

薬物の腎排泄に対する  
尿毒症物質の影響に関する研究

平成 28 年度

市 村 祐 一



## SUMMARY

**Objective:** The main objectives of this study were to assess whether the plasma levels of uremic toxins (UTs) are predictable in hemodialysis (HD) patients and to investigate the effects of a variety of UTs on the renal transport of drugs.

**Method:** Plasma levels of indoxyl sulfate (IS), indoleacetic acid (IA) and 3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropionic acid (CMPF) were determined in twenty outpatients undergoing HD at the Sapporo Higashi Tokushukai Hospital. Correlations among plasma levels of these three UTs and between their plasma levels and serum creatinine (Scr), blood urea nitrogen (BUN) or estimated glomerular filtration rate (eGFR) were evaluated. Binding ratios of IS, IA and CMPF to human serum albumin (HSA) and their effects on the pravastatin binding to HSA were also investigated using ultrafiltration method. Moreover, the effects of various UTs on the uptake of drugs into rat renal cortical slices were evaluated.

**Result:** Mean plasma IS levels in HD patients were much greater than plasma CMPF and IA levels. Although mean plasma IA level before HD was 2.2-fold greater than that of healthy subjects, its mean plasma levels immediately after HD decreased to similar level of healthy subjects. Mean plasma level of CMPF before HD was 5.2-fold greater compared with that of healthy subjects, and the value did not change after HD. When evaluating correlations between plasma levels of these UTs and laboratory values, good correlations were obtained between IS and Scr or eGFR. Pravastatin binding to HSA was inhibited markedly by IS and IA not by CMPF, indicating that pravastatin binds to site II on HSA.

IS and IA significantly inhibited the uptake of meropenem (MEPM) and methotrexate (MTX) into rat renal cortical slices. However, MTX uptake was not affected by MEPM, implying that different transporters are involved in the uptake of these two anionic drugs. Biapenem (BIPM) uptake into rat renal cortical slices decreased in the presence of IS, IA and CMPF, all substrates of organic anion transporters (OATs). However, methylguanidine (MG), an inhibitor of organic cation transporters, did not modulate BIPM uptake. Guanidine (GU) and MG inhibited metformin (MET) uptake, but IS and guanidinosuccinic acid (GSA) failed to do it. Although creatinine (Cr) significantly inhibited the uptakes of MEPM, MTX and BIPM, Cr did not influence MET uptake.

**Conclusion:** It was suggested that IS highly accumulated in HD patients and that plasma IS levels could be predictable based on Scr or eGFR. UTs are capable of modulating drug binding to HSA, and affecting the renal transport of drugs. The mechanisms by which UTs interfere with drug transport are diverse.

## 略語集

BIPM : biapenem, ビアペネム

BSA : body surface area, 体表面積

BUN : blood urea nitrogen, 血中尿素窒素

CKD : chronic kidney disease, 慢性腎臓病

CMPF : 3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropionic acid, 3-カルボキシ-4-メチル-5-プロピル-2-フランプロピオン酸

Cr : creatinine, クレアチニン

DPBS : Dulbecco's phosphate buffered saline, ダルベッコのリン酸緩衝液

eGFR : estimated glomerular filtration rate, 推算糸球体ろ過量

ESRD : end stage renal disease, 末期腎不全

GSA : guanidosuccinic acid, グアニジノコハク酸

GU : guanidine, グアニジン

HD : hemodialysis, 血液透析

HEK293 : human embryonic kidney cell, ヒト胚腎由来細胞株

HMG-CoA : 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A, 3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル補酵素 A

HPLC : high-performance liquid chromatography, 高速液体クロマトグラフィー

HSA : human serum albumin, ヒト血清アルブミン

IA : indoleacetic acid, インドール酢酸

IS : indoxyl sulfate, インドキシル硫酸

MATE : multidrug and toxin extrusion protein, 多剤排出タンパク質

MDCK : Madin-Darby canine kidney, イヌ腎尿細管上皮細胞株

MEPM : meropenem, メロペネム

MET : metformin, メトホルミン

MG : methylguanidine, メチルグアニジン

MPP : 1-methyl-4-phenylpyridinium, 1-メチル-4-フェニルピリジニウム

MRP : multidrug resistance associated protein, 多剤耐性関連タンパク質

5-MTHF : 5-methyltetrahydrofolate, 5-メチルテトラヒドロ葉酸

MTX : methotrexate, メトトレキサート

OAT : organic anion transporter, 有機アニオン輸送担体

OATP : organic anion transporting polypeptide, 有機アニオン輸送ポリペプチド

OCT : organic cation transporter, 有機カチオン輸送担体

PAH : *p*-aminohippuric acid, パラアミノ馬尿酸

PCG : penicillin G, ベンジルペニシリン

P-gp : P-glycoprotein, P-糖タンパク質

RFC : reduced folate carrier, 還元型葉酸輸送担体

Scr : serum creatinine, 血清クレアチニン

TEA : tetraethylammonium, テトラエチルアンモニウム

UTs : uremic toxins, 尿毒症物質

UV : ultraviolet, 紫外線

## 目次

序論.....	1
第1部 アニオン性尿毒症物質の血液透析患者における 血漿中濃度と血漿タンパク結合.....	6
第1章 血液透析患者における3種アニオン性尿毒症物質の 血漿中濃度の比較.....	6
第1節 緒言.....	6
第2節 実験方法.....	7
第1項 使用薬物および試薬.....	7
第2項 血液透析患者および健常被験者からの 血液試料の採取.....	8
第3項 インドキシル硫酸, インドール酢酸および3-カルボキシ-4- メチル-5-プロピル-2-フランプロピオン酸の定量.....	8
第4項 統計処理.....	9
第3節 実験結果.....	10
第1項 インドキシル硫酸の透析前後における血漿中濃度.....	10
第2項 インドール酢酸の透析前後における血漿中濃度.....	11
第3項 3-カルボキシ-4-メチル-5-プロピル-2- フランプロピオン酸の透析前後における血漿中濃度.....	12
第4節 考察.....	13
第2章 血液透析患者におけるアニオン性尿毒症物質の血漿中濃度の 相関性.....	14
第1節 緒言.....	14
第2節 実験方法.....	14
第1項 臨床検査値の調査.....	14
第2項 統計処理.....	16
第3節 結果.....	17
第1項 血液透析患者における血漿中インドキシル硫酸, インドール酢酸および3-カルボキシ-4-メチル-5-プロピル-2- フランプロピオン酸濃度の相関性.....	17
第2項 血液透析患者の血漿中インドキシル硫酸, インドール酢酸および3-カルボキシ-4-メチル-5-プロピル-2- フランプロピオン酸濃度と腎機能検査値の相関性.....	19
第4節 考察.....	22

第3章	アニオン性尿毒症物質の血漿タンパク結合特性.....	24
第1節	緒言.....	24
第2節	実験方法.....	25
第1項	使用薬物および試薬.....	25
第2項	限外ろ過法によるインドキシル硫酸, インドール酢酸および 3-カルボキシ-4-メチル-5-プロピル-2-フランプロピオン酸の ヒト血清アルブミンへの結合実験.....	26
(1)	薬物溶液の調製.....	26
(2)	ヒト血清アルブミンへのインドキシル硫酸, インドール酢酸および 3-カルボキシ-4-メチル-5-プロピル-2-フランプロピオン酸の 結合率の測定.....	26
第3項	ヒト血清アルブミンへのプラバスタチン結合に対する インドキシル硫酸, インドール酢酸および3-カルボキシ-4- メチル-5-プロピル-2-フランプロピオン酸の影響.....	27
(1)	薬物溶液の調製.....	27
(2)	インドキシル硫酸, インドール酢酸または3-カルボキシ-4-メチル- 5-プロピル-2-フランプロピオン酸共存下におけるヒト血清 アルブミンへのプラバスタチンの結合率の測定.....	27
第4項	プラバスタチンの定量.....	28
第5項	統計処理.....	28
第3節	結果.....	29
第1項	ヒト血清アルブミンへのインドキシル硫酸, インドール酢酸および3-カルボキシ-4-メチル-5-プロピル-2- フランプロピオン酸の結合率.....	29
第2項	インドキシル硫酸, インドール酢酸および3-カルボキシ-4- メチル-5-プロピル-2-フランプロピオン酸共存下における ヒト血清アルブミンへのプラバスタチンの結合の変化.....	30
第4節	考察.....	31
第2部	腎における薬物輸送に対する種々尿毒症物質の影響.....	33
第1章	ラット腎皮質スライスへのアニオン性薬物の取り込みに対する 尿毒症物質の影響に関する検討.....	33
第1節	緒言.....	33
第2節	実験方法.....	35

第 1 項	使用薬物および試薬.....	35
第 2 項	ラット腎皮質スライスを用いた取り込み実験.....	36
	(1) 実験動物.....	36
	(2) 薬物溶液の調製.....	36
	(3) ラット腎皮質スライスへの取り込み実験.....	36
第 3 項	薬物の定量.....	37
第 4 項	統計処理.....	37
第 3 節	実験結果.....	38
第 1 項	ラット腎皮質スライスへのメトトレキサートの 取り込み挙動.....	38
第 2 項	ラット腎皮質スライスへのメトトレキサート取り込みに 対するインドキシル硫酸およびインドール酢酸の影響.....	39
第 3 項	ラット腎皮質スライスへのメロペネム取り込みに対する インドキシル硫酸, インドール酢酸および 3-カルボキシ-4- メチル-5-プロピル-2-フランプロピオン酸の影響.....	40
第 4 項	ラット腎皮質スライスへのメトトレキサート取り込みに 対するメロペネムの影響.....	42
第 4 節	考察.....	43
第 2 章	両イオン性薬物ピアペネムのラット腎皮質スライス取り込みに 対する尿毒症物質の影響.....	46
第 1 節	緒言.....	46
第 2 節	実験方法.....	47
第 1 項	使用薬物および試薬.....	47
第 2 項	ラット腎皮質スライスを用いた取り込み実験.....	47
	(1) 実験動物.....	47
	(2) 薬物溶液の調製.....	47
	(3) 腎皮質スライスへの取り込み実験.....	47
第 3 項	ピアペネムの定量.....	48
第 4 項	統計処理.....	48
第 3 節	実験結果.....	49
第 1 項	ラット腎皮質スライスへのピアペネム取り込みに対する インドキシル硫酸, インドール酢酸および 3-カルボキシ-4- メチル-5-プロピル-2-フランプロピオン酸の影響.....	49
第 2 項	ラット腎皮質スライスへのピアペネム取り込みに対する	



メチルグアニジンの影響.....	50
第4節 考察.....	52
第3章 カチオン性薬物メトホルミンのラット腎皮質スライス取り込みに 対する尿毒症物質の影響.....	55
第1節 緒言.....	55
第2節 実験方法.....	55
第1項 使用薬物および試薬.....	55
第2項 ラット腎皮質スライスを用いた取り込み実験.....	56
(1) 実験動物.....	56
(2) 薬物溶液の調製.....	56
(3) 腎皮質スライス取り込み実験.....	56
第3項 メトホルミンおよびピアペネムの定量.....	57
第4項 統計処理.....	57
第3節 実験結果.....	58
第1項 ラット腎皮質スライスへのメトホルミンの取り込み挙動.....	58
第2項 ラット腎皮質スライスへのメトホルミン取り込みに 対するグアニジン, メチルグアニジンおよび グアニジノコハク酸の影響.....	59
第3項 ラット腎皮質スライスへのメトホルミン取り込みに 対するインドキシル硫酸の影響.....	60
第4項 ラット腎皮質スライスへのメトホルミンおよび ピアペネムの取り込み機構の検討.....	61
第4節 考察.....	63
第4章 ラット腎皮質スライスへの薬物取り込みに対する クレアチニンの影響.....	66
第1節 緒言.....	66
第2節 実験方法.....	67
第1項 使用薬物および試薬.....	67
第2項 ラット腎皮質を用いた取り込み実験.....	67
(1) 実験動物.....	67
(2) 薬物溶液の調製.....	67
(3) 腎皮質スライス取り込み実験.....	67
第3項 薬物の定量.....	67

第4項 統計処理.....	67
第3節 実験結果.....	68
第1項 ラット腎皮質スライスへのメロペネムおよび メトトレキサートの取り込みに対するクレアチニンの影響.....	68
第2項 ラット腎皮質スライスへのピアペネム取り込みに対する クレアチニンの影響.....	70
第3項 ラット腎皮質スライスへのメトホルミン取り込みに対する クレアチニンの影響.....	71
第4節 考察.....	72
結論.....	75
謝辞.....	77
引用文献.....	78

## 序 論

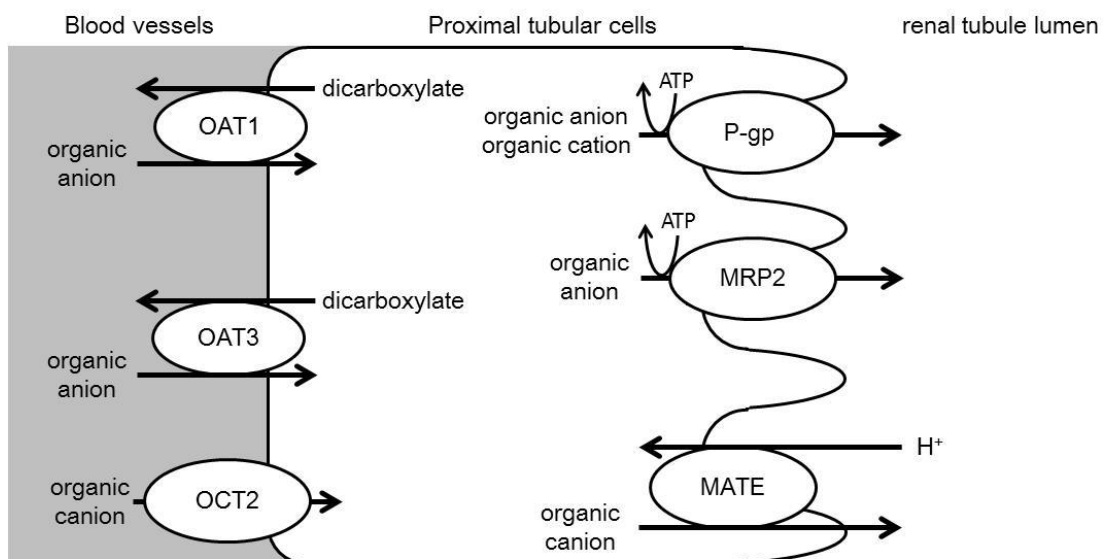
2014年現在、日本国内には約32万人の血液透析患者がいると報告されている。<sup>1)</sup> 血液透析導入患者の原疾患として1998年以前は慢性糸球体腎炎が第1位を占めていたが、1998年に糖尿病性腎症の割合が最多となり、現在では全体の約44%を占めている。また、2014年における血液透析導入患者のうち、65歳以上の患者数が全体の約70%を占めており、男女別に見た場合、男性では75歳以上80歳未満、女性では80歳以上85歳未満の年齢層が最も多い。<sup>1)</sup> 血液透析患者数は2005年頃までは年間約1万人ずつ増加していた。近年、患者数の上昇が緩やかになり、年間約6千人ずつの増加となっている<sup>1)</sup>が、これら血液透析患者の予備軍として日本の成人人口の約13%にあたる1,330万人の慢性腎臓病(CKD)患者がいるとされている。<sup>2)</sup>

腎機能が正常である場合、血液中に増加した老廃物は糸球体ろ過や尿細管分泌による尿中排泄を経て、体外へと排泄される。しかしながら、血液透析が必要となる末期腎不全(ESRD)のように、糸球体ろ過能や尿細管分泌能が著しく低下している場合、本来尿中排泄によって体外へと排出されるべき物質が体内に蓄積する。それらの物質の中で生体に対して悪影響を及ぼす物質は一般的に尿毒症物質(UTs)と呼ばれている。

UTsとして識別されている物質は現在、約100種類に及び、その性質によって水溶性低分子やタンパク結合性低分子、中分子などに分類される。<sup>3,4)</sup> UTsの中には分子量が1万を超えるものも存在し、その代表である $\beta_2$ -ミクログロブリンでは、骨や関節などに蓄積することによってアミロイドーシスを引き起こすことが知られている。<sup>5)</sup> また、タンパク結合性低分子UTsとしては3-カルボキシ-4-メチル-5-プロピル-2-フランプロピオン酸(CMPF)やインドキシル硫酸(IS)などがある。ISは、UTsの中でも様々な検討がなされてきた化合物の一つであり、特にCKD患者の心血管障害への関与に関しては数多くの報告がある。例えば、ISはマクロファージのコレステロール排泄能を低下させることによって血管へのコレステロール沈着を促進させること<sup>6)</sup>や、血管平滑筋細胞の増殖に対して濃度依存的に阻害作用を示すこと、および細胞内において活性酸素種の産生を増加させること<sup>7)</sup>が示されており、様々な機序を介して血管障害に関与すると考えられている。IS以外にも、インドール酢酸(IA)が活性酸素種の産生増加やシクロオキシゲナーゼの発現増加を引き起こすことによって心血管イベントの発生に関与することも考えられている。<sup>8)</sup>

また、IS による影響は、血管に対する障害性にとどまらず、尿細管上皮細胞内においてもフリーラジカルを産生することによって腎機能障害の進展に関与することが報告されており、<sup>9)</sup> UTs は腎機能低下患者の体内において、末期腎不全へと進行する以前から腎組織へ悪影響を及ぼすと考えられている。

血液中の老廃物や薬物などの尿中排泄には、糸球体ろ過および尿細管分泌が関与する。尿細管分泌には、血液中から腎尿細管上皮細胞内への輸送および腎尿細管上皮細胞内から尿細管腔への輸送の 2 つの過程が存在し、それぞれの過程における物質の移動には輸送担体が関与していることが知られている (Fig. 1)。ヒト腎尿細管上皮細胞の側底膜側には、有機アニオン輸送担体 (OAT) や有機カチオン輸送担体 (OCT) などが発現し、一方頂側膜側には P-糖タンパク質 (P-gp) や多剤耐性関連タンパク質 (MRP) 2 などが発現し、<sup>10)</sup> これらの輸送担体によって、血液中に存在する物質は効率よく尿中へと排泄される。また最近では頂側膜上に multidrug and toxin extrusion protein (MATE) が存在することも明らかになっている。<sup>11)</sup>



**Fig. 1. Transporters Expressing on Renal Proximal Tubular Cells**

UTs の中でも、輸送担体を介した尿細管分泌によって効率よく尿中へと排泄されるものが存在する。<sup>12-14)</sup> IS および CMPF や、同じくアニオン性の UTs である IA や馬尿酸の血液側から腎尿細管上皮細胞内への取り込みには OAT1 や OAT3 が関与するとされている。しかし、これらに対する輸送担体の寄与は UTs ごとに異なり、馬尿酸や IA の輸送では OAT1 の関与が大きく、IS の輸送に対する OAT1 および OAT3 の寄与は同程度であり、一方 CMPF の輸送には OAT3 の寄与が大きいことが報告されている。<sup>15)</sup> このように、UTs の腎への取り込みには輸送担体の関与することが報告されており、薬物との間に相互作用を引き起こすことが予測される。この他に、肝に発現する有機アニオン輸送ポリペプチド (OATP) を発現させた HEK293 細胞によるエストロン硫酸の取り込みを IS や CMFP が有意に低下させたことも報告されており、<sup>16)</sup> 薬物の腎外クリアランスに対しても影響を及ぼすことが示唆されている。前述したように、血液透析患者では高齢者の割合が高いことから、様々な疾患を併発している場合が多い。したがって、その治療に対して種々の薬物が投与されており、それらの排泄過程に輸送担体が関与する可能性がある。UTs はそれらの薬物の腎排泄において、輸送担体を介した相互作用を引き起こし、治療効果に影響を及ぼすことが考えられる。

これまで、腎機能低下時における腎消失型薬物の血中濃度の上昇は、多くの場合、糸球体ろ過機能の低下によって腎消失型薬物の排泄が遅延することに起因すると考えられてきた。しかし、腎機能の低下に伴って血液中に増加する UTs による尿細管分泌の阻害が一要因となっている可能性も無視できない。したがって、UTs による薬物の腎排泄に対する影響を明らかにすることによって、腎機能が低下した患者に対してより適切に薬物投与を行うことが可能になると考えられる。

薬物動態に関わる他の因子として、薬物の血漿タンパク結合が挙げられる。血液中にはアルブミンや  $\alpha_1$ -酸性糖タンパク質などの血漿タンパク質が存在し、様々な薬物と結合する。血漿タンパク質への結合能は薬物間で異なるが、血漿タンパク質により高い結合性を示す薬物が共存した場合、血漿タンパク結合の置換が起こり、結合能の低い薬物の遊離濃度が増加することによって組織への移行性が変化する。これまでに、バルプロ酸がジアゼパムの血漿タンパク結合を置換すること<sup>17)</sup> や、セファロsporin系抗生物質のヒト血清アルブミン (HSA) への結合がワルファリンの共存下において低下する<sup>18)</sup> ことなど、様々な報告がなされ、その結果として、薬

効の増強や副作用の発現などが引き起こされると考えられている。UTs の中にも IS や CMPF のように血漿タンパク質に高率に結合するものが存在する。<sup>19,20)</sup> また、*in vitro* の検討において、CMPF がフロセミドの HSA への結合に影響を及ぼし、フロセミドの遊離画分を増加させることが報告されている。<sup>20)</sup> したがって、UTs の血中濃度が上昇した場合、薬物と UTs の間においてもタンパク結合を介した薬物相互作用が様々な程度に引き起こされる可能性がある。

以上のように、UTs はヒト体内で様々な機序を介して薬物動態に影響を及ぼすと考えられているが、現在のところ、UTs による薬物動態への影響に関しては *in vitro* による検討がほとんどであるため、*in vivo* での検討における情報をさらに収集する必要がある。*in vivo* で UTs の影響を検討する場合には、患者における UTs の血漿中濃度を考慮することが重要である。しかしながら、これまで UTs の血漿中濃度に関する報告はあるものの、<sup>21-23)</sup> 日本人における検討例はまだ少ない。また、臨床において UTs による薬物相互作用を予測するためには、それぞれの医療機関において患者血漿中の UTs 濃度を把握する必要がある。しかしながら、UTs の濃度を測定するには高速液体クロマトグラフィー (HPLC) などの分析装置が不可欠となるため、分析装置を備えていない医療機関においては血漿中濃度の測定が困難となる。そこで、分析装置を使用せずに、より簡便に UTs の血漿中濃度を把握する方法として、臨床検査値を用いて UTs の血漿中濃度を予測することが試みられている。<sup>24,25)</sup> UTs は腎機能の低下に伴って体内に蓄積する物質であるため、UTs の血漿中濃度は、臨床検査値の中でも、特に腎機能検査値との間において相関性が認められる可能性が高い。

そこで、第 1 部では、末期腎不全患者における UTs の血漿中濃度およびそれらの予測方法について検討するために、札幌東徳洲会病院に通院中の血液透析患者から血液の提供を受け、IS、IA および CMPF の血漿中濃度を HPLC 法にて測定した。次に得られた値を用いて、IS、IA および CMPF の血漿中濃度間の相関性を評価するとともに、各患者の腎機能検査値を調査し、IS、IA または CMPF の血漿中濃度と腎機能検査値との相関性を評価した。

また、血漿タンパク結合における薬物と UTs の相互作用に関する基礎的知見を得ることを目的として、限外ろ過法にて、IS、IA および CMPF の HSA への結合率を測定し、これらの値と、血液透析患者の透析前後における UTs の血漿中濃度から算

出した透析除去率との相関性を評価した。さらにこれら 3 種 UTs 共存下におけるプラバスタチンの HSA の結合率の変化を比較した。

第 2 部では、薬物の腎排泄に対する UTs の影響を明らかにすることを目的として、血液中から腎尿細管上皮細胞内への薬物輸送に対する UTs の影響について検討した。代表的な UTs として IS, IA および CMPF を取り上げたが、これらはその構造からアニオン性 UTs に分類される。一方、UTs にはカチオン性の構造を有するものも存在し、グアニジン、メチルグアニジン、グアニジノコハク酸やクレアチニンなどのグアニジノ化合物が知られている。<sup>4)</sup> これらのカチオン性 UTs も OCT などの輸送担体を介して薬物の体内動態に影響を及ぼすことが報告されている。<sup>26)</sup> 近年、薬物や内因性物質が輸送担体によって基質として認識されて輸送されるか否かを評価するために、輸送担体を強制発現させた細胞系を用いた輸送実験が行われている。しかしながら、Fig. 1 に示すように、腎尿細管上皮細胞には種々の輸送担体が発現していることから、腎皮質スライスなどを用いた組織レベルでの報告も数多くなされており、<sup>13,27-29)</sup> より生理的条件に近い環境における検討も重要であると考えられている。そこで、本研究では血液側から腎尿細管上皮細胞内への薬物輸送に対する UTs の影響を評価するために、ラット腎皮質スライス法<sup>30)</sup> によりアニオン性およびカチオン性 UTs の共存下または非共存下における種々薬物の取り込み量を測定した。

## 第1部 アニオン性尿毒症物質の血液透析患者における血漿中濃度と血漿タンパク結合

### 第1章 血液透析患者における3種アニオン性尿毒症物質の血漿中濃度の比較

#### 第1節 緒言

尿毒症物質 (UTs)とは腎機能が著しく低下した患者の体内に蓄積する物質の総称であり、現在約100種類の物質がUTsとみなされている。<sup>3,31,32)</sup> これらのUTsが生体機能や薬物体内動態に及ぼす影響を明らかにすることは、血液透析患者を含め慢性腎臓病 (CKD) 患者における薬物療法や病態管理を適切に推進する上で極めて重要である。

