\mu\text{M}$  であった。Boukhettala らは、メトトレキサート誘発の消化管障害モデルにおいて、血中シトルリン濃度は 14  $\mu\text{M}$  と報告している(51)。メトトレキサートによって絨毛の高さを著しく減少した消化管障害の程度と比較して、本研究の小腸障害の程度は弱かった。本研究で得られた知見と併せて、血中シトルリン濃度は腸細胞量減少の程度を反映していると考えられた。

遺伝子発現解析から、GLS、P5CS、OAT、OCT などのグルタミンからのシトルリンの合成に関与する酵素はイリノテカンを投与したラットの腸で減少したが、プロリン又はアルギニンからのシトルリン合成に関与する PRODH と ARG2 は変化しなかった。P5CS の酵素活性は主に小腸で高く、そのため P5CS は小腸におけるシトルリン合成に寄与する(45)。また、OAT の酵素活性は、小腸、肝臓、腎臓、網膜においても高い(59)。さらに、壊死性腸

炎患者の腸組織において、GLS、P5CS、及びOATを含むシトルリン合成酵素の発現低下が報告されている(60)。したがって、今回みられたGLS、P5CS、OAT、OCTの遺伝子発現の低下は、小腸におけるシトルリン合成の低下と関連すると考えられた。

空腸及び回腸の内因性代謝物では、血中シトルリン濃度の低下及びシトルリン合成酵素の遺伝子発現の低下に伴い、イリノテカン投与群のシトルリンレベルが低下した。これらの結果より、血漿シトルリン濃度の減少が小腸におけるシトルリン合成の減少に起因することが示唆された。シトルリン濃度の低下の程度は、空腸よりも回腸で明らかであり、シトルリン合成に関与する酵素の遺伝子発現と同様の傾向が観察された。イリノテカンを投与したラットでは、回腸の損傷の程度が空腸よりも重度であったことが報告されている(10, 61)。これは、腸肝循環後の腸内細菌叢によって産生されるイリノテカン、SN-38の活性代謝産物のレベルの増加と関連すると考えられる(10)。本研究では、Day 7に空腸と回腸の病理変化の程度に明らかな部位による差は認められなかったが、遺伝子発現とシトルリンレベルの差は、空腸と回腸の機能低下の程度を反映している可能性がある。

イリノテカン誘発消化管障害モデルでは、小腸におけるシトルリンレベルは減少したが、グルタミン及びグルタミン酸レベルは減少しなかった。グルタミンは、炎症の抑制、核酸の合成、小腸の栄養などに関与している(62)。したがって、障害された腸上皮細胞が正常な状態に回復するため、腸内グルタミンレベルはグルタミンからのシトルリン合成の減少によって維持されているのかもしれない。実際、我々のモデルと同様にメトトレキサートは、十

二指腸においてシトルリンを減少させ、グルタミンを増加させることが示されている(51)。

血中の内因性代謝物に関して、シトルリン及びアルギニンレベルはイリノテカン誘発性消化管障害モデルで減少したが、グルタミン及びグルタミン酸レベルは消化管中と同様に減少しなかった。また、イリノテカン誘発性消化管障害モデルでは、他のアミノ酸、解糖代謝産物、ケトン体、脂肪酸の変化は明らかでなかったことから、シトルリン及びアルギニンレベルの低下が栄養不良によるアミノ酸の異化亢進と関連している可能性は低いことが示唆された。血中シトルリン及びアルギニンレベルは、腎及び肝障害によって影響を受ける可能性があるが(45, 58, 63)、イリノテカンは、AST、ALT、尿素窒素、及びクレアチニンなどの腎又は肝機能パラメータを増加させなかった。したがって、このモデルにおける血中シトルリンレベルの低下は、小腸でのグルタミンからのシトルリン合成の低下を反映していると考えられた (Fig. 14)。

結論として、血中シトルリン濃度は明らかな絨毛及び細胞萎縮を伴わない軽度の小腸障害を反映し、その減少は小腸におけるシトルリン合成の減少と関連することを示唆された。したがって、血中シトルリン濃度は消化管障害に対する感度の高い代謝性バイオマーカーであると考えられた。

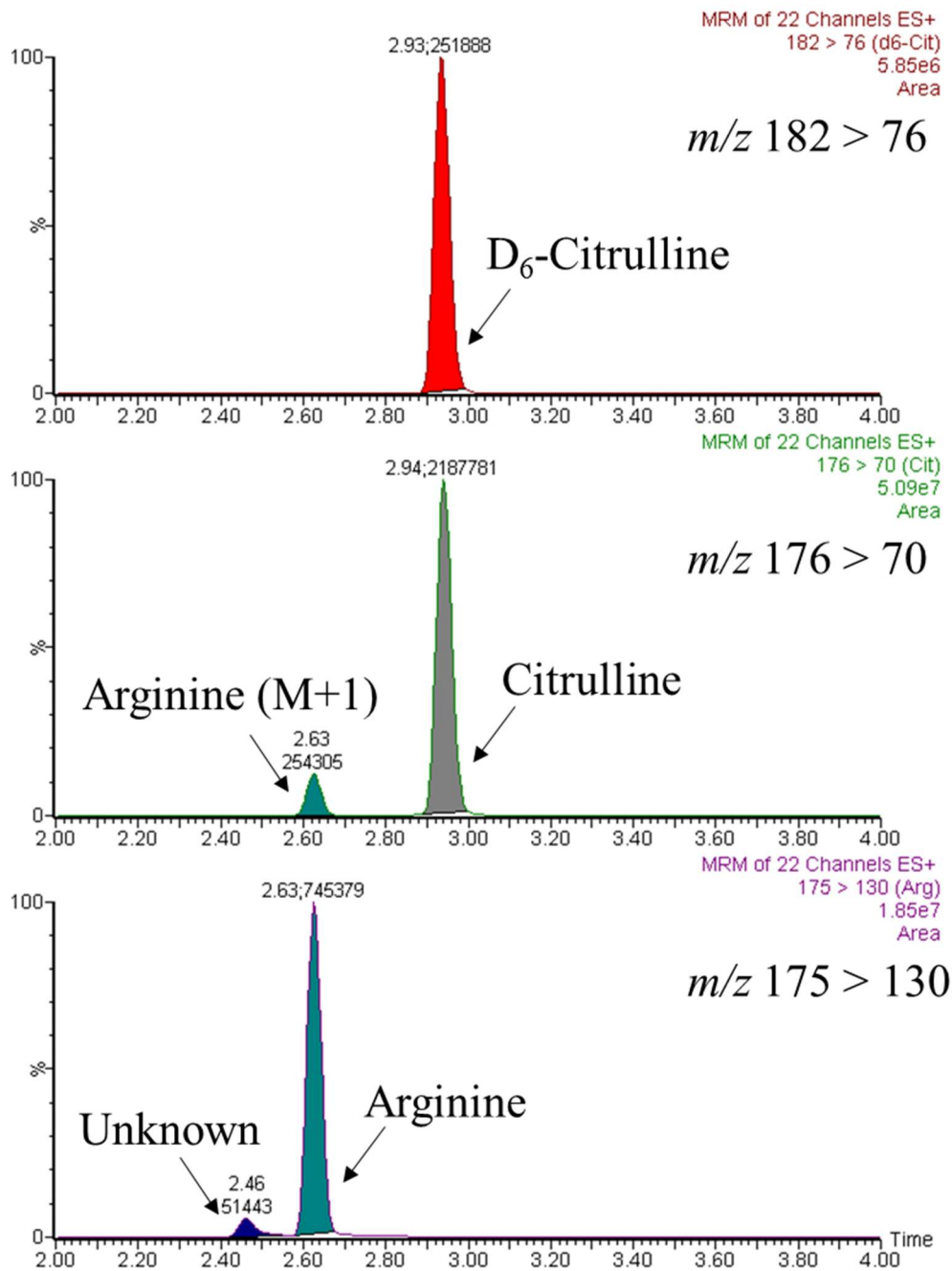
## 第五節 小括

明らかな絨毛及び細胞萎縮、びらん、潰瘍を伴う重度の消化管障害の場合、血中シトルリ

ンは減少するが、軽度の消化管障害における血中シトルリンの変動は未だ検討されていなかった。本研究では、イリノテカン 30mg/kg 又は 60mg/kg を反復静脈内投与したラットにおいて、小腸で明らかな絨毛及び細胞萎縮を伴わない軽度の粘膜上皮の単細胞壊死及び再生と同時に、Pair-fed 対照群と比較して有意な血中シトルリン濃度の低下がみられることを明らかにした。また、この消化管障害モデルの小腸では、グルタミンをシトルリンに変換する酵素の遺伝子発現が低下していたこと、回腸におけるシトルリン及びアルギニン濃度がグルタミン及びグルタミン酸濃度に変化を伴わずに低下したことより、グルタミンからのシトルリン合成が抑制されたことが示された。

メタボローム解析では、血中シトルリン及びアルギニン濃度は低下したが、他のアミノ酸、解糖代謝産物、ケトン体、または脂肪酸に顕著な変化はみられなかった。これらの結果から、血中シトルリン濃度の低下が、栄養不良によるアミノ酸の異化亢進に起因する可能性は低いと考えられた。

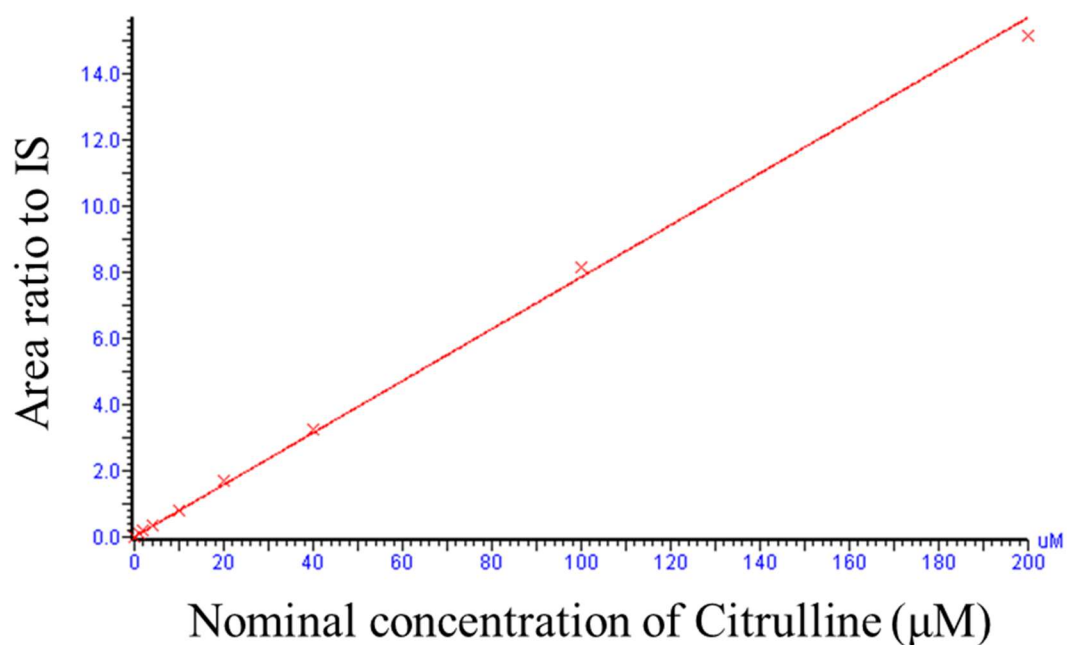
以上の結果から、血中シトルリン濃度は、明らかな絨毛及び細胞萎縮を伴わない軽度の消化管障害を反映し、消化管障害に対する感度の高いバイオマーカーであると考えられた。



**Fig. 8** Chromatographic separation of citrulline from arginine. Representative LC-MS/MS chromatograms of analytical sample prepared from rat plasma.  $M/z$  176 > 70 detects citrulline and M+1 isotopologue of arginine. Citrulline was separated from arginine on Inertsil NH<sub>2</sub> column.  
*Note.* Reprinted from “Plasma citrulline is a sensitive safety biomarker for small intestinal injury in rats.” by Saitoh W. *et al.* 2018, *Toxicol Lett.* 295:416-423, Supplemental Fig. 1

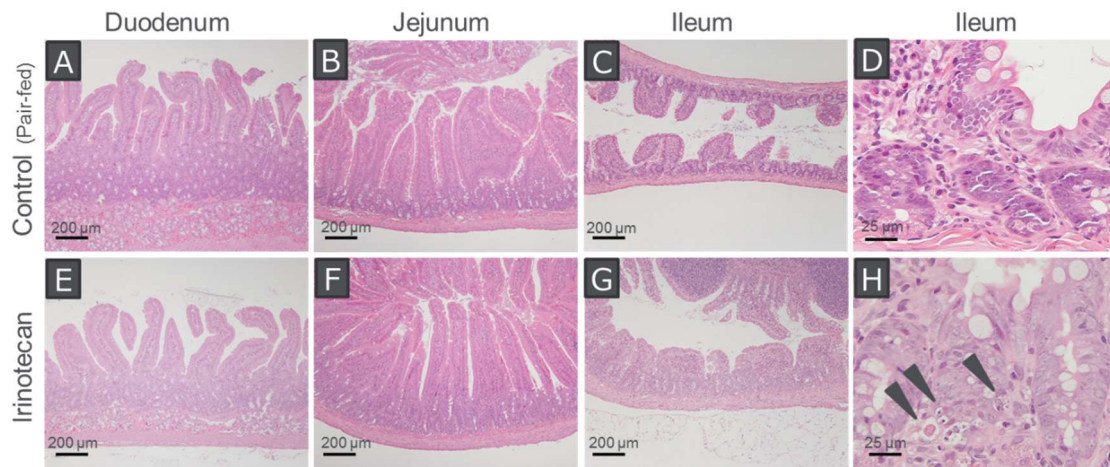


Compound name: Cit  
Correlation coefficient:  $r = 0.999151$ ,  $r^2 = 0.998303$   
Calibration curve:  $0.0785159 * x + 0.0146$   
Response type: Internal Std (Ref 9), Area \* (IS Conc. / IS Area)  
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



