

新 制
薬
164
京大附図

摘出臓器灌流法による薬物の 腎輸送特性に関する研究

1995

合 葉 哲 也

摘出臓器灌流法による薬物の
腎輸送特性に関する研究

1995

合 葉 哲 也

目次

総論の部

緒言	1
第 I 章 摘出腎灌流実験系の確立	3
第 1 節 腎灌流法の検討	4
1-a 灌流腎の生理機能ならびに薬物排泄機能の検討	4
1-b 考察	8
第 2 節 薬物挙動解析法	10
2-a モーメント解析法の適用	10
2-b 考察	24
第 II 章 有機イオン性薬物の輸送機構の解析	26
第 1 節 有機イオン性薬物の腎挙動特性	27
1-a 薬物排泄動態の用量依存的変化	27
1-b 尿細管腔内 pH の変動と薬物腎挙動の変化	33
1-c 考察	40
第 2 節 実験的腎障害と有機イオン性薬物排泄能の変化	41
2-a カチオン排泄能とアニオン排泄能	41
2-b 考察	48
第 III 章 アミノグリコシド系抗生物質の腎蓄積機構に関する検討	51
第 1 節 アミノグリコシド系抗生物質の腎移行特性	53
1-a アミノグリコシド系抗生物質 Tobramycin の腎挙動	53
1-b Tobramycin の腎挙動における用量依存的変化	57
1-c アミノグリコシド系抗生物質間における取り込み機構の共通性	61
1-d 考察	65
第 2 節 アミノグリコシド系抗生物質の腎蓄積機構の解析	70
2-a アミノグリコシド系抗生物質の正帯電性と腎移行性	70
2-b 低分子量タンパク質の輸送機構との関連	71
2-c 考察	76
結論	78
謝辞	81
実験の部	82
論文目録	96
引用文献	97

総論の部

緒言

生体が外部環境の変化に拘らず生理機能を正常に営むためには、体液量・電解質組成・pH平衡といった内部環境を厳しく維持管理する必要がある。腎臓はこの恒常性と呼ばれる一定の内部環境を維持する上で必要不可欠な臓器であり、腎小体・近位尿細管・ヘンレ係蹄・遠位尿細管とそれぞれ機能を異にする分節が連なった、ネフロンと呼ばれる機能単位から構成され、極めて効率的に電解質・栄養物質等、多種多様な血液中成分の分泌・再吸収を営んでいる^{1,2)}。腎臓における物質輸送は、限外濾過や濃度・浸透圧勾配による受動拡散並びに物質の親水・疎水性に基づく分配といった非特異的な輸送の他に、グルコースやナトリウムの再吸収に代表されるように、特に近位尿細管で発達している基質特異的な能動輸送系により行われるものが存在し、この後者による物質の輸送量は、ネフロンの各分節が複雑に連携することによって巧妙に調節・制御されている³⁾。

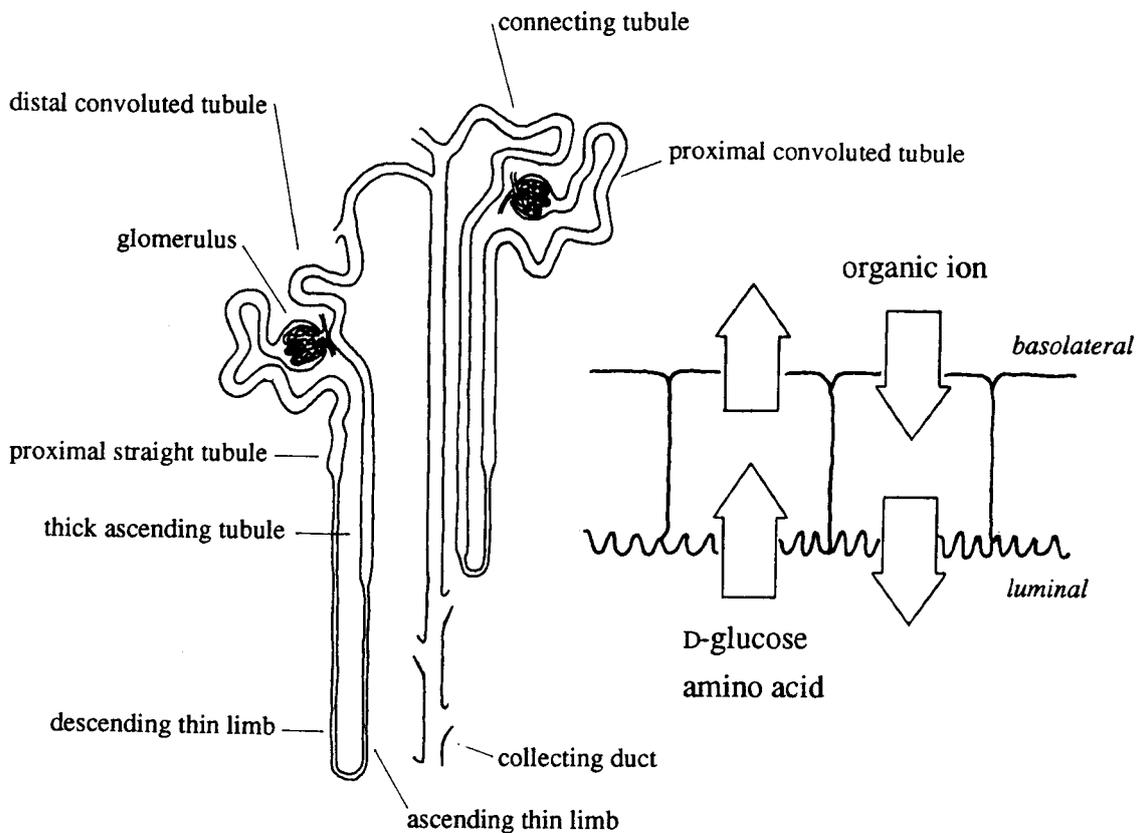


Figure Illustration of nephron with nomenclature, and scheme of the transport of compounds by the renal proximal epithelia.

さて、医薬品の有効性は、薬物の血液中濃度推移によって強く支配されることが知られており、この濃度推移に大きな影響を与える臓器のひとつとしてまず腎臓を挙げることができる。これは心拍出量の約20%にも及ぶ大きな腎血流量が、糸球体における薬物の非特異的な尿中排泄をより効果的なものに行っていることに加え、比較的基質認識性の広い能動輸送系が、薬物の尿細管分泌機構としてこの排泄過程に大きく寄与するからである。このため従来より、医薬品の効果的な臨床使用を考える上で、こうした腎の輸送機構による薬物挙動を把握することの重要性が認識されて、その輸送プロセスの解析が積極的に行われてきた。なかでも培養上皮細胞や単離膜小胞に代表されるミクロの系を中心とした研究は、近年の著しい各種デバイスの発展と相俟って、近位尿細管における薬物の能動輸送機構に関する幾多の知見を見出し続けている。しかし、腎組織は極めて複雑で不均一な構造であることに加えて、薬物挙動は薬物分子がネフロンの各部位とそれぞれに相互作用をした結果であることを鑑みると、ミクロの系から得られた知見を臨床の場に有意義な情報として提供していくためには、構造的特徴と生理機能とが保持された腎の臓器レベルにおける薬物挙動の解析によって、細胞系と臨床系双方の知見を総合的に解釈することが必要不可欠である。

そこで著者は、薬物挙動を臓器レベルで詳細に解析可能な実験系として、摘出腎灌流実験系の確立を試みた。次にこれを用いて、有機イオン性モデル薬物の Tetraethylammonium と *p*-Aminohippurate の腎挙動を解析し、尿pHや病態など薬物腎挙動の変動因子を定量的に明らかにした。更に、優れた抗菌作用を有しながら、その腎毒性故に臨床での使用が制限されるアミノグリコシド系抗生物質の腎挙動に焦点をあて、これに影響を与える因子について検討を加えた。

以下、本研究より得られた結果を3章にわたり論述する。

第 I 章 摘出腎灌流実験系の確立

生体に適用された医薬品はその量の大小はあるものの、腎臓において体循環血液より除去されて生体外へと排泄される。この排泄過程に大きく寄与しているのが近位尿細管であり、ここに有機カチオン並びに有機アニオンの選択的な輸送を行う機構が存在することが知られている^{4,6)}。薬物及びその代謝物の多くは生体内で有機イオンとして存在し、これらが腎臓を主たる排泄臓器としていることを考えると、医薬品をより安全に且つ効果的に使用するためには、尿細管における薬物輸送特性並びに輸送機構の解明が必要である^{7,8)}。