UTsの中でも、ISは様々な研究において生体への影響が検討されている物質の一つである。序論で言及した心血管障害のリスクの他にも、血管内皮細胞においてISの添加によって単球の接着に関与するタンパク質であるE-セレクチンの発現を増加させること<sup>33)</sup>や、CKDモデルとして用いられる5/6腎切除ラットにISを経口投与すると大腿動脈内への白血球の接着を有意に増加させること<sup>33)</sup>が報告されている。また、ISは輸送担体の発現に影響を及ぼすことも指摘されている。Luら<sup>34)</sup>は、大腸がん由来のCaco-2細胞にISを添加することにより、乳がん耐性タンパク質(BCRP)のmRNAの発現量が増加することを報告している。また、Akiyamaら<sup>35)</sup>は、UTsの排泄に関与するとされる腎尿細管上皮細胞基底膜上のSLCO4C1のmRNA発現量がISによって低下することを報告している。

CKD患者における薬物動態へのUTsの影響を考えると、最も重要なのはUTsの血漿中濃度である。UTsの血漿中濃度についてはこれまでも多くの研究グループによって報告されてきた。UTsは、①腎機能低下時に血漿中濃度が著しく上昇するもの、②中程度に上昇するもの、③ほとんど変化しないものに分類され、血漿中濃度が著しく増加するUTsとしては、上述したISの他にIA、グアニジノコハク酸(GSA)、メチルグアニジン(MG)などが挙げられる。<sup>3)</sup> UTsの出発物質の多くは食物由来であることから、UTsの体内蓄積には食習慣が影響する可能性がある。しかしながら、地域によってUTsの血漿中濃度が異なる傾向を示すか否かについては不明であり、この点に関する情報を集積する必要がある。CKD患者における血漿中UT



濃度の報告は国内外に多数あるが,<sup>3,21-23,36,37)</sup> 北海道地区においては検討されていない。

そこで第1章では、札幌東徳洲会病院に通院中の血液透析患者より透析前および直後における血液の提供を受け、IS、IA および CMPF の血漿中濃度を評価した。

## 第2節 実験方法

### 第1項 使用薬物および試薬

本実験に用いた試薬類は以下の通りである。

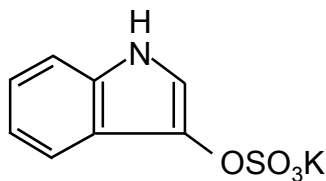
インドキシル硫酸カリウム塩 (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)

3-カルボキシ-4-メチル-5-プロピル-2-フランプロピオン酸 (Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI, USA)

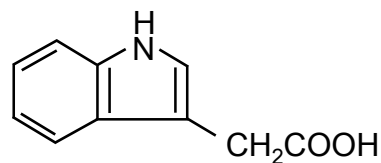
3-インドール酢酸 (和光純薬工業, 大阪)

これらの構造式を Fig. 2 に示す。

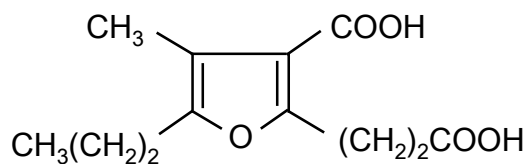
その他試薬および溶媒は、すべて市販の特級規格品を用いた。



Indoxyl sulfate



3-Indoleacetic acid



3-Carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropionic acid

**Fig. 2. Chemical Structures of Indoxyl Sulfate, 3-Indoleacetic Acid and 3-Carboxy-4-Methyl-5-Propyl-2-Furanpropionic Acid Used in This Study**

## 第2項 血液透析患者および健常被験者からの血液試料の採取

札幌東徳洲会病院に通院中の血液透析患者および健常被験者に対して、所定の様式に従った文書を用いて研究の主旨と個人情報保護について説明を行い、同意の得られた患者20名（男女各10名）と健常被験者5名（男4名、女1名）を対象とした。患者からの採血は透析回路から行い、透析前および透析終了直後の血液各4 mLをヘパリン入り採血管（Becton Dickinson Co., Franklin Lakes, NJ, USA）に採取後、遠心分離（2,600g, 5分, 5°C）し、血漿画分を得た。得られた血漿50  $\mu$ Lに生理食塩液50  $\mu$ L およびメタノール200  $\mu$ Lを加えて氷冷下10分間放置した後、遠心分離（5,350g, 10分, 5°C）し、得られた上清中のUTs濃度を測定した。なお、本研究は札幌東徳洲会病院倫理委員会の承認を得、透析室スタッフの協力の下に実施した。

## 第3項 インドキシル硫酸、インドール酢酸および3-カルボキシ-4-メチル-5-プロピル-2-フランプロピオン酸の定量

IS, IA および CMPF の定量はすべて HPLC-UV 法にて絶対検量線法により測定した。これらの分析条件を Table 1 に示した。

**Table 1. HPLC Conditions for UTs Assay**

---

Apparatus : Shimadzu LC-10AS (Shimadzu, Kyoto, Japan)

Detector : Shimadzu SPD-10A (Shimadzu, Kyoto, Japan)

**Indoxyl sulfate**

Column : Cosmosil 5C<sub>18</sub> AR- II (5  $\mu$  m, 4.6 mm i.d.  $\times$  150 mm, Nacalai Tesque Inc., Kyoto, Japan)

Column temperature : 50°C

Wave length : 280 nm

Mobile phase : 0.05 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : CH<sub>3</sub>CN = 95 : 5

Flow rate : 1.0 mL/min (retention time : 18 min)

**Indoleacetic Acid**

Column : Cosmosil 5C<sub>18</sub> AR- II (5  $\mu$  m, 4.6 mm i.d.  $\times$  150 mm, Nacalai Tesque Inc., Kyoto, Japan)

Column temperature : 50°C

Wave length : 282 nm

Mobile phase : 0.05 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : CH<sub>3</sub>CN = 9 : 1

Flow rate : 0.8 mL/min (retention time : 20 min)

**CMPF**

Column : Inertsil ODS-3 (5  $\mu$  m, 4.6 mm i.d.  $\times$  250 mm, GL Sciences Inc., Toyko, Japan)

Column temperature : 40°C

Wave length : 261 nm

Mobile phase : 0.08 M CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>Na + 1% CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H (pH 4.5) : CH<sub>3</sub>CN : CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H  
= 65 : 35 : 0.5

Flow rate : 1.0 mL/min (retention time : 13 min)

---

第 4 項 統計処理

血漿中 UTs 濃度の測定結果は、平均値  $\pm$  標準誤差 (mean  $\pm$  S.E.), または患者個々の値で示した。血液透析患者の透析前後での血漿中 UTs 濃度の有意差の検定は paired *t*-test にて、血液透析患者および健常被験者の血漿中 UTs 濃度間における有意差の検定は Dunnett test にて行い、 $p < 0.05$  をもって有意差ありとした。

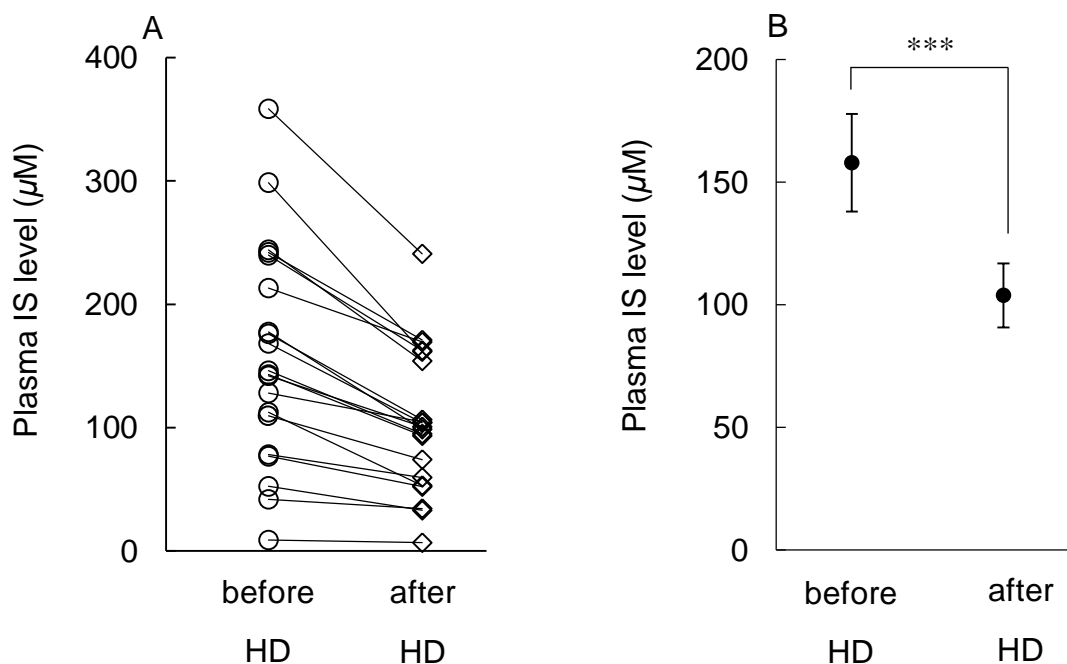
### 第3節 実験結果

#### 第1項 インドキシル硫酸の透析前後における血漿中濃度

20名の血液透析患者の透析前および透析直後におけるISの血漿中濃度をFig. 3Aに、透析前および透析直後における平均血漿中濃度をFig. 3Bに示した。

透析前の最大値および最小値は358.4  $\mu\text{M}$ , 8.9  $\mu\text{M}$ , 透析直後の最大値および最小値は240.9  $\mu\text{M}$ , 6.8  $\mu\text{M}$ であった。ISの平均血漿中濃度は透析前157.9  $\pm$  19.9  $\mu\text{M}$ , 透析直後103.8  $\pm$  13.3  $\mu\text{M}$ であり、血液透析によりISの血漿中濃度は有意に低下した。一方、健常被験者においては4名の血漿中からISは検出されず、残る1名でも3.8  $\mu\text{M}$ と低値を示した。

透析前後の平均血漿中濃度から算出したISの透析除去率は32.8  $\pm$  2.1%であった。



**Fig. 3. Plasma Levels (A) and Mean Plasma Levels (B) of Indoxyl Sulfate in Hemodialysis Patients**

Open circles represent the individual data of patients before hemodialysis.

Open squares represent the individual data of patients immediately after hemodialysis.

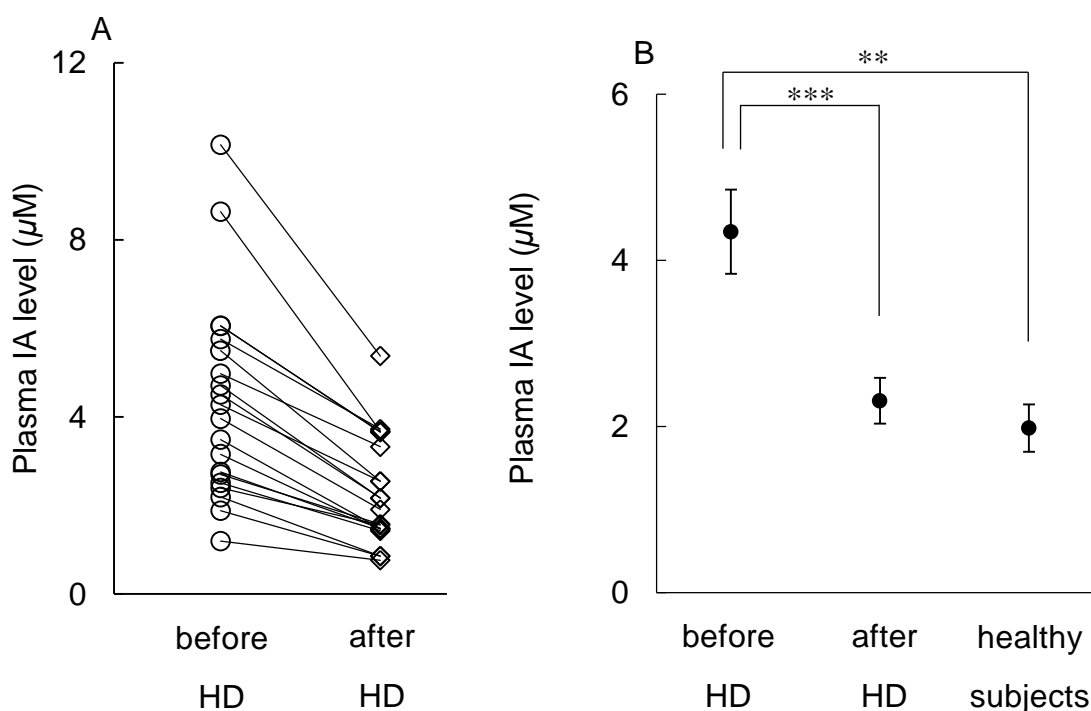
Closed circles represent the mean with S.E. (n = 20).

\*\*\*  $p < 0.001$ , significantly different from 'before dialysis'.

## 第2項 インドール酢酸の透析前後における血漿中濃度

20名の血液透析患者の透析前および透析直後におけるIAの血漿中濃度を Fig. 4Aに、透析前および透析直後、ならびに健常被験者における平均血漿中濃度を Fig. 4Bに示した。

透析前の最大値および最小値は  $10.1 \mu\text{M}$ ,  $1.2 \mu\text{M}$  であり、透析直後における最大値および最小値は  $5.4 \mu\text{M}$ ,  $0.8 \mu\text{M}$  であった。一方、健常被験者においては最大値および最小値は  $2.6 \mu\text{M}$ ,  $1.0 \mu\text{M}$  であった。IAの平均血漿中濃度は透析前  $4.3 \pm 0.5 \mu\text{M}$ , 透析直後  $2.3 \pm 0.3 \mu\text{M}$ , 健常被験者においては  $2.0 \pm 0.3 \mu\text{M}$  であった。IAの血漿中濃度は、血液透析により有意に低下し、健常被験者における平均血漿中濃度とほぼ同じレベルになった。透析前後の平均血漿中濃度から算出した透析除去率は  $46.6 \pm 2.0\%$  であった。



**Fig. 4. Plasma Levels (A) and Mean Plasma Levels (B) of Indoleacetic Acid in Hemodialysis Patients and Healthy Subjects**

Open circles represent the individual data of patients before hemodialysis.  
Open squares represent the individual data of patients immediately after hemodialysis.

Closed circles represent the mean with S.E. (hemodialysis patients:  $n = 20$ , healthy subjects:  $n = 5$ ).

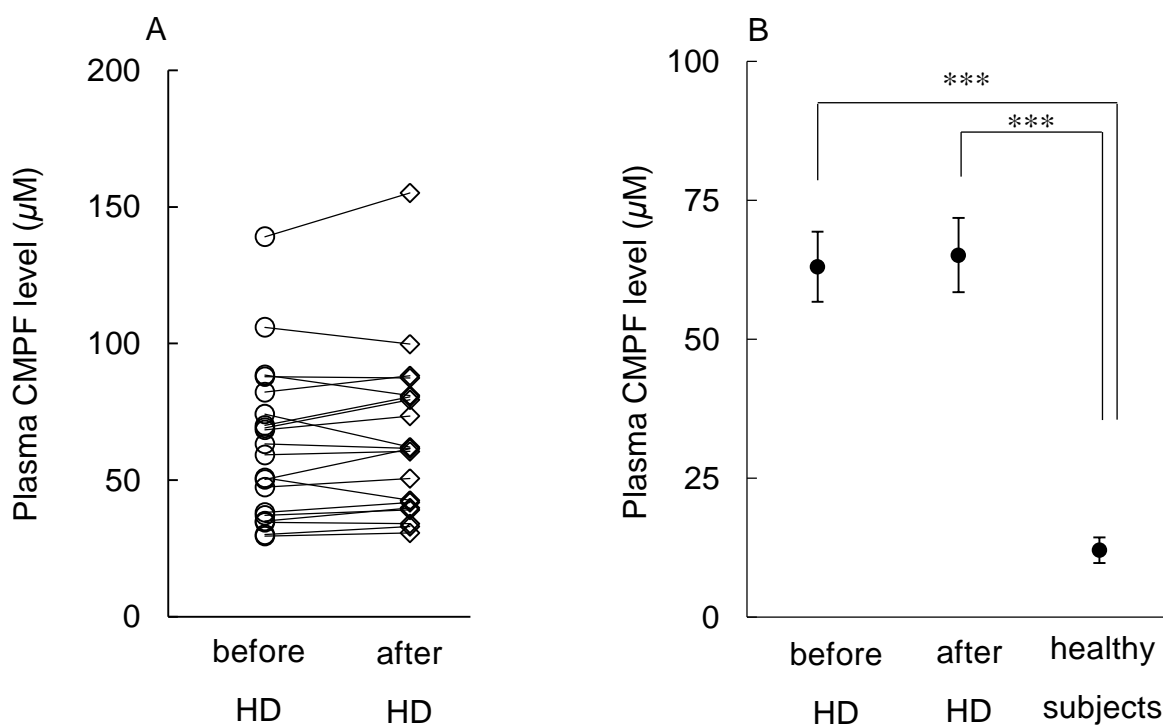
\*\*  $p < 0.01$ , significantly different from healthy subjects.

\*\*\*  $p < 0.001$ , significantly different from 'before dialysis'.

第 3 項 3-カルボキシ-4-メチル-5-プロピル-2-フランプロピオン酸の透析前後における血漿中濃度

20名の血液透析患者の透析前および透析直後におけるCMPFの血漿中濃度を Fig. 5A に、透析前および透析直後、ならびに健常被験者における平均血漿中濃度を Fig. 5B に示した。

透析前の最大値および最小値は  $139.1 \mu\text{M}$ ,  $29.5 \mu\text{M}$  であり、透析直後における最大値および最小値は  $155.1 \mu\text{M}$ ,  $30.7 \mu\text{M}$  であった。健常被験者においては最大値および最小値は  $18.1 \mu\text{M}$ ,  $5.1 \mu\text{M}$  であった。CMPFの平均血漿中濃度は、透析前  $63.0 \pm 6.3 \mu\text{M}$ 、透析直後  $65.1 \pm 6.7 \mu\text{M}$  であり、健常被験者では  $12.0 \pm 2.3 \mu\text{M}$  であった。また、透析前後の血漿中濃度から算出した透析除去率は  $-3.9 \pm 2.3\%$  であり、CMPFは血液透析によってほとんど除去されないことが示された。



**Fig. 5. Plasma Levels (A) and Mean Plasma Levels (B) of 3-Carboxy-4-Methyl-5-Propyl-2-Furanpropionic Acid in Hemodialysis Patients and Healthy Subjects**

Open circles represent the individual data of patients before hemodialysis.

Open squares represent the individual data of patients immediately after hemodialysis.

Closed circles represent the mean with S.E. (hemodialysis patients:  $n = 20$ , healthy subjects:  $n = 5$ ).

\*\*\*  $p < 0.001$ , significantly different from healthy subjects.

#### 第4節 考察

UTs の体内への蓄積の程度は、残存する腎機能や透析期間、食習慣などによって大きく変動すると考えられる。本章での測定結果より、CMPF および IS の血漿中濃度は血液透析患者間での差が大きく、CMPF では透析前における最大濃度と最小濃度の差が 4.7 倍、IS ではこの差がさらに大きく、最大濃度は最小濃度と比較して 40.3 倍高い値を示した (Figs. 3 & 5)。また、IS の透析前における平均血漿中濃度は、今回測定した 3 種 UTs のなかで最も高い値を示し、その一方で健常被験者においては、5 名中 4 名の血漿中から IS が検出されなかったことから、IS は血液透析患者の体内に蓄積しやすいと推察された。一方、IA の透析前平均血漿中濃度は CMPF および IS と比較して低く、健常被験者と比較した場合、有意差は認められたものの、IS や CMPF においてみられたような大きな差でなかったことから、血液透析患者における IA の蓄積性はそれ程大きなものではないと考えられた (Fig. 4)。今回検討したアニオン性 UTs については、日本国内においても、関東地区や中部地区の医療機関で血液透析を受けている CKD 患者や健常被験者での血漿中濃度について報告がなされているが、<sup>21,37)</sup> 今回の測定結果はそれらの報告とほぼ一致しており、IS、IA および CMPF の血漿中濃度には、地域の違いによる大きな差はないと考えられた。

各 UT の透析前後の血漿中濃度を比較した場合、CMPF では濃度変化がほとんどみられなかったことから、CMPF の透析除去率は極めて低いことが示された。一方、IS の場合、透析直後の血漿中濃度は透析前に比べて有意に低下したが、それでもなお健常被験者に比べて 27.3 倍高い値を示した。これに対し、IA の血漿中濃度は血液透析後に 46.6% 減少し、健常被験者とほぼ同程度の濃度となった。

以上より、IS や CMPF は、IA と比較して血液透析で除去されにくく、また IS は健常被験者に比べてかなり高い濃度で血液透析患者の血漿中に存在することが示された。また、IS の血漿中濃度には個体間変動が極めて大きいことから、薬物の体内動態に対する影響については特に注意が必要と思われる。IS は、末期 CKD 患者において腎機能低下を予測するマーカーとなることも指摘されており、<sup>38)</sup> IS の血漿中濃度のモニタリングは臨床上重要な意味を持つと考えられた。

## 第2章 血液透析患者におけるアニオン性尿毒症物質の血漿中濃度の相関性

### 第1節 緒言

第1章における検討で、血液透析患者におけるISの血漿中濃度には個体間変動が極めて大きいことが明らかになった。血漿中UTs濃度の上昇の程度は、残存する腎機能に依存すると考えられることから、UTs間の血漿中濃度にはある程度の相関性がみられると予測される。そこで第2章ではまず、前章で得られたIS、IAおよびCMPFの血漿中濃度を用いて、これらUTs間の相関性を評価した。

また、第1章の結果に基づけば、臨床において血液透析患者に投与される様々な薬剤の体内動態へのUTsの影響を判断するには、各患者におけるUTsの血中濃度を知ることが必須となる。しかしながら、序論でも述べたように、そのためには医療機関にHPLCなどの測定装置を備え、その扱いを熟知したスタッフを確保することが必要になる。したがって、より簡便に血漿中UT濃度を推定する方法を見出すことができれば、医療機関内での有用性が高まることが期待される。上述のように、血漿中UT濃度の上昇には、腎機能の低下が密接に関連するとみなされることから、本章ではIS、IAおよびCMPFの血漿中濃度と、腎機能の指標とされる血清クレアチニン値(Scr)、血中尿素窒素(BUN)、推定糸球体ろ過量(eGFR)との相関性について検討を加えた。

### 第2節 実験方法

#### 第1項 臨床検査値の調査

今回対象となった血液透析患者および健常被験者のScr、BUN、eGFRをTable 2およびTable 3に示した。患者年齢、Scr、BUNおよびアルブミン濃度は患者カルテより確認し、eGFRは式(1)、式(2)および式(3)に従って算出した。

$$\text{体表面積 (BSA)} = \text{体重}^{0.425} \times \text{身長}^{0.725} \times 0.007184 \quad (1)$$

$$\text{eGFR (男性)} = 194 \times \text{Scr}^{-1.094} \times \text{Age}^{-0.287} \times \text{BSA} / 1.73 \quad (2)$$

$$\text{eGFR (女性)} = 194 \times \text{Scr}^{-1.094} \times \text{Age}^{-0.287} \times 0.739 \times \text{BSA} / 1.73 \quad (3)$$



**Table 2. Laboratory Values of Twenty Hemodialysis Patients**

patients	age	eGFR (mL/min)	Scr (mg/dL)		BUN (mg/dL)		albumin (g/dL)		
			before	after	before	after	before	after	
			HD	HD	HD	HD	HD	HD	
male	1	72	3.8	10.8	4.5	59.8	22.1	4.0	4.7
	2	73	6.4	6.7	3.0	53.2	19.2	4.0	4.8
	3	57	4.1	11.1	4.8	51.4	18.9	3.9	4.5
	4	53	12.6	4.2	2.4	57.5	32.1	4.0	4.1
	5	62	5.2	8.5	3.4	42.8	13.9	3.6	3.9
	6	72	5.2	9.4	4.3	57.4	22.9	4.0	3.8
	7	92	22.6	2.3	1.3	41.2	19.0	4.0	4.0
	8	76	4.1	9.9	4.1	47.3	16.4	3.5	3.4
	9	62	4.2	10.9	5.1	63.1	24.7	4.0	4.0
	10	73	6.7	6.3	2.6	48.1	15.3	3.3	3.9
female	11	57	3.4	10.1	3.9	43.1	13.8	3.7	3.9
	12	74	3.8	7.9	3.3	45.4	14.8	3.9	3.8
	13	67	2.4	10.9	4.1	63.8	17.3	3.8	4.2
	14	48	2.8	11.5	3.0	59.9	11.1	4.1	4.5
	15	73	2.9	9.8	3.4	53.3	14.3	3.9	4.0
	16	46	3.4	11.5	5.1	66.7	24.8	3.6	4.3
	17	73	3.4	9.5	3.9	84.1	22.8	3.9	4.7
	18	71	3.1	9.5	4.0	81.1	26.6	4.1	4.3
	19	46	2.8	12.1	4.5	66.3	19.5	4.1	4.8
	20	79	3.9	6.7	2.1	58.5	14.1	3.9	3.9

Abbreviation: HD, hemodialysis.