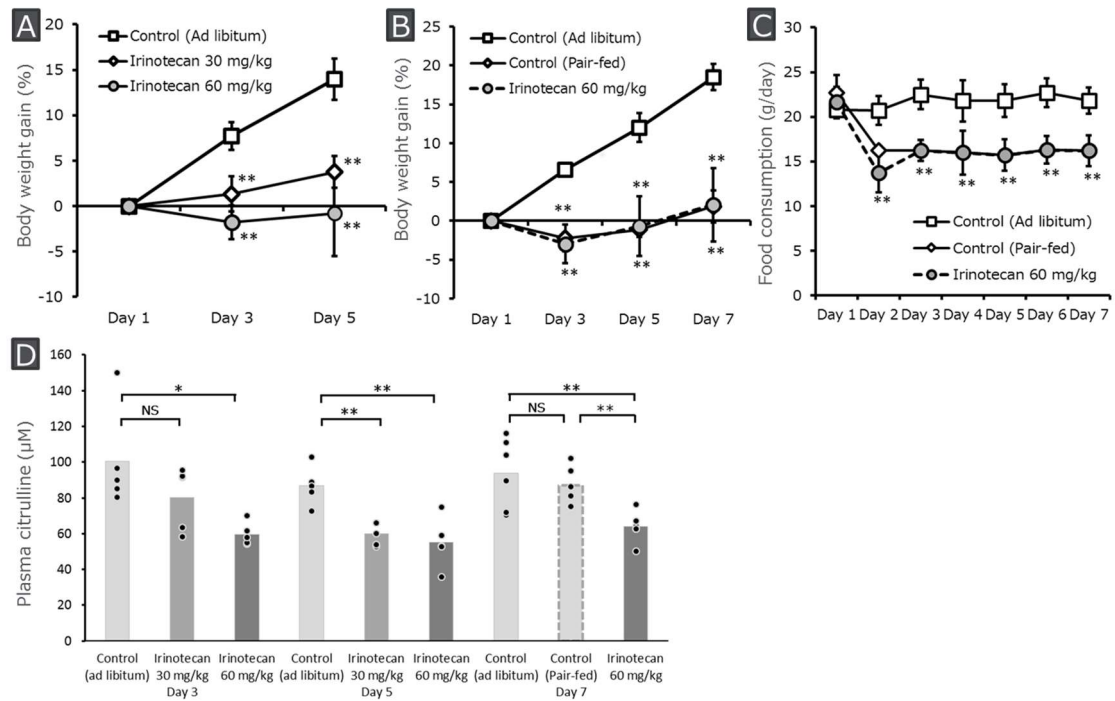
**Fig. 9** Linear calibration for citrulline.

*Note.* Reprinted from “Plasma citrulline is a sensitive safety biomarker for small intestinal injury in rats.” by Saitoh W. *et al.* 2018, *Toxicol Lett.* 295:416–423, Supplemental Fig. 2



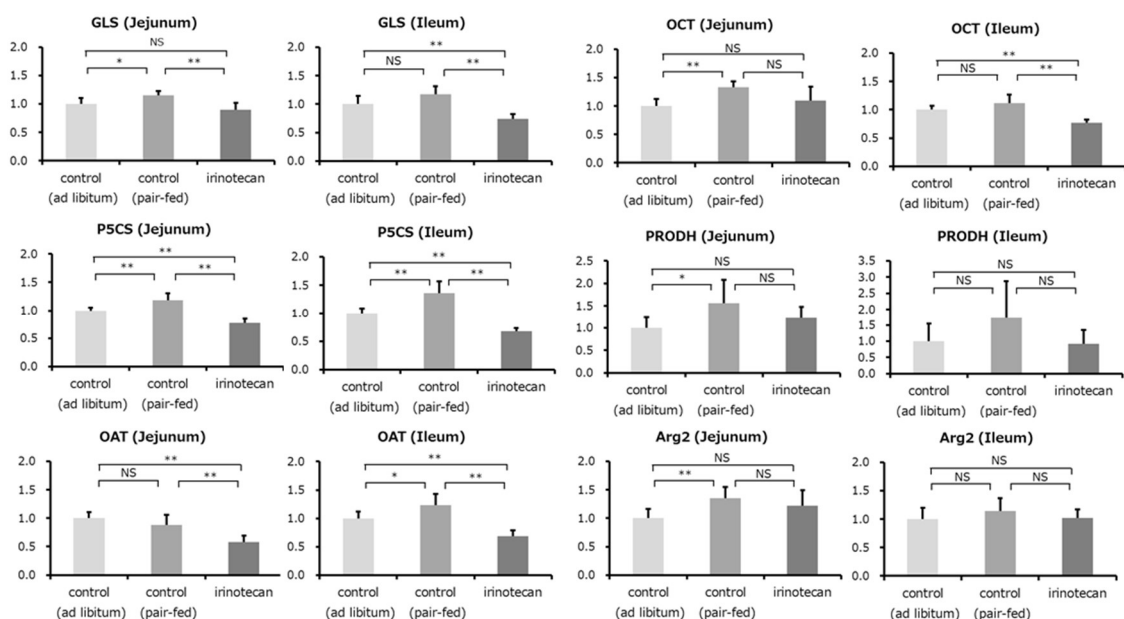
**Fig. 10** Irinotecan induced small intestinal toxicity without villus atrophy in the duodenum, jejunum, and ileum in all animals. Pair-fed control rats exhibited normal intestinal histopathology in the duodenum (A), jejunum (B), and ileum (C, D). Irinotecan did not induce villus atrophy, erosion, or ulcers in the duodenum (E), jejunum (F), and ileum (G). In the irinotecan-treated group, single cell necrosis (H; arrowheads) was observed. Moreover, the regeneration of mucosal epithelium was also noted, as indicated by large pale nuclei and basophilic cytoplasm. Black bar in H&E stained sections indicates 200  $\mu\text{m}$  (A, B, C, E, F and G) or 25  $\mu\text{m}$  (D and H).

*Note.* Reprinted from “Plasma citrulline is a sensitive safety biomarker for small intestinal injury in rats.” by Saitoh W. *et al.* 2018, *Toxicol Lett.* 295:416–423, Fig. 1

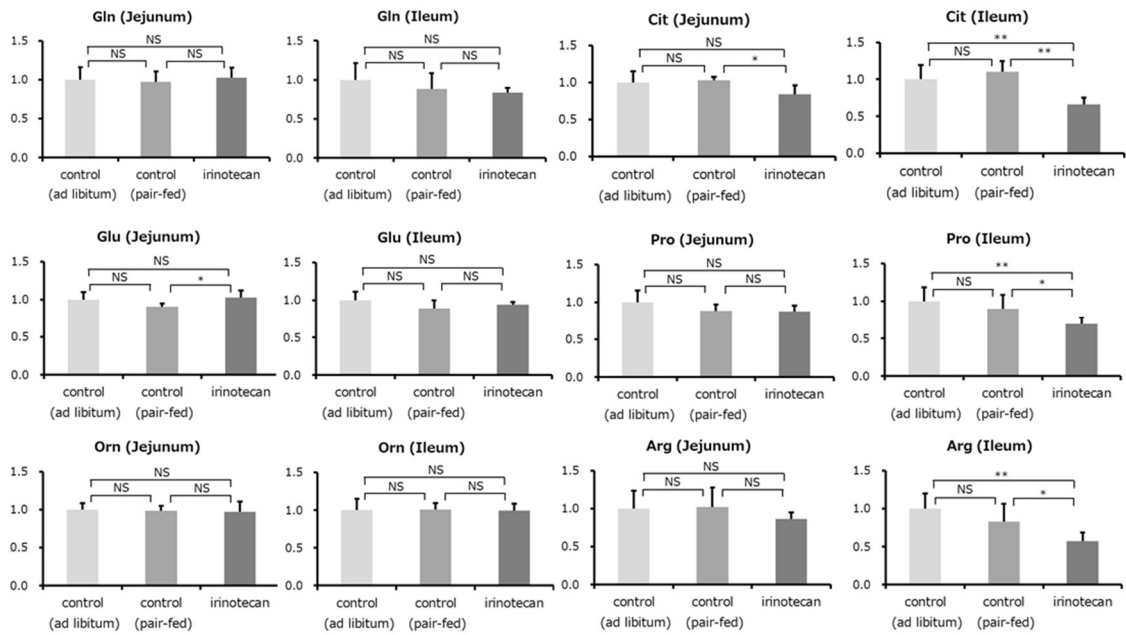


**Fig. 11** Decreased plasma citrulline concentration in the irinotecan-treated group. Irinotecan suppressed body weight gain (A and B) and food consumption (C). Rats in the pair-fed control received an equivalent amount of food to that in the irinotecan-treated group. Irinotecan decreased plasma citrulline concentration (D). Data represent the mean  $\pm$  standard deviation of six animals. The points represent individual value of plasma citrulline. \*\* $P < 0.01$ : Significantly different from the *ad libitum* or pair-fed control groups by Student's t-test or Welch's t-test, NS: Not significant.

*Note.* Reprinted from "Plasma citrulline is a sensitive safety biomarker for small intestinal injury in rats." by Saitoh W. *et al.* 2018, *Toxicol Lett.* 295:416–423, Fig. 2

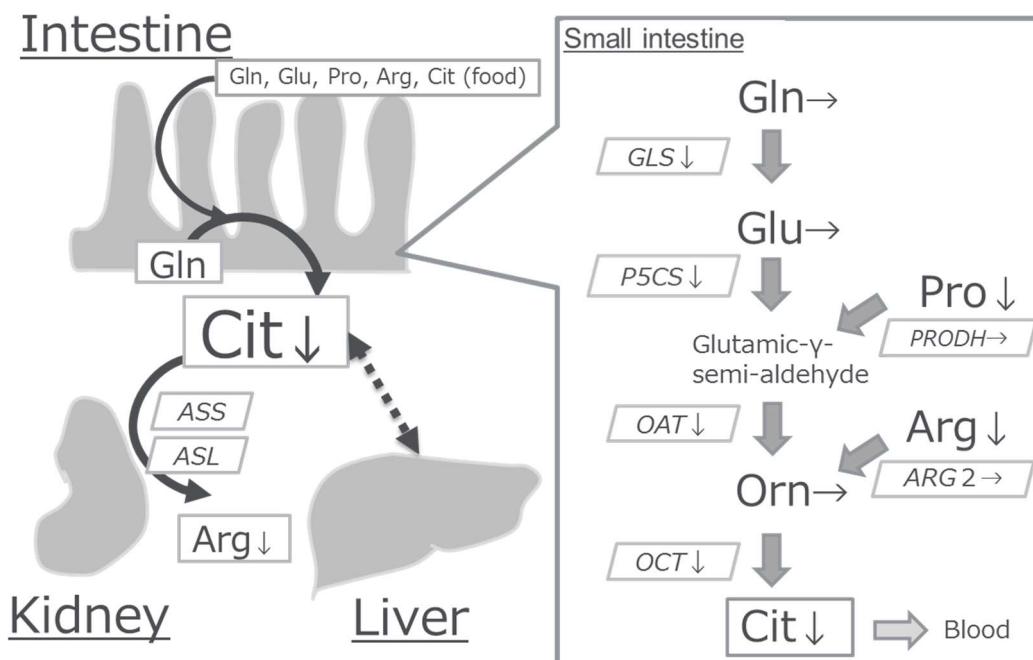


**Fig. 12** Decreased gene expression of enzymes required for citrulline synthesis in the jejunum and ileum. Gene transcription levels are expressed as a ratio of the value relative to the mean value of the *ad libitum* control group. Each expression level of target mRNA was normalized to beta-actin. Data represent the mean  $\pm$  standard deviation of 6 animals. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ : Significantly different from the *ad libitum* or pair-fed control groups by Student's t-test or Welch's t-test, NS: Not significant. GLS: glutaminase, OCT: ornithine carbamoyltransferase, P5CS: pyrroline-5-carboxylate synthase, PRODH: proline dehydrogenase, OAT: ornithine aminotransferase, ARG2: arginase 2. *Note.* Reprinted from "Plasma citrulline is a sensitive safety biomarker for small intestinal injury in rats." by Saitoh W. *et al.* 2018, *Toxicol Lett.* 295:416-423, Fig. 3



**Fig. 13** Decreased amino acid levels involved in citrulline synthesis in the jejunum and ileum samples. Each amino acid level is expressed as a ratio of the value relative to the mean value of the *ad libitum* control group. Data represent the mean  $\pm$  standard deviation of six animals. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ : Significantly different from the *ad libitum* or pair-fed control groups by Student's t-test or Welch's t-test. Gln: glutamine, Cit: citrulline, Glu: glutamic acid, Pro: proline, Orn: ornithine, Arg: arginine.