近位尿細管における薬物の輸送機構の研究は、膜小胞系及び培養上皮細胞系をはじめとする様々な実験系を用いて盛んに行なわれている⁹⁻¹²⁾。しかし、これらの検討は腎臓の解剖学的特徴及び生理学的機能が損なわれた条件下でしばしば行なわれており、こうした実験条件と生理的環境との乖離が、特に薬物の腎挙動を腎臓の生理機能との関連において、また薬物の体内挙動に影響を与える因子として論じる場合に問題となることが多い。

Nishiitsutsuji-Uwoらにより発表された摘出腎灌流法¹³⁾は、腎臓を一つの機能単位として捉えた上で薬物挙動を正確に把握できる利点を有し、灌流液組成及び投与薬物量といった実験条件を確実に設定可能な優れた手法である。しかし、腎の生理機能の維持が困難であることや、実験手技自体かなりの熟練度を要することなどのため、動態解析への適用が妨げられていた。本研究において著者はまず、従来の灌流実験法に改良を施し、腎生理機能がより維持された条件で薬物挙動の解析が可能な実験系を確立した。そして次に腎の臓器レベルにおける薬物挙動の変動因子を定量的に把握することを試みた。

本章ではまず、上述の摘出腎灌流手法及び灌流腎の生理機能について述べ、次に、上皮細胞膜と薬物との相互作用の観点より、有機イオン性薬物の尿細管分泌挙動を評価するための臓器レベルでの解析法について論述する。

第1節 腎灌流法の検討

1-a 灌流腎の生理機能ならびに薬物排泄機能の検討

腎臓の構成単位であるネフロンは固有の機能を有する分節の集合体であり、これらはすべて巧みに制御されて効率よく働いている。従って薬物の腎挙動を解析する場合には、腎臓の生理機能をいかに安定に保持し得るかが常に重要な問題になる。このため本研究では摘出操作により生体の恒常性維持機構から切り離された腎臓が、どの程度生理機能を保持し得るのかについて初めに検討した。

灌流回路は Fig.1-1 に示すような構成とし、 Krebs-Henseleit bicarbonate buffer (pH7.4) の基本組成に各種アミノ酸とグルコースを添加・調製したものを灌流液として使用した¹⁴⁾。更に腎機能維持に関しては組織への十分量の酸素供給が必須であるため、先の灌流液に牛赤血球を添加することによって酸素供給能の向上を試みた。腎機能の評価は、測定の簡便性から灌流速度・灌流圧・尿流速の3項目を指標とし、灌流系構築後これらの変動を経時的に測定することによって確認した。

まず Fig.1-2 に、実験期間15分間における灌流腎実験系の安定性を検討した結果を示した。灌流開始より10分経過以降に灌流圧の増加傾向が認められるが、灌流速度・灌流圧・尿流速の各項目に著しい変動は存在せず、本実験系の安定性は

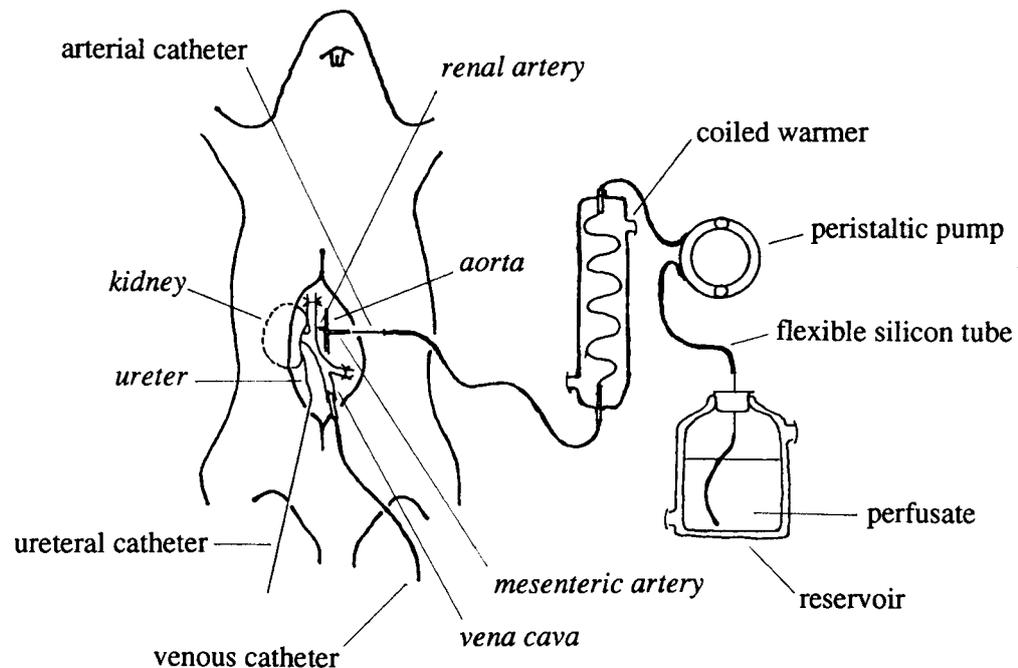


Fig. 1-1. Sketch of the isolated perfused rat kidney. Some tools and apparatus for sampling are omitted.

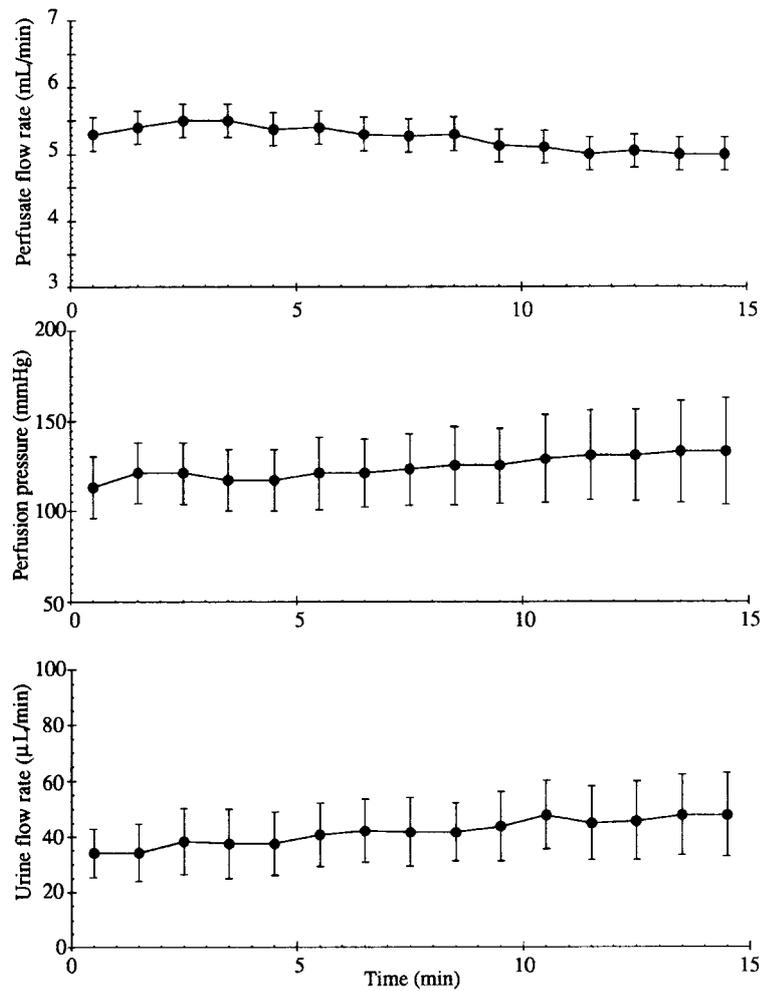


Fig. 1-2. The physiological functions of the isolated perfused rat kidney. After a 20min-equilibrium period, the renal functions were measured for 15min. In this study, the average of glomerular filtration rate was 0.34 ± 0.01 mL/min.