**Table 3. Laboratory Values of Five Healthy Subjects**

healthy subjects	age	eGFR (mL/min)	Scr (mg/dL)	BUN (mg/dL)	albumin (g/dL)
1	26	97.8	0.8	11.8	4.7
2	28	81.8	1.0	13.4	5.1
3	41	78.0	0.8	10.9	4.9
4	25	85.3	0.9	9.2	5.1
5	27	126.3	0.6	8.6	4.4

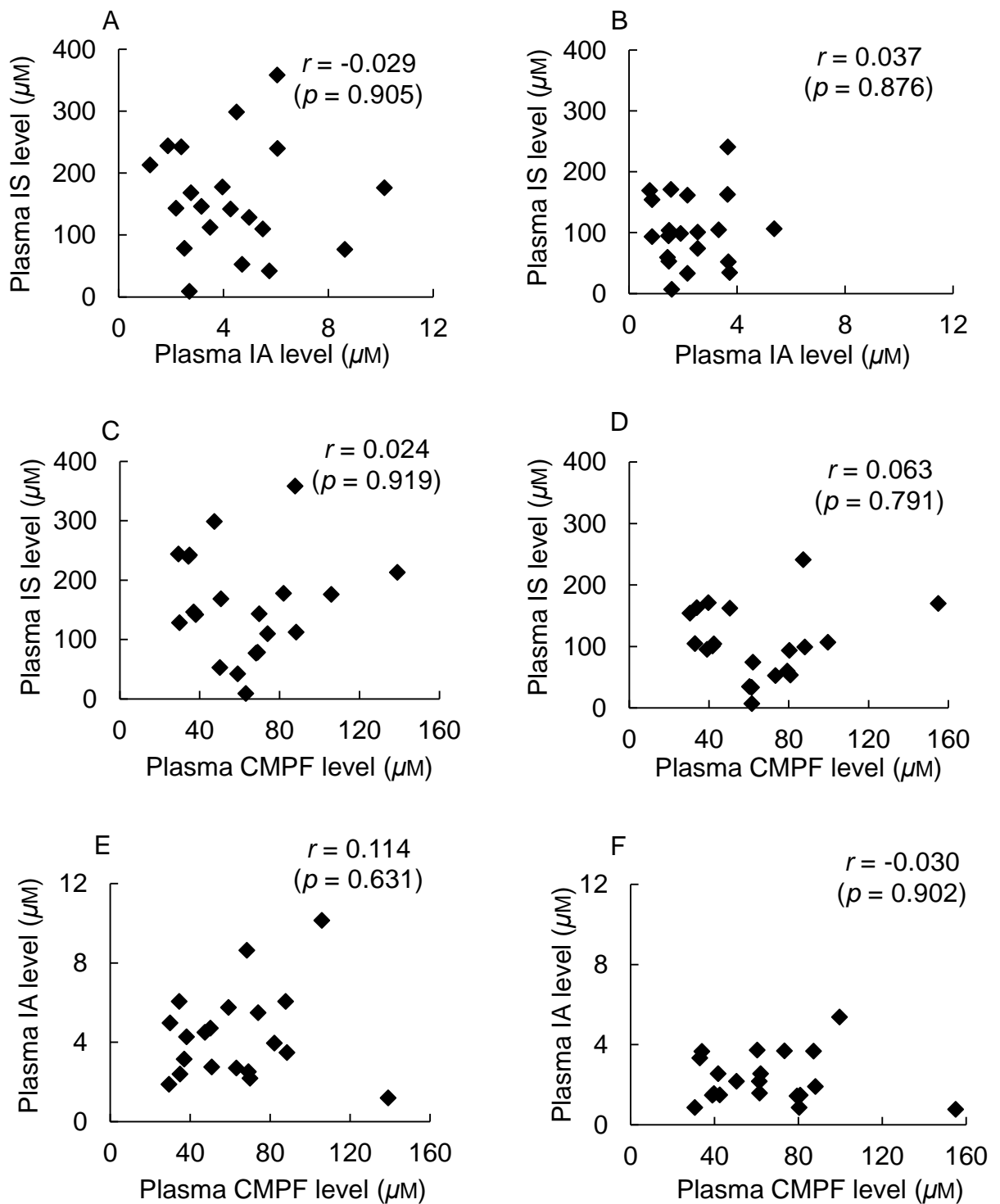
## 第 2 項 統計処理

UTs の血漿中濃度間ならびに血漿中 UTs 濃度と臨床検査値の相関性の検討はエクセル統計 2012 for Windows (ver. 1.14) を用いて行い, いずれも  $p < 0.05$  をもって有意差ありとした.

### 第3節 結果

#### 第1項 血液透析患者における血漿中インドキシル硫酸、インドール酢酸および3-カルボキシ-4-メチル-5-プロピル-2-フランプロピオン酸濃度の相関性

20名の血液透析患者における透析前後の血漿中IS, IA およびCMPF濃度間の相関係数をそれぞれ算出した。透析前血漿中濃度間における相関係数は, IS vs. IA で  $-0.03$  ( $p = 0.91$ ), IS vs. CMPF で  $0.02$  ( $p = 0.92$ ), IA vs. CMPF で  $0.11$  ( $p = 0.63$ )であり, いずれの場合も有意な相関は認められなかった (Fig. 6)。一方, 透析直後における血漿中濃度間の相関係数は, IS vs. IA で  $0.04$  ( $p = 0.88$ ), IS vs. CMPF で  $0.06$  ( $p = 0.79$ ), IA vs. CMPF で  $-0.03$  ( $p = 0.90$ ) であり, 透析直後の血漿中濃度においても有意な相関はみられなかった (Fig. 6)。

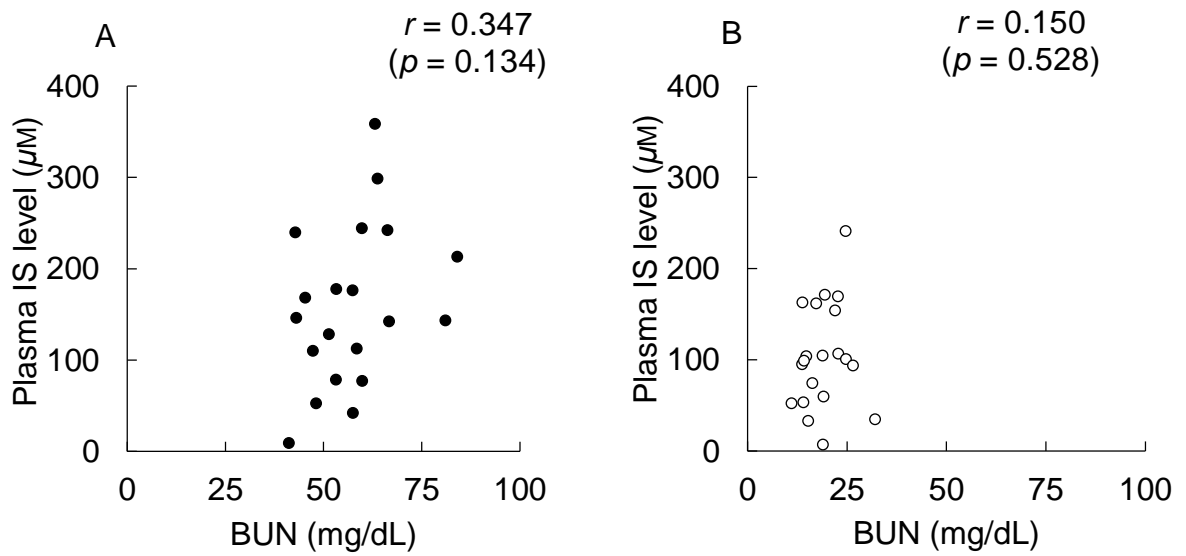


**Fig. 6. Correlations among Plasma Levels of Indoxyl Sulfate, Indoleacetic Acid and 3-Carboxy- 4-Methyl-5-Propyl-2-Furanpropionic Acid in Hemodialysis Patients before (A, C and E) and Immediately after Hemodialysis (B, D and F)**  
 Each point represents the individual data from hemodialysis patients.  
 $r$ : correlation coefficient.

第2項 血液透析患者の血漿中インドキシル硫酸, インドール酢酸および3-カルボキシ-4-メチル-5-プロピル-2-フランプロピオン酸濃度と腎機能検査値の相関性

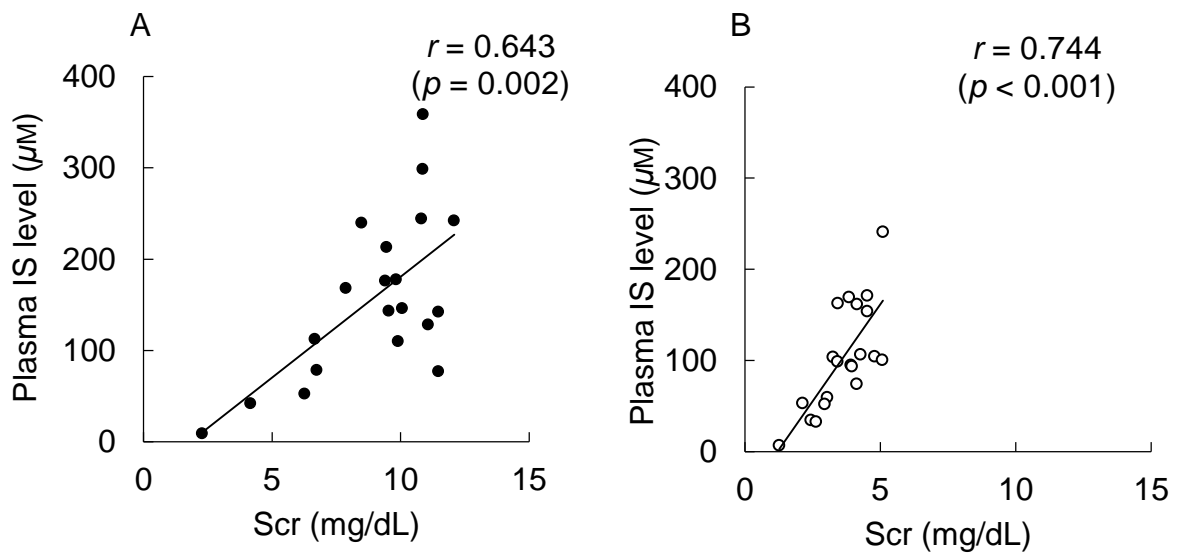
IS, IA または CMPF の血漿中濃度と, 腎機能の指標である Scr, BUN または eGFR との相関性を検討したところ, 透析前後ともに IA および CMPF の血漿中濃度と, BUN, Scr および eGFR との間に有意性は認められなかった. また, 透析前後の血漿中 IS 濃度と BUN との間にも有意な相関は認められなかった (Fig. 7) が, 血漿中 IS 濃度と Scr の間には有意な正の相関 (Fig. 8) が, また Fig. 9 に示すように血漿中 IS 濃度と eGFR の間には有意な負の相関がみられた. 透析前および透析直後における相関係数は, IS vs. Scr ではそれぞれ 0.643 ( $p = 0.002$ ), 0.744 ( $p < 0.001$ ) であり, IS vs. eGFR ではそれぞれ-0.558 ( $p = 0.011$ ) および-0.645 ( $p = 0.002$ ) であった.

また, この相関は IS 濃度を対数とすることによってさらに良好となり, 透析前および透析直後における IS と Scr 間の相関係数はそれぞれ 0.799 ( $p < 0.001$ ), 0.829 ( $p < 0.001$ ), IS と eGFR 間ではそれぞれ-0.863 ( $p < 0.001$ ), -0.909 ( $p < 0.001$ ) となった (Fig. 10).



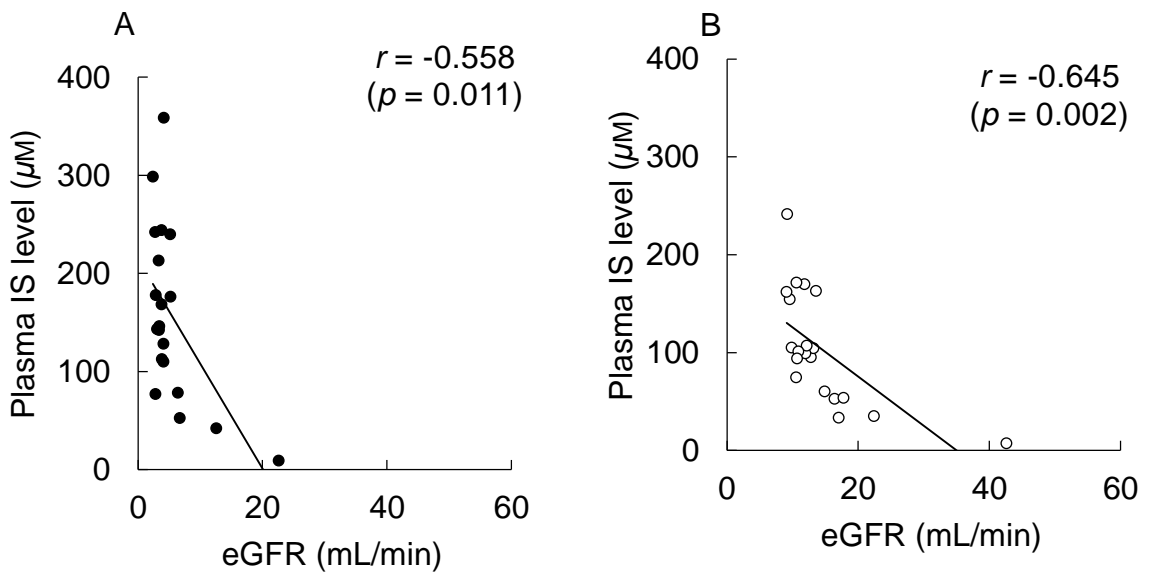
**Fig. 7. Correlations between Plasma Indoxyl Sulfate Levels and BUN before (A) and Immediately after Hemodialysis (B)**

Each point represents the individual data from hemodialysis patients.  
*r*: correlation coefficient.



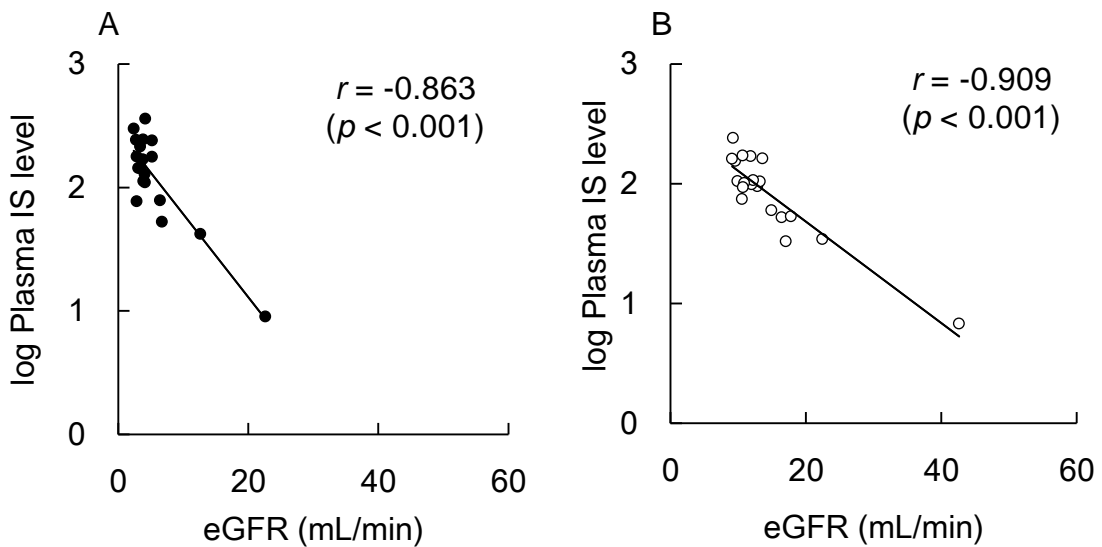
**Fig. 8. Correlations between Plasma Indoxyl Sulfate Levels and Scr before (A) and Immediately after Hemodialysis (B)**

Each point represents the individual data from hemodialysis patients.  
*r*: correlation coefficient; line: linear regression curve.



**Fig. 9. Correlations between Plasma Indoxyl Sulfate Levels and eGFR before (A) and Immediately after Hemodialysis (B)**

Each point represents the individual data from hemodialysis patients.  
*r*: correlation coefficient; line: linear regression curve.



**Fig. 10. Correlations between Plasma Indoxyl Sulfate Levels and eGFR before (A) and immediately after Hemodialysis (B)**

Each point represents the individual data from hemodialysis patients.  
*r*: correlation coefficient; line: linear regression curve.

#### 第4節 考察

本章ではまず、IS、IA およびCMPFの血漿中濃度間の相関性を評価した。UTsの血漿中濃度の上昇に関わる機序については十分に解明されていないが、腎機能の低下が一つの要因であることは疑いない。

IS および IA は共に食事性トリプトファンから生成される UTs である。<sup>39)</sup> 摂取されたトリプトファンは腸内細菌によってインドールに分解されて腸管から吸収される。その後、肝においてインドールが硫酸抱合を受け、IS が生成すると考えられている。同様に、IA も腸管内で生成したインドールから合成されると考えられていることから、<sup>39)</sup> これらの血漿中濃度の間にはある程度の相関性がみられると予測された。しかしながら今回の検討ではそのような結果は得られなかった (Fig. 6)。

第1章で示されたように、今回検討した血液透析患者における最大濃度および最小濃度が、IS では358.4  $\mu\text{M}$ , 8.9  $\mu\text{M}$ , IA では10.1  $\mu\text{M}$ , 1.2  $\mu\text{M}$ と大きく異なっており、血液透析患者の体内で合成される程度に大きな違いがあることが要因の一つと推察された。また、透析による除去率の違いも密接に関わっていると考えられた。一方、IS や IA と異なり、CMPFは体内では魚卵などに含まれるリン脂質に由来するフラン脂肪酸の代謝物として生成される。<sup>40)</sup> したがって、血液透析患者の食習慣の違いがIS および IA と CMPF の間に相関性がみられなかった要因の一つであると考えられた (Fig. 6)。

さらに、本章では3種 UTs の血漿中濃度と腎機能の指標である BUN, Scr, eGFR との相関性についても評価した。その結果、IA および CMPF の血漿中濃度と各腎機能検査値との間に有意な相関性は認められなかった。これに対し IS の場合には、BUN との間には有意な相関性が認められなかったものの (Fig. 7), Scr ならびに eGFR との間にそれぞれ正および負の相関が認められた。また、これらの相関性は透析後の値を用いることによりさらに顕著になった (Figs. 8 & 9)。さらに、血漿中 IS 濃度を対数とした場合に、これらの相関係数はさらに高値を示した (Fig. 10)。

これらの結果のうち、血漿中 IS 濃度と eGFR の間に認められた良好な相関性については、eGFR が Scr と体表面積を用いて算出されていることから、血漿中 IS 濃度と Scr との結果に基づけば当然の結果であると考えられる。そこで、血漿中 IS 濃度と Scr の良好な相関性の背景について考察した。

まず IS とクレアチニン (Cr) の排泄経路に着目した。血液中の IS はその大部分が



尿中に排泄されるが、尿細管分泌過程で血液側から腎尿細管上皮細胞内へ輸送される際に OAT1 および OAT3 が関与するとされている。<sup>15)</sup> 一方、Cr の排泄経路は主に糸球体ろ過によって進行するが、Cr は一部が OCT の基質として尿細管分泌を受けることが報告されている。<sup>41)</sup> さらに、Cr はカチオン性化合物であるにも関わらず、OAT によって血液側から尿細管上皮細胞内に輸送されることも示されている。その例として、Eisner ら<sup>42)</sup> はマウスの静脈内にパラアミノ馬尿酸 (PAH) を投与した場合に Cr の分泌画分が著しく減少したことを報告している。さらに、Vallon ら<sup>43)</sup> は、Oat ノックアウトマウスと野生型マウスにおいて Cr クリアランスとイヌリンクリアランスを比較したところ、野生型マウスでは Cr クリアランスがより高値を示したが、Oat ノックアウトマウスではこの傾向は認められなかったことから、Oat が Cr の腎排泄に寄与すると報告している。このように、Cr の尿中排泄機序はかなり複雑であるため、IS と Cr の排泄経路から血漿中 IS 濃度と Cr の間の相関性を解釈することは困難であると考えられた。

そこで次に、IS および Cr の前駆物質に着目した。上述したように、IS の前駆体はトリプトファンである。<sup>39)</sup> 一方、Cr の前駆体はクレアチンであり、クレアチンはアルギニン、グリシンおよびメチオニンから合成される。<sup>44)</sup> これらは様々な食物に含まれるアミノ酸であるため、食物を摂取することによって IS や Cr の血漿中濃度は増加するが、腎機能が正常な場合は共にアミノ酸の代謝物として尿中へ排泄される。しかしながら、血液透析患者においては腎機能が著しく低下しているため、IS や Cr などの UTs は体内に蓄積する。このような IS と Cr の側面が今回の結果に関与すると考えられるが、IS と Scr の間の相関係数が透析前 0.643 から透析直後 0.744 へと上昇した結果に関して明確な理由は不明であり、血漿中 IS 濃度と Scr の有意な相関性に関わる機序については今後さらに検討が必要である。しかし、本章での検討から、Scr と eGFR は血漿中 IS 濃度を予測する上で有用なパラメーターになる可能性が示唆されたことから、Scr と eGFR の値を基に IS による生体への負の影響を予測することに繋がると考えられた。

### 第3章 アニオン性尿毒症物質の血漿タンパク結合特性

#### 第1節 緒言

血液中にはアルブミンや  $\alpha_1$ -酸性糖タンパク質などの血漿タンパク質が存在し、様々な薬物と結合する。また、薬物の血漿タンパク質への結合は可逆的であるため薬物間で競合的な置換が起こり、血漿タンパク質に対してより強い結合能を有する薬物によって置換される。末期腎不全患者の血液中に蓄積する UTs の中でも、血漿タンパク質に高い親和性を示すものが存在し、第1章、第2章で検討した IS, IA および CMPF もタンパク結合性 UTs に分類されている。<sup>3,4,39,45,46)</sup> したがって、血漿タンパク質に結合した薬物に対する置換はこれらの UTs によっても引き起こされることが予測される。

序論において、生活習慣病の一つである糖尿病の合併症に糖尿病性腎症があり、現在では血液透析導入の原疾患の第一位を占めること<sup>1)</sup>を述べたが、慢性腎臓病 (CKD) 患者では生活習慣病の一つである脂質異常症を併発している場合も少なくない。CKD 診療ガイドライン 2012<sup>2)</sup>では、血糖値に加えて脂質管理の重要性についても言及されており、これら合併症の治療のために CKD 患者には多くの薬剤が投与されている。

現在、脂質異常症の治療に最も汎用されているのは、プラバスタチンを始めとするスタチン系薬である。スタチン系薬の中には高い血漿タンパク結合率を示すものがある。スタチン系薬は酸性薬物であることから主にアルブミンに結合すると考えられるが、アルブミン分子上のどのサイトに結合するかについてはこれまで明らかにされていない。タンパク結合性 UTs の中にはアルブミンのサイト I に結合するもの、サイト II に結合するものが存在することから、スタチン系薬の血漿タンパク結合に影響を及ぼす UTs を明らかにすることは临床上重要と考えられる。

そこで第3章では、UTs のアルブミンへの結合性、ならびにスタチン系薬の血漿タンパク結合に対する影響について評価するために、限外ろ過法を用いて IS, IA および CMPF のヒト血清アルブミン (HSA) への結合率を測定するとともに、これら3種 UTs 共存下におけるプラバスタチンの HSA への結合率の変化について検討した。

## 第2節 実験方法

### 第1項 使用薬物および試薬

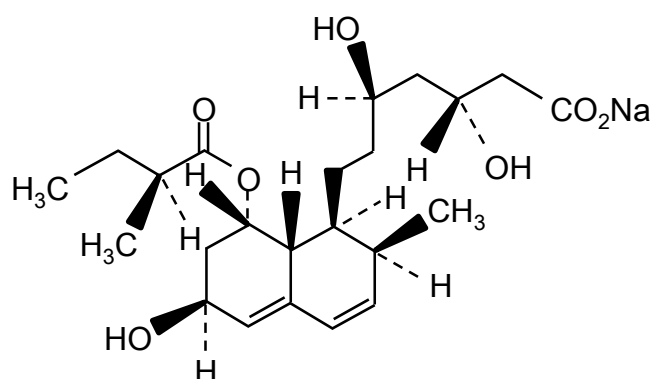
本実験に新たに用いた試薬類は以下の通りである。

プラバスタチンナトリウム塩水和物 (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)

アルブミン, ヒト血清由来 (和光純薬工業, 大阪)

実験に使用したプラバスタチンの構造式を Fig. 11 に示す。

その他試薬および溶媒は, すべて市販の特級規格品を用いた。



**Fig. 11. Chemical Structure of Pravastatin Sodium**

第2項 限外ろ過法によるインドキシル硫酸, インドール酢酸および3-カルボキシ-4-メチル-5-プロピル-2-フランプロピオン酸のヒト血清アルブミンへの結合実験

(1) 薬物溶液の調製

IS, CMPF および HSA は, 塩化カルシウムを含まない Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS, pH 7.4) に溶解した. DPBS の組成を Table 4 に示した. 濃度は IS および CMPF 100  $\mu\text{M}$ , HSA 8% (w/v) とした. インドール酢酸は水に難溶のため, まずエタノールに溶解して原液を調製し, これを上述の DPBS で希釈して 100  $\mu\text{M}$  とした. なお, エタノールの最終濃度は 0.5% (v/v) 以下とした. 各溶液は実験直前に pH を再度 7.4 に調整した.