*Note.* Reprinted from "Plasma citrulline is a sensitive safety biomarker for small intestinal injury in rats." by Saitoh W. *et al.* 2018, *Toxicol Lett.* 295:416-423, Fig. 4



**Fig. 14** Schematic illustration of pathways involved in decreased plasma citrulline following small intestinal injury. In rats intravenously exposed to irinotecan for 6 days, decreased gene expression of enzymes such as *GLS*, *P5CS*, *OAT*, and *OCT*, and decreased synthesis of citrulline, were seen in the small intestine. Since citrulline synthesized in the small intestine is released into the circulation, plasma citrulline is considered to be decreased following small intestinal injury. Plasma citrulline is primarily taken up by the kidneys and converted to arginine, while the release and uptake of citrulline by the liver are negligible. Consequently, plasma arginine is also likely to decrease following intestinal injury. Gln: glutamine, Glu: glutamic acid, Pro: proline, Arg: arginine, Orn: ornithine, Cit: citrulline, *GLS*: glutaminase, *P5CS*: pyrroline-5-carboxylate synthase, *OAT*: ornithine aminotransferase, *OCT*: ornithine carbamoyltransferase, *PRODH*: proline dehydrogenase, *ARG2*: arginase 2, *ASS*: argininosuccinate synthase, *ASL*: argininosuccinate lyase, ↑: increase, →: no change, ↓: decrease. Roman and Italic typefaces show metabolites and enzymes, respectively.

*Note.* Reprinted from “Plasma citrulline is a sensitive safety biomarker for small intestinal injury in rats.” by Saitoh W. *et al.* 2018, *Toxicol Lett.* 295:416-423, Fig. 5

**Table 4 Summary of the calibration curves for citrulline.**

Nominal Concentration ( $\mu\text{M}$ )	Peak area		Ratio (a) to (b)	Observed Concentration ( $\mu\text{M}$ )	Accuracy (%)
	Citrulline (a)	D <sub>6</sub> -Citrulline (b)			
1	27296	311681	0.0876	0.929	92.9
2	55156	311132	0.177	2.07	103.5
4	102574	304479	0.337	4.10	102.5
10	239994	298376	0.804	10.1	101.0
20	472323	275941	1.71	21.6	108.0
40	855210	261697	3.27	41.4	103.5
100	1883074	230529	8.17	104	104.0
200	3247841	214193	15.2	193	96.5

Accuracy = Observed value / Nominal value x 100

**Note.** Reprinted from “Plasma citrulline is a sensitive safety biomarker for small intestinal injury in rats.” by Saitoh W. *et al.* 2018, *Toxicol Lett.* 295:416-423, Supplemental Table 1

**Table 5** Intraday accuracy of quantitation method for citrulline.

Nominal concentration ( $\mu\text{M}$ )	Day 1			Day 2			Day 3		
	Mean $\pm$ S.D.	Accuracy (%)	Precision (%)	Mean $\pm$ S.D.	Accuracy (%)	Precision (%)	Mean $\pm$ S.D.	Accuracy (%)	Precision (%)
1	0.891 $\pm$ 0.115	<b>89.1</b>	<b>12.9</b>	0.923 $\pm$ 0.0958	<b>92.3</b>	<b>10.4</b>	0.943 $\pm$ 0.0524	<b>94.3</b>	<b>5.6</b>
3	2.96 $\pm$ 0.0844	<b>98.7</b>	<b>2.9</b>	2.79 $\pm$ 0.0570	<b>93.0</b>	<b>2.0</b>	2.88 $\pm$ 0.171	<b>96.0</b>	<b>5.9</b>
25	26.6 $\pm$ 1.03	<b>106.4</b>	<b>3.9</b>	25.2 $\pm$ 1.26	<b>100.8</b>	<b>5.0</b>	26.2 $\pm$ 1.33	<b>104.8</b>	<b>5.1</b>
160	170 $\pm$ 4.21	<b>106.3</b>	<b>2.5</b>	157 $\pm$ 3.71	<b>98.1</b>	<b>2.4</b>	163 $\pm$ 4.15	<b>101.9</b>	<b>2.5</b>

Accuracy = Observed value / Nominal value x 100

Precision = Standard deviation / Mean observed value x 100

n=5

**Note.** Reprinted from “Plasma citrulline is a sensitive safety biomarker for small intestinal injury in rats.” by Saitoh W. *et al.* 2018, *Toxicol Lett.* 295:416-423, Supplemental Table 2



**Table 6 Interday accuracy of quantitation method for citrulline.**

Nominal concentration ( $\mu\text{M}$ )	Mean $\pm$ S.D.	Accuracy (%)	Precision (%)
1	0.919 $\pm$ 0.0262	<b>91.9</b>	<b>2.9</b>
3	2.88 $\pm$ 0.0850	<b>96.0</b>	<b>3.0</b>
25	26.0 $\pm$ 0.721	<b>104.0</b>	<b>2.8</b>
160	163 $\pm$ 6.51	<b>101.9</b>	<b>4.0</b>

Accuracy = Observed value / Nominal value x 100

Precision = Standard deviation / Mean observed value x 100

n=3

**Note.** Reprinted from “Plasma citrulline is a sensitive safety biomarker for small intestinal injury in rats.” by Saitoh W. *et al.* 2018, *Toxicol Lett.* 295:416-423, Supplemental Table 3

**Table 7 Histopathological findings in the irinotecan-induced small intestinal injury model.**

Day of necropsy		Day 3			Day 5			Day 7		
		0	30	60	0	30	60	0	0	60
Dose (mg/kg)										
Number of animals		(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(6)	(6)	(6)
Feeding condition		<i>ad libitum</i>	<i>ad libitum</i>	<i>ad libitum</i>	<i>ad libitum</i>	<i>ad libitum</i>	<i>ad libitum</i>	<i>ad libitum</i>	pair-fed	<i>ad libitum</i>
Organ	Findings									
Duodenum	Single cell necrosis, mucosal epithelium	-	-	1(+)	-	2(+)	5(+)	-	-	6(+)
	Regeneration, mucosal epithelium	-	4(+), 1(++)	2(+), 3(++)	-	4(+), 1(++)	2(+), 3(++)	-	-	6(+)
Jejunum	Single cell necrosis, mucosal epithelium	-	-	-	-	-	3(+)	-	-	6(+)
	Regeneration, mucosal epithelium	-	5(+)	2(+), 3(++)	-	5(+)	1(+), 4(++)	-	-	4(+), 1(++)
Ileum	Single cell necrosis, mucosal epithelium	-	-	-	-	1(+)	2(+)	-	-	6(+)
	Regeneration, mucosal epithelium	-	1(+)	1(+)	-	4(+), 1(++)	1(+), 4(++)	-	-	4(+), 1(++)
Cecum	Single cell necrosis, mucosal epithelium	-	-	-	-	-	-	-	-	3(+)
	Regeneration, mucosal epithelium	-	-	-	-	-	-	-	-	1(+), 3(++)
Forestomach		-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glandular stomach		-	-	-	-	-	-	-	-	-
Peyer's patch		-	-	-	-	-	-	-	-	-
Colon		-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rectum		-	-	-	-	-	-	-	-	-

The number shows the incidence of each histopathological finding.

The histopathological grades are shown in parentheses (-: Within normal limits, +: Slight, ++: Moderate).

**Note.** Reprinted from “Plasma citrulline is a sensitive safety biomarker for small intestinal injury in rats.” by Saitoh W. *et al.* 2018, *Toxicol Lett.* 295:416-423, Table 1

**Table 8 Endogenous metabolome profile of blood samples in the irinotecan-induced intestinal injury model.**

SUPER PATHWAY	SUB PATHWAY	BIOCHEMICAL NAME	Fold change		
			Irinotecan / Control (ad libitum)	Irinotecan / Control (Pair-fed)	Control (ad libitum) / Control (Pair-fed)
Amino acid	Urea cycle; arginine-, proline-, metabolism	arginine	0.79	0.87	1.11
		argininosuccinate	0.54	0.42	0.79
		urea	1.06	1.08	1.01
		ornithine	0.81	1.04	1.28
		2-oxoarginine*	0.64	0.51	0.80
		citrulline	0.75	0.79	1.07
		homoarginine	0.83	0.85	1.03
		homocitrulline	0.78	0.85	1.09
		proline	0.74	0.87	1.18
		dimethylarginine (SDMA + ADMA)	0.88	0.95	1.08
		N-acetylarginine	0.65	0.64	0.99
		N-acetylcitrulline	0.64	0.53	0.82
		N-acetylproline	0.53	0.57	1.08
		N-delta-acetylorithine	0.89	1.07	1.21
		N-alpha-acetylorithine	0.66	0.69	1.03
		N2,N5-diacetylorithine	1.07	0.95	0.89
		trans-4-hydroxyproline	0.99	1.01	1.02
		pro-hydroxy-pro	1.38	1.05	0.76
		N-methylproline	0.98	1.19	1.21
	N-monomethylarginine	0.78	1.18	1.51	
	argininate*	0.94	0.87	0.93	
	Amino acid	glycine	0.95	0.97	1.02
		serine	0.97	0.96	0.99
		threonine	0.86	0.99	1.15
		alanine	0.86	0.87	1.01
		aspartate	0.91	1.01	1.11
		asparagine	0.95	1.03	1.09
		glutamate	0.97	1.12	1.15
		glutamine	1.06	1.09	1.03
		lysine	0.98	0.98	1.00
		phenylalanine	1.08	1.09	1.01
		tyrosine	0.79	0.74	0.94
		tryptophan	1.03	1.06	1.03
		isoleucine	1.05	1.23	1.17
		leucine	1.04	1.24	1.19
		valine	1.03	1.27	1.23
		cysteine	1.02	0.82	0.80
		methionine	0.78	0.88	1.13
	histidine	1.01	1.10	1.09	
Carbo hydrate	Glycolysis, Gluconeogenesis, and Pyruvate Metabolism	3-methylhistidine	1.08	1.09	1.01
		1,5-anhydroglucitol (1,5-AG)	1.17	1.16	0.99
		glucose	0.98	0.97	0.99
		2,3-diphosphoglycerate	1.29	0.61	0.48
		3-phosphoglycerate	0.84	0.84	1.00
		pyruvate	0.93	0.90	0.97
		lactate	0.76	0.77	1.02
		glycerate	1.01	1.15	1.14
Energy	TCA Cycle	citrate	0.83	0.77	0.94
		aconitate [cis or trans]	0.86	0.81	0.95
		isocitrate	1.54	0.48	0.31
		alpha-ketoglutarate	0.74	0.78	1.06
		succinate	0.63	0.70	1.11
		fumarate	0.76	0.77	1.01
		malate	0.76	0.76	1.01
Lipid	Ketone bodies	tricarballylate	1.25	1.02	0.82
		acetoacetate	1.09	1.54	1.42
	Medium chain fatty acid	3-hydroxybutyrate (BHBA)	1.20	1.23	1.03
		heptanoate (7:0)	0.94	0.87	0.93
		caprylate (8:0)	0.71	0.58	0.81
		pelargonate (9:0)	0.99	0.84	0.85
	Long chain fatty acid	caprate (10:0)	1.26	1.01	0.80
		myristate (14:0)	1.10	0.83	0.76
		myristoleate (14:1n5)	1.25	0.90	0.72
		pentadecanoate (15:0)	1.10	0.94	0.86
palmitate (16:0)	1.32	0.96	0.73		

Data are expressed as a ratio of the value relative to the mean value of the respective vehicle control group. Data represent the mean of six samples. Shaded cells indicate a statistically significant increase (red) or decrease (blue) ( $P < 0.05$  by Student's t-test or Welch's t-test)

*Note.* Reprinted from "Plasma citrulline is a sensitive safety biomarker for small intestinal injury in rats." by Saitoh W. *et al.* 2018, *Toxicol Lett.* 295:416-423, Table 2

## 第四章 アルギニン及びシトルリンの有用性検証

### 第一節 アルギニン及びシトルリンのバイオマーカーとしての有用性

安全性バイオマーカーの検討では、臨床及び非臨床安全性試験の標準的評価法、例えば毒性試験の病理組織検査や血液検査との感度を比較する共に、変動機序を検証する必要がある(64)。また、医薬品は全身の臓器に毒性を生じさせる可能性があることから、薬物の標的臓器以外への薬理作用や臓器毒性による影響を調べ、その特異性を検証することも不可欠である(65)。そこで本章では、血中アルギニンやシトルリンの代謝性バイオマーカーとしての感度と特異性について、本研究結果及び文献による知見を踏まえて総合的に考察した。