薬物挙動解析のために十分であることが確認された。次に、灌流液への10-20%の血球添加の有無と主要な腎機能指標値との関係についての検討結果を、Fig.1-3に掲げる。ここで認められる腎機能の著しい差異は、血球添加による酸素供給能改善の結果生じたものと考えられ、灌流液中の血球比率即ちヘマトクリット値がラットの *in vivo* 平均値 40-45%⁵⁾より低い値でも、かなりの効果が得られることが示された。本灌流腎におけるグルコース及びナトリウム再吸収率はそれぞれ 90-99%, 80-95%であった。

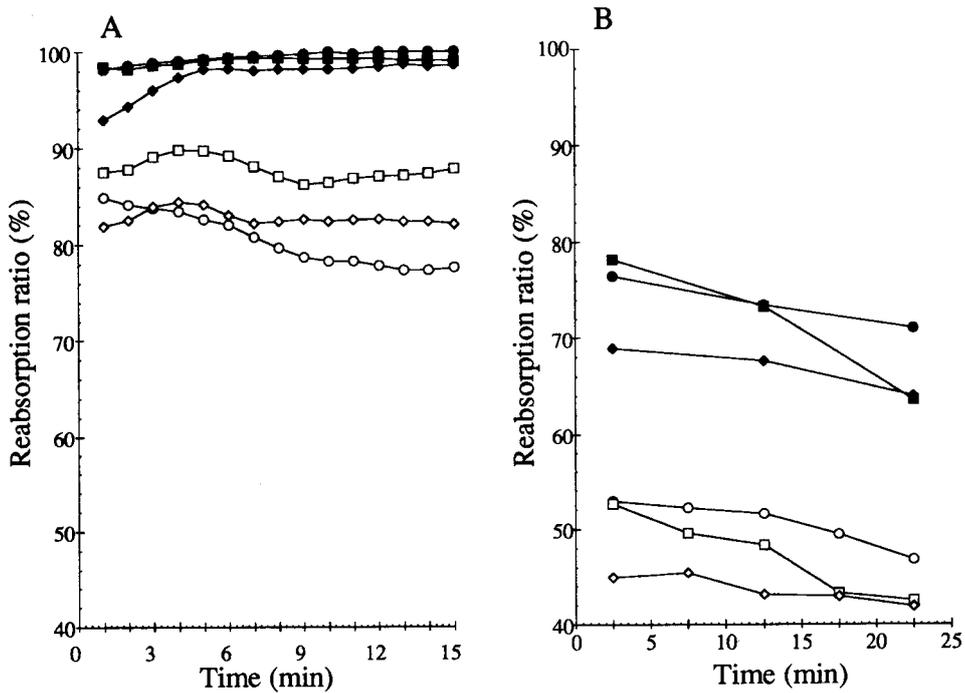


Fig. 1-3. Contribution of bovine erythrocyte in the perfusate to the improvement of the renal functions which can be estimated from the reabsorption ratio of glucose (closed symbol) and water (open symbol). The renal functions in the presence (panel A) and the absence (panel B) of the erythrocyte were measured in the respective studies. Three experiments were carried out in panel A and panel B, respectively. The data of glucose and water reabsorption from same experiment were represented with the same shape.

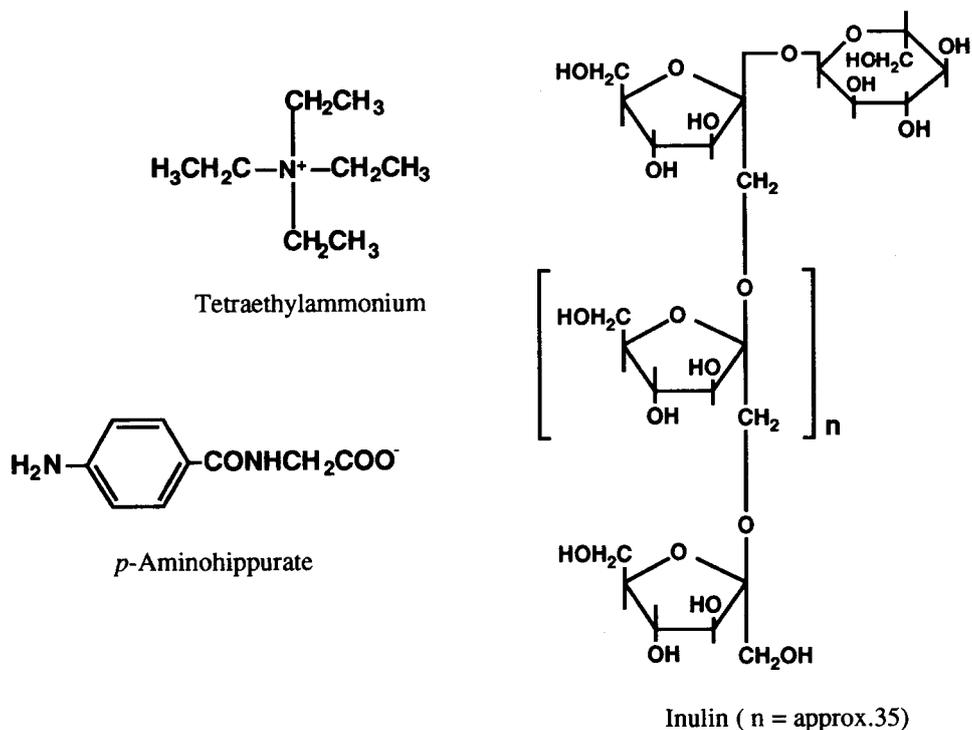


Fig. 1-4. Structure of the compounds used in this study.

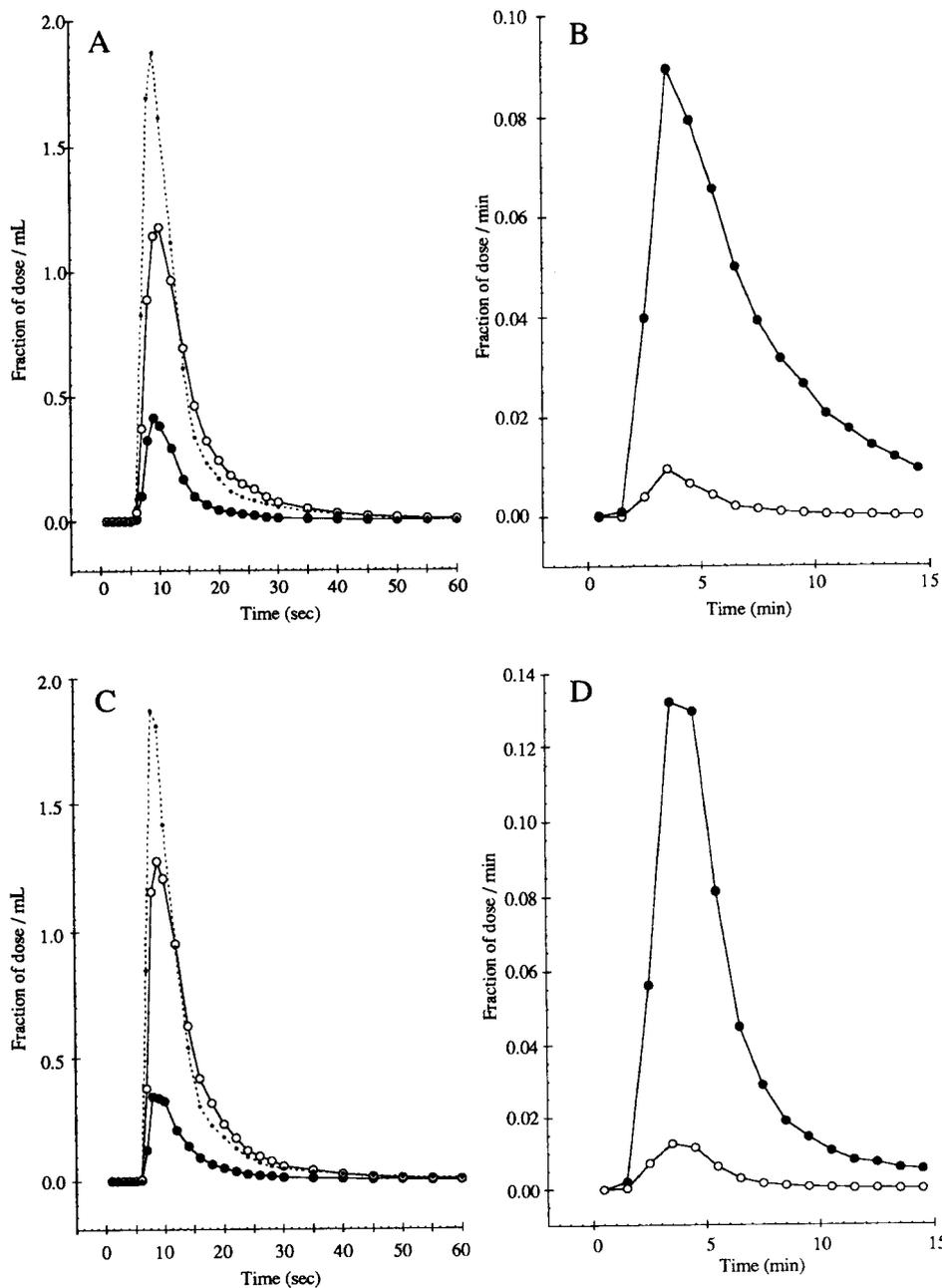


Fig. 1-5. Typical outflow profiles of the ionized model compounds, tetraethylammonium (panel A and B) and *p*-aminohippurate (panel C and D). They were dissolved in the injection solution at the concentration of 1mM and 0.1mM, respectively. The venous outflow profiles of theirs were indicated in panel A and C, and the urinary profiles were in B and D. The profile of EB-albumin, which was used as intravascular marker, was represented by ····. This compound does not appear in the urine. The profile of the extracellular space and glomerular filtration marker, inulin was shown with ○. Extracted by renal epithelia from the perfusate, the profile of the model compound, which was indicated by ●, was the smallest in the venous profiles. Please note that TEA and PAH differ in their urinary profile. This figure appears again as fig.1-12 in the next section.