**Table 4. Composition of DPBS without  $\text{CaCl}_2$**

NaCl	137 mM
KCl	3 mM
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	8 mM
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1.5 mM
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.5 mM

(2) ヒト血清アルブミンへのインドキシル硫酸, インドール酢酸および 3-カルボキシ-4-メチル-5-プロピル-2-フランプロピオン酸の結合率の測定

IS, IA または CMPF 溶液と HSA 溶液を 1 : 1 で混合し, 37°C で 30 分間インキュベートした. インキュベート時の濃度はアニオン性 UTs 50  $\mu\text{M}$ , HSA 4% (w/v) とした. インキュベート後の溶液 0.5 mL を Nanosep<sup>®</sup> 10K OMEGA centrifugal devices (Pall Life Sciences, Port Washington, NY, USA) の上部に充填して遠心分離 (12,000g, 10 分, 20°C) した. また, 各 UTs 溶液 (100  $\mu\text{M}$ ) と DPBS を 1 : 1 で混合し, 前述と同様に遠心分離を行った. 得られたろ液 100  $\mu\text{L}$  にメタノール 100  $\mu\text{L}$  を加えて氷冷下 10 分間放置した後, 遠心分離 (5,400g, 10 分, 5°C) し, 上清中の UTs 濃度を測定した. それぞれの濃度を遊離濃度および総濃度とし, 式 (4) に従って HSA への結合率を算出した. なお, 今回用いた限外ろ過膜への吸着率は, 遠心分離直前の UTs 濃度である 50  $\mu\text{M}$  を 100% とし, 式 (5) に従って算出した.

$$\text{HSA への結合率 (\%)} = (\text{総濃度} - \text{遊離濃度}) / \text{総濃度} \times 100 \quad (4)$$

$$\text{限外ろ過膜への吸着率 (\%)} = (50 - \text{総濃度}) / 50 \times 100 \quad (5)$$

### 第 3 項 ヒト血清アルブミンへのプラバスタチン結合に対するインドキシル硫酸、 インドール酢酸および3-カルボキシ-4-メチル-5-プロピル-2-フランプロピ オン酸の影響

#### (1) 薬物溶液の調製

塩化カルシウムを含まない DPBS とジメチルスルホキシドの 1 : 1 混液を用いて、800  $\mu\text{M}$  の IS, IA または CMPF と 100  $\mu\text{M}$  のプラバスタチンの混合溶液を調製した。HSA は塩化カルシウムを含まない DPBS に溶解し、濃度は 4% (w/v) とした。これらの溶液は実験直前に pH を再度 7.4 に調整した。

#### (2) インドキシル硫酸、インドール酢酸または 3-カルボキシ-4-メチル-5-プロピル -2-フランプロピオン酸共存下におけるヒト血清アルブミンへのプラバスタチンの 結合率の測定

IS, IA または CMPF とプラバスタチンの混合溶液を 4% (w/v) の HSA 溶液と 1 : 1 で混合し、37°C で 30 分間インキュベートした後、第 1 部 第 3 章 第 2 節 第 2 項 (2) に準拠して限外ろ過を行い、プラバスタチンの結合率を算出した。なお、最終濃度はプラバスタチン 50  $\mu\text{M}$ , UTs 400  $\mu\text{M}$ , HSA 2% (w/v) である。

#### 第4項 プラバスタチンの定量

プラバスタチンの定量は HPLC-UV 法にて絶対検量線法により行った. 分析条件を Table 5 に示した.

**Table 5. HPLC Conditions for Pravastatin Assay**

---

---

**Pravastatin**

Apparatus : Shimadzu LC-10AS (Shimadzu, Kyoto, Japan)

Detector : Shimadzu SPD-10A (Shimadzu, Kyoto, Japan)

Column : Inertsil ODS-3 (5  $\mu$  m, 4.6 mm i.d.  $\times$  250 mm, GL Sciences Inc., Toyko, Japan)

Column temperature : 40°C

Wave length : 238 nm

Mobile phase : 2.5 mM CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>NH<sub>4</sub> : CH<sub>3</sub>CN = 7 : 3

Flow rate : 1.0 mL/min (retention time : 8 min)

---

#### 第5項 統計処理

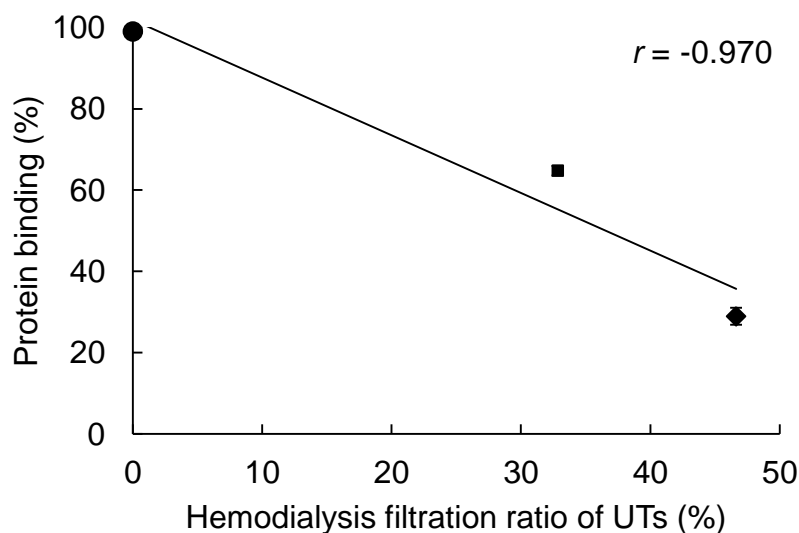
HSA への結合率は平均値  $\pm$  標準誤差 (mean  $\pm$  S.E.) で示した. UT 共存下, 非共存下におけるプラバスタチンのタンパク結合率の有意差の検定は Dunnett test にて行い,  $p < 0.05$  をもって有意差ありとした.

### 第3節 結果

#### 第1項 ヒト血清アルブミンへのインドキシル硫酸、インドール酢酸および3-カルボキシ-4-メチル-5-プロピル-2-フランプロピオン酸の結合率

限外ろ過法にて、IS および IA の HSA への結合率を算出したところ、それぞれ  $64.8 \pm 1.2\%$ ,  $29.0 \pm 2.1\%$  であった。一方、CMPF は限外ろ過によるろ液中に全く検出されなかったことから、CMPF の HSA への結合率はほぼ 100% であると判断された。なお、今回使用した限外ろ過膜への IS, IA および CMPF の吸着率は、それぞれ 12.1% 以下、0.6% 以下、0% であった。

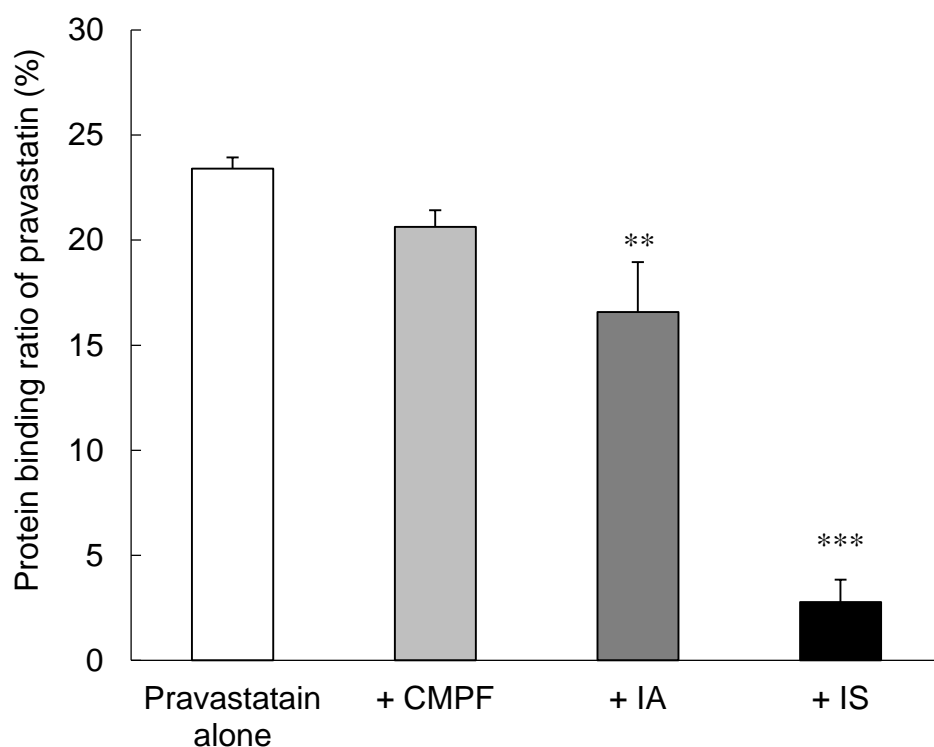
また、各 UT の HSA への結合率と、第1章において算出した透析除去率の相関係数を算出したところ、 $-0.970$  であった (Fig. 12)。



**Fig. 12. Correlation between Binding Ratio to HSA and Hemodialysis Filtration Ratios of Indoxyl Sulfate, Indoleacetic Acid and 3-Carboxy-4-Methyl-5-Propyl-2- Furanpropionic Acid**  
Each point represents the mean with S.E. (n = 3).  
Error bars are hidden behind symbols.

第2項 インドキシル硫酸, インドール酢酸および3-カルボキシ-4-メチル-5-プロピル-2-フランプロピオン酸共存下におけるヒト血清アルブミンへのプラバスタチンの結合の変化

限外ろ過法にてプラバスタチンのタンパク結合率を測定したところ,  $23.4 \pm 0.5\%$ であった. この値は IS 共存下で  $2.8 \pm 1.1\%$  (減少率: 88.1%), IA 共存下で  $16.6 \pm 2.4\%$  (減少率: 29.0%), CMPF 共存下で  $20.6 \pm 0.8\%$  (減少率: 12.0%) に低下した. CMPF 共存下において有意差は認められなかったものの, IS または IA を共存させた場合には有意差が認められた (Fig. 13).



**Fig. 13. Effect of 3-Carboxy-4-Methyl-5-Propyl-2-Furanpropionic Acid, Indoxyl Sulfate and Indoleacetic Acid on the Pravastatin Binding to HSA**

Each column represents the mean with S.E. (pravastatin alone:  $n = 6$ , with UTs:  $n = 3$ ).

\*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , significantly different from pravastatin alone.



#### 第4節 考察

多くの酸性薬物の結合に関わるアルブミンは、その構造中にサイト I、サイト II、サイト III とよばれる薬物結合部位を有している。これらを介したアルブミンへの結合の程度は薬物ごとに異なっており、結合能の低い薬物のアルブミンへの結合は、結合能の高い薬物によって置換され、これにより組織分布や代謝、排泄が変化する。現在、ワルファリンやジアゼパムなどの薬物に加えて、ビリルビンや L-チロキシンなどの内因性物質や、CMPF および馬尿酸などの UTs もアルブミンに結合性を示すことが報告されている。<sup>47)</sup> また、血液中に存在する遊離脂肪酸は、アルブミンに結合している UTs に対して、直接的な置換またはアルブミン上の脂肪酸結合サイトに結合することによって間接的に UTs の遊離を促進させ、それに伴って UTs とアルブミン上の結合サイトが同一である薬物のアルブミンとの結合が置換されるといった機序も報告されている。<sup>48)</sup> このように、UTs は血漿中に存在する薬物の遊離濃度を増加させることによって、それらの治療効果や副作用発現などに影響を及ぼすことが考えられる。先にも述べたように、CKD 患者の合併症として多くみられる疾患の一つに脂質異常症があるが、その治療薬としてプラバスタチンなどの HMG-CoA 還元酵素阻害薬が用いられる。スタチン系薬は酸性薬物であり、アルブミンと結合する可能性が考えられるが、アルブミン分子上の結合部位についてはこれまで明らかになっていない。そこで本章では、IS、IA および CMPF の HSA への結合性を比較するとともに、プラバスタチンをモデル薬物として、HSA への結合に対するこれら 3 種アニオン性 UTs の影響について検討した。

限外ろ過法によりこれら 3 種アニオン性 UTs の HSA への結合率を算出したところ、IA と IS はそれぞれ  $29.0 \pm 2.1\%$ 、 $64.8 \pm 1.2\%$  と算出されたのに対し、CMPF はろ液中に全く検出されなかったことから、そのタンパク結合率はほぼ 100% であると判断された。CMPF や IS の透析除去率の決定要因としてタンパク結合率が指摘されているが、<sup>21)</sup> 本研究でもこれらアニオン性 UTs のタンパク結合率と透析除去率との間に良好な負の相関 ( $r = -0.970$ ) が認められた (Fig. 12)。

本章での実験条件におけるプラバスタチンの HSA への結合率は  $23.4 \pm 0.5\%$  であった。この値は CMPF 共存下ではわずかに減少したに過ぎなかった (減少率: 12% 程度) が、IA 共存下および IS 共存下では有意に減少した。ここでの重要な知見は、IS や IA 共存下における HSA へのプラバスタチンの結合率が CMPF 共存下に比べて

大きく低下したことである (Fig. 13). また, プラバスタチンの HSA 結合率の低下は IS でより顕著だった. タンパク結合率が大きい CMPF や IS が HSA への薬物結合を阻害することについては, これまでも様々な報告がなされている. 例えば, フロセミドでは IA や IS 共存下よりも CMPF 共存下において明らかに遊離体濃度が増加する.<sup>20)</sup> また, ワルファリンの HSA への結合を阻害する CMPF はダンシルザルコシンの HSA 結合には影響せず, これに対し IS は, ワルファリンの HSA への結合は変化させず, ダンシルザルコシンの HSA 結合を減少させる.<sup>19)</sup> これらの違いは, CMPF が HSA のサイト I に, 一方 IS はサイト II に高い親和性を有することに起因するとされている.<sup>49)</sup> したがって, 本章で得られた知見に基づけば, プラバスタチンは HSA のサイト II に結合すると推察された.

今回の検討では, プラバスタチンの HSA 上の結合サイトを明らかにし, また, プラバスタチンの HSA 結合に対する 3 種 UTs の阻害効果の強さを比較するために, UTs 濃度を一律 400  $\mu\text{M}$ , プラバスタチン濃度を 50  $\mu\text{M}$  とし, UTs 濃度が 8 倍高い条件下にて限外ろ過を行った. プラバスタチンのインタビューフォームには, プラバスタチン 20 mg を経口投与した場合の最高血漿中濃度は  $0.07 \pm 0.04 \mu\text{M}$  と示されている. また, 第 1 章で検討した血液透析患者における IS の透析前最大血漿中濃度は 358.4  $\mu\text{M}$  であったことから (Fig. 3), 血液透析患者の体内における IS 濃度は, プラバスタチンと比較してかなり高濃度で存在する場合がある. したがって, 血液透析患者の体内において, プラバスタチンの HSA 結合はより顕著に IS によって置換されることが推察された. 他のスタチン系薬のタンパク結合率はプラバスタチンよりも高く, シンバスタチン 95%以上, フルバスタチン 95~97%, アトルバスタチン 80~90%, ピタバスタチン 99%と報告されている (各インタビューフォームより). これらのスタチン系薬もプラバスタチンと同様に HSA のサイト II に結合すると考えられるが, プラバスタチンと比較して, いずれの薬物も脂溶性が高く, 物理化学的性質が異なるため, 今後, これらのスタチン系薬のタンパク結合に対する IS の影響について詳細に検討していく必要がある.

## 第2部 腎における薬物輸送に対する種々尿毒症物質の影響

### 第1章 ラット腎皮質スライスへのアニオン性薬物の取り込みに対する尿毒症物質の影響に関する検討

#### 第1節 緒言

ヒトや動物の小腸や肝、腎には様々な輸送担体が発現し、生体に必須な物質の吸収や、生体に不要な物質（異物）の排泄に重要な役割を担っている。腎尿細管分泌においては、血液中から腎尿細管上皮細胞内への取り込み過程および腎尿細管上皮細胞内から尿細管腔中への排出過程が多様な輸送担体の関与により進行する。このうち、ヒトの腎尿細管上皮細胞内への取り込み過程に関与する代表的な輸送担体として、有機アニオン輸送担体（OAT）や有機カチオン輸送担体（OCT）が挙げられる。これらの輸送担体にはサブタイプが存在し、腎にはそれぞれ OAT1 および OAT3 と OCT2 が主に発現している。<sup>50-52)</sup> 同様に、ラットの腎尿細管上皮細胞の側底膜にも Oat1, Oat3 および Oct2 が発現しており、これらの輸送担体の腎における機能は、ヒトとほぼ同等であるとされている。<sup>53)</sup> ラット腎には Oct1 も発現するが、その発現量は Oct2 と比較して少ない。<sup>53)</sup> このように、腎上皮細胞の側底膜に発現する輸送担体の種類にヒトとラット間で大きな違いがないことから、血液側から腎尿細管上皮細胞内への薬物輸送機構を検討するために、現在でもラット腎皮質スライス法が汎用されている。<sup>13,27-29)</sup>

担体輸送では共通に輸送される基質薬物が共存する場合、競合的な阻害が起こる。例えば、OAT 発現細胞を用いた検討で、セファゾリンやセフォペラゾンなどのセファロsporin系抗生物質や、シメチジン、プラバスタチンが、OAT の基質薬物として知られているパラアミノ馬尿酸（PAH）やエストロン硫酸の取り込みを低下させることが報告されている。<sup>54,55)</sup> このような細胞内への取り込みの阻害が腎で引き起こされた場合、輸送が阻害された薬物の消失が遅延し、作用増強や副作用発現が引き起こされる。

腎機能が正常な場合には、UTs は輸送担体を介して効率よく体外へと排泄される。これまで、OAT3 を発現させたアフリカツメガエル卵母細胞を用いた検討において、IS の取り込みがプロベネシドや PAH によって阻害されること、<sup>12)</sup> OAT 発現細胞を用

いた検討において、IS の輸送には OAT1 および OAT3 が関与し、CMPF の輸送には主に OAT3 が関与すること、<sup>28)</sup> ラット腎皮質スライスを用いた検討において、CMPF の取り込みが PAH 共存下で濃度依存的に低下すること<sup>13)</sup> などが報告されている。また、UTs が輸送担体を介した薬物輸送を阻害することも知られている。その例として、CMPF がエリスロマイシンの有機アニオン輸送ポリペプチド (Oatp) を介したラット肝細胞への取り込みを濃度依存的に低下させること、<sup>56)</sup> IS や IA, キヌレニン酸、*p*-クレソールなどが OATP1B1 および OATP1B3 による薬物輸送に対し阻害作用を示すこと<sup>57)</sup> などが報告されている。このように、UTs の腎尿細管上皮細胞への取り込みに輸送担体の関与することや、肝取り込みに関わる輸送担体を介した相互作用が報告されていることから、UTs が薬物の腎排泄に対しても影響を及ぼすことが考えられる。しかしながらこれまで、尿細管分泌における薬物と尿毒症物質の相互作用については、十分な検討がなされてこなかった。

そこで本章では、血管側から腎尿細管上皮細胞への取り込み機構を評価する実験モデルとして汎用されるラット腎皮質スライス法にて、Oat 基質薬物の取り込みに対する IS, IA, CMPF の影響を検討した。対象薬物としては、メトトレキサート (MTX) と、OAT によって輸送されることが報告されているメロペネム (MEPM)<sup>58)</sup> を使用した。

## 第2節 実験方法

### 第1項 使用薬物および試薬

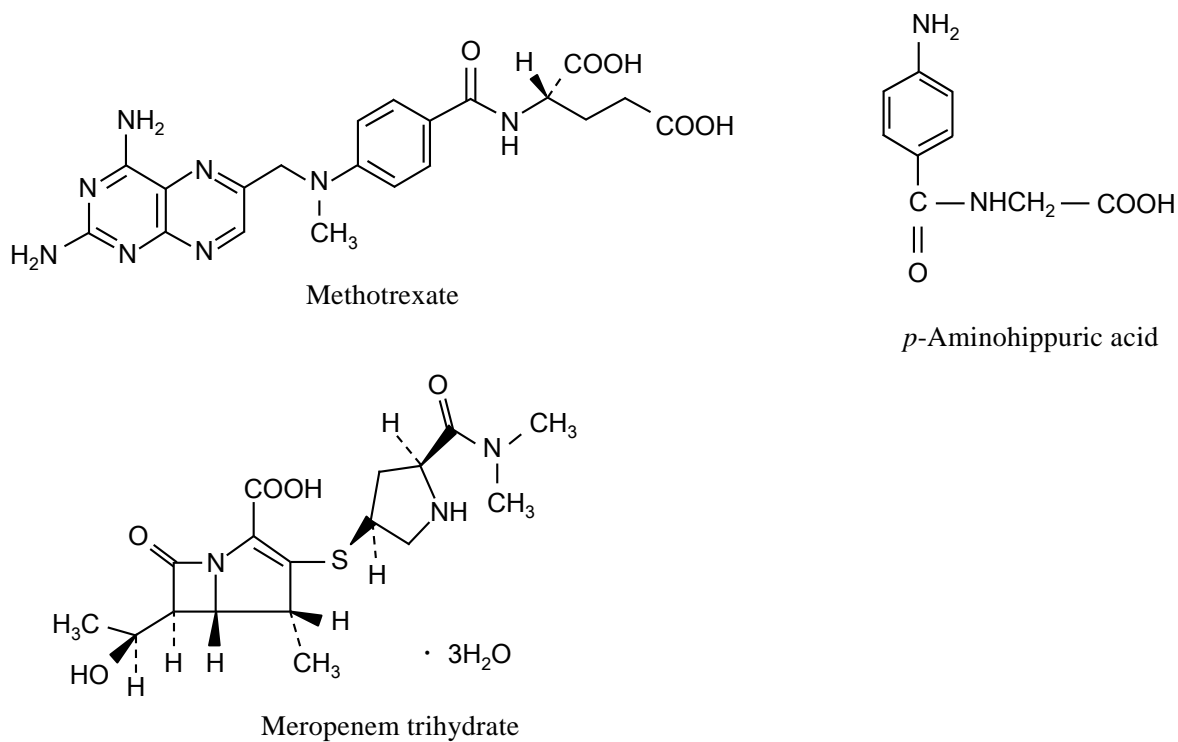
本章で新たに用いた医薬品および試薬類は以下の通りである。

メトトレキサート (和光純薬工業, 大阪)

*p*-アミノ馬尿酸 (和光純薬工業, 大阪)

メロペネム三水和物 (メロペン<sup>®</sup>, 大日本住友製薬, 大阪)

これらの構造式を Fig. 14 に示す。その他試薬および溶媒は、すべて市販の特級規格品を用いた。



**Fig. 14. Chemical Structures of Methotrexate, Meropenem and *p*-Aminohippuric Acid**

## 第2項 ラット腎皮質スライスを用いた取り込み実験

### (1) 実験動物

実験動物には Sprague-Dawley 系雄性ラット (200~660 g, ホクドー, 札幌) を使用した。動物実験は北海道医療大学動物実験センターの承認を得, 北海道医療大学動物実験規程に従って行った。

### (2) 薬物溶液の調製

薬物溶液の調製には, Table 6 に示した incubation buffer (pH 7.4) を使用した。incubation buffer にはあらかじめ約1時間混合ガス (95% O<sub>2</sub> : 5% CO<sub>2</sub>) を通気させた。薬物濃度は MTX 50 μM, MEPM 100 μM とし, 薬物溶液は実験前に pH を再度 7.4 に調整した。

**Table 6. Composition of Incubation Buffer**

NaCl	84.8 mM
KCl	40 mM
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.74 mM
NaHCO <sub>3</sub>	25.2 mM

### (3) ラット腎皮質スライスへの取り込み実験

Cross ら<sup>30)</sup>の方法に準拠し, ラット腎皮質スライスを調製した。ペントバルビタールナトリウムの腹腔内投与 (40 mg/kg) およびイソフルランの吸入によって麻酔したラットから摘出した左右腎臓を氷冷した 0.02 M KCl-0.13 M NaCl 溶液で洗浄後, Stadie-Riggs microtome<sup>59)</sup> で質量約 50 mg となるようにスライスした。得られた腎スライスを薬物溶液 3 mL 中に浸し, 混合ガス (95% O<sub>2</sub> : 5% CO<sub>2</sub>) を通気下 37°C 条件下でインキュベートした。なお, インキュベート時間は MTX15 分, MEPM30 分とした。その後, 腎スライスを取り出し, 氷冷 0.02 M KCl-0.13 M NaCl 溶液にて洗浄した後, 1 mL の incubation buffer を加えてポリトロン®によりホモジナイズし, 遠心分離 (5,400g, 10 分, 5°C) した。得られたホモジネート上清 100 μL に incubation buffer 100 μL と MTX の場合にはメタノール 200 μL, MEPM の場合には 0.1% トリフルオロ酢酸

200  $\mu$ L を加え、氷冷下 10 分放置した後、遠心分離 (5,400g, 10 分, 5°C) し、得られた上清中の薬物濃度を測定した。

また、同一の個体から得られた腎皮質スライスを用いて阻害剤の非共存下ならびに共存下にて取り込み実験を行ったものについては、阻害剤非共存下での値を対照として、阻害剤共存下での取り込み量の割合を算出した。

### 第 3 項 薬物の定量

薬物の定量はすべて HPLC-UV 法にて行った。MTX および MEPM の分析条件を Table 7 に示した。

**Table 7. HPLC Conditions for Methotrexate and Meropenem Assay**

---

Apparatus : Shimadzu LC-10AT <sub>VP</sub> (Shimadzu, Kyoto, Japan)
Detector : Shimadzu SPD-10A <sub>VP</sub> (Shimadzu, Kyoto, Japan)
<b>Methotrexate</b>
Column : Cosmosil 5C <sub>18</sub> AR- II (5 $\mu$ m, 4.6 mm i.d. $\times$ 150 mm, Nacalai Tesque Inc., Kyoto, Japan)
Column temperature : 35°C
Wave length : 300 nm
Mobile phase : 0.05 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> : CH <sub>3</sub> CN = 9 : 1
Flow rate : 1.0 mL/min (retention time : 5 min)
<b>Meropenem</b>
Column : Inertsil ODS-3 (5 $\mu$ m, 4.6 mm i.d. $\times$ 250 mm, GL Sciences Inc., Toyko, Japan)
Column temperature : 30°C
Wave length : 310 nm
Mobile phase : 0.05 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> : CH <sub>3</sub> OH = 85 : 15
Flow rate : 0.8 mL/min (retention time : 13 min)

---

### 第 4 項 統計処理

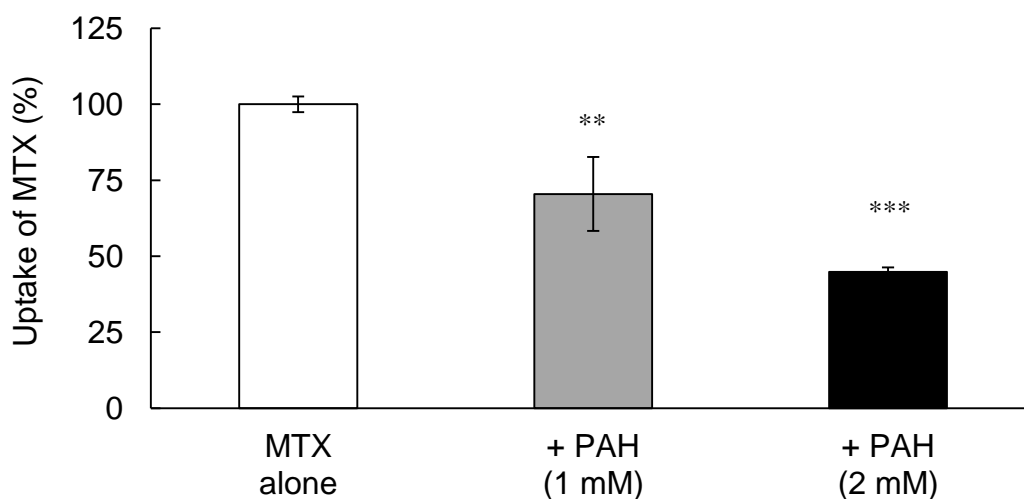
結果は平均値  $\pm$  標準誤差 (mean  $\pm$  S.E.) で示した。なお、有意差検定は Dunnett test または Student's *t*-test を用いて行い、 $p < 0.05$  をもって有意差ありとした。

### 第3節 実験結果

#### 第1項 ラット腎皮質スライスへのメトトレキサートの取り込み挙動

まず, MTX のラット腎皮質スライスへの取り込みにおける Oat の寄与ならびに代表的な Oat 基質を共存させた場合の MTX の取り込み量の変化の程度を確認するために, MTX に PAH を共存させ, 取り込み実験を行った.