#### 1. 肝障害に対するアルギニンの感度と特異性

本研究では機序の異なる 3 種類の肝障害モデルを用いて、肝障害に対するアルギニンの感度を検証した。その結果、いずれの動物モデルにおいても、病理組織検査で肝細胞壊死がみられた時点で、血中アルギニンは低下し、血中 ALT と有意な負の相関を示した。同様の血中アルギニンの低下は、四塩化炭素やチオアセトアミドによる肝障害モデルでも報告されており(16, 18)、血中アルギニンは肝障害に対する感度が高いことが示された。

イリノテカンによる消化管障害モデルにおける血中アルギニンの変動を調べたところ、血中アルギニンは肝障害を伴わない消化管障害でも低値を示した。同様の血中アルギニンの低値は、壊死性腸炎の患者でも報告されている(66)。このアルギニンの低下の変動機序と

して、消化管障害時のシトルリン生成と関連した2つの可能性が考えられた。1つ目は、血中アルギニンが消化管でのシトルリン生成に利用される可能性である。消化管で生成されるシトルリンの約8割はグルタミンから生成されると報告されているが(49)、この経路の代謝酵素 GLS、P5CS、OAT、OCT の消化管中の遺伝子発現量は、消化管障害時に減少した。一方、消化管でのシトルリン生成には、血中アルギニンやオルニチンも利用される(67)。消化管障害時に消化管中のアルギニンは減少したが、代謝酵素 ARG2 の遺伝子発現量やオルニチンは変動しないことから、消化管障害時のシトルリン生成に血中アルギニンやオルニチンが利用された可能性がある。2つ目は、腎臓から血中へのアルギニンの供給低下の可能性である。血中アルギニンは、腎臓でのシトルリンからアルギニンへの代謝に由来し、この腎臓でのアルギニン合成には消化管で生成されたシトルリンの約8割が用いられる(45, 68)。消化管障害時には血中シトルリンが低下するため、その結果として腎臓でのシトルリンからアルギニンへの代謝が低下し、血中アルギニンの低下につながった可能性がある。このように、血中アルギニンの低下は、肝障害以外に消化管障害にも起因する可能性がある。

本研究の MCT と ANIT による肝障害モデルでは、肝臓中アルギナーゼの血中への漏出により、血中アルギニン低下に加えて血中オルニチンが上昇することが示唆された。同様の変化は、四塩化炭素による肝障害モデルでも報告されており(40)、アルギナーゼの基質であるアルギニンの低下とその生成物のオルニチンの上昇の変動パターンは、肝障害に特徴的な変化である可能性が考えられた。一方、本研究の ConA による肝障害モデルでは、血中オル

ニチンの上昇は観察されず、一貫した結果が得られなかった。ConA は肝障害に加えて小腸の形態変化を惹起することが知られており(44)、本研究の ConA による肝障害モデルでの血中シトルリンの減少は、消化管障害を反映した変化と推察された。前述のように消化管障害時には、アルギナーゼの基質となる血中アルギニンが減少する。したがって、血中アルギニンとオルニチンの変動パターンは、アルギニン単独に比べて肝障害をより正確に判別する可能性があるが、消化管障害の併発時には肝障害に対する感度が低下すると考えられた。

近年、アルギナーゼの活性上昇に伴う血中アルギニンとオルニチンの変動が、肝障害以外の様々な疾患で観察されることが報告されている。アルギナーゼはアルギニンの異化に最も重要な酵素であり、I 型と II 型が存在する。I 型アルギナーゼは肝細胞に豊富に発現し、腸細胞、マクロファージ、赤血球を含む肝外細胞の発現は限定的であるが、II 型アルギナーゼは全てのミトコンドリアを含む肝外細胞に比較的低レベルで発現することが知られている(69)。I 型及び II 型アルギナーゼの発現は、様々な疾患においてサイトカインや他の炎症性刺激により誘導され、血中アルギニンを低下させることが報告されている(70)。例えば、卵白アルブミンによるマウスの気管支炎モデルでは、肺中のアルギナーゼ活性が上昇し、血中オルニチンに対するアルギニン比率が低下した(71)。また、アテローム動脈硬化や糖尿病の動物やヒトでも血中のアルギナーゼが上昇し、同様にアルギニンの比率が低下した(72)。その他にもアルギナーゼの誘導は、中枢神経系疾患やがんを含む様々な疾患で報告されている(73)。そのため、血中アルギニンは肝障害以外の複数の疾患でも低下すると推察された。

以上、血中アルギニンは肝障害に対して感度が高いと考えられたが、血中アルギニンの恒常性に関与する消化管の影響も受け、消化管障害時にも低下すると推察された。また、血中アルギニン低下とオルニチン上昇の変動パターンにより、アルギニン単独に比べて肝障害をより正確に判別することが可能であるが、肝障害と消化管障害の併発時にその特異性が低下することが示された。さらにアルギナーゼは炎症性疾患、肺障害、糖尿病など複数の疾患で誘導されるため、血中アルギニンやオルニチンを指標とした肝障害の判別には、これらの疾患の有無に留意する必要があると考えられた (Table 9)。

## 2. 消化管障害に対するシトルリンの感度と特異性

本研究では、イリノテカンによる消化管障害モデルを用いて、消化管障害に対するシトルリンの感度を検証した。その結果、ラットの血中シトルリンは、明らかな絨毛や細胞萎縮、潰瘍、びらんを伴わない軽度の消化管障害で低下した。これまでに抗がん剤、放射線障害、又は小腸の外科的切除に伴う重度の消化管障害時に、動物やヒトの血中シトルリンが低下することが報告されている(15, 47, 51-54)。血中シトルリンは、ヒトの消化管障害に対する診断能は低いとの報告もあるが(74)、本研究より、ラットでは軽度から重度の消化管障害を反映する感度の高いバイオマーカーと考えられた。

本研究で用いた肝障害モデルや骨格筋障害モデルにおけるシトルリンの変動を調べたところ、MCT と ANIT による肝障害モデルでは、血中シトルリンの低下は確認されず、Holecck

らによって報告されている四塩化炭素による肝障害モデルと同様の結果であった(75)。したがって、アルギナーゼの血中への漏出を介した血中アルギニン低下は、血中シトルリンに影響しないと考えられた。なお、ConAによる肝障害モデルでは血中シトルリンの低下がみられたが、前述のようにConAによる消化管への影響に起因すると考えられた(44)。骨格筋障害モデルでは血中シトルリンやアルギニンの低下はみられず、本研究では血中シトルリンの消化管障害に対する特異性に影響する因子は観察されなかった。

シトルリンは非タンパク性のアミノ酸であり、ほとんどの食品に含まれていないが、制限給餌や絶食により、血中シトルリンが減少することが知られている(55)。本研究では、消化管障害時の摂餌の影響を評価するため、飽食に比べ2割程度の給餌量を減らしたPair-fed対照群を設けたが、血中シトルリンを含むアミノ酸の低下や消化管の病理組織変化は観察されなかった。これまでに血中シトルリンは、極度の栄養不良がなければ正常範囲内であり(45)、シトルリンの前駆体であるアルギニン、グルタミン酸、プロリン等のアミノ酸を4週間食事から除去しても、血中シトルリンは変動しないことが報告されている(76)。したがって、摂餌条件によるシトルリンへの影響は、他のアミノ酸と明らかな差はないと推察された。絶食時には、血中シトルリンやアルギニンだけでなく、空腹時に筋肉から放出されるアラニンも減少することが知られており(39)、血中のアミノ酸プロファイルを確認することで消化管障害と摂餌量減少の影響を区別できると考えられた。

これまでに血中シトルリンの低下は、消化管毒性やOTC欠損症などの遺伝性疾患を除い



て報告されておらず、血中シトルリンは消化管障害に対する特異性が高いと考えられている(15, 45)。一方で、血中シトルリンは腎障害の患者で上昇し、これは腎臓でのシトルリンからアルギニンへ代謝が抑制されるためと考えられている(63, 77)。また、血中シトルリンやオルニチンの上昇は、高脂肪食給餌又はストレプトゾトシン誘導の糖尿病誘発マウスで観察されている(78)。これらの血中シトルリンを上昇させる因子は、軽度の消化管障害によるシトルリン低下を打ち消し、感度を低下させる可能性がある。

以上、血中シトルリンは軽度の消化管障害でも低下し、消化管障害以外の臓器障害での低下は報告されていないことから、消化管障害を反映する有用なバイオマーカーであると考えられた。血中シトルリンを消化管障害バイオマーカーとして使用する場合は、腎毒性、高脂肪食、糖尿病による血中シトルリン上昇により感度が低下すること、及び栄養不良による血中シトルリン低下との判別に留意する必要があると考えられた (Table 9)。

**Table 9** Variation factors of blood arginine and citrulline

	Blood arginine	Blood citrulline
Metabolic Biomarkers	Hepatic injury: Decrease	Intestinal injury: Decrease
Other Increase factor	—	Renal injury High-fat diet Diabetes mellitus
Other decrease factor	Intestinal injury Lung injury Inflammatory disease Atherosclerosis Diabetes mellitus Malnutrition	Malnutrition

## 第二節 消化器バイオマーカーの現状と課題

### 1. 肝障害バイオマーカーの現状

現在の標準的検査法である ALT は、肝障害に加えて骨格筋障害でも軽度上昇することから、その特異性に課題があると考えられている(17)。近年、肝障害に対する感度及び特異性が高く、ALT と異なる特徴を有する新規肝障害バイオマーカーが複数報告されている(79)。新規肝障害バイオマーカー候補の代表例を以下に記載する (Table 10)。

#### 1-1 グルタミン酸脱水素酵素 (GLDH)

GLDH はミトコンドリアに局在する酵素で、アミノ酸の酸化と尿素の産生に関与している。ラットの肝障害では、GLDH は ALT 上昇に比べて早期に変動する(80)。ヒトにおいても血中 GLDH と ALT には強い相関があり、GLDH は ALT に比べ短い半減期により肝障害を正確に反映すると考えられている(80)。また、骨格筋の壊死及び再生を主病変とする遺伝性筋疾患のデュシェンヌ型筋ジストロフィーの患者では、GLDH は正常範囲であり、骨格筋障害に影響される ALT と異なる特徴を有する(81)。さらに、細胞質中に存在する ALT と異なり、GLDH はミトコンドリア由来であることから、肝障害におけるミトコンドリア毒性の判別にも利用でき、肝障害の機序解明に役立つ可能性があると考えられている(82)。

#### 1-2 miR-122

miRNA は、転写後遺伝子調節に寄与する低分子の非コード RNA であり、生体液中での安定性が高いとされている。miRNA の 1 つである miR-122 は、ラットの肝臓で特異的に発現し、ALT と比べて肝障害への特異性の高いバイオマーカーとされている(83)。肝障害による miR-122 の上昇は、げっ歯類に加えてイヌやヒトなど複数の動物種で認められている。また、血中 miR-122 は ALT 上昇に先立って上昇し、肝障害の程度を正確に反映することが示唆されている(84)。一方で、miR-122 は ALT のような肝細胞死に伴う受動的な放出ではなく、他の臓器への伝達物質として調節を受ける可能性が報告されている。そのため GLDH と比べて健常者でのばらつきが大きく、miR-122 の新規の肝障害マーカーとして有用性が疑問視されている(79)。

### 1-3 高移動度グルーブボックス 1 (HMGB1)

HMGB1 は、ユビキタスに発現する核タンパク質であり、主として DNA に結合して転写を調節する。肝細胞の損傷後、HMGB1 は核内から血中に放出され、免疫反応に関与することが示唆されている(85)。HMGB1 は、マウスにおいて ALT より早期に増加し、臨床でもアセトアミノフェンによる肝毒性への感度が高いことが報告されている(86-88)。また、アイソフォームの 1 つである高アセチル化 HMGB1 は、アセトアミノフェンによる肝障害の不良な転帰の予後因子である可能性が示唆されている(89)。一方で、アセトアミノフェン以外の薬剤性肝障害時の HMGB1 の変動やアイソフォームの役割についての報告は少なく、今後

の検討が期待されている(85)。

これらの新規の肝障害バイオマーカー候補が普遍的に使われるには更なる検討が必要であるが、標準的検査項目に加えることができれば、臨床での薬物性肝障害の予測、検出、及びリスク管理を改善できると期待されている(89)。

これらの新規の肝障害バイオマーカー探索では、アルギニンを代謝するアルギナーゼの検証も行われ、その感度及び特異性は、GLDH に比べて低いことも報告されている(79)。そのため、血中アルギナーゼ活性に依存する代謝性バイオマーカーのアルギニンが、GLDH と同様に臨床応用される可能性は低いと推察された。

**Table 10 Characteristics of novel liver injury biomarkers**

Hepatic injury biomarkers	Advantages	Disadvantages
Blood arginine	<ul style="list-style-type: none"> <li>• High sensitivity</li> <li>• Easy to measure</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Effects of other diseases and malnutrition</li> </ul>
Glutamic acid dehydrogenase (GLDH)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• High sensitivity and specificity</li> <li>• Change earlier than ALT</li> </ul>	—
miR-122	<ul style="list-style-type: none"> <li>• High sensitivity and specificity</li> <li>• Change earlier than ALT</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Variations in healthy individuals</li> </ul>
HMGB1	<ul style="list-style-type: none"> <li>• High sensitivity</li> <li>• Change earlier than ALT</li> <li>• Predicting poor outcomes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Few reported cases in drug-induced liver injury</li> </ul>