更に灌流腎において尿細管分泌能が働いていることを確かめるために、灌流液中で正または負の電荷を有する Tetraethylammonium (TEA) 及び *p*-Aminohippurate (PAH) を腎動脈内へ急速投与し、静脈側並びに尿管側の流出曲線を調べた。この両薬物は代表的な有機イオン性モデル薬物として様々な実験系で繁用されており¹⁶⁻¹⁸⁾、また *in vivo* クリアランス実験において能動的に尿中へ排泄されることが知られている^{19,20)}。Fig.1-4にこれら両薬物の構造式を、Fig.1-5に本実験で得られる代表的な両薬物の流出曲線を、同時に投与したEB-albumin並びにInulinの流出曲線とあわせて表示した。EB-albuminは、分子量約 68,000 のタンパク質であるアルブミンと濃青色を呈する色素 Evans Blue が事実上非可逆的に結合した複合体で、糸球体の分子篩構造や毛細血管壁を通過して尿中や血管外へ漏出することなく、静脈側流出液中に全量回収される性質を持つ。また分子量約 5,000 のポリサッカライドである Inulin は、細胞内へは移行せず、急速投与後血管内と血管外空間との間で速やかに分布平衡に達し、尿細管上皮細胞において分泌や再吸収を受けることなく糸球体濾過のみで尿中へ排泄される性質を有している。先に示した静脈側流出曲線では TEA・PAH の両モデル薬物は、消失が起きない EB-albumin に対しては勿論のこと、糸球体で投与量の約 5% が灌流液中から除去される Inulin との比較においてもより小さな流出曲線を示し、一方、これに対応するように、尿中へは Inulin の排泄曲線が示す糸球体濾過量よりも遥かに多い量が排泄されている。

これらの結果は、本摘出灌流腎における有機イオン性薬物の尿細管分泌機構が十分に機能していることを明確に示すものである。

1-b 考察

薬物の腎輸送機構を分子レベルで詳細に検討するためには、単離膜小胞実験系あるいは培養細胞実験系は非常に適した実験系であり、輸送機構の本体である膜タンパク質の単離精製やその遺伝子レベルでの解明が進みつつある²¹⁾。しかし、ネフロンや血管系が入り組んだ複雑な構造を持つ腎の臓器レベルにおいて、これらの輸送機構が如何に機能し、制御されているのかについては、未だ十分に検討が行われているとは言い難い。一方 *in vivo* 実験系では、ひとつの臓器が薬物の血液中濃度推移にどれだけ寄与をしているのか推定することは難しく、また使用可能な薬物や阻害剤の種類並びにその濃度あるいは溶液 pH の範囲までもが制限されるため、臓器

構成細胞の薬物輸送系に関して詳細な議論をすることは不可能に近い。

摘出臓器灌流系の実験条件設定の自由度は、*in vivo* に比し遥かに大きく、また目的臓器以外からの影響を排除した環境であるため、薬物挙動を臓器レベルでも細胞レベルでの知見を考慮しつつ詳細に検討・解析することが可能であり、*in vivo, in vitro* 双方の知見を統一的に且つ総合的に解釈するために非常に有用である。摘出灌流腎が薬物動態の分野に紹介された当初は、その灌流液として若干の栄養物質を含む緩衝液が用いられており^{13,14,22}、組織 pH と腎へのエネルギー供給だけが考慮されていたきらいがある。しかしながら動脈血中には標準状態換算で平均して約 20v/v% の酸素が溶存しているのに対し、水に対する酸素の溶解度は 20 °C で約 3 v/v% と極めて低い^{23,24}。従って緩衝液のみによる灌流条件では、摘出臓器が容易に無酸素状態に陥り、機能不全をきたすことが非常に多いものと考えられる²⁵。このため、実験結果を薬物の臨床使用と結び付けようとする本研究において、酸素供給能の改善は必須の検討課題であった。

各臓器への酸素供給を担っているヘモグロビンは標準状態で 1g あたり 1.3mL の酸素分子を結合することができ、赤血球にはこれが約 350mg/mL の濃度で含まれている²⁶。従って灌流液中に赤血球を含ませることでこの問題を解決できると考え検討を行った。結果は Fig.1-3 に示したとおりであるが、酸素供給性の改善によってもたらされる腎機能の向上は満足のものであった。Leiberthal らは灌流腎の機能を同様の手法を用いて維持することを試みており、ヘマトクリット値が 40-45% の場合に腎血管抵抗やナトリウム再吸収率に著しい改善が認められたとしている^{15,27}。しかし著者らが追試を行ったところ、ヘマトクリット値の上昇にともなって灌流液の粘度上昇が起り、十分な灌流速度の確保が困難であった。腎臓の病態生理の分野で得られている知見²⁸によると、腎臓の動脈血からの酸素抽出率は 10-15% と低い。このことから、この臓器に組織重量あたり最大の血流が流れ込む理由は、腎組織へ酸素を供給するためではなく、糸球体濾過量を保つためであることがわかる²⁸。そこで灌流速度と酸素供給性の双方を考慮してヘマトクリット値を 10-20% と設定することにし、以後この組成において実験を行なった^{29,30}。また灌流速度は腎血流量の文献値 3-5 mL/min/g-kidney の範囲内に設定し³¹、更にこのときの灌流圧が循環血圧値である 110-140 mmHg の範囲内に収まることを実験条件の調節基準とした³²。

本摘出臓器灌流実験系における腎機能の保持性及び安定性は、実験期間中の

尿流量・糸球体濾過率並びにグルコース及びナトリウムの再吸収率を指標にして評価した。残念ながらインビボレベルの腎機能をそのまま再現するには至らず、遠位尿細管が関与するナトリウムなど電解質の再吸収能が若干損なわれている傾向が見られた。これは血液と灌流液組成が全く同一のものではなく、また本実験系では臓器に対する神経支配が遮断されているため、腎組織内の体液分配バランスの調節や腎髄質の浸透圧勾配の形成が阻害されているためと考えられる。しかし、糸球体濾過率では 0.3-0.6 mL/min/g·kidney、グルコース再吸収率は 90-99% とそれぞれ高い値を示し、生理機能が高く保持されていることが明らかとなった。従って、薬物の体内からの排泄に大きく寄与する糸球体や近位尿細管の薬物輸送能は満足できる水準に達しており、生理的条件における薬物挙動の解析を可能とし得る灌流実験系を確立できたものとする。

第2節 薬物挙動解析法

2-a モーメント解析法の適用

薬物の体内動態を数学モデルを駆使して解析する試みは、従来より活発に行なわれており、計算機の急激な発達と呼応して分子レベルの理論から全身の薬物挙動を記述することも不可能ではないものとなってきている。しかしこれらの解析法は、薬物挙動を支配するすべての因子について詳細に記述し数値表現できる反面、実際に得られる以上の情報量を必要とする場合も多く、またすべてのモデルパラメータに対して実験による裏付けが可能であるとは限らない。その結果、複雑なモデルを用いた解析を行なう場合にはモデルの妥当性が問題となることが多く、本来は推測の域を出ない数値が勝手に一人歩きをはじめの危険性がともなう。

1978年に Yamaoka らは特定のモデルに依存しない解析法であるモーメント解析法を薬学領域へ応用し³³⁾、以来このモデル非依存的な手法は薬物挙動解析の手段として多くの研究者に受け入れられてきた³⁴⁻³⁶⁾。そこで著者は腎組織の複雑さを考慮し、複雑なモデルを記述することなく実験事実³⁴⁾に忠実に薬物挙動を評価するために、このモーメント法を解析法として選択した。しかしモーメント解析法はややもすると定性的な議論になりがちである。このため灌流腎実験系の特徴を生かし、薬物と腎組織との相互作用を静脈側と尿管側とで分離評価することにした。即ち、灌