その結果, ラット腎皮質スライス 1 mg あたりの MTX の取り込み量は  $39.9 \pm 1.7$  pmol であり, この取り込み量は 1 mM または 2 mM の PAH 共存下で, それぞれ 70.5%, 44.9% まで有意に低下した (Fig. 15).



**Fig. 15. Effect of *p*-Aminohippuric Acid on the Uptake of Methotrexate by Rat Renal Cortical Slices**

Each column represents the mean with S.E. of 3-34 experiments.

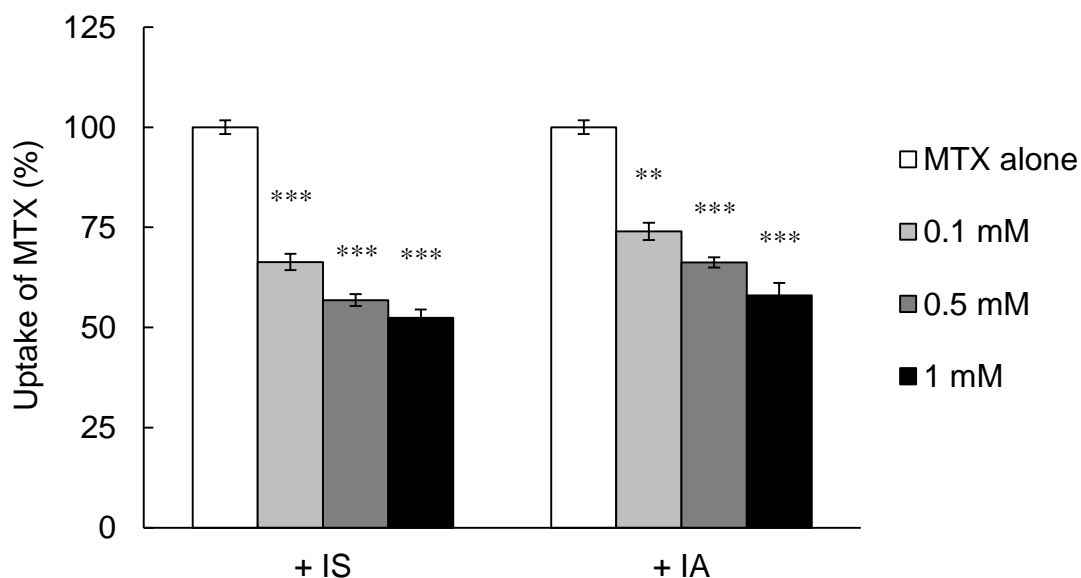
\*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , significantly different from MTX alone.



## 第2項 ラット腎皮質スライスへのメトトレキサート取り込みに対するインドキシル硫酸およびインドール酢酸の影響

前項において、ラット腎皮質スライスへのMTX取り込みがPAH共存下で有意に低下し、Oatの関与が確認できたことから、次にISまたはIAを共存させMTX取り込み量の変化を検討した。

その結果、MTXの取り込みは今回用いたISおよびIAの濃度に依存して、いずれの場合も有意に低下した (Fig. 16)。また、1 mMのISまたはIA共存下においてMTXの取り込みはそれぞれ52.5%、58.0%まで低下したことから、両UTsの阻害効果はほぼ同程度とみなされた。



**Fig. 16. Effect of Indoxyl Sulfate and Indoleacetic Acid on the Uptake of Methotrexate by Rat Renal Cortical Slices**

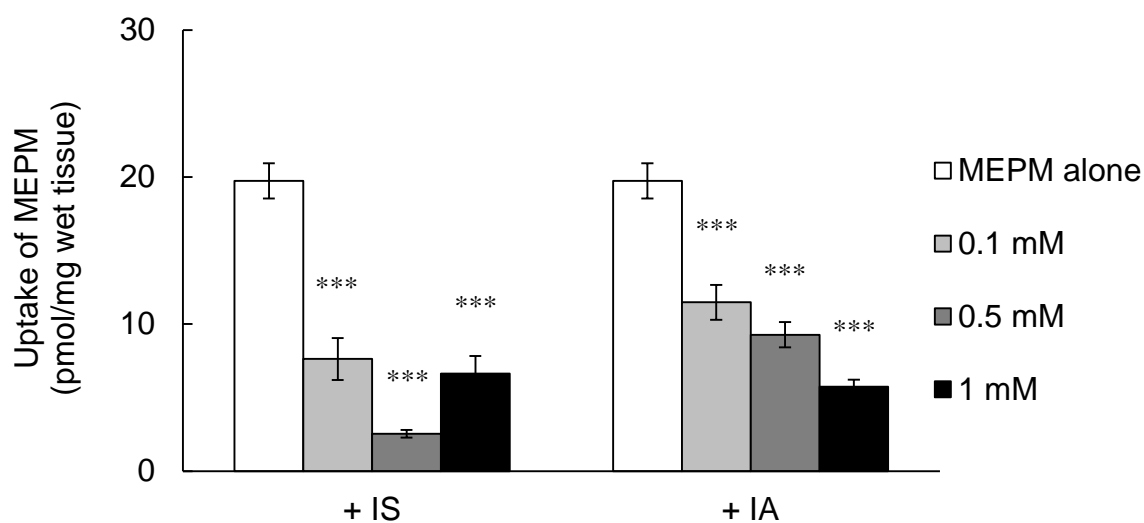
Each column represents the mean with S.E. of 5-34 experiments.

\*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , significantly different from MTX alone.

第3項 ラット腎皮質スライスへのメロペネム取り込みに対するインドキシル硫酸、  
インドール酢酸および3-カルボキシ-4-メチル-5-プロピル-2-フランプロ  
ピオン酸の影響

当研究室における過去の検討で、MEPM (0.1 mM) のラット腎皮質スライスへの取り込みに対して PAH (1 mM) を共存させたところ、MEPM の取り込み量は約 14 pmol/mg wet tissue から約 6 pmol/mg wet tissue へと有意に低下した。このことから、MEPM の血液側から腎尿細管上皮細胞内への輸送には Oat が関与することが推察された。そこで本項では、IS、IA または CMPF 共存下におけるラット腎皮質スライスへの MEPM の取り込み量の変化について検討した。

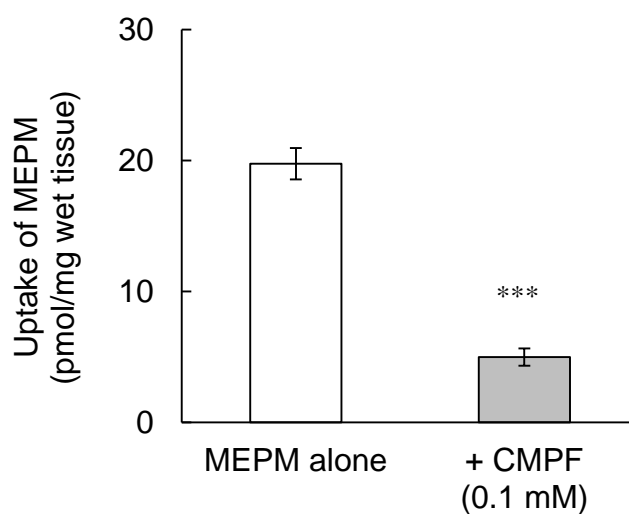
その結果、Fig. 17 に示すように、IS または IA を 0.1, 0.5, 1 mM の濃度で共存させると、MEPM の取り込みは有意に低下した。0.5 mM の IS 共存下における MEPM の取り込み量は、1 mM の IS 共存下よりも大きく減少する傾向を示したが、これらに有意差は認められなかった。また、0.1 mM の CMPF を共存させた場合においても MEPM の取り込み量は大きく減少した (Fig. 18)。



**Fig. 17. Effect of Indoxyl Sulfate and Indoleacetic Acid on the Uptake of Meropenem by Rat Renal Cortical Slices**

Each column represents the mean with S.E. of 3-4 experiments.

\*\*\*  $p < 0.001$ , significantly different from MEPM alone.



**Fig. 18. Effect of 3-Carboxy-4-Methyl-5-Propyl-2-Furanpropionic Acid on the Uptake of Meropenem by Rat Renal Cortical Slices**

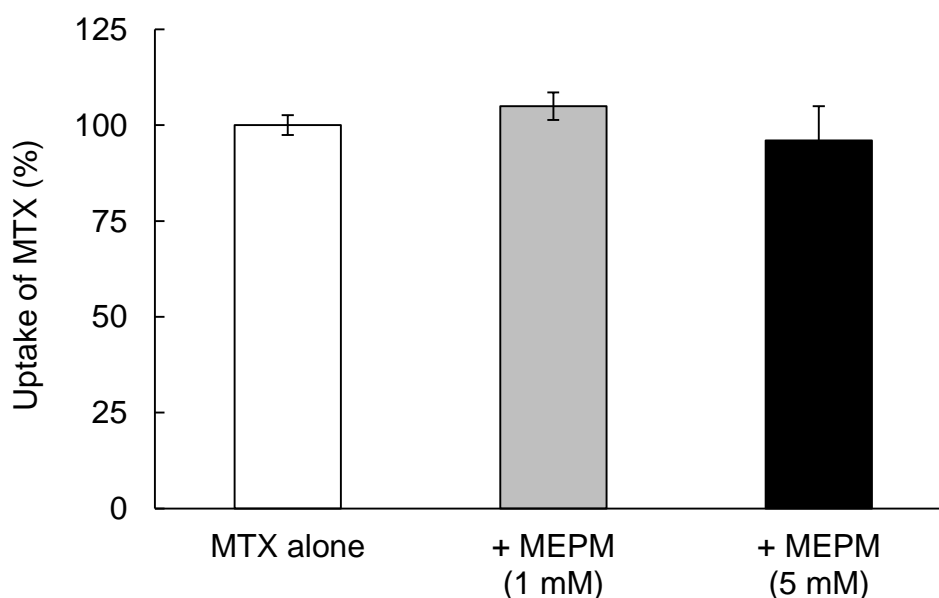
Each column represents the mean with S.E. of 4 experiments.

\*\*\*  $p < 0.001$ , significantly different from MEPM alone.

#### 第 4 項 ラット腎皮質スライスへのメトトレキサート取り込みに対するメロペネムの影響

MTX および MEPM のラット腎皮質スライスへの取り込み量が, IS および IA 共存下で有意に低下したことから, MTX と MEPM は共通の輸送機構を介して尿細管分泌を受けると推察された.

このことを確認するために, 1 mM または 5 mM の MEPM を共存させて MTX の取り込み実験を行った. しかしながら, いずれの MEPM 濃度においても MTX 取り込み量に有意な変化は認められなかった (Fig. 19).



**Fig. 19. Effect of Meropenem on the Uptake of Methotrexate by Rat Renal Cortical Slices**

Each column represents the mean with S.E. of 3-34 experiments.

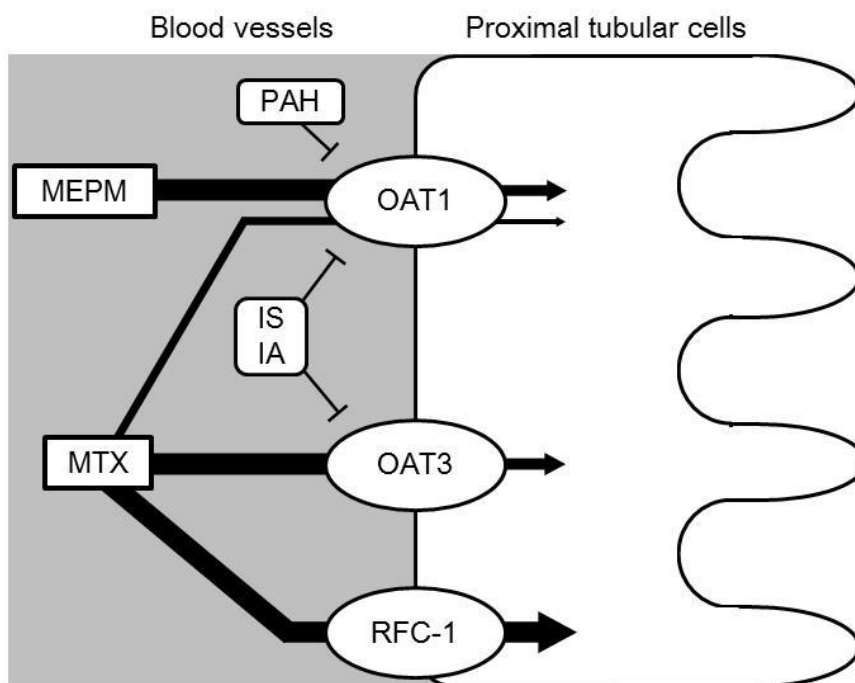
#### 第4節 考察

当研究室ではこれまで、ラット腎皮質スライスへの MEPM 取り込み量が OAT の基質として知られる PAH<sup>60,61)</sup> 共存下および IS 共存下で有意に低下するという知見を得てきた。そこで本章では、複数の Oat 基質薬物の腎排泄に対する UTs の影響を比較するために、MTX と MEPM を用いてラット腎皮質スライス取り込み実験を行った。

まず、MTX がラット腎尿細管上皮細胞の側底膜に発現する Oat によって輸送されることを確認するため、PAH を共存させた場合のラット腎皮質スライスへの MTX 取り込み量の変化について検討した。その結果、1 mM または 2 mM の PAH 共存下において MTX 取り込み量は有意に低値を示した (Fig. 15) ことから、MTX の取り込みに Oat の関与することが確認された。また、1 mM PAH 共存下における MTX 取り込み量は PAH 非共存下の取り込み量の 70.5% に低下した (Fig. 15)。一方、当研究室の過去の検討では、1 mM PAH を共存させた場合、MEPM の取り込み量が 50% 以上減少するという結果が得られている。これらのことから、PAH は MTX と比較して、MEPM に対してより大きな影響を及ぼす可能性が考えられた。また、MTX と MEPM の腎尿細管上皮細胞側底膜における輸送機構の異同性を検討するために、MEPM 共存下での MTX 取り込み実験を行ったところ、MEPM は MTX の取り込みを変化させないことが示された (Fig. 19)。この結果は MEPM と MTX の取り込みに関わる輸送担体が異なることを示唆した。

PAH は OAT3 と比較して、OAT1 に対してより高い親和性を示すことが報告されている。<sup>27)</sup> したがって、過去の検討で、1 mM PAH 共存下においてラット腎皮質スライスへの取り込み量が約 50% 以下まで減少した MEPM<sup>62)</sup> では、OAT1 の寄与が相対的に大きいと推察された。一方、血液側から腎尿細管上皮細胞内への MTX 輸送には OAT の他に還元型葉酸トランスポーター (RFC-1) が関与することが知られている。これについて Nozaki ら<sup>27)</sup> は、Madin-Darby canine kidney (MDCK) II 細胞に RFC-1 を発現させた場合、MTX の取り込み量が大きく増加することや、MTX が RFC-1 の特異的基質である 5-メチルテトラヒドロ葉酸 (5-MTHF) の取り込みを阻害することを報告した。また、ラット腎皮質スライスを用いた検討において、葉酸や 5-MTHF が MTX の取り込みを約 30% 低下させたこと、OAT3 の基質薬物であるベンジルペニシリン (PCG) によってラット腎皮質スライスへの取り込みが約 50% 低

下したこと, さらに OAT1 に対してより強い阻害作用を示す PAH によって 20~30% 低下したことが報告された.<sup>27)</sup> これらの結果から, MTX 輸送における RFC-1 および OAT3 の寄与はそれぞれ約 30%, 30%~50% と見積もられている. したがって, 本検討において PAH や MEPM によって OAT1 が阻害された場合でも, MTX は RFC-1 と OAT3 によって効率よく腎上皮細胞へ取り込まれるため, PAH や MEPM による影響が比較的小さく現れた可能性が考えられる. これに対し, MEPM の場合は PAH と共通の輸送担体である OAT1 によって主に輸送されるため, PAH による影響を強く受けたと推察された. Fig. 20 に, MEPM と MTX の腎尿細管上皮細胞への取り込みに関わると推察された輸送担体について図示した.



**Fig. 20. Possible Transporters Involved in the Uptake of Meropenem and Methotrexate in the Renal Proximal Tubular Cells**

アニオン性 UTs である IS または IA を共存させて MEPM および MTX のラット腎皮質スライスへの取り込み量の変化を検討したところ, IS および IA はいずれの濃度でも MEPM および MTX の取り込み量を有意に低下させた (Figs. 16 & 17) ことから, MEPM および MTX の輸送はアニオン性 UTs によって阻害されることが示さ

れた。さらに、MEPMの取り込み量は、0.1 mM CMPF 共存下においても有意に低下し (Fig. 18), 同濃度の IS または IA の共存下における MEPM の取り込み量と比較して最も低い値を示したことから、CMPF は IS や IA よりも MEPM 輸送に対する阻害作用が強いと考えられた。また、1 mM の IS または IA を共存させた場合、MTX の取り込み量の低下は約 50% だったのに対し、MEPM 取り込み量は約 30% まで低下していることから、これらの UTs は有機アニオン輸送に関わる複数の輸送担体を阻害することが考えられたものの、MEPM 輸送に対してより大きな影響を及ぼすとみなされた。この要因としては、先に述べたように、MTX の取り込みには OAT1, OAT3 および RFC-1 など複数の輸送担体が関与するため、IS や IA による影響が MEPM と比較して小さかったことや、IS および IA が OAT1 に対してより強い阻害作用を示すことが考えられた (Fig. 20)。

第 1 部第 1 章にて、血液透析患者の血漿中 IS 濃度について検討したが、平均血漿中濃度は、透析前  $157.9 \pm 19.9 \mu\text{M}$ 、透析直後  $103.8 \pm 13.3 \mu\text{M}$  であり、また透析前の透析患者における最大値は  $358.4 \mu\text{M}$  であった (Fig. 3)。第 1 部第 3 章にて測定した IS の HSA への結合率は 64.8% であり、この値を用いて血漿中 IS 濃度の遊離濃度を算出すると、透析前の透析患者における最大値は  $126.2 \mu\text{M}$  であった。本章では、IS の最低濃度を 0.1 mM として MTX または MEPM に共存させて取り込み実験を行ったところ、0.1 mM IS は両薬物の取り込み量を有意に低下させた。したがって、血液透析患者の体内において IS が薬物と実際に相互作用を引き起こす可能性は充分にあると判断されることから、IS による薬物の腎排泄への影響について、更に詳細に検討を進める必要があると考えられた。

## 第2章 両イオン性薬物ピアペネムのラット腎皮質スライス取り込みに対する尿毒症物質の影響

### 第1節 緒言

ヒト腎尿細管上皮細胞の側底膜に発現する OCT2 は、カチオン性物質を基質として細胞内へ輸送する役割を担う。<sup>51,63)</sup> Burger ら<sup>64)</sup> は、シスプラチンやオキサリプラチンなどの白金製剤が OCT2 を発現させた HEK293 細胞によって取り込まれることや、オキサリプラチンの取り込みが OCT 基質であるテトラエチルアンモニウム (TEA) や 1-メチル-4-フェニルピリジニウム (MPP) の共存下で有意に低下したことを報告している。また、Nies ら<sup>65)</sup> は、OCT1, OCT2 および OCT3 をそれぞれ発現させた HEK 細胞にメトホルミン (MET) が取り込まれること、さらにその輸送がプロトンポンプ阻害薬のオメプラゾールやラベプラゾールによって阻害されたことを報告している。

前章にて用いた IS, IA および CMPF は、いずれもアニオン性の構造を有する UTs であるが、UTs にはカチオン性の構造を有するものも多く存在する。その例としてジメチルアミンやトリメチルアミンなどのアミン類、スペルミンやスペルミジン、プトレッシンなどのポリアミン類などがあるが、体内動態に OCT が関与することが知られている UTs としてはグアニジノ化合物が挙げられる。<sup>3,22)</sup> グアニジノ化合物の一つであるグアニジン (GU) では、OCT2 を発現させた細胞への取り込みが促進されることや、GU が MPP の取り込みを低下させることから、GU の輸送に OCT2 が関与すると考えられている。また、GU と類似の構造を有するクレアチニン (Cr) が GU と同様に OCT2 によって取り込まれることが報告されている。<sup>66)</sup> したがって、グアニジノ化合物は OCT2 によって輸送される薬物の尿細管分泌に影響を及ぼすことが予測される。当研究室では以前に、カルバペネム系抗生物質の体内動態を明らかにする目的で、両イオン性構造を有するピアペネム (BIPM) のラット腎皮質スライスへの取り込み挙動を検討したところ、BIPM の取り込みが TEA によって阻害されたことから、BIPM の腎排泄には一部 Oct が関与する可能性を見出してきた。そこで本章では、両イオン性薬物の腎尿細管上皮細胞への取り込みに対する UTs の影響について検討するために、アニオン性またはカチオン性の UTs を共存させてラット腎皮質スライスへの BIPM 取り込みに対する影響を比較した。



## 第2節 実験方法

### 第1項 使用薬物および試薬

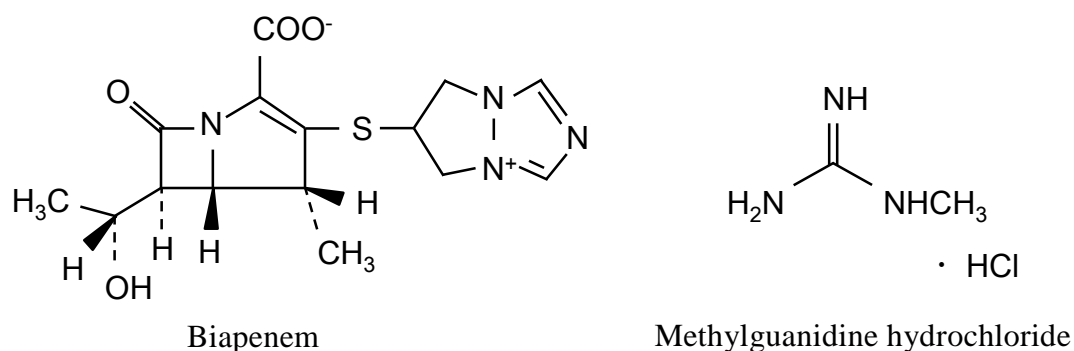
本章で新たに用いた医薬品および試薬類は以下の通りである。

ビアペネム (オメガシン<sup>®</sup>, 明治製菓, 東京)

メチルグアニジン塩酸塩 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)

これらの構造式を Fig. 21 に示す。

その他の試薬および溶媒はすべて市販の特級規格品を用いた。



**Fig. 21. Chemical Structures of Biapenem and Methylguanidine**

### 第2項 ラット腎皮質スライスを用いた取り込み実験

#### (1) 実験動物

実験動物には Sprague-Dawley 系雄性ラット (350~650 g, ホクドー, 札幌) を使用した。

#### (2) 薬物溶液の調製

薬物溶液の調製は第2部 第1章 第2節 第2項 (2) に準拠し, BIPM の濃度は 100  $\mu$ M とした。

#### (3) 腎皮質スライスへの取り込み実験

取り込み実験は第2部 第1章 第2節 第2項 (3) に準拠した。なお, BIPM のインキュベートは 30 分間とした。また, ホモジネート上清に incubation buffer 100  $\mu$ L および 0.1% トリフルオロ酢酸 200  $\mu$ L を加えた。

### 第 3 項 ビアペネムの定量

BIPM の定量は HPLC-UV 法にて行った。BIPM の分析条件を Table 8 に示した。

**Table 8. HPLC Conditions for Biapenem Assay**

---

---

**Biapenem**

Apparatus : Shimadzu LC-10AT<sub>VP</sub> (Shimadzu, Kyoto, Japan)

Detector : Shimadzu SPD-10A<sub>VP</sub> (Shimadzu, Kyoto, Japan)

Column : Inertsil ODS-3 (5  $\mu$  m, 4.6 mm i.d.  $\times$  250 mm, GL Sciences Inc., Toyko, Japan)

Column temperature : 30°C

Wave length : 310 nm

Mobile phase : 0.05 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : CH<sub>3</sub>OH = 97 : 3

Flow rate : 0.8 mL/min (retention time : 12 min)