## 2. 消化管バイオマーカーの現状

これまでにジアミンオキシダーゼ、CD64、ガストリンなどの複数のバイオマーカー候補が報告されてきたが、その感度、特異性、又は測定法に課題があり、臨床や非臨床では活用されていない(47)。近年、腸型脂肪酸結合タンパク (I-FABP) や miR-215 が消化管障害を反映すると報告されている(90, 91)。新規消化管障害バイオマーカー候補の代表例を以下に記載する (Table 11)。

### 2-1 ジアミンオキシダーゼ

ジアミンオキシダーゼはヒスタミンの代謝に関与する酵素で、主に小腸の粘膜、特に絨毛の先端に存在する。ジアミンオキシダーゼ活性は小腸粘膜の状態を反映し、動物やヒトの消化管障害時に血中のジアミンオキシダーゼ活性が低下することが報告されている(92, 93)。一方で、PAK4 阻害剤による消化管障害では、血中シトルリンの低下はみられたが、ジアミンオキシダーゼの変動は観察されなかった(47)。また、血中ジアミンオキシダーゼ活性は、採血時に使用する抗凝固剤ヘパリンにより上昇することが知られ、スクリーニングを目的とした非臨床試験での使用を阻害する要因となっている。

### 2-2 腸型脂肪酸結合蛋白 (I-FABP)

脂肪酸結合タンパクは、脂肪酸代謝を有する組織に豊富に発現する小さな細胞質タンパ

ク質で、長鎖脂肪酸、胆汁酸、又はレチノイドに高い親和性で結合する。9種類の脂肪酸結合タンパクのうち、I-FABPは、主に小腸の腸上皮細胞に限局しており、胃及び大腸ではごく微量しか存在しない。ラットでは、敗血症による消化管障害モデルで血中I-FABPは上昇し、シトルリンと負の相関を示すことが報告されている(91)。ヒトでは、回腸炎を伴う潰瘍性大腸炎に加え、腸間膜梗塞や壊死性腸炎でI-FABPが上昇することが報告されている(94)。しかし、薬物による消化管障害との関連を示す報告事例は少ない。

### 2-3 miR-215

近年、シトルリンと同様に消化管障害に伴って変動するmiRNAが報告されている。血中miRNAのうち、miR-215は血中シトルリンと比べて感度よくラットの消化管障害を検出することが示唆されている(90)。しかし、miR-215はマウスの腎臓やヒトの肝臓での発現も確認され、慢性肝炎や肝細胞がんのバイオマーカー候補となる可能性が報告されている(95)。そのため、消化管障害の特定には、miR-215だけでなく、複数のバイオマーカーによる検証が必要と考えられている。また、miR-215の日内及び日間変動は大きく、シトルリンに比べて測定上の課題も存在する(90)。

このように消化管障害のバイオマーカー候補の報告はあるが、シトルリンに比べて消化管障害との関連を示す報告事例は限られ、今後の感度及び特異性の検証と測定法の確立が



期待される。現時点では血中シトルリンは、臨床及び非臨床で消化管障害を反映し、LC/MS/MS で容易に測定可能で有望な安全性バイオマーカーと考えられている。実際、消化管機能の診断や薬理作用を示すバイオマーカーとしても、臨床や医薬品の開発に使われている(15, 45, 96)。一方、臨床で血中シトルリンの感度は十分でないとの報告もあり(74)、さらに優れた新規バイオマーカーが求められている。

**Table 11 Characteristics of novel intestinal biomarkers**

Intestinal injury biomarker	Advantages	Disadvantages
Blood citrulline	<ul style="list-style-type: none"> <li>• High sensitivity and specificity</li> <li>• Easy to measure</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Effects of other diseases and malnutrition</li> </ul>
Diamine Oxidase	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Localization in the intestine</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Few reported cases</li> <li>• Effects of anticoagulants on measurements</li> </ul>
Intestinal fatty acids Binding protein (I-FABP)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Localization in the intestine</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Few reported cases in drug-induced intestinal injury</li> </ul>
miR-215	<ul style="list-style-type: none"> <li>• High sensitivity</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Few reported cases</li> <li>• Variations in healthy individuals</li> </ul>

### 第三節 メタボローム解析による代謝性バイオマーカーの展望

本研究で注目したアルギニン、オルニチン、シトルリンは体内の恒常性維持に欠かせないアミノ酸である。その血中濃度は摂餌条件や様々な疾患による影響を受けるため、単独の代謝性バイオマーカーとして診断能は必ずしも高くないと考えられた。しかし、メタボローム解析の特徴は、血液、尿、組織などのサンプル中の内因性代謝物を網羅的に解析できることである。複数の代謝性バイオマーカーを組み合わせることで互いの欠点を補い、疾患や毒性のスクリーニングに使える可能性がある。これまでにアルギニンやシトルリンを含むアミノ酸が、生活習慣病やがんで特徴的なプロファイルを示すことが報告されており(97-99)、実際にスクリーニング検査として実臨床で利用されている。

尿素サイクル関連のアミノ酸のうち、アルギニン、オルニチン、シトルリンは、肝臓、消化管、腎臓の毒性に応じた異なったプロファイルを示す。本研究の肝障害モデルでは、血中アルギニンの低下とオルニチンの上昇がみられ、消化管障害モデルでは血中アルギニンとシトルリンの低下することを示した。また、腎障害ではシトルリンからアルギニンへの代謝が抑制されるため、血中シトルリンが上昇することが知られている(77, 100)。このように3つの内因性代謝物は、毒性に応じた特徴的なプロファイルを示すことから、肝臓、消化管、腎臓の毒性スクリーニングに利用できる可能性がある。しかし、医薬品の毒性試験では、複数の臓器毒性や摂餌量の変化が見られることから、他の要因が3つの尿素サイクルの関連代謝物に影響を与える可能性がある。そのため、尿素サイクルと異なる代謝経路で変動する

代謝性バイオマーカーと組み合わせれば、毒性スクリーニングの精度は更に向上すると思われた。

尿素サイクル関連代謝物の他にも、これまでに様々な臓器毒性に対する代謝性バイオマーカー候補が報告されている。肝障害及び酸化ストレスのバイオマーカーとして、それぞれ $\gamma$ -グルタミルジペプチドやオフタルミン酸(25, 101)、胃潰瘍のバイオマーカーとしてヒドロキシプロリンが報告されている(102)。また、カチオン性両親媒性薬剤により各組織のライソゾームにリン脂質が異常蓄積するリン脂質症のバイオマーカーとして 22:6 bis (monoacylglycerol) phosphate (22:6 BMP) が知られている(103, 104)。このような代謝性バイオマーカー候補を網羅的測定することで、そのプロファイルから複数の臓器毒性をスクリーニングできる可能性がある。一方で、代謝性バイオマーカーは小規模で予備的な研究が多く、臨床や非臨床での活用例は少ないことが知られている(105)。今後、非臨床の毒性スクリーニングに代謝性バイオマーカーを利用するには、多様な医薬品候補の毒性試験で継続的に測定し、病理組織検査の結果を比較して有用性を検証することが欠かせない。

毒性試験における代謝性バイオマーカーの初期検証では、血中の内因性代謝物が摂餌量や腸内細菌の影響される可能性があることから(106)、注目する臓器に短期間で毒性を生じさせる医薬品候補を用いることが望ましい。近年注目されている核酸医薬品や抗がん剤は、この条件に合致し、消化器毒性に対する代謝性バイオマーカーの検証に適していると考えられた。核酸医薬品は、肝臓、腎臓、脾臓などの臓器に集積し(107)、特にマウスで感受性が

高いことが知られている(108)。核酸医薬品による肝毒性は、オフターゲットの転写誘導や医薬品自体によるものと考えられ、マウスの単回投与による肝毒性のスクリーニングが有用と報告されている(109)。核酸医薬品による肝障害が、直接的な細胞障害と異なる機序で発現するのであれば、ALT と異なるバイオマーカーを測定することで新たなリスクを捉えられるかもしれない。抗がん剤の開発では、がんの増殖に関わる遺伝子変異に対する分子標的薬が注目されているが、消化管はその標的臓器の 1 つである(110)。消化管毒性は患者さんの生活の質や抗がん剤の投与量に影響するため、安全性の高い薬が望まれている(111)。

新たな代謝性バイオマーカーを非臨床試験の毒性スクリーニングに活用するには、臓器毒性による影響の他にも、いくつかの解決すべき課題がある。第一に、正常と異常を区別する閾値の設定である。これには通常の毒性試験でのメタボローム解析を進め、動物の例数を増やして検証する必要がある。第二に、週齢差、性差、日内変動の検証である。ヒトの血中アルギニンに性差があり、血中シトルリンは年齢とともに上昇することが報告されている(112)。また、マウスの血中アルギニン、オルニチン、シトルリンには、日内変動があることが知られている(113)。アミノ酸に限らず、多くの内因性代謝物には、週齢差、性差、日内変動による影響の可能性があるため、適切な対照群との比較や背景データ収集が重要と考えられる。第三に、採血時の溶血やサンプルの扱いなど人為的な影響である。溶血時には血球のアルギナーゼが漏出し、血中アルギニン濃度が低下することが報告されており(114)、アミノ酸の分析では適切な採血とサンプルの温度管理が求められている(115)。このような課

題を解決し、代謝性バイオマーカーによるスクリーニング法が確立されれば、毒性の低い医薬品候補を早期に選抜し、医薬品の効率的な開発に貢献すると考えられる (Fig. 15)。

今後、代謝性バイオマーカーが更に充実させるためには、代謝物測定 of 技術進歩に加えて新しい技術も必要である。これまでの代謝性バイオマーカー探索の欠点は、統計学的解析との指摘がある(116)。近年、マシンラーニングを利用したメタボローム解析が行われ、アルツハイマーや乳がんの診断能が向上することが報告されている(117, 118)。新たな解析法により、消化器に対するバイオマーカーパネルの診断能も劇的に改善するかもしれない。このような組み合わせによる診断は、代謝性バイオマーカーに限らない。GLDH などの臨床で検証中の肝臓のバイオマーカーについても、単一の候補が新しいゴールドスタンダードとして浮上する可能性は低く、複数の候補によるバイオマーカーパネルが有用と考えられている(89)。今後、新しい統計解析方法の導入により、代謝性バイオマーカーも含めた多様な安全性バイオマーカーパネルを構築され、医薬品の開発が更に効率化することを期待したい。

#### 第四節 小括

本章では本研究の結果と最近の知見を踏まえ、肝障害に対するアルギニンの有用性と消化管障害に対するシトルリンの有用性を検討した。また、肝障害及び消化管障害のバイオマーカー探索の現状と代謝性バイオマーカーの展望を考察した。

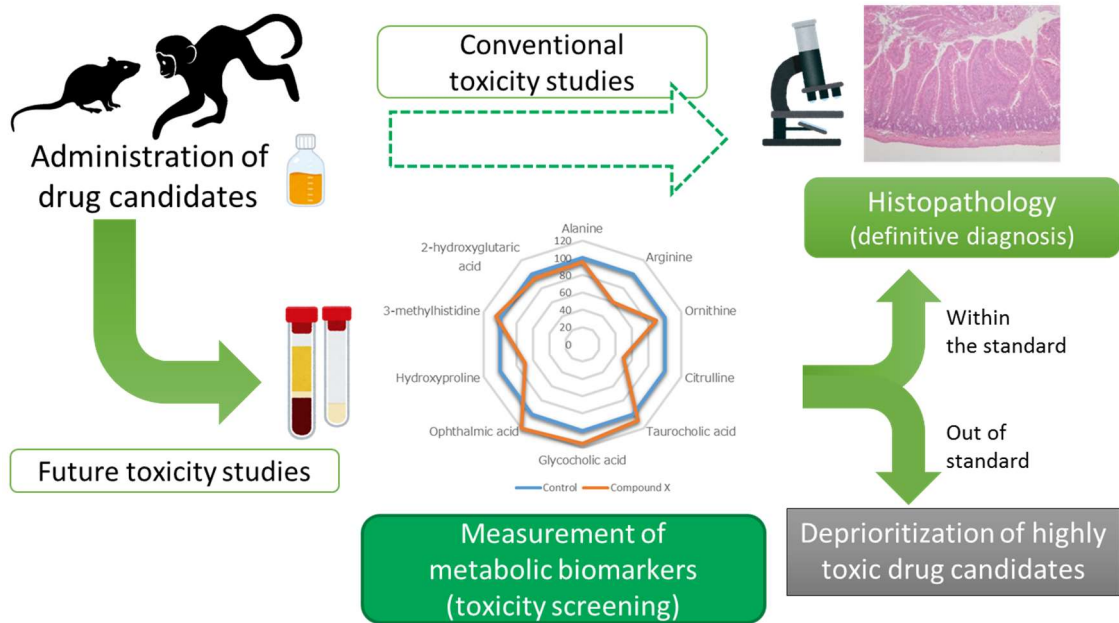
血中アルギニンの低下は、複数の肝障害モデルの ALT 上昇と相関し、肝障害に対する感度が高いことが示唆された。しかし、消化管毒性、肺毒性、糖尿病を含む複数の条件下でもアルギニンは低下するため、血中アルギニンやオルニチンを指標とした肝障害の判別には、これらの疾患の有無に留意する必要があると考えられた。近年、肝障害の新規バイオマーカーとしての診断能は GLDH が高く、血中アルギニン低下に関与するアルギナーゼは低いことが報告されている。そのため、血中アルギナーゼ活性に依存する代謝性バイオマーカーのアルギニンが、GLDH と同様に臨床応用される可能性は低いと推察された。