流実験系で得られる薬物の静脈側流出曲線より血管から上皮細胞への移行を、また尿管側の流出曲線より上皮細胞から管腔内への薬物分泌挙動を、それぞれ解析することとした。更にこれらの流出曲線より、薬物が血管内から上皮細胞へ取り込まれそして管腔内へ分泌されていく一連の過程を、尿細管上皮細胞の薬物輸送特性にまで踏み込んで定量的に論じるために、以下の数式誘導を行なった。

本摘出灌流腎実験系では、解析対象とする薬物を既知の挙動特性を有するマーカ物質とともに腎動脈内へ急速投与し、その後得られる流出曲線をマーカ物質の流出曲線を基準に解析して薬物の腎挙動を探る手法、所謂 Multiple Indicator Dilution Method を採る。解析対象薬物である TEA や PAH、並びにマーカ物質である EB-albumin, Inulin は、各々 Fig.1-5 に例示したような異なる流出曲線を示す。これは急速投与後に各物質が、Fig.1-6 に示すようなそれぞれ異なる腎組織内経路を通過するからである。

EB-albuminの血管外漏出量は通常極めて少なく、また糸球体を通過せず尿中には排泄されない。このようにEB-albuminは専ら血管内を血流と共に移動するため、この物質の流出曲線は腎臓の血管内空間における薬物挙動の比較基準として用いることができ、また灌流腎の血管系に異常が無いことを確認する手段としても利用できる。

一方 Inulin は毛細血管壁を自由に通過するため血管外へは分布できるが、尿細管上皮細胞内へは入り込むことができない。このためこの物質は、血管内

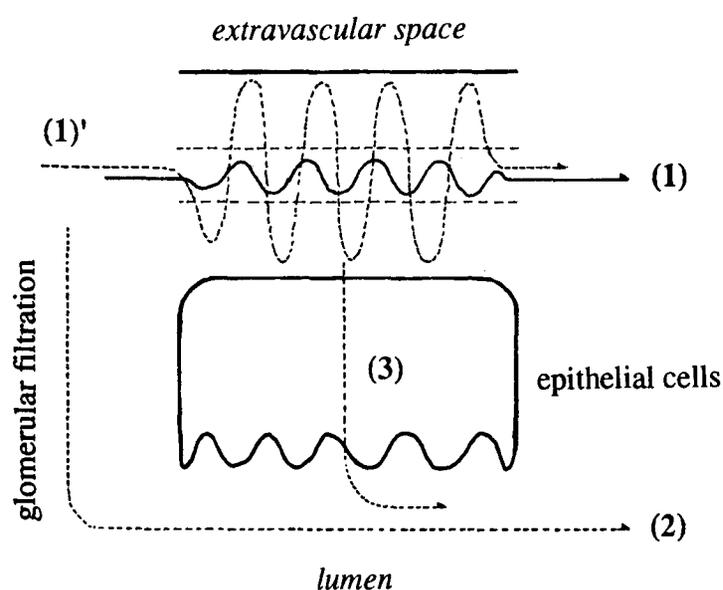


Fig. 1-6. Three routes through which drugs pass the isolated perfused kidney are illustrated. EB-albumin flows within vascular space (route 1), because its molecular size is too large to pass through the fenestrae of capillaries and the sieve of the glomerulus. Inulin enters the extravascular space, but it cannot penetrate the surface membranes of epithelia (route 1'). This substance can be also filtrated at glomerulus, and flows in the lumen without any interactions with the tubular cells (route 2). Organic ions in blood such as p-aminohippurate and tetraethylammonium are extracted by the epithelia and secreted into the lumen (route 3). Therefore those compounds are excreted through two routes, 2 and 3.

(Intravascular Space) と細胞間隙 (Extracellular Space) とを併せた範囲内を動くこととなり、その静脈側流出曲線は薬物が上皮細胞と相互作用することなく移動すると仮定した場合の流出曲線に相当する。Inulin はまた、糸球体濾過のみで尿中に排泄され、尿細管上皮細胞による分泌・再吸収をうけないことが知られており、このためその流出曲線は、薬物が尿細管内で上皮細胞と相互作用を起こさないと仮定した場合の流出曲線に相当すると考えられる。従って薬物の糸球体による非特異的な排泄過程を推定するためのマーカ物質として用いられ、薬物の尿管内挙動を推定する際に利用することができる。

このような各マーカ物質の挙動特性を利用して、薬物の血管側からの取り込み過程や、分泌・再吸収といった尿細管腔内挙動特性の解析が可能である。そこで次にPAHの挙動を例に薬物の腎分泌挙動の具体的な評価手順を論じていくが、勿論本手法はPAH以外の腎挙動解析を行なう場合でも適用できる。

各薬物の静脈側流出曲線及び尿中排泄曲線の曲線下面積 AUC (Area Under the Curve) は、以下の式で求められる。

$$\text{AUC}_{v,dr} = \int C_p(t) dt \quad [1]$$

$$\text{AUC}_{u,dr} = \int \frac{dA_u(t)}{dt} dt \quad [2]$$

また、静脈及び管腔内の平均通過時間 MTT (Mean Transit Time)及び、通過時間の分散 VTT (Variance of the Transit Time) は、

$$\text{MTT}_{v,dr} = \frac{\int t \cdot C_p(t) dt}{\text{AUC}_{v,dr}} \quad [3]$$

$$\text{MTT}_{u,dr} = \frac{\int t \cdot \frac{dA_u(t)}{dt} dt}{\text{AUC}_{u,dr}} \quad [4]$$

$$\text{VTT}_{v,dr} = \frac{\int t^2 \cdot C_p(t) dt}{\text{AUC}_{v,dr}} - (\text{MTT}_{v,dr})^2 \quad [5]$$

$$\text{VTT}_{u,dr} = \frac{\int t^2 \cdot \frac{dAu(t)}{dt} dt}{\text{AUC}_{u,dr}} - (\text{MTT}_{u,dr})^2 \quad [6]$$

の関係式より算出できる^{37,38)}。AUC, MTT, VTT はそれぞれ 0 次, 1 次, 2 次モーメントと呼ばれる値であり、これらの式は系の線形非線形を問わずに成立する。更に高次のモーメントである歪度 (Skewness) や尖度 (Turtosis) も存在するが、計算の際に、測定値の僅かな誤差が無視できなくなるために実用的ではない^{37,39)}。

式中、 $C_p(t)$ は静脈側流出液 1mL あたりの薬物量を示す。但しここでは投与量で規格化した薬物量を用いるため、この単位は Fraction of dose / mL となる。 $Au(t)$ は尿中薬物排泄速度であるが、同じく投与量で規格化し Fraction of dose / min の次元とする。また第 1 添え字の v は静脈側における薬物挙動に関する値であることを示し、血管内空間のみでの挙動を示すときは特別に b の記号を用いた。以下同様に $u, g, trans$ を用いて管腔内挙動、糸球体濾過過程、経細胞輸送過程 (分泌過程) に関する値であることを示した。但し煩雑を避けるために、 $C_p(t), Au(t)$ に関する添え字は誤解を招かない範囲で省略した。また EB-albumin, Inulin それぞれの挙動を示す際には更に第 2 添え字 alb, inu を付けることとし、薬物挙動の表示には dr の記号を用いた。

「分泌を受けて管腔内へ出現する薬物分子」については、特に分泌が絡んでいることを明示するために添え字 sec を付け、単に糸球体濾過のみで尿管内へ入る薬物分子と区別した。

以上の表記法に基づくと Inulin の静脈側流出曲線の曲線下面積は $\text{AUC}_{v,inu}$ となり、「分泌された薬物」の尿中排泄曲線の平均通過時間は $\text{MTT}_{u,sec}$ となる。

薬物濃度 $C_p(t)$ と排泄速度 $dAu(t)/dt$ は両者とも時間の関数であるので、簡略化のためこれらをまとめて $X(t)$ と表記し、ラプラス変換

$$\tilde{X}(s) = \int e^{-st} \cdot X(t) dt \quad [7]$$

を用いると、上記のモーメント算出式[1]-[6]は以下のように記述できる。

$$\text{AUC} = \lim_{s \rightarrow 0} \tilde{X}(s) \quad [8]$$

$$\text{MTT} = \lim_{s \rightarrow 0} \left[-\frac{d}{ds} \ln \tilde{X}(s) \right] \quad [9]$$

$$\text{VTT} = \lim_{s \rightarrow 0} \left[\frac{d^2}{ds^2} \ln \tilde{X}(s) \right] \quad [10]$$