---

### 第 4 項 統計処理

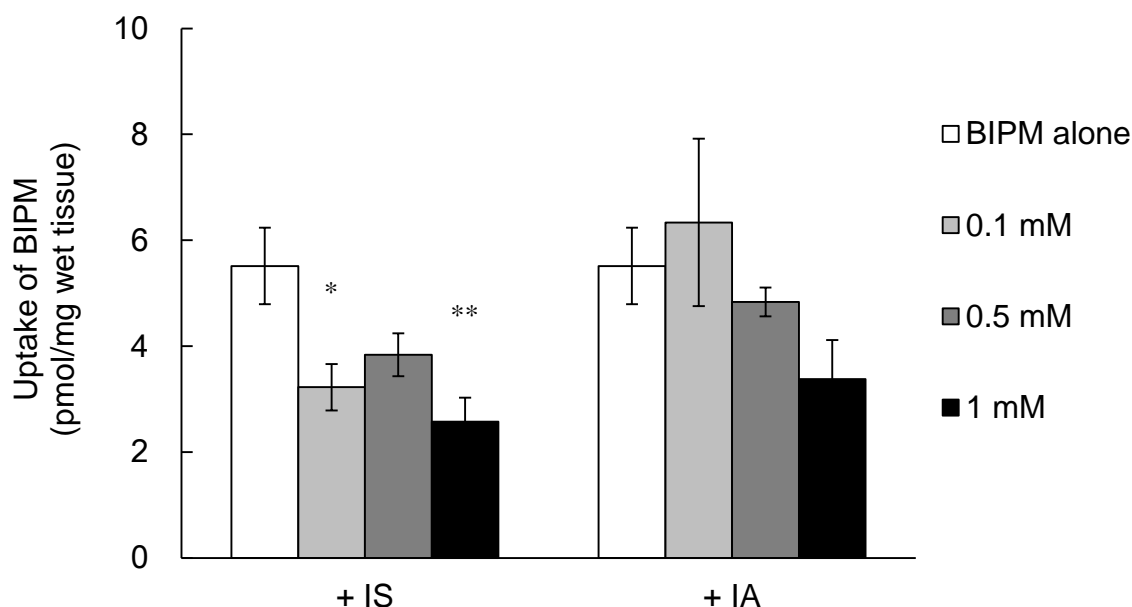
統計処理は第 2 部 第 1 章 第 2 節 第 4 項に準拠した。

### 第3節 実験結果

#### 第1項 ラット腎皮質スライスへのビアペネム取り込みに対するインドキシル硫酸、インドール酢酸および3-カルボキシ-4-メチル-5-プロピル-2-フランプロピオン酸の影響

MEPMと同じくカルバペネム系抗生物質に属するBIPMは、その構造中に陽性および陰性に荷電する部位を有する両イオン性薬物である。そこでまず、BIPMの腎尿細管上皮細胞輸送に対するアニオン性UTsの影響を検討するために、IS、IAまたはCMPFを共存させ、BIPMの取り込み実験を行った。

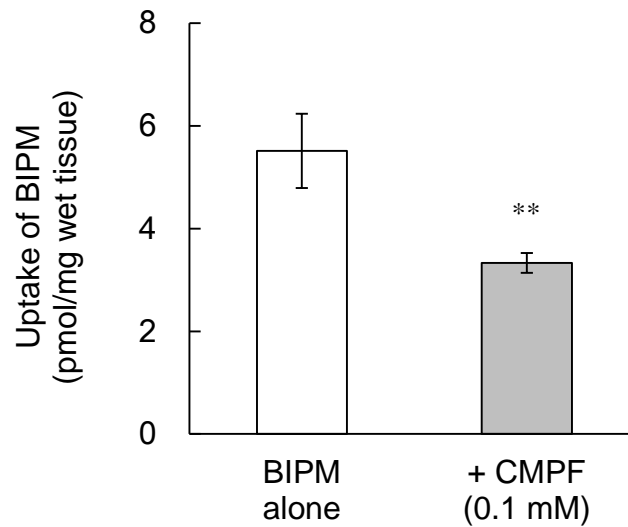
その結果、BIPMのラット腎皮質スライスへの取り込みは腎組織1 mgあたり $5.5 \pm 0.7$  pmolであったが、0.1 および 1 mMのISを共存させた場合、その値は有意に低下した (Fig. 22)。一方、同濃度のIAを共存させた場合、BIPMの取り込みはIAの濃度依存的に低下する傾向を示したものの、いずれの濃度の場合においても有意差は認められなかった (Fig. 22)。また、0.1 mMのCMPFを共存させた場合も、BIPMの取り込みは有意に低下した (Fig. 23)。



**Fig. 22. Effect of Indoxyl Sulfate and Indoleacetic Acid on the Uptake of Biapenem by Rat Renal Cortical Slices**

Each column represents the mean with S.E. of 6-16 experiments.

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , significantly different from BIPM alone.



**Fig. 23. Effect of 3-Carboxy-4-Methyl-5-Propyl-2-Furanpropionic Acid on the Uptake of Biapenem by Rat Renal Cortical Slices**

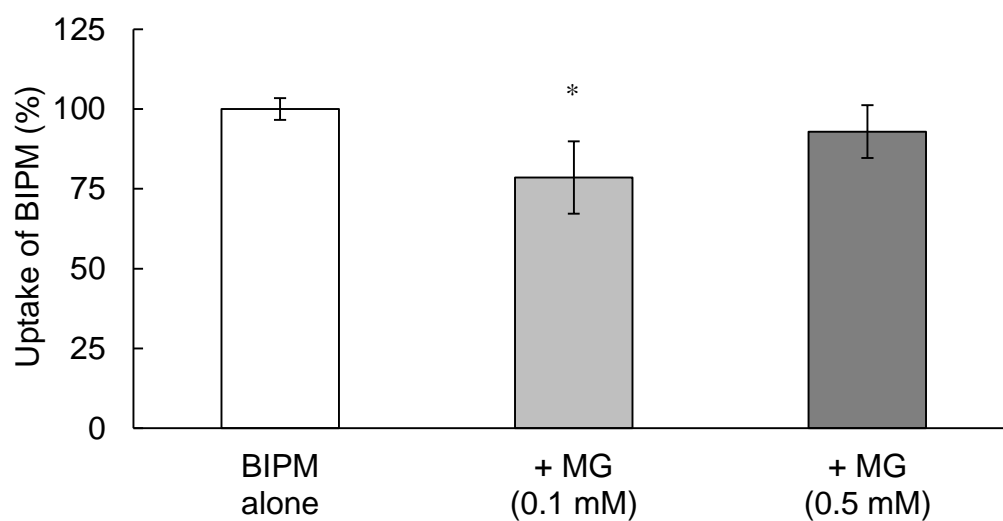
Each column represents the mean with S.E. of 4-16 experiments.

\*\*  $p < 0.01$ , significantly different from BIPM alone.

## 第2項 ラット腎皮質スライスへのピアペネム取り込みに対するメチルグアニジンの影響

カチオン性UTsのグアニジノ化合物にはGUやメチルグアニジン (MG) などがある。これらは腎機能の低下に伴って血漿中濃度が上昇すること、これらグアニジノ化合物の中には OCT による輸送を阻害するものが存在することが報告されている。<sup>66,67)</sup> また、前述のように、当研究室におけるラット腎皮質スライス法による過去の検討で、BIPM は Oct の基質になることが推察されている。したがって、グアニジノ化合物は OCT を阻害することによって BIPM の尿中排泄に影響を及ぼす可能性が考えられた。そこで次に、MG を共存させ、BIPM の取り込み実験を行った。

その結果、Fig. 24 に示すように、0.1 mM MG 共存下で BIPM 取り込み量の有意な減少が認められたものの、0.5 mM MG 共存下の結果も合わせると、BIPM 輸送に対する MG の影響はそれほど大きなものではないと判断された。



**Fig. 24. Effect of Methylguanidine on the Uptake of Biapenem by Rat Renal Cortical Slices**

Each column represents the mean with S.E. of 3-23 experiments.

\*  $p < 0.05$ , significantly different from BIPM alone.

#### 第4節 考察

Hasegawa ら<sup>29)</sup> は、OAT1 および OAT3 発現細胞における PAH の取り込みについて検討し、PAH が OAT1 発現細胞には取り込まれるが、OAT3 発現細胞では取り込みが認められないことを報告している。また、当研究室での過去の検討で、ラット腎皮質スライスへの BIPM の取り込みは Oat1 基質である PAH を共存させた場合にはほとんど変化しないのに対し、TEA を共存させた場合には BIPM 取り込み量が有意に減少するという知見を得ている。これらを併せると、BIPM の腎尿細管上皮細胞への取り込みには、Oct による輸送に加えて、Oat3 による輸送も関与している可能性や、Oat1 の寄与の小さいことが推察された。そのため、BIPM は UTs を共存させることによって、前章において検討した MEPM や MTX とは異なる影響を受けることが予測された。そこでまず、アニオン性 UTs による影響を明らかにするために、BIPM に様々な濃度の IS、IA または CMPF を共存させ、腎皮質スライスへの BIPM 取り込み量の変化について検討した。その結果、いずれの濃度の IS を共存させた場合でも BIPM の取り込み量は減少した (Fig. 22)。

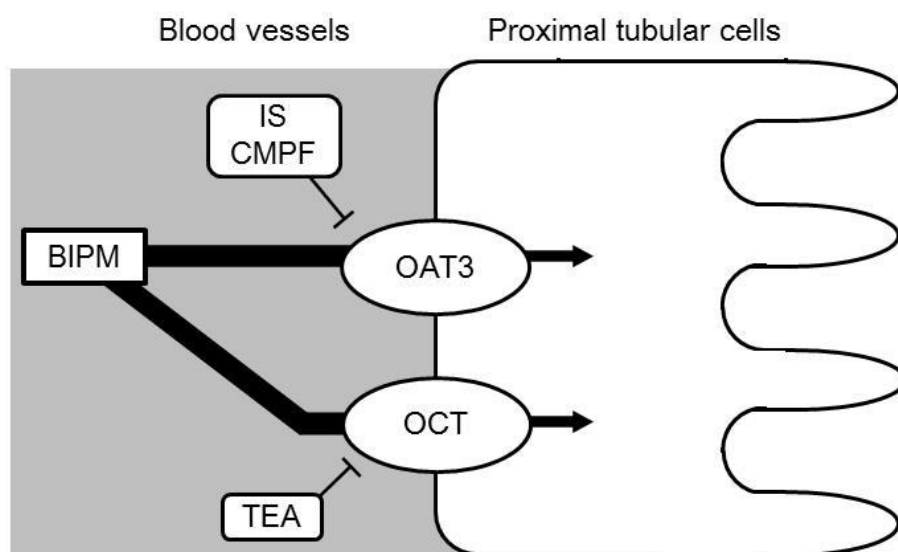
Enomoto ら<sup>68)</sup> は、OAT または OCT 発現細胞を用いた検討において、IS は OAT1 による PAH の取り込みと OAT3 によるエストロン硫酸の取り込みを濃度依存的に低下させるが、その一方で OCT1 と OCT2 による TEA の取り込みには影響を及ぼさなかったことを報告している。先に述べたように、BIPM の腎尿細管上皮細胞への取り込みには、Oct に加えて、Oat3 も関与すると考えられるが、Fig. 22 に示された IS の阻害効果は Oat3 による BIPM 輸送に対して起こっていると推察された。IA を共存させた場合、BIPM の取り込みは、IA 濃度に依存して低下する傾向を示した (Fig. 22) が、有意差は認められなかったことから、BIPM のラット腎皮質スライスへの取り込みに対する IA の影響は小さいとみなされた。

Deguchi ら<sup>15)</sup> は、麻酔下でラット腎動脈へ薬物投与を行う kidney uptake index 法による検討で、IS および CMPF は Oat3 の基質薬物であるベンジルペニシリン (PCG) の取り込みを有意に低下させ、特に CMPF は PCG の取り込みを約 35% まで減少させること、これに対し、IA は PCG の取り込みに対して有意な阻害効果を示さないことを報告している。本検討においても、CMPF 共存下における BIPM のラット腎皮質スライスへの取り込み量は、同濃度の IA 共存下における取り込み量よりも低値を示し、IS を共存させた場合と同程度であった (Fig. 23)。また、前章において、MTX

と MEPM に IS, IA または CMPF を共存させラット腎皮質スライスへの取り込み量の変化を比較検討したが、これらのアニオン性 UTs は、いずれの濃度で共存させた場合においても、BIPM と比較して、MTX および MEPM の取り込み量をより顕著に低下させた (Figs. 16-18). この要因としては、IS, IA または CMPF 共存下において Oat が阻害されても、先に述べたように BIPM は Oat3 に加えて Oct によっても輸送されるため、MEPM や MTX に比べて影響が小さかったことが考えられた。

次に、薬物の腎尿細管上皮細胞への取り込みに対するカチオン性 UTs の影響について検討するために、グアニジノ化合物の一つである MG を共存させて、ラット腎皮質スライスへの BIPM 取り込み実験を行った。その結果、0.1 mM MG 共存下において有意差が認められたが、0.5 mM MG 共存下においては BIPM の取り込み量に有意な変化は認められなかった (Fig. 24). MG は、hOCT1 または hOCT2 を発現させた HEK293 細胞を用いた検討において、両輸送担体による TEA の取り込みに対して阻害作用を示すことが報告されている。<sup>67)</sup> また、腎尿細管上皮細胞の側底膜には OCT2 が発現しているため、腎機能が低下した場合、体内に蓄積した MG は OCT2 を介して薬物と相互作用を引き起こすことが考えられた。しかしながら、今回の検討では MG 共存下で BIPM 取り込みは低下する傾向を示したものの、その変化は大きなものではなかった。先に述べたように BIPM の取り込みは、Oat1 の基質である PAH<sup>29)</sup> 共存下で変化せず、また、Oat3 を阻害する IS および CMPF<sup>15)</sup> 共存下で有意に低下する。したがって、MG の影響が限定的であった要因として、Oat3 による輸送の寄与が大きいことが考えられた。

以上より、両イオン性薬物の BIPM は、Oat3 および Oct によって血管側から腎尿細管上皮細胞へ取り込まれるが、その輸送はアニオン性 UTs の IS や CMPF によってより強く阻害されることが示された (Fig. 25). 本検討ではラット腎皮質スライスへの BIPM 取り込みに対する MG の影響は大きなものではなかったが、末期 CKD 患者のように、血液中に複数の UTs が共存する場合には、他の UTs によっても輸送担体が阻害される可能性も無視できない。実際に、ブチルグアニジン、フェニルグアニジンなど MG と類似の構造を持つグアニジノ化合物が OCT1 および OCT2 に対して阻害作用を示すことが報告されており、<sup>67)</sup> BIPM のように OAT および OCT の基質となる薬物では、血液側から腎尿細管上皮細胞への取り込み過程において、アニオン性 UTs およびカチオン性 UTs の影響を同時に受ける可能性がある。



**Fig. 25. Possible Transporters Involved in the Uptake of Biapenem in the Renal Proximal Tubular Cells**



### 第3章 カチオン性薬物メトホルミンのラット腎皮質スライス取り込みに対する尿毒症物質の影響

#### 第1節 緒言

前章までの検討で、アニオン性薬物の **MEPM** や両イオン性薬物の **BIPM** のラット腎皮質スライスへの取り込みが、**IS** や **CMPF** などのアニオン性 **UTs** によって阻害されることが明らかになった。しかしながら、アニオン性 **UTs** がカチオン性薬物の輸送に及ぼす影響については、これまでほとんど報告されていない。また、カチオン性 **UT** の一種である **MG** は **BIPM** の輸送に大きな影響を及ぼさなかったが、カチオン性 **UT** がカチオン性薬物の輸送に対する影響についても、詳細な報告はこれまでみられていない。

そこで本章では、糖尿病治療薬の一つであるメトホルミン (**MET**) をカチオン性薬物のモデルとし、ラット腎皮質スライスへの **MET** 取り込みに対するアニオン性ならびにカチオン性 **UTs** の影響について検討した。なお、本章ではカチオン性 **UTs** として **MG** と **GU**、およびこれらと類似構造を有するグアニジノコハク酸 (**GSA**) を使用した。

#### 第2節 実験方法

##### 第1項 使用薬物および試薬

本章で新たに用いた試薬類は以下の通りである。

メトホルミン塩酸塩 (MP Biomedicals, LLC, Santa Ana, CA, USA)

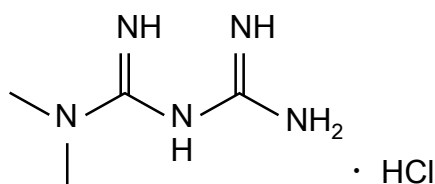
テトラエチルアンモニウム塩化物 (和光純薬工業, 大阪)

グアニジン (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)

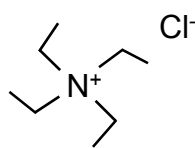
グアニジノコハク酸 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)

これらの構造式を Fig. 26 に示す。

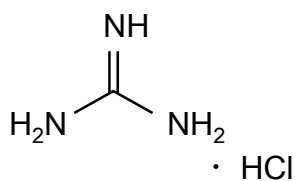
その他試薬および溶媒は、すべて市販の特級規格品を用いた。



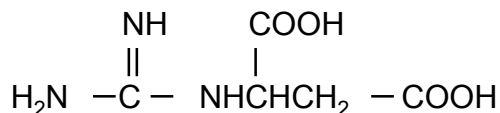
Metformin hydrochloride



Tetraethylammonium chloride



Guanidine hydrochloride



Guanidinosuccinic acid

**Fig. 26. Chemical Structures of Drugs and UTs Used in This Study**

## 第2項 ラット腎皮質スライスを用いた取り込み実験

### (1) 実験動物

実験動物には Sprague-Dawley 系雄性ラット (250~500 g, ホクドー, 札幌) を使用した。

### (2) 薬物溶液の調製

薬物溶液の調製は第2部 第1章 第2節 第2項 (2) に準拠し、メトホルミンの濃度は 100  $\mu\text{M}$  とした。

### (3) 腎スライス取り込み実験

取り込み実験は第2部 第1章 第2節 第2項 (3) に準拠した。なお、メトホルミンのインキュベートは10分間とした。また、ホモジネート上清には incubation buffer 100  $\mu\text{L}$  および 0.1% トリフルオロ酢酸 200  $\mu\text{L}$  を加えた。

### 第3項 メトホルミンおよびビアペネムの定量

MET および BIPM の定量は HPLC-UV 法にて行った。MET の分析条件を Table 9 に示した。BIPM は第2部 第2章 第2節 第3項 Table 8 の HPLC 条件に準拠した。

**Table 9. HPLC Conditions for Metformin Assay**

---

---

#### Metformin

Apparatus : Shimadzu LC-10AT<sub>VP</sub> (Shimadzu, Kyoto, Japan)

Detector : Shimadzu SPD-10A<sub>VP</sub> (Shimadzu, Kyoto, Japan)

Column : Cosmosil 5C<sub>18</sub> AR- II (5 μm, 4.6 mm i.d. × 150 mm, Nacalai Tesque Inc., Kyoto, Japan)

Column temperature : 50°C

Wave length : 234 nm

Mobile phase : 0.04 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>\*</sup> : CH<sub>3</sub>CN = 9 : 1

<sup>\*</sup>1-Octanesulfonic acid sodium salt was added at 5 mM.

Flow rate : 1.0 mL/min (retention time : 6 min)

---

### 第4項 統計処理

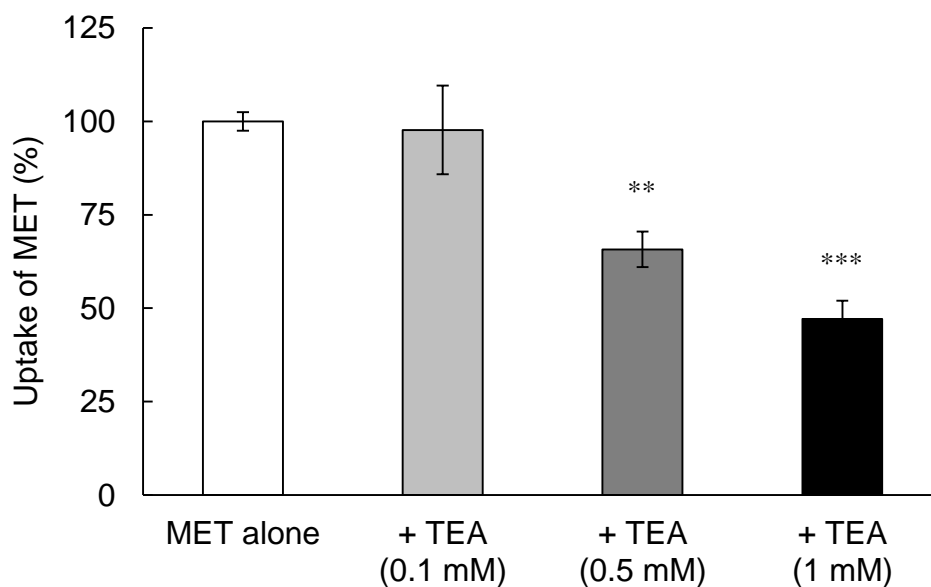
統計処理は第2部 第1章 第2節 第4項に準拠した。

### 第3節 実験結果

#### 第1項 ラット腎皮質スライスへのメトホルミンの取り込み挙動

ラット腎皮質スライスへの MET 取り込みに対する UTs の影響を評価するためには、本研究の実験条件下で Oct を介した MET 輸送を評価できることを確認する必要がある。そこでまず、Oct2 の代表的基質であるテトラエチルアンモニウム (TEA) を共存させて MET の取り込み実験を行った。

その結果、MET の取り込み量は単独時腎組織 1 mg あたり  $111.6 \pm 4.5$  pmol であったが、この値は 0.1 mM TEA 共存下は変化しなかったものの、0.5 mM または 1 mM の TEA 共存下ではそれぞれ 65.7%、47.2%まで有意に低下した (Fig. 27)。この結果は、MET が Oct2 によって輸送されることを示した。



**Fig. 27. Effect of Tetraethylammonium on the Uptake of Metformin by Rat Renal Cortical Slices**

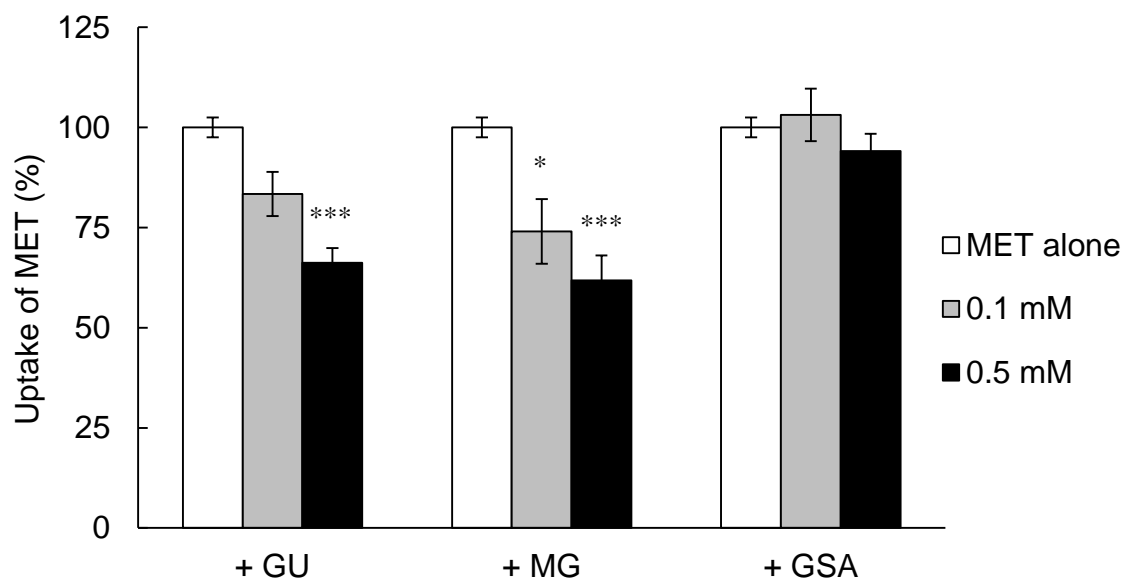
Each column represents the mean with S.E. of 3-36 experiments.

\*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , significantly different from MET alone.

第2項 ラット腎皮質スライスへのメトホルミン取り込みに対するグアニジン、メチルグアニジンおよびグアニジノコハク酸の影響

前項で、TEA 共存下において、ラット腎皮質スライスへの MET 取り込み量が有意に減少したことから、MET の血管側から腎尿細管上皮細胞への取り込みに Oct の関与することが確認された。そこで次に、この MET 輸送に対するカチオン性 UTs の影響を明らかにするために、3 種のグアニジノ化合物 (MG, GU, GSA) を共存させ、ラット腎皮質スライスへの MET 取り込み量の変化を検討した。

GU および MG の濃度を 0.1 mM および 0.5 mM として比較したところ、MET の取り込み量は 0.1 mM の GU または MG 共存下においてそれぞれ 83.4%、74.0% まで低下した。また、0.5 mM の GU または MG 共存下においてはそれぞれ 66.2%、61.8% まで有意に低下した。しかしながら、GSA 共存下では、いずれの濃度においても MET の取り込みに対する影響は認められなかった (Fig. 28)。



**Fig. 28. Effect of Guanidine, Methylguanidine and Guanidinosuccinic Acid on the Uptake of Metformin by Rat Renal Cortical Slices**

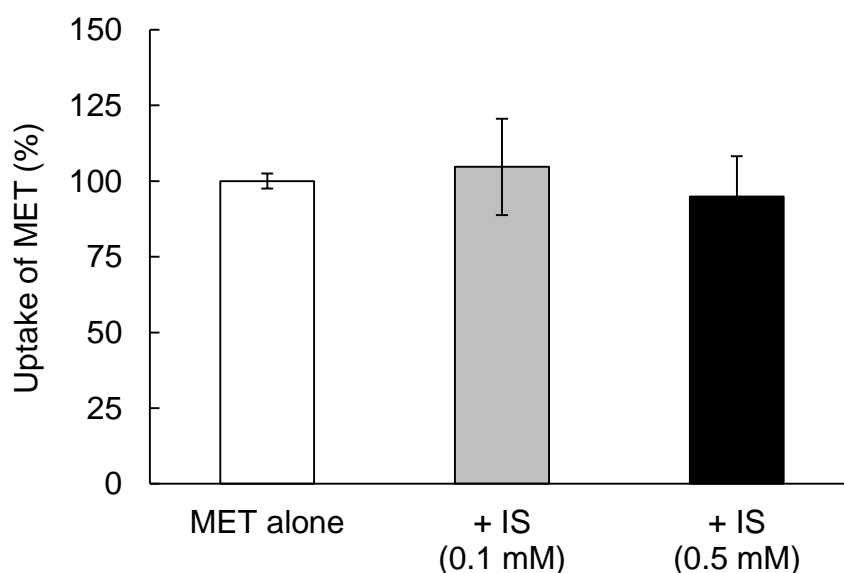
Each column represents the mean with S.E. of 3-36 experiments.