血中シトルリンは、軽度の消化管障害モデルで低下し、軽度から重度の消化管障害を反映する感度の高いバイオマーカーであることが示唆された。また、血中シトルリンは消化管以外の臓器毒性による影響を受けず、その特異性は高いと考えられている。一方で、血中シトルリンは極度の栄養不良で低下し、腎障害や高脂肪食で上昇することが知られており、これらの感度や特異性に影響する因子には留意する必要がある。これまでに消化管障害の新規バイオマーカー候補は複数報告されているが、感度、特異度、又は測定法に課題がある。そのため、血中シトルリンは、現時点で消化管の状態を反映するエビデンスの多いバイオマーカーと考えられている。

このように血中アルギニン及びシトルリンは、消化器障害を反映して変動するが、他の疾患や摂餌条件の影響を受ける可能性がある。そのため、これらの代謝性バイオマーカー単独による臓器毒性の同定は難しい。一方で、メタボロームの特徴は、複数代謝物の変動を網羅

的に調べることである。アルギニン、オルニチン、シトルリンを含む尿素サイクル関連代謝物は、肝臓、消化管、腎臓の毒性により異なるプロファイルを示す。また、これまでに様々な臓器毒性と関連を示す複数の代謝性バイオマーカー候補が報告されている。今後、これらの代謝性バイオマーカーパネルによるスクリーニング法を確立できれば、より有望な医薬品候補を優先的に毒性評価できる。その結果として、高い安全性の医薬品候補が早期に選抜され、医薬品開発の効率化に貢献できると期待される。





**Fig. 15** Future perspectives of the use of metabolic biomarkers

## 総括

第一章では、医薬品開発における消化器障害バイオマーカーへの期待と課題を示した。医薬品の研究開発において、肝臓や消化管を含む消化器は毒性の発現しやすい臓器である。これらの毒性を簡便に検出できるバイオマーカーがあれば、効率的に安全性の高い医薬品が創出できると期待される。しかし、既存の肝障害のバイオマーカーである ALT は骨格筋障害でも変動を示し、特異性に課題がある。また、消化管障害に対して、感度及び特異性の高いバイオマーカーは確立されていない。そこで本研究では、医薬品開発でのバイオマーカーの活用を目指し、消化器毒性との関連が示唆されている血中アルギニン及びシトルリンについて、代謝性バイオマーカー候補としての有用性を検証した。

第二章では、肝障害と血中アルギニンの関連を調べた。肝障害物質又は骨格筋障害物質をラットに単回経口投与し、血中アルギニン及び ALT の測定と病理組織学的検査を実施した。その結果、肝障害モデルの血中アルギニンは、血中 ALT の上昇及び肝臓の病理組織変化と相関して低下した。骨格筋障害モデルでは、ALT は軽度の上昇したが、血中アルギニンの変動は見られなかった。よって、血中アルギニンは、ALT と異なる挙動を示す肝障害のバイオマーカーである可能性が示唆された。次に、肝障害時の血中アルギニン低下の機序を確認するため、アルギニンを分解する酵素であるアルギナーゼの血中濃度を調べた。その結果、血中アルギニンと血中アルギナーゼは負の相関を示した。さらにアルギニン水溶液に肝障害モデルの血漿を加えたところ、アルギニンは低下し、オルニチンが上昇した。これらの変化

はアルギナーゼ阻害剤存在下で観察されなかったことから、肝障害時の血中アルギニン低下は、肝臓から漏出したアルギナーゼに起因すると考えられた。血中のメタボローム解析でも肝障害時のアルギニン低下とオルニチン上昇が観察され、アルギナーゼの関与が裏付けられた。以上の結果から、アルギニン代謝、特にアルギニンからオルニチンへの経路が肝障害と関連し、血中アルギニン及びオルニチンは、肝障害の代謝性バイオマーカーとなる可能性が示唆された。

第三章では、消化管障害と血中シトルリンの関連を調べた。消化管毒性誘発化合物をラットに反復静脈内投与し、血中シトルリンの測定及び病理組織検査を実施した。その結果、血中シトルリンは、明らかな絨毛及び細胞萎縮、びらん、潰瘍を伴わない軽度の消化管障害に伴って低下した。次に、消化管障害時の血中シトルリン低下の機序を確認するため、消化管中の遺伝子発現と内因性代謝物の測定を行った。その結果、消化管中のシトルリン合成経路の遺伝子発現が低下し、シトルリンを含めた関連代謝物が消化管中で低下した。したがって、消化管障害時の血中シトルリン低下は、消化管におけるシトルリン生成の抑制を反映した変化と考えられた。血中のメタボローム解析では、消化管障害時にアルギニン及びシトルリンが低下したが、その他のアミノ酸の低下は観察されず、血中シトルリンの減少は栄養不良に応答したアミノ酸異化作用に起因する可能性は低いと考えられた。以上の結果から、血中シトルリン濃度は、明らかな絨毛及び細胞萎縮を伴わない軽度の消化管障害を反映し、消化管障害に対する感度の高いバイオマーカーであると考えられた。

第四章では、消化器障害に対するアルギニン及びシトルリンの有用性を総合的に考察した。血中アルギニンは複数の肝障害モデルで低下することから感度は高いが、消化管障害、肺障害、糖尿病等の条件下でも変動し、血中アルギニンやオルニチンを指標とした肝障害の判別には、これらの疾患の有無に留意する必要があると考えられた。また、血中シトルリンは軽度の消化管障害でも低下し、軽度から重度の消化管障害を反映する感度の高いバイオマーカーであることが示唆された。さらに、血中シトルリンの低下は消化管以外の臓器毒性ではみられず、消化管障害に対する特異性も高いと考えられた。一方、血中シトルリンは、他のアミノ酸と同様に極度の栄養不良で低下し、腎障害や高脂肪食で上昇することが知られている。そのため、これらの感度や特異性に影響する因子の有無に留意する必要があると考えられた。

以上、消化器障害に対する代謝性バイオマーカーとしてアルギニン及びシトルリンの有用性の検討を行い、それぞれ肝障害及び消化管障害を反映するバイオマーカーとしての可能性とその限界を明らかにした。本研究では、アルギニンやシトルリンのような代謝性バイオマーカーは、消化器毒性を感度よく反映した。しかし、他の臓器毒性や摂餌条件の影響を受ける可能性があり、単一の代謝物の変動を指標とした臓器毒性の同定は難しいと推察された。一方、代謝性バイオマーカーは、複数代謝物によるバイオマーカーパネルとして、臓器毒性の早期発見や機序解明に使用することも想定できる。今後、メタボローム解析によるスクリーニングを目的として、多様な臓器毒性を検出できるバイオマーカーパネルを構築

できれば、毒性の弱い化合物を効率的に取得して医薬品開発に貢献すると期待される。

## 謝辞

本論文の作成にあたり、主査又は副査として御審査、適切な御指示、御鞭撻を賜りました筑波大学大学院 生命環境科学研究科 生物機能科学専攻 深水 昭吉 教授、臼井 健郎 教授、木村 圭志 准教授、ならびに加香 孝一郎 講師に謹んで感謝いたします。本研究について適切な御指示及び御指導を賜りました生命環境科学研究科 生物機能科学専攻長、田中 俊之 教授に深謝いたします。

本研究の機会を与えて頂き、適切な御助言、御鞭撻を頂きました第一三共株式会社 研究開発本部長 高崎 渉 博士、安全性研究所長 森 和彦 博士、同安全性研究所グループ長 西矢 剛淑 博士に深く感謝いたします。

本研究の遂行にあたり、御助言、御討論及び卓越した技術を持ってご協力いただきました第一三共株式会社 平尾 潤 博士、白井 真人 博士、井口 拓馬 博士、山内 秀介 所員、渡辺 恭子 所員、高田 早苗 所員をはじめとした安全性研究所の皆様、ならびに第一三共 RD ノバーレ株式会社 辻 真 博士に心から感謝致します。

## 参考文献

1. Paul SM, Mytelka DS, Dunwiddie CT, Persinger CC, Munos BH, Lindborg SR, et al. How to improve R&D productivity: the pharmaceutical industry's grand challenge. *Nature reviews Drug discovery*. 2010;9(3):203-14. Epub 2010/02/20.
2. Schuhmacher A, Gassmann O, Hinder M. Changing R&D models in research-based pharmaceutical companies. *Journal of translational medicine*. 2016;14(1):105. Epub 2016/04/28.
3. Schomaker S, Ramaiah S, Khan N, Burkhardt J. Safety biomarker applications in drug development. *The Journal of toxicological sciences*. 2019;44(4):225-35. Epub 2019/04/05.
4. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2001;69(3):89-95. Epub 2001/03/10.
5. Ozer JS, Dieterle F, Troth S, Perentes E, Cordier A, Verdes P, et al. A panel of urinary biomarkers to monitor reversibility of renal injury and a serum marker with improved potential to assess renal function. *Nature biotechnology*. 2010;28(5):486-94. Epub 2010/05/12.
6. Vaidya VS, Ferguson MA, Bonventre JV. Biomarkers of acute kidney injury. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 2008;48:463-93. Epub 2007/10/17.
7. Griffin BR, Faubel S, Edelstein CL. Biomarkers of Drug-Induced Kidney Toxicity. *Therapeutic drug monitoring*. 2019;41(2):213-26. Epub 2019/03/19.
8. Arrowsmith J, Miller P. Trial watch: phase II and phase III attrition rates 2011-2012. *Nature reviews Drug discovery*. 2013;12(8):569. Epub 2013/08/02.
9. Cook D, Brown D, Alexander R, March R, Morgan P, Satterthwaite G, et al. Lessons learned from the fate of AstraZeneca's drug pipeline: a five-dimensional framework. *Nature reviews Drug discovery*. 2014;13(6):419-31. Epub 2014/05/17.
10. Takasuna K, Hagiwara T, Hirohashi M, Kato M, Nomura M, Nagai E, et al. Involvement of beta-glucuronidase in intestinal microflora in the intestinal toxicity of the antitumor camptothecin derivative irinotecan hydrochloride (CPT-11) in rats. *Cancer research*. 1996;56(16):3752-7. Epub 1996/08/15.
11. Acharya C, Sahingur SE, Bajaj JS. Microbiota, cirrhosis, and the emerging oral-gut-liver axis. *JCI insight*. 2017;2(19). Epub 2017/10/06.
12. Kakiuchi-Kiyota S, Koza-Taylor PH, Mantena SR, Nelms LF, Enayetallah AE, Hollingshead BD, et al. Comparison of hepatic transcription profiles of locked ribonucleic acid antisense oligonucleotides: evidence of distinct pathways contributing to non-target mediated toxicity in mice. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*. 2014;138(1):234-48. Epub 2013/12/18.
13. Swayze EE, Siwkowski AM, Wancewicz EV, Migawa MT, Wyrzykiewicz TK, Hung G, et

- al. Antisense oligonucleotides containing locked nucleic acid improve potency but cause significant hepatotoxicity in animals. *Nucleic acids research*. 2007;35(2):687-700. Epub 2006/12/22.
14. Nathwani RA, Pais S, Reynolds TB, Kaplowitz N. Serum alanine aminotransferase in skeletal muscle diseases. *Hepatology*. 2005;41(2):380-2. Epub 2005/01/22.
15. Crenn P, Vahedi K, Lavergne-Slove A, Cynober L, Matuchansky C, Messing B. Plasma citrulline: A marker of enterocyte mass in villous atrophy-associated small bowel disease. *Gastroenterology*. 2003;124(5):1210-9. Epub 2003/05/06.
16. Trennery PN, Waring RH. Early changes in thioacetamide-induced liver damage. *Toxicology letters*. 1983;19(3):299-307. Epub 1983/12/01.
17. Ozer J, Ratner M, Shaw M, Bailey W, Schomaker S. The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. *Toxicology*. 2008;245(3):194-205. Epub 2008/02/23.
18. Vijaya S, Nagarajan B. Arginine metabolism in rat liver after hepatic damage. *Biochemical medicine*. 1982;27(1):86-94. Epub 1982/02/01.
19. Jenkinson CP, Grody WW, Cederbaum SD. Comparative properties of arginases. *Comparative biochemistry and physiology Part B, Biochemistry & molecular biology*. 1996;114(1):107-32. Epub 1996/05/01.
20. Houdijk AP, Teerlink T, Visser JJ, van Lambalgen AA, van Leeuwen PA. Arginine deficiency in bile duct-ligated rats after surgery: the role of plasma arginase and gut endotoxin restriction. *Gastroenterology*. 1997;113(4):1375-83. Epub 1997/10/10.
21. Roth E, Steininger R, Winkler S, Langle F, Grunberger T, Fugger R, et al. L-Arginine deficiency after liver transplantation as an effect of arginase efflux from the graft. Influence on nitric oxide metabolism. *Transplantation*. 1994;57(5):665-9. Epub 1994/03/15.
22. Yagnik GP, Takahashi Y, Tsoulfas G, Reid K, Murase N, Geller DA. Blockade of the L-arginine/NO synthase pathway worsens hepatic apoptosis and liver transplant preservation injury. *Hepatology*. 2002;36(3):573-81. Epub 2002/08/29.
23. Wu G, Morris SM, Jr. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *The Biochemical journal*. 1998;336 ( Pt 1):1-17. Epub 1998/11/10.
24. Ishihara K, Katsutani N, Aoki T. A metabonomics study of the hepatotoxicants galactosamine, methylene dianiline and clofibrate in rats. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*. 2006;99(3):251-60. Epub 2006/08/26.
25. Soga T, Baran R, Suematsu M, Ueno Y, Ikeda S, Sakurakawa T, et al. Differential metabolomics reveals ophthalmic acid as an oxidative stress biomarker indicating hepatic glutathione consumption. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(24):16768-76. Epub 2006/04/13.
26. Chen C, Krausz KW, Idle JR, Gonzalez FJ. Identification of novel toxicity-associated



metabolites by metabolomics and mass isotopomer analysis of acetaminophen metabolism in wild-type and Cyp2e1-null mice. *The Journal of biological chemistry*. 2008;283(8):4543-59. Epub 2007/12/21.