ところでFig.1-5に示されるように、灌流実験で得られる流出曲線は腎動脈内への薬物投与が急速投与つまり衝撃関数 δ 様で行われるにもかかわらず、広がりを持った波形に変化している。この波形変化は腎臓という「系」が、これに δ で入力された薬物の分子ひとつひとつに対してそれぞれ異なった時間・空間・物理・生物的作用を及ぼした結果であり、別な見方をすれば入力波形に対し「系」である腎臓が「応答した」と解釈することができる。

この波形変化は入力関数を $I(t)$ 、出力関数を $O(t)$ とすれば、

$$O(t) = \int_0^t I(u) \cdot H(t-u) du \quad [11]$$

という関係式で表現することができる。ここで用いた関数 $H(t)$ は入力が行われた系の性質を表現する関数であり、即ち今回の場合、薬物に対する腎臓の輸送特性を表わす関数となる。

式[11]はラプラス次元では次のように表わされる。

$$\tilde{O}(s) = \tilde{H}(s) \cdot \tilde{I}(s) \quad [12]$$

摘出灌流腎の応答関数 $\tilde{H}(s)$ は実際の薬物の腎排泄過程を考えた場合に、更に細かく分けることができる(Fig.1-7)。すなわち急速投与された薬物の静脈側流出曲線には血管系の応答関数 $\tilde{H}_v(s)$ が関係し、尿管側流出曲線は糸球体濾過・尿細管腔内の通過・経細胞輸送の各過程の応答関数 $\tilde{H}_g(s), \tilde{H}_u(s), \tilde{H}_{trans}(s)$ すべてと関連していると考えられる。実際には更にこれに加えて、静脈と輸尿管に挿入したサンプリング・カテーテルの寄与をそれぞれ考慮しなければならないが、これについては後ほど考察する。

さて先のFig.1-5からも明らかなように、同時に急速投与された3種の薬物の

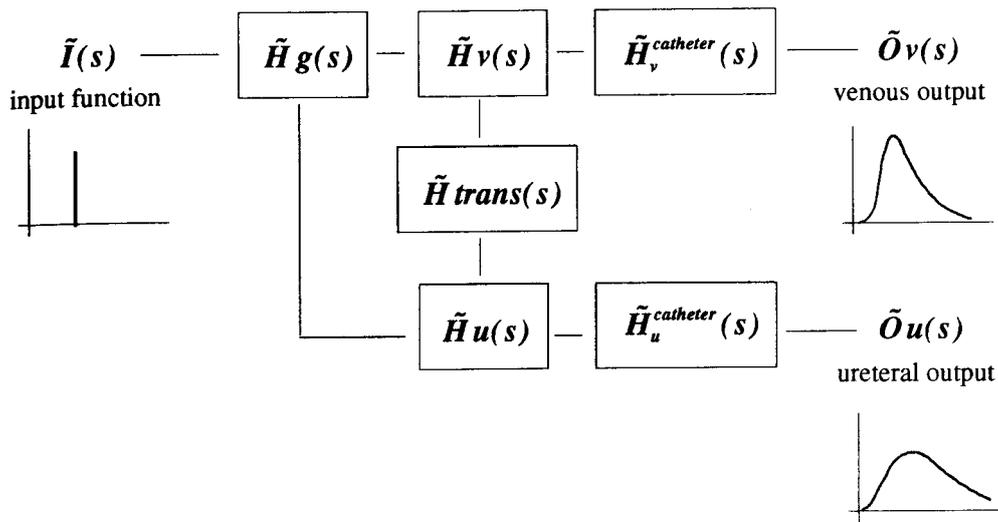


Fig. 1-7. Block diagram to explain the formation of the output profile into which the input profile was converted by convoluting response functions.

流出曲線はそれぞれの腎挙動特性を反映したものであるため、目的とする薬物の腎挙動はマーカ物質との挙動の違いをもとに解析でる。そこで各応答関数を用いて各薬物の腎挙動を順次記述し、その挙動の違いを数式表現していく。

まず血管外漏出がないものと考えられる EB-albumin の挙動を検討すると、この物質の流出曲線即ち出力関数 $O_{v,alb}(t)$ に反映される腎の応答関数は、腎臓の血管系によるものだけとなり、次のように記述できる。

$$O_{b,alb}(t) = \int_0^t I_{alb}(u) \cdot H_b(t-u) du \quad [13]$$

この式はラプラス次元において次のように簡単に記述される。

$$\tilde{O}_{b,alb}(s) = \tilde{H}_b(s) \cdot \tilde{I}_{alb}(s) \quad [14]$$

薬物は急速投与されているので入力関数 $I_{alb}(t)$ は $\delta(t)$ に近似でき、これはラプラス次元において、

$$\tilde{I}_{alb}(s) = 1 \quad [15]$$

であるので、これを式[14]に代入した後両辺の対数をとって微分すると次のようになる、

$$\frac{d}{ds} [\ln \tilde{O}_{b,alb}(s)] = \frac{d}{ds} [\ln \tilde{H}_b(s)] \quad [16]$$

これより式[9]を考慮して次の等式が成り立つ。

$$\mathbf{MTT}_{b,alb} = \mathbf{MTT}_b \quad [17]$$

この結果、式[16],[17]からEB-albuminの静脈側流出曲線には、入力に対する腎血管系の応答関数のみが反映されていることがわかる。

今回用いた薬物と2種類のマーカ物質は同時に急速投与されていることを考慮しながら Inulin の流出曲線について同様に考えていくと、まず静脈側流出曲線について、

$$\tilde{O}_{v,inu}(s) = \tilde{H}_v(s) \tilde{I}_{inu}(s) \quad [18]$$

$$\mathbf{MTT}_{v,inu} = \mathbf{MTT}_v \quad [19]$$

が導かれ、そして尿中排泄曲線については、

$$\tilde{O}_{u,inu}(s) = \tilde{H}_g,inu(s) \tilde{H}_u,inu(s) \tilde{I}_{inu}(s) \quad [20]$$

が導かれる。ここで薬物の糸球体通過は投与直後に起こるものと考え、また糸球体での相互作用は無視できるとすると、糸球体濾過過程の応答関数は

$$\tilde{H}_g(s) = 1 \quad [21]$$

と置けるので、式[20]は簡略化でき以下のようなになる。

$$\tilde{O}_{u,inu}(s) = \tilde{H}_u(s) \quad [22]$$

$$\mathbf{MTT}_{u,inu} = \mathbf{MTT}_u \quad [23]$$

このように Inulin 流出曲線をもとに導かれた式[18]より、投与された薬物に対する腎血管系と上皮細胞外空間の応答は、Inulinの静脈側流出曲線にあわせて反映されており、また式[22]より薬物が尿細管内部を流れる際に受ける影響は、Inulinの尿管側流出曲線に反映されていることがわかる。

ここまで、EB-albumin, Inulin といったマーカ物質の流出曲線を用いることによって、腎の各部における薬物の挙動特性即ち、投与された薬物に対する腎各部位の応答特性を評価することが可能であることが示された。次にこれを用いて PAH の腎挙動、特にその尿中排泄挙動を定量的に評価することを考える。

PAH の尿中排泄量は糸球体濾過マーカである Inulin のそれよりも遥かに多く、この尿中排泄過程には糸球体濾過に加えて上皮細胞による血管側から管腔内への輸送過程が寄与していること明らかである。こうしたPAHの尿中排泄過程は上記に従って次のように記述できる。

$$\begin{aligned}
\tilde{O}u,dr(s) &= [\tilde{H}g,dr(s) \cdot \tilde{H}u,dr(s) \cdot \tilde{I}dr(s)] \\
&\quad + [\tilde{H}trans,sec(s) \cdot \tilde{H}u,sec(s) \cdot \tilde{I}sec(s)] \\
&= \tilde{O}u,inu(s) + \tilde{H}trans,sec(s) \cdot \tilde{H}u,sec(s)
\end{aligned} \tag{24}$$

式[24]の右辺第2項は、分泌されたPAHの挙動を表わしているので、

$$\begin{aligned}
\tilde{H}trans,sec(s) \cdot \tilde{H}u,sec(s) &= \tilde{H}trans,sec(s) \cdot \tilde{H}u,inu(s) \\
&= \tilde{O}u,sec(s)
\end{aligned} \tag{25}$$