\*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , significantly different from MET alone.

### 第3項 ラット腎皮質スライスへのメトホルミン取り込みに対するインドキシル硫酸の影響

第2章での検討において、ラット腎皮質スライスへのBIPMの取り込みがIS共存下で有意に低下した (Fig. 22) ことから、BIPMとISは共通の輸送経路によって腎上皮細胞へ取り込まれることが示唆された。また、TEA共存下、BIPMおよびMETの取り込み量が共に低下することから、BIPMとMETの輸送にも共通の機構が関与すると考えられた。

そこで、ISを共存させた場合のMETのラット腎皮質スライスへの取り込み量の変化について検討したが、Fig. 29に示すように、0.1 mMまたは0.5 mMのIS共存下で、METのラット腎皮質スライスへの取り込み量に有意な変化は認められなかった。



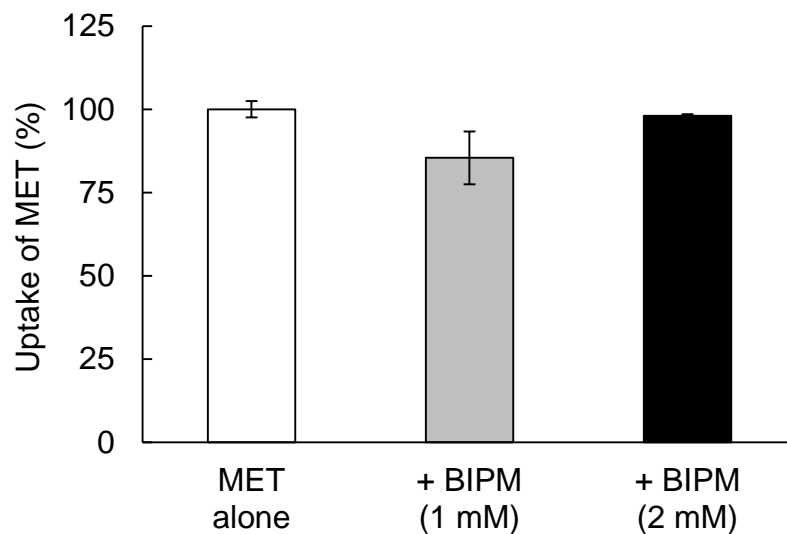
**Fig. 29. Effect of Indoxyl Sulfate on the Uptake of Metformin by Rat Renal Cortical Slices**

Each column represents the mean with S.E. of 3-36 experiments.

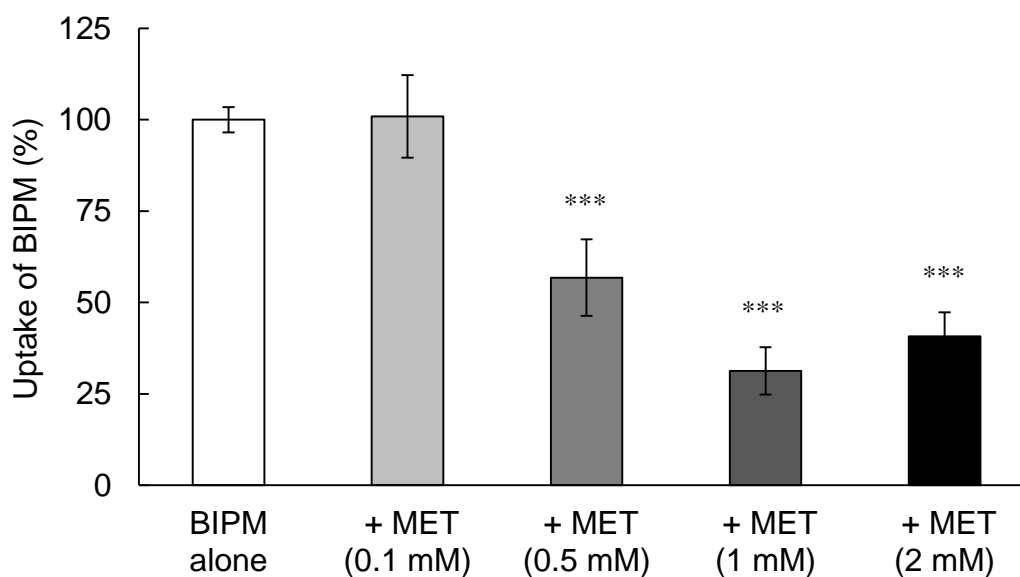
#### 第4項 ラット腎皮質スライスへのメトホルミンおよびビアペネムの取り込み機構の検討

第2章第1項および第2項で示したように、ラット腎皮質スライスへのBIPMの取り込みはIS共存下において有意に低下した (Fig. 22) が、MG共存下ではほとんど変化が認められなかった (Fig. 24). 一方、本章第2項および第3項で示したように、ラット腎皮質スライスへのMETの取り込みは、IS共存下でほとんど変化しなかったのに対し、MG共存下において有意に低下した. このことから、BIPM およびMETの取り込みに対して、IS およびMGはそれぞれ異なる影響を及ぼすことが示唆された. そこで、MET およびBIPMの腎尿細管上皮細胞への取り込み機構についてさらに検討するために、BIPMに対してMETを、METに対してBIPMをそれぞれ共存させて取り込み挙動を比較した.

その結果、METに対して1 mMまたは2 mMのBIPMを共存させたところ、MET取り込み量の変化はほとんど認められなかった (Fig. 30). これに対し、BIPMのラット腎皮質スライスへの取り込み量は、0.5, 1または2 mMのMET共存下においてそれぞれ56.8%, 31.3%および40.8%へと有意に低下した (Fig. 31).



**Fig. 30. Effect of Biapenem on the Uptake of Metformin by Rat Renal Cortical Slices**  
 Each column represents the mean with S.E. of 3-36 experiments.



**Fig. 31. Effect of Metformin on the Uptake of Biapenem by Rat Renal Cortical Slices**  
 Each column represents the mean with S.E. of 3-23 experiments.  
 \*\*\* $p < 0.001$ , significantly different from BIPM alone.



#### 第4節 考察

本章では、腎尿細管上皮細胞側底膜における薬物輸送に対するカチオン性 UTs の影響について明らかにするために、OCT によって輸送されることが知られている MET をモデル薬物として、まず始めに、OCT 基質である TEA 共存下でラット腎皮質スライスへの MET 取り込みを検討した。その結果、MET 取り込み量は TEA の濃度依存的に有意に低下し (Fig. 27)、この結果から、MET の腎尿細管上皮細胞への輸送には Oct1 または Oct2 が関与することが確認された。

次に、腎機能が低下した場合に血液中に増加することが報告されているグアニジノ化合物の GU, MG または GSA<sup>3,22)</sup> を共存させ、MET への影響について検討した (Fig. 28)。カチオン性 UTs である GU と MG の共存下において MET の取り込みは有意に低下したが、GSA を共存させた場合には、MET 取り込み量に有意な減少は認められなかった。Kimura ら<sup>67)</sup> は、hOCT1 または hOCT2 を発現させた HEK293 細胞への TEA 取り込みにおいて、GU は主に hOCT2 による輸送を阻害し、一方 MG と GSA は hOCT1, hOCT2 の両方に同程度の阻害作用を示すことを報告した。一方、Toyohara ら<sup>69)</sup> は、5/6 腎切除ラットにおける GSA の血漿中濃度は腎切除前と比較して上昇するが、SLCO4C1 を導入したラットに同様の腎切除を施した場合、血漿中 GSA 濃度の上昇は有意に抑制されることを示し、SLCO4C1 が GSA の腎尿細管分泌輸送に関与することを見出した。このように、GSA の輸送には OCT 以外の輸送担体も関与するため、ラット腎皮質スライスへの MET 取り込みに対する影響が、GU および MG と比較して小さかったと推察された。この結果は、グアニジノ化合物でも OCT による薬物の輸送に対して大きく影響を及ぼすものとあまり影響を及ぼさないものがあることを示唆した。

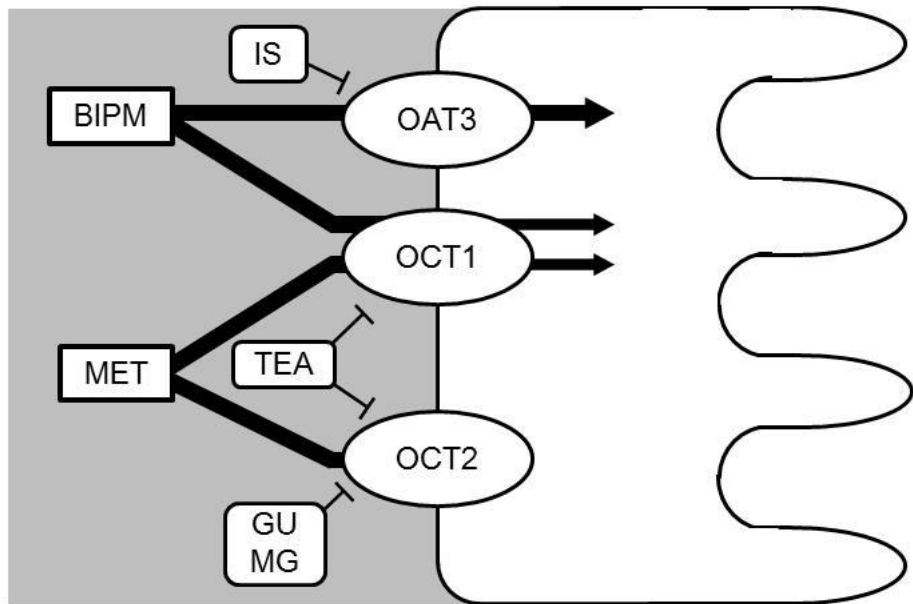
また本章では、第2章でラット腎皮質スライスへの BIPM 取り込みに対して阻害作用を示した IS を共存させ、MET 取り込みに対する影響を検討したが、IS は MET 取り込み量に影響を与えなかった (Fig. 29)。IS については、先に述べたように、OAT1 による PAH 輸送や OAT3 によるエストロン硫酸輸送に阻害作用を示し、OCT1 または OCT2 による TEA 輸送には影響を及ぼさなかったことが報告されている。<sup>68)</sup> 本章での結果はこの報告と一致するものと判断される。

第2章で、MG 共存下において BIPM 取り込み量は減少する傾向を示したものの、その程度は限定的であることが示された (Fig. 24)。一方、本章において、MET 取り

込み量は MG 共存下で濃度依存的に低下した (Fig. 28). MET と BIPM は TEA 共存下においてその取り込み量が有意に低下したことから, 両薬物は Oct によって輸送されるという結果が得られたにも関わらず, OCT による輸送に対して阻害作用を示す MG<sup>67)</sup> 共存下における MET および BIPM の取り込み量の変化は異なるパターンを示した.

そこで, MET と BIPM の輸送機構についてさらに検討するために, ラット腎皮質スライスへの BIPM 取り込みに対する MET の影響と, ラット腎皮質スライスへの MET 取り込みに対する BIPM の影響を比較した. その結果, BIPM は MET の取り込み量を変化させなかった (Fig. 30) が, MET は BIPM の取り込みを大きく減少させた (Fig. 31). この結果は, MET の輸送には BIPM と共通の機構に加えて, BIPM とは異なる機構が関与することを示唆した. TEA および MET の取り込みには OCT1 および OCT2 の関与することが知られている.<sup>70)</sup> 一方, MG は, OCT1 または OCT2 をそれぞれ発現させた細胞において TEA の取り込みを阻害することが報告されているが, それぞれの発現細胞を用いた TEA の取り込みにおける *trans-stimulation* 効果は OCT2 発現細胞においてのみ認められたことから, MG の取り込みには主として OCT2 が関与することが報告されている.<sup>67)</sup> ラット腎皮質スライスのように Oct1 および Oct2 が混在する評価系の場合, MG による OCT 取り込み阻害作用 (Fig. 28) が Oct1, Oct2 のどちらへの影響を反映しているかは特定できない. また, BIPM は Oct によって輸送されると推察されたものの, そこに関与する Oct のサブタイプについても現時点において不明である.

一方, MET の輸送には, OCT1 と比較して OCT2 の寄与の大きいことが報告されている.<sup>70)</sup> 腎尿細管上皮細胞への取り込みにおいて, MET には OCT2 が, BIPM には OCT1 がそれぞれ関与する場合, 本研究において得られたように, BIPM 取り込みに対する MG の影響は, TEA や MET による影響と比較して小さくなると予測される (Fig. 32). しかしながら, このことを明らかにするためには更なる検討が必要である.



**Fig. 32. Possible Transporters Involved in the Uptake of Metformin and Biapenem in the Renal Proximal Tubular Cells**

## 第4章 ラット腎皮質スライスへの薬物取り込みに対するクレアチニンの影響

### 第1節 緒言

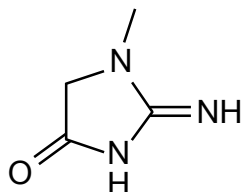
これまで、薬物の腎尿細管上皮細胞への取り込みに対するカチオン性 UTs の影響を検討するために GU や MG などのグアニジノ化合物を共存させて実験を行った。腎機能の指標として用いられている Cr もグアニジノ化合物の一つであり、末期腎不全患者や尿毒症患者で腎機能が大きく低下した場合に血漿中 Cr 濃度は著しく上昇し、健常者と比較して 10 倍以上高い血漿中濃度を示す場合もある。<sup>3,21)</sup> また、Cr の排泄には糸球体ろ過および尿細管分泌が関わることが知られており、尿細管分泌に関わる輸送担体に関しては様々な報告がある。Gründemann ら<sup>66)</sup> は、Oct1 や Oct2 を発現させた HEK293 細胞を用いた検討で、Oct2 発現細胞による Cr 取り込み量は Oct1 発現細胞による取り込み量よりも大きいことを報告している。一方、Shen ら<sup>71)</sup> は、HEK 細胞を用いた検討において、OAT2 を発現させた場合に Cr の取り込みが大きく増加すること、さらにシメチジンやインドメタシン、ブロモスルホフタレインなど、OAT2 を阻害すると考えられている薬物を共存させた場合に有意に低下したことを報告している。このように、Cr はカチオン性の構造を有するにも関わらず、その腎尿細管上皮細胞内への輸送には OCT のみならず、OAT が関与するとされている。そのため、Cr が高濃度で血液中に存在する場合、様々な薬物の腎尿細管分泌に対して影響を及ぼす可能性が考えられる。しかしながら、Cr による血液側から腎尿細管上皮細胞への薬物取り込みに対する影響に関する報告は少なく、Cr の影響については不明な点が多い。

そこで本章では、側底膜上で薬物の尿細管分泌に関与する輸送担体への Cr の影響を明らかにする目的で、ラット腎皮質スライスへの MEPM, BIPM, MTX および MET の取り込みに対する Cr の影響を検討した。

## 第2節 実験方法

### 第1項 使用薬物および試薬

本章で新たに用いた Cr (Fig. 33) は和光純薬工業 (大阪) より購入した. その他の試薬および溶媒は, すべて市販の特級規格品を用いた.



**Fig. 33. Chemical Structure of Creatinine**

### 第2項 ラット腎皮質を用いた取り込み実験

#### (1) 実験動物

実験動物には Sprague-Dawley 系雄性ラット (240~400 g, ホクドー, 札幌) を使用した.

#### (2) 薬物溶液の調製

薬物溶液の調製は第2部 第1章 第2節 第2項 (2) に準拠した.

#### (3) 腎スライス取り込み実験

取り込み実験は第2部 第1章 第2節 第2項 (3) に準拠した.

### 第3項 薬物の定量

薬物の定量は HPLC-UV 法にて行った. MEPM および MTX は第2部 第1章 第2節 第3項 Table 7 の HPLC 条件に, BIPM は第2部 第2章 第2節 第3項 Table 8 の HPLC 条件に, MET は第2部 第3章 第2節 第3項 Table 9 の HPLC 条件にそれぞれ準拠した.

### 第4項 統計処理

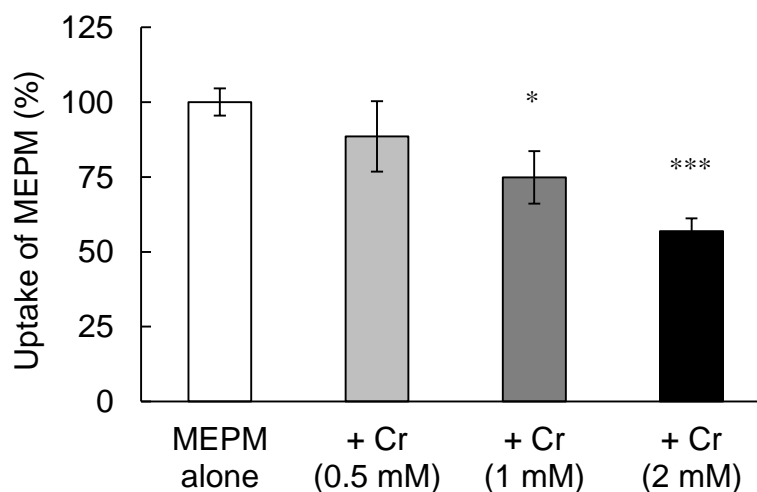
統計処理は第2部 第1章 第2節 第4項に準拠した.

### 第3節 実験結果

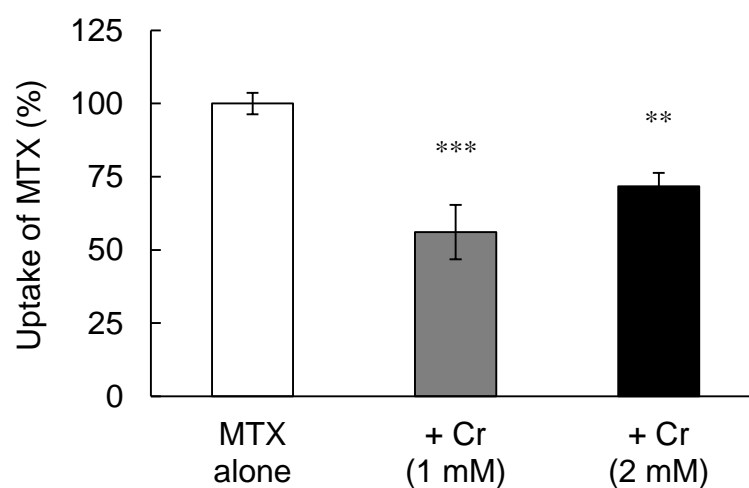
#### 第1項 ラット腎皮質スライスへのメロペネムおよびメトトレキサートの取り込みに対するクレアチニンの影響

まず, OAT によって輸送される MTX および MEPM を用いて, Cr 共存下または非共存下における取り込み量を比較した. なお, 本実験における Cr 濃度は, 尿毒症患者において報告されている<sup>3)</sup> 平均血漿中濃度 ( $13.6 \pm 4.6$  mg/dL, 約 1.2 mM) と最高血漿中濃度 (24.0 mg/dL, 約 2.1 mM) を参考にして設定した.

MEPM の取り込み量は単独時腎組織 1 mg あたり  $7.6 \pm 0.6$  pmol であったが, この値は共存する Cr の濃度に依存して減少し, 2 mM Cr 共存下においては単独時の 57.0% まで有意に低下した (Fig. 34). また, 腎組織 1 mg あたりの MTX の取り込みは  $58.3 \pm 5.7$  pmol であったが, 1 mM または 2 mM の Cr を共存させた場合にそれぞれ 56.1% および 71.7% まで有意に低下した (Fig. 35).



**Fig. 34. Effect of Creatinine on the Uptake of Meropenem by Rat Renal Cortical Slices**  
Each column represents the mean with S.E. of 7-30 experiments.  
\*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , significantly different from MEPM alone.



**Fig. 35. Effect of Creatinine on the Uptake of Methotrexate by Rat Renal Cortical Slices**

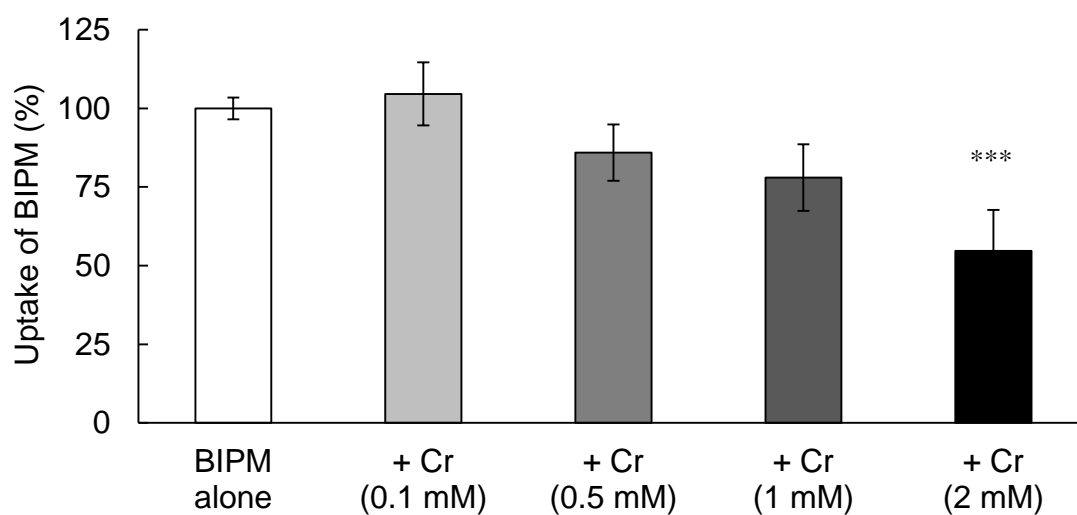
Each column represents the mean with S.E. of 5-8 experiments.

\*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , significantly different from MTX alone.

## 第2項 ラット腎皮質スライスへのビアペネム取り込みに対するクレアチニンの影響

次に、腎尿細管上皮細胞への輸送に Oat および Oct が関与することが示された BIPM に対して Cr を共存させ、ラット腎皮質スライスへの BIPM 取り込み量の変化を検討した。

その結果、BIPM 取り込み量は Cr の濃度に依存して低下する傾向を示し、2 mM Cr 共存下では 54.6%まで有意に低下した (Fig. 36)。



**Fig. 36. Effect of Creatinine on the Uptake of Biapenem by Rat Renal Cortical Slices**

Each column represents the mean with S.E. of 6-23 experiments.

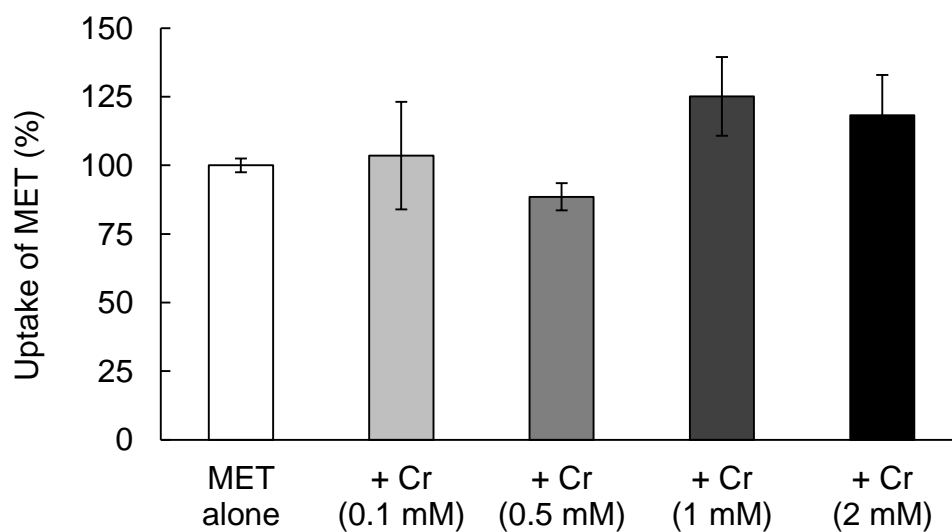
\*\*\*  $p < 0.001$ , significantly different from BIPM alone.



### 第 3 項 ラット腎皮質スライスへのメトホルミン取り込みに対するクレアチニンの影響

第 3 章での検討において Oct の基質になることが確認された MET を用いて, Cr の影響を同様に検討した.

その結果, MTX や BIPM と異なり, 0.1, 0.5, 1 または 2 mM の Cr を共存させた場合, MET 取り込み量はいずれの Cr 濃度においても有意な変化は認められなかった (Fig. 37).