27. Evans AM, DeHaven CD, Barrett T, Mitchell M, Milgram E. Integrated, nontargeted ultrahigh performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry platform for the identification and relative quantification of the small-molecule complement of biological systems. *Analytical chemistry*. 2009;81(16):6656-67. Epub 2009/07/25.

28. Takei M, Ando Y, Saitoh W, Tanimoto T, Kiyosawa N, Manabe S, et al. Ethylene glycol monomethyl ether-induced toxicity is mediated through the inhibition of flavoprotein dehydrogenase enzyme family. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*. 2010;118(2):643-52. Epub 2010/07/10.

29. Cao Q, Batey R, Pang G, Russell A, Clancy R. IL-6, IFN-gamma and TNF-alpha production by liver-associated T cells and acute liver injury in rats administered concanavalin A. *Immunology and cell biology*. 1998;76(6):542-9. Epub 1999/01/20.

30. Copple BL, Banes A, Ganey PE, Roth RA. Endothelial cell injury and fibrin deposition in rat liver after monocrotaline exposure. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*. 2002;65(2):309-18. Epub 2002/01/29.

31. Desmet VJ, Krstulovic B, Van Damme B. Histochemical study of rat liver in alpha-naphthyl isothiocyanate (ANIT) induced cholestasis. *The American journal of pathology*. 1968;52(2):401-21. Epub 1968/02/01.

32. Waters NJ, Holmes E, Williams A, Waterfield CJ, Farrant RD, Nicholson JK. NMR and pattern recognition studies on the time-related metabolic effects of alpha-naphthylisothiocyanate on liver, urine, and plasma in the rat: an integrative metabolomic approach. *Chemical research in toxicology*. 2001;14(10):1401-12. Epub 2001/10/16.

33. Pluskal T, Castillo S, Villar-Briones A, Oresic M. MZmine 2: modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. *BMC bioinformatics*. 2010;11:395. Epub 2010/07/24.

34. Murayama H, Ikemoto M, Fukuda Y, Tsunekawa S, Nagata A. Advantage of serum type-I arginase and ornithine carbamoyltransferase in the evaluation of acute and chronic liver damage induced by thioacetamide in rats. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2007;375(1-2):63-8. Epub 2006/07/29.

35. Murayama H, Ikemoto M, Fukuda Y, Nagata A. Superiority of serum type-I arginase and ornithine carbamoyltransferase in the detection of toxicant-induced acute hepatic injury in rats. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2008;391(1-2):31-5. Epub 2008/02/19.

36. Yamazaki M, Miyake M, Sato H, Masutomi N, Tsutsui N, Adam KP, et al. Perturbation of bile acid homeostasis is an early pathogenesis event of drug induced liver injury in rats. *Toxicology and applied pharmacology*. 2013;268(1):79-89. Epub 2013/01/31.
37. Frohlich J, Seccombe DW, Hahn P, Dodek P, Hynie I. Effect of fasting on free and esterified carnitine levels in human serum and urine: correlation with serum levels of free fatty acids and beta-hydroxybutyrate. *Metabolism: clinical and experimental*. 1978;27(5):555-61. Epub 1978/05/01.
38. Nagasawa T, Yoshizawa F, Nishizawa N. Plasma N tau-methylhistidine concentration is a sensitive index of myofibrillar protein degradation during starvation in rats. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 1996;60(3):501-2. Epub 1996/03/01.
39. Bloxam DL. Nutritional aspects of amino acid metabolism. 2. The effects of starvation on hepatic portal-venous differences in plasma amino acid concentration and on liver amino acid concentrations in the rat. *The British journal of nutrition*. 1972;27(2):233-47. Epub 1972/03/01.
40. Holecek M, Kovarik M. Alterations in protein metabolism and amino acid concentrations in rats fed by a high-protein (casein-enriched) diet - effect of starvation. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. 2011;49(12):3336-42. Epub 2011/10/04.
41. Robertson DG, Ruepp SU, Stryker SA, Hnatyshyn SY, Shipkova PA, Aranibar N, et al. Metabolomic and transcriptomic changes induced by overnight (16 h) fasting in male and female Sprague-Dawley rats. *Chemical research in toxicology*. 2011;24(4):481-7. Epub 2011/03/09.
42. McGuire DM, Gross MD, Elde RP, van Pilsum JF. Localization of L-arginine-glycine amidinotransferase protein in rat tissues by immunofluorescence microscopy. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*. 1986;34(4):429-35. Epub 1986/04/01.
43. Van Pilsum JF, Stephens GC, Taylor D. Distribution of creatine, guanidinoacetate and enzymes for their biosynthesis in the animal kingdom. Implications for phylogeny. *The Biochemical journal*. 1972;126(2):325-45. Epub 1972/01/01.
44. Sjolander A, Magnusson KE, Latkovic S. Morphological changes of rat small intestine after short-time exposure to concanavalin A or wheat germ agglutinin. *Cell structure and function*. 1986;11(3):285-93. Epub 1986/09/01.
45. Crenn P, Messing B, Cynober L. Citrulline as a biomarker of intestinal failure due to enterocyte mass reduction. *Clin Nutr*. 2008;27(3):328-39. Epub 2008/04/29.
46. Ozturk F, Ucar M, Ozturk IC, Vardi N, Batcioglu K. Carbon tetrachloride-induced nephrotoxicity and protective effect of betaine in Sprague-Dawley rats. *Urology*.

2003;62(2):353-6. Epub 2003/08/02.

47. John-Baptiste A, Huang W, Kindt E, Wu A, Vitsky A, Scott W, et al. Evaluation of potential gastrointestinal biomarkers in a PAK4 inhibitor-treated preclinical toxicity model to address unmonitorable gastrointestinal toxicity. *Toxicologic pathology*. 2012;40(3):482-90. Epub 2012/03/08.

48. Barzal JA, Szczylik C, Rzepecki P, Jaworska M, Anuszevska E. Plasma citrulline level as a biomarker for cancer therapy-induced small bowel mucosal damage. *Acta biochimica Polonica*. 2014;61(4):615-31. Epub 2014/12/05.

49. van de Poll MC, Ligthart-Melis GC, Boelens PG, Deutz NE, van Leeuwen PA, Dejong CH. Intestinal and hepatic metabolism of glutamine and citrulline in humans. *The Journal of physiology*. 2007;581(Pt 2):819-27. Epub 2007/03/10.

50. Windmueller HG, Spaeth AE. Source and fate of circulating citrulline. *The American journal of physiology*. 1981;241(6):E473-80. Epub 1981/12/01.

51. Boukhettala N, Leblond J, Claeysens S, Faure M, Le Pessot F, Bole-Feysot C, et al. Methotrexate induces intestinal mucositis and alters gut protein metabolism independently of reduced food intake. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2009;296(1):E182-90. Epub 2008/11/06.

52. Gutierrez IM, Fisher JG, Ben-Ishay O, Jones BA, Kang KH, Hull MA, et al. Citrulline levels following proximal versus distal small bowel resection. *Journal of pediatric surgery*. 2014;49(5):741-4. Epub 2014/05/24.

53. Herbers AH, Feuth T, Donnelly JP, Blijlevens NM. Citrulline-based assessment score: first choice for measuring and monitoring intestinal failure after high-dose chemotherapy. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2010;21(8):1706-11. Epub 2010/01/22.

54. Lutgens LC, Deutz NE, Gueulette J, Cleutjens JP, Berger MP, Wouters BG, et al. Citrulline: a physiologic marker enabling quantitation and monitoring of epithelial radiation-induced small bowel damage. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2003;57(4):1067-74. Epub 2003/10/25.

55. Kume S, Yamato M, Tamura Y, Jin G, Nakano M, Miyashige Y, et al. Potential biomarkers of fatigue identified by plasma metabolome analysis in rats. *PloS one*. 2015;10(3):e0120106. Epub 2015/03/21.

56. Coeffier M, Claeysens S, Hecketsweiler B, Lavoine A, Ducrotte P, Dechelotte P. Enteral glutamine stimulates protein synthesis and decreases ubiquitin mRNA level in human gut mucosa. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2003;285(2):G266-73. Epub 2003/04/19.

57. Samuels SE, Taillandier D, Aourousseau E, Cherel Y, Le Maho Y, Arnal M, et al.

- Gastrointestinal tract protein synthesis and mRNA levels for proteolytic systems in adult fasted rats. *The American journal of physiology*. 1996;271(2 Pt 1):E232-8. Epub 1996/08/01.
58. Saitoh W, Yamauchi S, Watanabe K, Takasaki W, Mori K. Metabolomic analysis of arginine metabolism in acute hepatic injury in rats. *The Journal of toxicological sciences*. 2014;39(1):41-50. Epub 2014/01/15.
59. Ginguay A, Cynober L, Curis E, Nicolis I. Ornithine Aminotransferase, an Important Glutamate-Metabolizing Enzyme at the Crossroads of Multiple Metabolic Pathways. *Biology*. 2017;6(1). Epub 2017/03/09.
60. Leung KT, Chan KY, Ma TP, Yu JW, Tong JH, Tam YH, et al. Dysregulated expression of arginine metabolic enzymes in human intestinal tissues of necrotizing enterocolitis and response of CaCO<sub>2</sub> cells to bacterial components. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2016;29:64-72. Epub 2016/02/21.
61. Yao Y, Zhang P, Wang J, Chen J, Wang Y, Huang Y, et al. Dissecting Target Toxic Tissue and Tissue Specific Responses of Irinotecan in Rats Using Metabolomics Approach. *Frontiers in pharmacology*. 2017;8:122. Epub 2017/03/28.
62. Kim MH, Kim H. The Roles of Glutamine in the Intestine and Its Implication in Intestinal Diseases. *International journal of molecular sciences*. 2017;18(5). Epub 2017/05/13.
63. Ceballos I, Chauveau P, Guerin V, Bardet J, Parvy P, Kamoun P, et al. Early alterations of plasma free amino acids in chronic renal failure. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 1990;188(2):101-8. Epub 1990/04/30.
64. Viant MR, Ebbels TMD, Beger RD, Ekman DR, Epps DJT, Kamp H, et al. Use cases, best practice and reporting standards for metabolomics in regulatory toxicology. *Nature communications*. 2019;10(1):3041. Epub 2019/07/12.
65. Goldstein RA. Skeletal Muscle Injury Biomarkers: Assay Qualification Efforts and Translation to the Clinic. *Toxicologic pathology*. 2017;45(7):943-51. Epub 2017/11/23.
66. Richir MC, Siroen MP, van Elburg RM, Fetter WP, Quik F, Nijveldt RJ, et al. Low plasma concentrations of arginine and asymmetric dimethylarginine in premature infants with necrotizing enterocolitis. *The British journal of nutrition*. 2007;97(5):906-11. Epub 2007/03/27.
67. Marini JC, Didelija IC, Castillo L, Lee B. Plasma arginine and ornithine are the main citrulline precursors in mice infused with arginine-free diets. *The Journal of nutrition*. 2010;140(8):1432-7. Epub 2010/06/25.
68. Breuillard C, Cynober L, Moinard C. Citrulline and nitrogen homeostasis: an overview. *Amino acids*. 2015;47(4):685-91. Epub 2015/02/14.
69. Wu G, Bazer FW, Davis TA, Kim SW, Li P, Marc Rhoads J, et al. Arginine metabolism and nutrition in growth, health and disease. *Amino acids*. 2009;37(1):153-68. Epub 2008/11/26.