と表記法を変えた上で、式[24]を式[9], [20], [22]を用いて整理すると、

$$\tilde{O}u,dr(s) = \tilde{O}u,inu(s) + \tilde{O}u,sec(s) \tag{26}$$

が得られる。更に式[25]から式[9]に従ってMTTを計算すると次の関係式が得られる。

$$MTTu,sec = MTTtrans,sec + MTTu,inu \tag{27}$$

$$MTTtrans,sec = MTTu,sec - MTTu,inu \tag{28}$$

$$\bar{T}cell \equiv MTTtrans,sec \tag{29}$$

式[26]は、薬物尿中排泄曲線には糸球体濾過過程と上皮細胞による分泌過程が重ね合わさって反映していることを表わしており、式[27]は、腎動脈内へ急速投与された薬物が分泌を受けた後、尿管側へ流出してくるまでに平均してどれだけの時間が必要であるのかを表わしている。また、式[29]で定義された $\bar{T}cell$ は、分泌される薬物分子が、腎尿細管上皮細胞を血管側から管腔側へと横切る際に要する時間を表わしている。この $\bar{T}cell$ は各物質の尿管側流出曲線のみから算出される値であり、静脈側流出曲線つまり血管側薬物挙動と係わり合いを持たない。このため薬物分子が血管側で上皮細胞に「取り込まれた直後」から「管腔内へ分泌された直後」までの平均所要時間を示していると考えられる。薬物分泌経路を考えた場合、 $\bar{T}cell$ に大きな影響を与えるものは上皮細胞の管腔刷子縁膜に存在する薬物輸送担体であり、このため $\bar{T}cell$ の変化を捉えることでこの輸送担体の薬物分泌能の変化を推定することが可能である。

次に、実験データからこの $\bar{T}cell$ を算出する手順を述べる。(Fig.1-8)

式[26]を式[8]に従って誘導すると、

$$AUCu,dr = AUCu,inu + AUCu,sec \tag{30}$$

の関係式が得られることから、まずPAHの尿中排泄曲線とInulinの排泄曲線との差

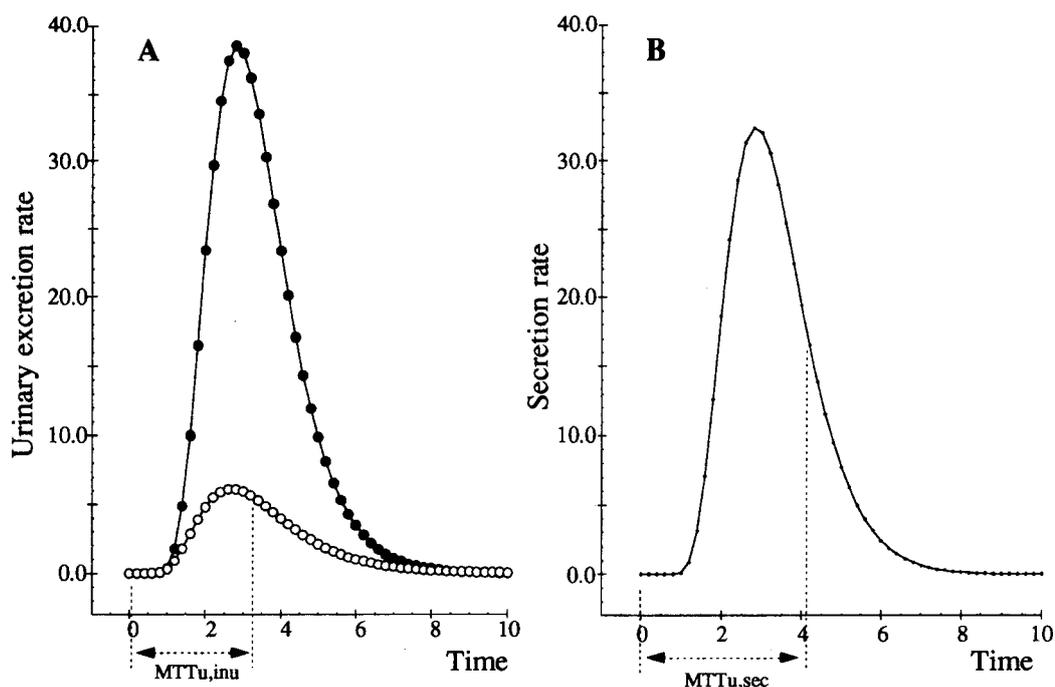


Fig. 1-8. Explanation of the procedure for calculating the moment parameter \bar{T}_{cell} . Typical urinary outflow profiles of secreted drug (●) and glomerular filtration marker inulin (○) were shown in panel A. By subtracting ○ from ●, a curve shown in panel B can be obtained. The mean transit time calculated from the profile in panel B is $MTTu, sec$. The value of \bar{T}_{cell} is given by subtracting $MTTu, inu$, which is from ○ in panel A, from $MTTu, sec$ in panel B.

を求め、これを改めてプロットすると、分泌を受けた薬物分子のみに起因する尿管側の薬物流出曲線が得られる(Fig.1-8B)。この曲線のAUCが式[30]の $AUC_{u, sec}$ であり、またこの曲線から計算される1次モーメントの値が $MTTu, sec$ である。最後に式[28]に示すように、 $MTTu, sec$ からInulinの尿中排泄曲線の $MTTu, inu$ を減じると、PAHの上皮細胞平均通過時間 \bar{T}_{cell} が得られる。

また各薬物のモーメント・パラメータを用いて、以下の各値の算出も可能である。まず血管内容積 V はEB-albuminが血管外へ漏出しないことから、

$$V = Q \cdot MTTv, alb \quad [31]$$

で計算される^{39,40)}。ここで Q は実験時の灌流速度である。更にInulinの挙動から、

$$Vd, inu = Q \cdot MTTv, inu \quad [32]$$

によって算出される値は、Inulinが動きまわる範囲即ち血管内容積と細胞外空間をあわせた部分の体積を表わす。同様に薬物の静脈側流出曲線から同じ操作で、

$$V_{d,dr} = Q \cdot MTT_{v,dr} \quad [33]$$

が算出される。この値 $V_{d,dr}$ は、静脈側流出液中の薬物分子が急速投与された後に「腎組織とどれだけ相互作用をしてきたか」ということを反映する値である。これは言い換えると「薬物と腎上皮細胞との相互作用の特性値」をモデル非依存的に示す値であるといえる。仮に少しも相互作用を起こさずに薬物流出が起こる場合を考えると $V_{d,dr}$ と $V_{d,inu}$ は同じ値となるため、 $V_{d,dr}$ を Inulin の値を基準として表示した挙動特性値、

$$\begin{aligned} MTT_v \text{ Ratio} &= \frac{V_{d,dr}}{V_{d,inu}} = \frac{Q \cdot MTT_{v,dr}}{Q \cdot MTT_{v,inu}} \\ &= \frac{MTT_{v,dr}}{MTT_{v,inu}} \end{aligned} \quad [34]$$

を導入し、これを用いて薬物と上皮細胞との相互作用の評価を行なうことにした。

尿管側流出曲線に関しても同様に、

$$MTT_u \text{ Ratio} = \frac{MTT_{u,dr}}{MTT_{u,inu}} \quad [35]$$

を用いて薬物挙動を評価できる。

PAH のように、上皮細胞内へ取り込まれ管腔内へ分泌されるような薬物の場合、固有クリアランス $CL_{int,dr}$ 並びに、みかけ上の分布容積 $V_{dapp,dr}$ は次のように表わすことができる。

$$V_{dapp,dr} = Q \cdot MTT_{v,dr} + CL_{int,dr} \cdot \bar{T}_{cell} \quad [36]$$

$$CL_{int,dr} = \frac{Q \cdot (1 - F)}{f \cdot F} \quad [37]$$

但しこの2式が成立するためには、灌流腎での薬物挙動が well-stirred model に従い、且つ血管側から消失した薬物がすべて尿側で回収可能であることが必要である。ちなみに式[37]では、灌流腎の血管系における薬物の抽出回避率 Availability を F 、薬物のタンパク非結合率を f とおいた。灌流腎実験系における F の値は次式によって求めることができる。

$$F = \frac{(\text{Plasma Recovery Ratio of Drug})}{1 - f \cdot (\text{Urinary Recovery Ratio of Inulin})} \quad [38]$$

以上示してきたように、静脈側・尿管側での各薬物量の回収率に加えて、モーメント解析法で算出した \bar{T}_{cell} , MTTv Ratio, MTTu Ratio の各値を用いることにより、薬物の上皮細胞での挙動をモデル非依存的に定量的に解析することが可能となった。

さて、灌流実験で得られる数値から実際に数値誘導を行う場合には、静脈に挿入したカテーテル内での薬物挙動や、モーメント計算の打ち切り誤差の影響について把握しておかなければならない。このため以下の予備検討を行なった。