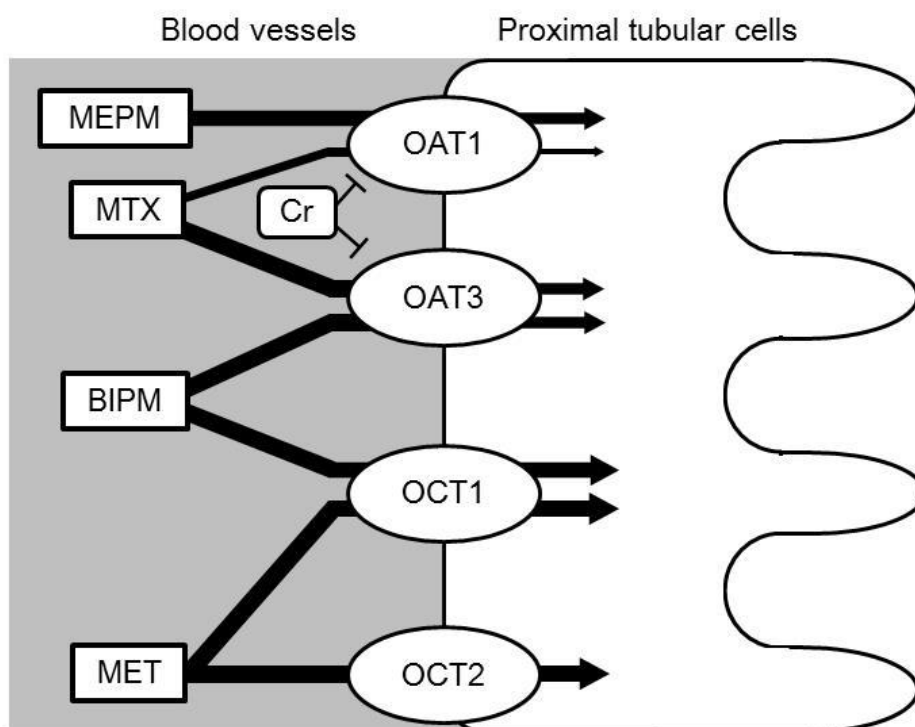
**Fig. 37. Effect of Creatinine on the Uptake of Metformin by Rat Renal Cortical Slices**  
Each column represents the mean with S.E. of 6-23 experiments.

#### 第4節 考察

Cr は腎機能の低下に伴って血液中に蓄積することから、臨床において腎機能の指標として用いられている。しかしながら、一般に UTs としての認識は低く、Cr による薬物動態への影響に関する報告はほとんどなされていない。Cr は第3章で用いたカチオン性 UTs の GU や MG と類似の構造を有することから、これらと同様にグアニジノ化合物に分類される。先にも述べたように、Cr は OCT ばかりでなく OAT によっても輸送されることが報告されている。<sup>66,71)</sup> さらに、Oat1 または Oat3 を発現させたアフリカツメガエル卵母細胞に Cr が取り込まれ、プロベネシドによってその取り込みが阻害されることや、Oat3 欠損マウスにおいて Cr の血漿中濃度が有意に増加し、Cr クリアランスがイヌリンクリアランスと同程度にまで減少したことなどが報告され、Cr の腎排泄に Oat1 および Oat3 が関与すると見なされている。<sup>43)</sup> また、Lepist ら<sup>72)</sup> は、OCTs および OATs を導入した MDCK II 細胞を用いた検討で、Cr は OAT2、OCT2 および OCT3 によって輸送され、中でも OAT2 による輸送が顕著であったこと、OAT2 による Cr 輸送がインドメタシンによって阻害されることを報告している。このように、腎尿細管上皮細胞側底膜における Cr 輸送には複数の輸送担体が関わっていることから、薬物の尿中排泄に対する Cr の影響について明らかにすることは临床上重要である。そこで本章では、薬物の尿細管分泌に対する Cr の影響に関する基礎的知見を得るために、これまでの検討で用いた MEPM、MTX、BIPM または MET に Cr を共存させ、ラット腎皮質スライスへの取り込み量の変化について検討した。

まず、アニオン性薬物の腎尿細管上皮細胞内への輸送に対する Cr の影響を明らかにするために、MTX と MEPM に Cr を共存させてラット腎皮質スライスへの取り込み実験を行った。その結果、1 mM または 2 mM Cr 共存下において MTX と MEPM の取り込み量は有意に低下した (Figs. 34 & 35)。これまでの検討により、MEPM の輸送には Oat が関与すること、一方 MTX の輸送には、Oat および RFC-1 が関与することが示唆されている。Cr はこれら MEPM や MTX の取り込みに関与する輸送担体の中で、Oat1 と Oat3 によって輸送される。<sup>43)</sup> また、腎尿細管上皮細胞の側底膜には OAT2 も発現しているが、<sup>73)</sup> 発現系細胞を用いた検討から、Cr は OAT2 によっても輸送され、その寄与の程度は OCT2 や OCT3 よりも大きいことが報告されている。<sup>71,72)</sup> Sekine ら<sup>74)</sup> は、OAT2 を発現させたアフリカツメガエル卵母細胞を用いた検討にお

いて、PAHやMTX、アセチルサリチル酸がOAT2の基質であることを報告している。過去の検討においてMEPMの取り込みがPAH共存下において低下したことを併せて考えると、MEPMの取り込みにはOat1ならびにOat2が関与する可能性も考えられた。このように、MEPMやMTXそしてCrの腎尿細管上皮細胞側底膜における輸送は、Oat1やOat2、Oat3などの複数の輸送担体を介して進行するため、それらの共存により腎皮質スライスへの取り込み量の変化が生じたと推察された (Fig. 38)。



**Fig. 38. Possible Transporters Influenced by Cr in the Renal Proximal Tubular Cells**

尿毒症患者における血漿中Cr濃度に関しては、平均血漿中濃度が13.6 mg/dL (約1.2 mM)、最大血漿中濃度が24.0 mg/dL (約2.1 mM) という報告<sup>3)</sup>がある。本検討においてラット腎皮質スライスへのMEPMとMTXの取り込みはいずれも1 mM Cr共存下で有意に低下したことから、OATを介した薬物の尿細管分泌に対するCrの影響は尿毒症患者の体内で十分に起こり得ると判断される。

次に、腎尿細管上皮細胞内への輸送にOCTが関与する薬物に対するCrの影響を明らかにするために、Cr共存下におけるMET取り込み量の変化を評価した。METは

OCT1 および OCT2 によって輸送され、またその寄与については OCT2 が OCT1 より大きいことが報告されている。<sup>70)</sup> 一方、Cr は OCT2 によって輸送され、OCT2 を介した TEA 輸送に対して阻害作用を示すことが報告されている。<sup>67)</sup> したがって、Cr が共存する場合、ラット腎皮質スライスへの MET 取り込みが減少すると予測された。しかしながら、Cr は MET の取り込みにほとんど影響を及ぼさなかった (Fig. 37)。この結果は、Cr が Oct1 および Oct2 に対して阻害作用をほとんど示さないことを示唆しており、これまでの報告と矛盾するものだった。この理由は現時点では不明であり、今後の検討が必要である。

その一方で、Cr はラット腎皮質スライスへの BIPM 取り込みに対しては阻害効果を示している (Fig. 36)。BIPM の輸送には Oat と Oct が関与するとみなされるが、MET の結果を考慮すると、この相互作用は Oat を介して起こっていると考えられる (Fig. 38)。

以上の結果より、Cr はカチオンとしての構造を有するにも関わらず、尿細管分泌過程で OAT の基質となる薬物の輸送を阻害することが示唆された。その一方で、OCT によって輸送される薬物への影響は小さいと推察された。Cr と類似の構造を有する UTs として MG や GSA が挙げられるが、これらのグアニジノ化合物は OAT や OCT を介した薬物輸送に異なる影響を及ぼすことも示唆されたことから、薬物の体内動態に対するこれら UTs の影響については、更なる情報の収集が不可欠である。また、本研究では、ラット腎皮質スライスを用いて、腎尿細管上皮細胞の側底膜に発現する輸送担体への UTs の影響を検討したが、腎尿細管上皮細胞には、側底膜のみならず、頂側膜側にも P-gp や MRP2, MATE などの輸送担体が発現し、薬物の輸送に関与している。これらの輸送担体を介した UTs の分泌や、UTs による薬物輸送への影響は不明であるため、これらについても今後検討していく必要がある。

## 結 論

今回の研究から得られた知見を以下にまとめる。

### 血液透析患者におけるアニオン性 UTs の血漿中濃度について

1. 血液透析患者における血漿中 IS 濃度は、同時に測定した IA や CMPF と比較して高い値を示した。また、血液透析患者における最大濃度と最小濃度の差が非常に大きく、個体間変動の大きいことが明らかになった。IS は血液透析によって約 32% が除去されるものの、透析後でも健常被験者と比較してかなり高い値を示し、血液透析患者の体内に蓄積しやすいことが示唆された。
2. CMPF の血漿中濃度は、透析前後において健常被験者と比較して約 5 倍高い値を示した。また、血液透析によってほとんど除去されないことから、血液透析患者の体内に一度蓄積すると除去しにくい UT であることが示唆された。
3. IA の血漿中濃度は IS や CMPF よりも低く、透析前は、健常被験者と比較して有意に高い値ではあったが、透析直後における濃度は健常被験者と同程度の値を示した。IA は透析によって除去されやすく、蓄積性が低い UT であることが示唆された。
4. IS, IA および CMPF の血漿中濃度間に相関性は認められなかった。また、IA および CMPF の血漿中濃度と、Scr, BUN および eGFR の間にも相関性は認められなかった。一方、IS の血漿中濃度は Scr および eGFR と良好な相関性を示したことから、これらの腎機能検査値を用いて IS の血漿中濃度を予測することが可能であると考えられた。

### アニオン性 UTs の HSA への結合特性について

1. HSA に対する UTs の結合率は CMPF > IS > IA の順となり、また、各 UTs の HSA 結合率と血液透析による除去率との間に良好な負の相関性が認められたことから、血漿タンパク質への結合の程度が、血液透析による UTs の除去効率の決定要因となることが確認された。

2. プラバスタチンはヒト血清アルブミンのサイト II に結合し、その結合は IS や IA によって置換されることが示唆された。

#### 腎尿細管上皮細胞側底膜における薬物輸送に対する種々 UTs の影響について

1. アニオン性 UTs である IS, IA および CMPF は, OAT1 や OAT3 が関与する薬物輸送を阻害することが示唆された。
2. グアニジノ化合物系 UTs のうち, GU と MG は OCTs を介した薬物輸送に対して阻害作用を示すが, GSA および Cr は OCTs を介した薬物輸送には影響を及ぼさないことが示唆された。また, Cr は OATs を介した薬物輸送に対して阻害作用を示す可能性が示された。したがって, グアニジノ化合物系 UTs は類似の構造を有するにもかかわらず影響を及ぼす輸送担体が異なることが推察された。

本研究より, 末期腎不全患者において UTs は血漿タンパク結合の阻害や腎尿細管分泌の阻害などを介して薬物動態に様々な影響を及ぼすおそれのあることが示された。UTs が関わる相互作用を予測 (回避) するためには, 血中 UT 濃度を測定することが重要となるが, 本研究で検討した UTs の中で, 患者の血液中に高濃度に存在している IS は, Scr や eGFR を用いることで簡便に血中濃度を予測することが可能であることが明らかとなった。

これらの知見は, 腎機能が著しく低下した患者に薬物を投与する際に, UTs による薬物動態への影響を考慮し, 適切な投与量を設定するための一助となると考えられる。また, これまで UTs の輸送担体に対する影響について, 輸送担体を発現させた細胞を用いた検討がなされてきたが, それらの報告と, ラット腎皮質スライス法を用いた本研究から得られた知見には, 一部一致しない点もみられた。種々薬物の体内動態に対する UTs の影響を明らかにするためには, 更なる情報の構築が不可欠であると思われる。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究に際して終始懇切なるご指導ご鞭撻を賜りました北海道医療大学大学院薬学研究科 齊藤浩司教授に心より深く感謝致します。

本論文の主査としてご審査賜り、また発表の際の座長としてご助言を賜り、さらに有益なご教示ご指導を頂きました北海道医療大学大学院薬学研究科 小林道也教授に厚く御礼申し上げます。

また、副査として本論文のご審査を賜りました北海道医療大学大学院薬学研究科 吉村昭毅教授、北海道医療大学大学院薬学研究科 平野剛教授に心より感謝致します。

本研究を遂行するにあたり、終始有益なご指導ご支援を賜りました北海道医療大学大学院薬学研究科 小田雅子准教授に深く感謝いたします。

本研究の実施にあたり、終始有益なご支援を賜り、種々の検討にご協力頂きました高松宏行修士、村部嵩学士、赤尾拓実学士、伊藤志帆学士、綿貫奨学士、工藤奈津美氏に深く感謝いたします。

本研究に際し、終始多大なるご協力と暖かいご支援を賜りました北海道医療大学薬学部薬剤学講座（薬剤学）の皆様感謝いたします。

平成 29 年 3 月 市 村 祐 一

## 引用文献

- 1) 図説 わが国の慢性透析療法の現況, 日本透析医学会 (2014).
- 2) CKD 診療ガイド 2012, *日腎会誌*, **54**, 1031-1189 (2012).
- 3) Vanholder R., De Smet R., Glorieux G., Argilés A., Baurmeister U., Brunet P., Clark W., Cohen G., De Deyn P. P., Deppisch R., Descamps-Latscha B., Henle T., Jörres A., Lemke H. D., Massy Z. A., Passlick-Deetjen J., Rodriguez M., Stegmayr B., Stenvinkel P., Tetta C., Wanner C., Zidek W., European Uremic Toxin Work Group (EUTox), *Kidney Int.*, **63**, 1934-1943 (2003).
- 4) Neiryneck N., Vanholder R., Schepers E., Eloit S., Pletinck A., Glorieux G., *Int. Urol. Nephrol.*, **45**, 139-150 (2013).
- 5) Vanholder R., De Smet R., *J. Am. Soc. Nephrol.*, **10**, 1815-1823 (1999).
- 6) Matsuo K., Yamamoto S., Wakamatsu T., Takahashi Y., Kawamura K., Kaneko Y., Goto S., Kazama J. J., Narita I., *Toxins.*, **7**, 3155-3166 (2015).
- 7) Mozar A., Louvet L., Morlière P., Godin C., Boudot C., Kamel S., Drüeke T. B., Massy Z. A., *Ther. Apher. Dial.*, **15**, 135-139 (2011).
- 8) Dou L., Sallée M., Cerini C., Poitevin S., Gondouin B., Jourde-Chiche N., Fallague K., Brunet P., Calaf R., Dussol B., Mallet B., Dignat-George F., Burtsey S., *J. Am. Soc. Nephrol.*, **26**, 876-887 (2015).
- 9) Motojima M., Hosokawa A., Yamato H., Muraki T., Yoshioka T., *Br. J. Pharmacol.*, **135**, 555-563 (2002).
- 10) Kusuhara H., Sugiyama Y., *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **24**, 35-52 (2009).
- 11) Otsuka M., Matsumoto T., Morimoto R., Arioka S., Omote H., Moriyama Y., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **102**, 17923-17928 (2005).
- 12) Deguchi T., Kouno Y., Terasaki T., Takadate A., Otagiri M., *Kidney Int.*, **61**, 1760-1768 (2002).
- 13) Henderson S. J., Lindup W. E., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **263**, 54-60 (1992).
- 14) Nigam S. K., Wu W., Bush K. T., Hoenig M. P., Blantz R. C., Bhatnagar V., *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*, **10**, 2039-2049 (2015).
- 15) Deguchi T., Kouno Y., Terasaki T., Takadate A., Otagiri M., *Pharm. Res.*, **22**, 619-627 (2005).



- 16) Reyes M., Benet L. Z., *J. Pharm. Sci.*, **100**, 3831-3842 (2011).
- 17) Dhillon S., Richens A., *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **13**, 553-560 (1982).
- 18) Tawara S., Matsumoto S., Matsumoto Y., Kamimura T., Goto S., *J. Antibiot.*, **45**, 1346-1357 (1992).
- 19) Watanabe H., Noguchi T., Miyamoto Y., Kadowaki D., Kotani S., Nakajima M., Miyamura S., Ishima Y., Otagiri M., Maruyama T., *Drug Metab. Dispos.*, **40**, 1423-1428 (2012).
- 20) Takamura N., Maruyama T., Otagiri M., *Clin. Chem.*, **43**, 2274- 2280 (1997).
- 21) Itoh Y., Ezawa A., Kikuchi K., Tsuruta Y., Niwa T., *Anal. Bioanal. Chem.*, **403**, 1841-1850 (2012).
- 22) Duranton F., Cohen G., De Smet R., Rodriguez M., Jankowski J., Vanholder R., Argiles A., European Uremic Toxin Work Group, *J. Am. Soc. Nephrol.*, **23**, 1258-1270 (2012).
- 23) Mutsaers H. A., van den Heuvel L. P., Ringens L. H., Dankers A. C., Russel F. G., Wetzels J. F., Hoenderop J. G., Masereeuw R., *PLoS One*, **6**, e18438 (2011).
- 24) Lin C. J., Chen H. H., Pan C. F., Chuang C. K., Wang T. J., Sun F. J., Wu C. J., *J. Clin. Lab. Anal.*, **25**, 191-197 (2011).
- 25) Barreto F. C., Barreto D. V., Canziani M. E., Tomiyama C., Higa A., Mozar A., Glorieux G., Vanholder R., Massy Z., de Carvalho A.B., *J. Bras. Nefrol.*, **36**, 289-296 (2014).
- 26) Schophuizen C. M., Wilmer M. J., Jansen J., Gustavsson L., Hilgendorf C., Hoenderop J. G., van den Heuvel L. P., Masereeuw R., *Pflugers Arch.*, **465**, 1701-1714 (2013).
- 27) Nozaki Y., Kusuhara H., Endou H., Sugiyama Y., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **309**, 226-234 (2004).
- 28) Deguchi T., Kusuhara H., Takadate A., Endou H., Otagiri M., Sugiyama Y., *Kidney Int.*, **65**, 162-174 (2004).
- 29) Hasegawa M., Kusuhara H., Sugiyama D., Ito K., Ueda S., Endou H., Sugiyama Y., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **300**, 746-753 (2002).
- 30) Cross R. J., Taggart J. V., *Am. J. Physiol.*, **161**, 181-190 (1950).
- 31) Niwa T., *Mass Spectrom. Rev.*, **30**, 510-521 (2011).
- 32) European Uremic Toxin (EUTox) Work Group of the ESAO and endorsed Work Group

of the ERA-EDTA, “Uremic Toxin - Data Base” :

<<http://www.uremic-toxins.org/DataBase.html>>

- 33) Ito S., Osaka M., Higuchi Y., Nishijima F., Ishii H., Yoshida M., *J. Biol. Chem.*, **285**, 38869-38875 (2010).
- 34) Lu Y., Nakanishi T., Hosomi A., Komori H., Tamai I., *J. Pharm. Pharmacol.*, **67**, 170-177 (2015).
- 35) Akiyama Y., Kikuchi K., Saigusa D., Suzuki T., Takeuchi Y., Mishima E., Yamamoto Y., Ishida A., Sugawara D., Jinno D., Shima H., Toyohara T., Suzuki C., Souma T., Moriguchi T., Tomioka Y., Ito S., Abe T., *PLoS One*, **8**, e66518 (2013).
- 36) De Smet R., Dhondt A., Eloot S., Galli F., Waterloos M.A., Vanholder R., *Nephrol. Dial. Transplant.*, **22**, 2006-2012 (2007).
- 37) Iitaka M., Kawasaki S., Sakurai S., Hara Y., Kuriyama R., Yamanaka K., Kitahama S., Miura S., Kawakami Y., Katayama S., *Clin. Endocrinol.*, **48**, 739-746 (1998).
- 38) Wu I. W., Hsu K. H., Lee C.C., Sun C.Y., Hsu H.J., Tsai C.J., Tzen C.Y., Wang Y.C., Lin C.Y., Wu M.S., *Nephrol. Dial. Transplant.*, **26**, 938-947 (2011).
- 39) Jourde-Chiche N., Dou L., Cerini C., Dignat-George F., Vanholder R., Brunet P., *Semin. Dial.*, **22**, 334-339 (2009).
- 40) Ishii K., Okajima H., Okada Y., Watanabe H., *J. Biochem.*, **103**, 836-839 (1988).
- 41) Urakami Y., Kimura N., Okuda M., Masuda S., Katsura T., Inui K., *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **20**, 200-205 (2005).
- 42) Eisner C., Faulhaber-Walter R., Wang Y., Leelahavanichkul A., Yuen P. S., Mizel D., Star R. A., Briggs J. P., Levine M., Schnermann J., *Kidney Int.*, **77**, 519-526 (2010).
- 43) Vallon V., Eraly S.A., Rao S.R., Gerasimova M., Rose M., Nagle M., Anzai N., Smith T., Sharma K., Nigam S.K., Rieg T., *Am. J. Physiol. renal physiol.*, **302**, F1293-F1299 (2012).
- 44) Allen P. J., *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **36**, 1442-1462 (2012).
- 45) Vanholder R., Van Laecke S., Glorieux G., *Pediatr. Nephrol.*, **23**, 1211-1221 (2008).
- 46) Liabeuf S., Drüeke T. B., Massy Z.A., *Toxins*, **3**, 911-919 (2011).
- 47) Watanabe T., Maruyama T., Otagiri M., *Xenobio. Metabol. and Dispos.*, **16**, 264-270 (2001).

- 48) Nishio T., Takamura N., Nishii R., Tokunaga J., Yoshimoto M., Kawai K., *Nephrol. Dial. Transplant.*, **23**, 2304-2310 (2008).
- 49) Sakai T., Takadate A., Otagiri M., *Biol. Pharm. Bull.*, **18**, 1755-1761 (1995).
- 50) Emami Riedmaier A., Nies A. T., Schaeffeler E., Schwab M., *Pharmacol. Rev.*, **64**, 421-449 (2012).
- 51) Motohashi H., Inui K., *AAPS J.*, **15**, 581-588 (2013).
- 52) Nigam S. K., Bush K. T., Martovetsky G., Ahn S. Y., Liu H. C., Richard E., Bhatnagar V., Wu W., *Physiol. Rev.*, **95**, 83-123 (2015).
- 53) 乾賢一, “トランスポーター活用ライブラリー：機能・輸送基質から創薬・応用まで”, 羊土社, 東京, 67-92 (2009).
- 54) Takeda M., Babu E., Narikawa S., Endou H., *Eur. J. Pharmacol.*, **438**, 137-142 (2002).
- 55) Khamdang S., Takeda M., Shimoda M., Noshiro R., Narikawa S., Huang X. L., Enomoto A., Piyachaturawat P., Endou H., *J. Pharmacol. Sci.*, **94**, 197-202 (2004).
- 56) Sun H., Huang Y., Frassetto L., Benet L. Z., *Drug Metab. Dispos.*, **32**, 1239-1246 (2004).
- 57) Sato T., Yamaguchi H., Kogawa T., Abe T., Mano N., *J. Pharm. Pharm. Sci.*, **17**, 475-484 (2014).
- 58) Shibayama T., Sugiyama D., Kamiyama E., Tokui T., Hirota T., Ikeda T., *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **22**, 41-47 (2007).
- 59) Stadie W. C., Riggs B.C., *J. Bio. Chem.*, **154**, 687-690 (1944).
- 60) Nozaki Y., Kusuhara H., Kondo T., Hasegawa M., Shiroyanagi Y., Nakazawa H., Okano T., Sugiyama Y., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **321**, 362-369 (2007).
- 61) Sweeney D. E., Vallon V., Rieg T., Wu W., Gallegos T. F., Nigam S.K., *Mol. Pharmacol.*, **80**, 147-154 (2011).
- 62) 齊藤俊英, (北海道医療大学大学院薬学研究科) 博士論文, 52-63 (2011).
- 63) Jonker J. W., Schinkel A.H., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **308**, 2-9 (2004).
- 64) Burger H., Zoumaro-Djajoon A., Boersma A. W., Helleman J., Berns E. M., Mathijssen R. H., Loos W. J., Wiemer E. A., *Br. J. Pharmacol.*, **159**, 898-908 (2010).
- 65) Nies A. T., Hofmann U., Resch C., Schaeffeler E., Rius M., Schwab M., *PLoS One*, **6**, e22163 (2011).

- 66) Gründemann D., Liebich G., Kiefer N., Köster S., Schömig E., *Mol. Pharmacol.*, **56**, 1-10 (1999).
- 67) Kimura N., Masuda S., Katsura T., Inui K., *Biochem. Pharmacol.*, **77**, 1429-1436 (2009).
- 68) Enomoto A., Takeda M., Taki K., Takayama F., Noshiro R., Niwa T., Endou H., *Eur. J. Pharmacol.*, **466**, 13-20 (2003).
- 69) Toyohara T., Suzuki T., Morimoto R., Akiyama Y., Souma T., Shiwaku H.O., Takeuchi Y., Mishima E., Abe M., Tanemoto M., Masuda S., Kawano H., Maemura K., Nakayama M., Sato H., Mikkaichi T., Yamaguchi H., Fukui S., Fukumoto Y., Shimokawa H., Inui K., Terasaki T., Goto J., Ito S., Hishinuma T., Rubera I., Tauc M., Fujii-Kuriyama Y., Yabuuchi H., Moriyama Y., Soga T., Abe T., *J. Am. Soc. Nephrol.*, **20**, 2546-2555 (2009).
- 70) Kimura N., Masuda S., Tanihara Y., Ueo H., Okuda M., Katsura T., Inui K., *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **20**, 379-386 (2005).
- 71) Shen H., Liu T., Morse B. L., Zhao Y., Zhang Y., Qiu X., Chen C., Lewin A. C., Wang X. T., Liu G., Christopher L. J., Marathe P., Lai Y., *Drug Metab. Dispos.*, **43**, 984-993 (2015).
- 72) Lepist E. I., Zhang X., Hao J., Huang J., Kosaka A., Birkus G., Murray B. P., Bannister R., Cihlar T., Huang Y., Ray A. S., *Kidney Int.*, **86**, 350-357 (2014).
- 73) Enomoto A., Takeda M., Shimoda M., Narikawa S., Kobayashi Y., Kobayashi Y., Yamamoto T., Sekine T., Cha S. H., Niwa T., Endou H., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **301**, 797-802 (2002).
- 74) Sekine T., Cha S. H., Tsuda M., Apiwattanakul N., Nakajima N., Kanai Y., Endou H., *FEBS Lett.*, **429**, 179-182 (1998).