70. Morris SM, Jr. Arginine metabolism: boundaries of our knowledge. *The Journal of nutrition*. 2007;137(6 Suppl 2):1602S-9S. Epub 2007/05/22.
71. Scott JA, North ML, Rafii M, Huang H, Pencharz P, Grasemann H. Plasma arginine metabolites reflect airway dysfunction in a murine model of allergic airway inflammation. *J Appl Physiol (1985)*. 2015;118(10):1229-33. Epub 2015/05/17.
72. Kovamees O, Shemyakin A, Pernow J. Amino acid metabolism reflecting arginase activity is increased in patients with type 2 diabetes and associated with endothelial dysfunction. *Diabetes & vascular disease research*. 2016;13(5):354-60. Epub 2016/05/18.
73. Caldwell RW, Rodriguez PC, Toque HA, Narayanan SP, Caldwell RB. Arginase: A Multifaceted Enzyme Important in Health and Disease. *Physiological reviews*. 2018;98(2):641-65. Epub 2018/02/08.
74. Peters JH, Wierdsma NJ, Teerlink T, van Leeuwen PA, Mulder CJ, van Bodegraven AA. Poor diagnostic accuracy of a single fasting plasma citrulline concentration to assess intestinal energy absorption capacity. *The American journal of gastroenterology*. 2007;102(12):2814-9. Epub 2007/09/04.
75. Holecek M, Skalska H, Mraz J. Plasma amino acid levels after carbon tetrachloride induced acute liver damage. A dose-response and time-response study in rats. *Amino acids*. 1999;16(1):1-11. Epub 1999/03/17.
76. Tharakan JF, Yu YM, Zurakowski D, Roth RM, Young VR, Castillo L. Adaptation to a long term (4 weeks) arginine- and precursor (glutamate, proline and aspartate)-free diet. *Clin Nutr*. 2008;27(4):513-22. Epub 2008/07/02.
77. Li R, Dai J, Kang H. The construction of a panel of serum amino acids for the identification of early chronic kidney disease patients. *Journal of clinical laboratory analysis*. 2018;32(3). Epub 2017/06/24.
78. Sailer M, Dahlhoff C, Giesbertz P, Eidens MK, de Wit N, Rubio-Aliaga I, et al. Increased plasma citrulline in mice marks diet-induced obesity and may predict the development of the metabolic syndrome. *PloS one*. 2013;8(5):e63950. Epub 2013/05/22.
79. Church RJ, Kullak-Ublick GA, Aubrecht J, Bonkovsky HL, Chalasani N, Fontana RJ, et al. Candidate biomarkers for the diagnosis and prognosis of drug-induced liver injury: An international collaborative effort. *Hepatology*. 2019;69(2):760-73. Epub 2018/01/23.
80. Thulin P, Hornby RJ, Auli M, Nordahl G, Antoine DJ, Starkey Lewis P, et al. A longitudinal assessment of miR-122 and GLDH as biomarkers of drug-induced liver injury in the rat. *Biomarkers : biochemical indicators of exposure, response, and susceptibility to chemicals*. 2017;22(5):461-9. Epub 2016/12/17.
81. Flanigan KM, Voit T, Rosales XQ, Servais L, Kraus JE, Wardell C, et al. Pharmacokinetics and safety of single doses of drisapersen in non-ambulant subjects with Duchenne muscular

- dystrophy: results of a double-blind randomized clinical trial. *Neuromuscular disorders : NMD*. 2014;24(1):16-24. Epub 2013/12/11.
82. McGill MR. The past and present of serum aminotransferases and the future of liver injury biomarkers. *EXCLI journal*. 2016;15:817-28. Epub 2016/01/01.
83. Sharapova T, Devanarayan V, LeRoy B, Liguori MJ, Blomme E, Buck W, et al. Evaluation of miR-122 as a Serum Biomarker for Hepatotoxicity in Investigative Rat Toxicology Studies. *Veterinary pathology*. 2016;53(1):211-21. Epub 2015/07/01.
84. Wang K, Zhang S, Marzolf B, Troisch P, Brightman A, Hu Z, et al. Circulating microRNAs, potential biomarkers for drug-induced liver injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(11):4402-7. Epub 2009/02/28.
85. Gaskell H, Ge X, Nieto N. High-Mobility Group Box-1 and Liver Disease. *Hepatology communications*. 2018;2(9):1005-20. Epub 2018/09/12.
86. Antoine DJ, Williams DP, Kipar A, Jenkins RE, Regan SL, Sathish JG, et al. High-mobility group box-1 protein and keratin-18, circulating serum proteins informative of acetaminophen-induced necrosis and apoptosis in vivo. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*. 2009;112(2):521-31. Epub 2009/09/29.
87. Antoine DJ, Dear JW, Lewis PS, Platt V, Coyle J, Masson M, et al. Mechanistic biomarkers provide early and sensitive detection of acetaminophen-induced acute liver injury at first presentation to hospital. *Hepatology*. 2013;58(2):777-87. Epub 2013/02/08.
88. Antoine DJ, Jenkins RE, Dear JW, Williams DP, McGill MR, Sharpe MR, et al. Molecular forms of HMGB1 and keratin-18 as mechanistic biomarkers for mode of cell death and prognosis during clinical acetaminophen hepatotoxicity. *Journal of hepatology*. 2012;56(5):1070-9. Epub 2012/01/24.
89. Church RJ, Watkins PB. The transformation in biomarker detection and management of drug-induced liver injury. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*. 2017;37(11):1582-90. Epub 2017/04/08.
90. Kalabat DY, Vitsky A, Scott W, Kindt E, Hayes K, John-Baptiste A, et al. Identification and Evaluation of Novel MicroRNA Biomarkers in Plasma and Feces Associated with Drug-induced Intestinal Toxicity. *Toxicologic pathology*. 2017;45(2):302-20. Epub 2016/05/18.
91. Shen LJ, Guan YY, Wu XP, Wang Q, Wang L, Xiao T, et al. Serum citrulline as a diagnostic marker of sepsis-induced intestinal dysfunction. *Clinics and research in hepatology and gastroenterology*. 2015;39(2):230-6. Epub 2014/12/03.
92. Miyoshi J, Miyamoto H, Goji T, Taniguchi T, Tomonari T, Sogabe M, et al. Serum diamine oxidase activity as a predictor of gastrointestinal toxicity and malnutrition due to anticancer drugs. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2015;30(11):1582-90. Epub 2015/05/15.
93. Moriyama K, Kouchi Y, Morinaga H, Irimura K, Hayashi T, Ohuchida A, et al. Diamine

- oxidase, a plasma biomarker in rats to GI tract toxicity of oral fluorouracil anti-cancer drugs. *Toxicology*. 2006;217(2-3):233-9. Epub 2005/11/10.
94. Wiercinska-Drapalo A, Jaroszewicz J, Siwak E, Pogorzelska J, Prokopowicz D. Intestinal fatty acid binding protein (I-FABP) as a possible biomarker of ileitis in patients with ulcerative colitis. *Regulatory peptides*. 2008;147(1-3):25-8. Epub 2008/01/19.
95. Zhang ZQ, Meng H, Wang N, Liang LN, Liu LN, Lu SM, et al. Serum microRNA 143 and microRNA 215 as potential biomarkers for the diagnosis of chronic hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Diagnostic pathology*. 2014;9:135. Epub 2014/07/06.
96. Jeppesen PB, Pertkiewicz M, Messing B, Iyer K, Seidner DL, O'Keefe S J, et al. Teduglutide reduces need for parenteral support among patients with short bowel syndrome with intestinal failure. *Gastroenterology*. 2012;143(6):1473-81 e3. Epub 2012/09/18.
97. Yamaguchi N, Mahbub MH, Takahashi H, Hase R, Ishimaru Y, Sunagawa H, et al. Plasma free amino acid profiles evaluate risk of metabolic syndrome, diabetes, dyslipidemia, and hypertension in a large Asian population. *Environmental health and preventive medicine*. 2017;22(1):35. Epub 2017/11/23.
98. Yamakado M, Nagao K, Imaizumi A, Tani M, Toda A, Tanaka T, et al. Plasma Free Amino Acid Profiles Predict Four-Year Risk of Developing Diabetes, Metabolic Syndrome, Dyslipidemia, and Hypertension in Japanese Population. *Scientific reports*. 2015;5:11918. Epub 2015/07/15.
99. Miyagi Y, Higashiyama M, Gochi A, Akaike M, Ishikawa T, Miura T, et al. Plasma free amino acid profiling of five types of cancer patients and its application for early detection. *PloS one*. 2011;6(9):e24143. Epub 2011/09/15.
100. Benito S, Sanchez-Ortega A, Unceta N, Jansen JJ, Postma G, Andrade F, et al. Plasma biomarker discovery for early chronic kidney disease diagnosis based on chemometric approaches using LC-QTOF targeted metabolomics data. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2018;149:46-56. Epub 2017/11/04.
101. Soga T, Sugimoto M, Honma M, Mori M, Igarashi K, Kashikura K, et al. Serum metabolomics reveals gamma-glutamyl dipeptides as biomarkers for discrimination among different forms of liver disease. *Journal of hepatology*. 2011;55(4):896-905. Epub 2011/02/22.
102. Takeuchi K, Ohishi M, Endo K, Suzumura K, Naraoka H, Ohata T, et al. Hydroxyproline, a serum biomarker candidate for gastric ulcer in rats: a comparison study of metabolic analysis of gastric ulcer models induced by ethanol, stress, and aspirin. *Biomarker insights*. 2014;9:61-6. Epub 2014/08/16.
103. Thompson KL, Zhang J, Stewart S, Rosenzweig BA, Shea K, Mans D, et al. Comparison of urinary and serum levels of di-22:6-bis(monoacylglycerol)phosphate as noninvasive biomarkers of phospholipidosis in rats. *Toxicology letters*. 2012;213(2):285-91. Epub

2012/07/26.

104. Liu N, Tengstrand EA, Chourb L, Hsieh FY. Di-22:6-bis(monoacylglycerol)phosphate: A clinical biomarker of drug-induced phospholipidosis for drug development and safety assessment. *Toxicology and applied pharmacology*. 2014;279(3):467-76. Epub 2014/06/27.
105. Trivedi DK, Hollywood KA, Goodacre R. Metabolomics for the masses: The future of metabolomics in a personalized world. *New horizons in translational medicine*. 2017;3(6):294-305. Epub 2017/11/03.
106. Kao CC, Cope JL, Hsu JW, Dwarkanath P, Karnes JM, Luna RA, et al. The Microbiome, Intestinal Function, and Arginine Metabolism of Healthy Indian Women Are Different from Those of American and Jamaican Women. *The Journal of nutrition*. 2016. Epub 2016/03/11.
107. Dirin M, Winkler J. Influence of diverse chemical modifications on the ADME characteristics and toxicology of antisense oligonucleotides. *Expert opinion on biological therapy*. 2013;13(6):875-88. Epub 2013/03/05.
108. Burdick AD, Sciabola S, Mantena SR, Hollingshead BD, Stanton R, Warneke JA, et al. Sequence motifs associated with hepatotoxicity of locked nucleic acid--modified antisense oligonucleotides. *Nucleic acids research*. 2014;42(8):4882-91. Epub 2014/02/20.
109. Kamola PJ, Maratou K, Wilson PA, Rush K, Mullaney T, McKeivitt T, et al. Strategies for In Vivo Screening and Mitigation of Hepatotoxicity Associated with Antisense Drugs. *Molecular therapy Nucleic acids*. 2017;8:383-94. Epub 2017/09/18.
110. Bowen JM, Mayo BJ, Plews E, Bateman E, Wignall A, Stringer AM, et al. Determining the mechanisms of lapatinib-induced diarrhoea using a rat model. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 2014;74(3):617-27. Epub 2014/07/25.
111. Khozin S, Weinstock C, Blumenthal GM, Cheng J, He K, Zhuang L, et al. Osimertinib for the Treatment of Metastatic EGFR T790M Mutation-Positive Non-Small Cell Lung Cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2017;23(9):2131-5. Epub 2016/12/08.
112. Pitkanen HT, Oja SS, Kemppainen K, Seppa JM, Mero AA. Serum amino acid concentrations in aging men and women. *Amino acids*. 2003;24(4):413-21. Epub 2003/05/28.
113. Minami Y, Kasukawa T, Kakazu Y, Iigo M, Sugimoto M, Ikeda S, et al. Measurement of internal body time by blood metabolomics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(24):9890-5. Epub 2009/06/03.
114. Davis JS, Darcy CJ, Piera K, McNeil YR, Woodberry T, Anstey NM. Ex-vivo changes in amino acid concentrations from blood stored at room temperature or on ice: implications for arginine and taurine measurements. *BMC clinical pathology*. 2009;9:10. Epub 2009/11/28.
115. Takehana S, Yoshida H, Ozawa S, Yamazaki J, Shimbo K, Nakayama A, et al. The effects of pre-analysis sample handling on human plasma amino acid concentrations. *Clinica*



- chimica acta; international journal of clinical chemistry. 2016;455:68-74. Epub 2016/02/02.
116. Lee MY, Hu T. Computational Methods for the Discovery of Metabolic Markers of Complex Traits. *Metabolites*. 2019;9(4). Epub 2019/04/17.
117. Varma VR, Oommen AM, Varma S, Casanova R, An Y, Andrews RM, et al. Brain and blood metabolite signatures of pathology and progression in Alzheimer disease: A targeted metabolomics study. *PLoS medicine*. 2018;15(1):e1002482. Epub 2018/01/26.
118. Alakwaa FM, Chaudhary K, Garmire LX. Deep Learning Accurately Predicts Estrogen Receptor Status in Breast Cancer Metabolomics Data. *Journal of proteome research*. 2018;17(1):337-47. Epub 2017/11/08.