まずサンプリング用の静脈カテーテルが、薬物挙動解析に及ぼす影響について

検討した。先の灌流回路

(Fig.1-1, 4ページ)における動脈カテーテルと静脈カテーテルを直結した流路を用意して、動脈側から薬物の急速注入実験を行ない、各薬物の流出曲線間の差異について調べた。結果は、Fig.1-9に示されているように、EB-albumin, Inulin, PAHの各流出曲線はほぼ同一の形状となり、カテーテル内の挙動特性に薬物間での違いは認められなかった。

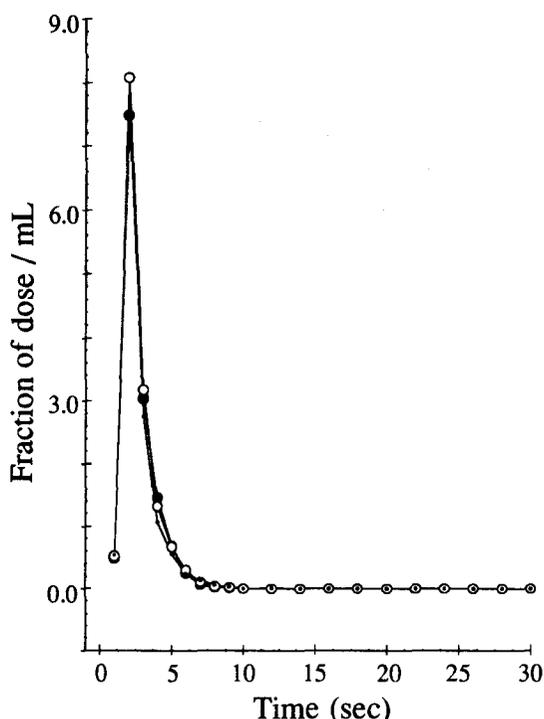


Fig. 1-9. Typical alteration of the input profile by the apparatus used in this study. To be compared with the profiles in Fig. 1-5, the abscissa is adjusted to the half of that for the venous profile in Fig. 1-5. Three outflow profiles of EB-albumin(●), inulin(○), and PAH(●) were overlaying each other. The peak of the profile appeared just after the injection was done, unlike that in Fig. 1-5.

また灌流速度の変化によって、薬物のカテーテル通過の所要時間やこれを通過する際に受ける波形変化が異なるため、これに対する補正について検討を行った。その結果、灌流速度と薬物の平均カテーテル通過時間及びその分散との間にFig.1-10に示される負の相関関係が認められた。このため両者の関係を線形一次式で近似し

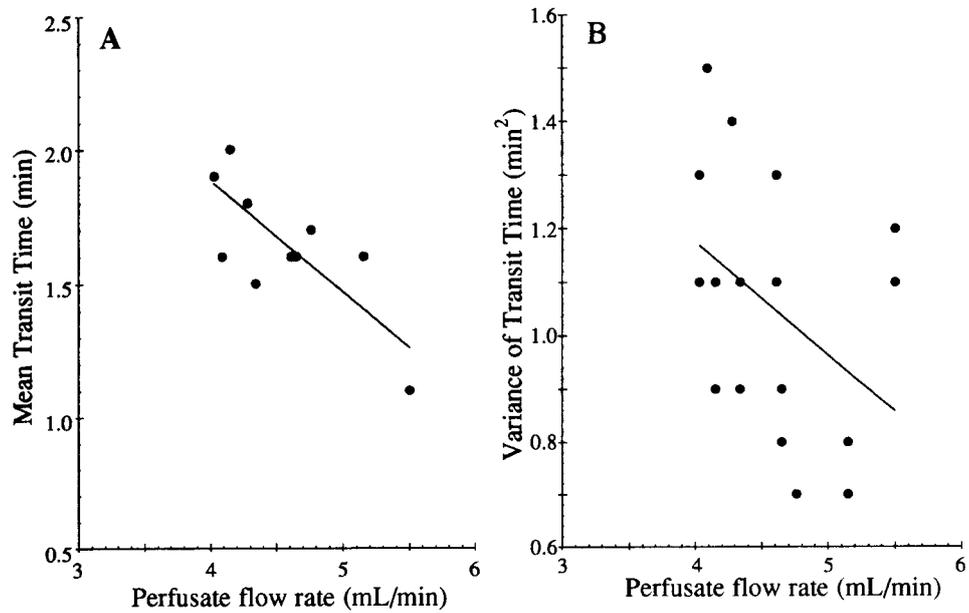


Fig. 1-10. Flow-dependent change of mean transit time (panel A) and variance of the transit time (panel B). This examination was carried out to evaluate the response function of catheter. The correlation coefficients for MTT and VTT were -0.76 and -0.44, respectively.

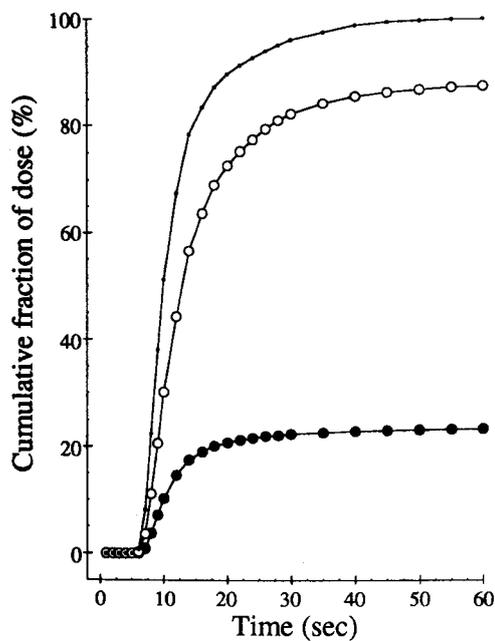


Fig. 1-11. Cumulative outflow profile from the venous catheter. The recovery of EB-albumin being regarded as 100%, their profiles are corrected. The outflow of the substances from the venous catheter, which were administered into the renal artery, were almost finished at 60 sec after the injection. Symbols; EB-albumin (·), inulin (○), *p*-aminohippurate (●).

て実験時の灌流速度から対応する補正値を推定し、deconvolutionによって各種モーメント・パラメータ算出時の補正を行うことにした。

一方、尿サンプル採取用に挿入した輸尿管カテーテルの影響に関する検討も同様に行ったが、血管側とは異なり広い範囲で尿流速を変化させることが技術的に困難であったこと、カテーテルに特定の薬物を吸着する性質が無いこと、また \bar{T}_{cell} 算出の際の減算操作によってカテーテル寄与分は最終的に消去されることを考慮して、各実験でカテーテル長を揃えるにとどめ、特に補正を施すことは行わないことにした。

モーメント・パラメータ算出の際に計算対象とする測定点は、次の基準に基づいて決定した。まず灌流実験における典型的な累積回収率曲線を Fig.1-11に示す。静脈側流出液中の薬物濃度は約5分で測定限界まで低下し、この時点での薬物回収率は投与量の99%以上に達する。このため本来は無限時間までの測定値が要求されるAUC, MTTの算出計算ではあるが、本実験では5分までの値を用いてこれらの計算を行なうことにした。一方尿側データについては、薬物濃度が測定限界以下までに達する時間が実験事例毎に異なるため、全てについて実験時間15分までの測定値を計算対象値として採用し、この時点での計算打ち切りとした。血管側並びに尿管側いずれの場合も、これ以降の外挿計算は測定値に含まれる誤差の影響が無視できなくなるため行なわなかった。

薬物タンパク結合率並びに実験期間中の薬物腎代謝も、実験結果の解釈に大きな影響を与える要因となり得る。本実験では解析対象とした2つのモデル薬物に関し次のように扱った。TEAの場合は文献報告⁴¹⁾より腎代謝は起こらないものとした。一方PAHについては高速液体クロマトグラフを用いた測定の結果、尿中排泄分について投与量の5%程度の代謝を認めたが、実験誤差との比較で無視できるものと判断した。また灌流液中でのタンパク結合率は、薬物濃度0.1mMの条件でTEAは2%未満、PAHでは約13%であった。従ってPAHの場合についてのみ補正計算を行なった。

改めてPAH並びにTEA実験で得られる典型的な流出曲線を示し (Fig.1-12: 再掲)、Table 1-1にマーカ物質の回収率と静脈内及び管腔内平均通過時間、並びに実験条件を挙げた。各有機イオン性モデル薬物の流出曲線に対するモーメント解析の結果、有機カチオンTEAと有機アニオンPAHの血管側での灌流液中からの除去率はそれぞれ投与量の約63%及び約66%であり、また薬物と腎組織の血管側と管腔側との相互作用を、MTTv RatioとMTTu Ratioとを用いて比較した結果、どちらのモデル薬物においても血管側の方が大きい値であった。また血管から上皮細胞内へ取

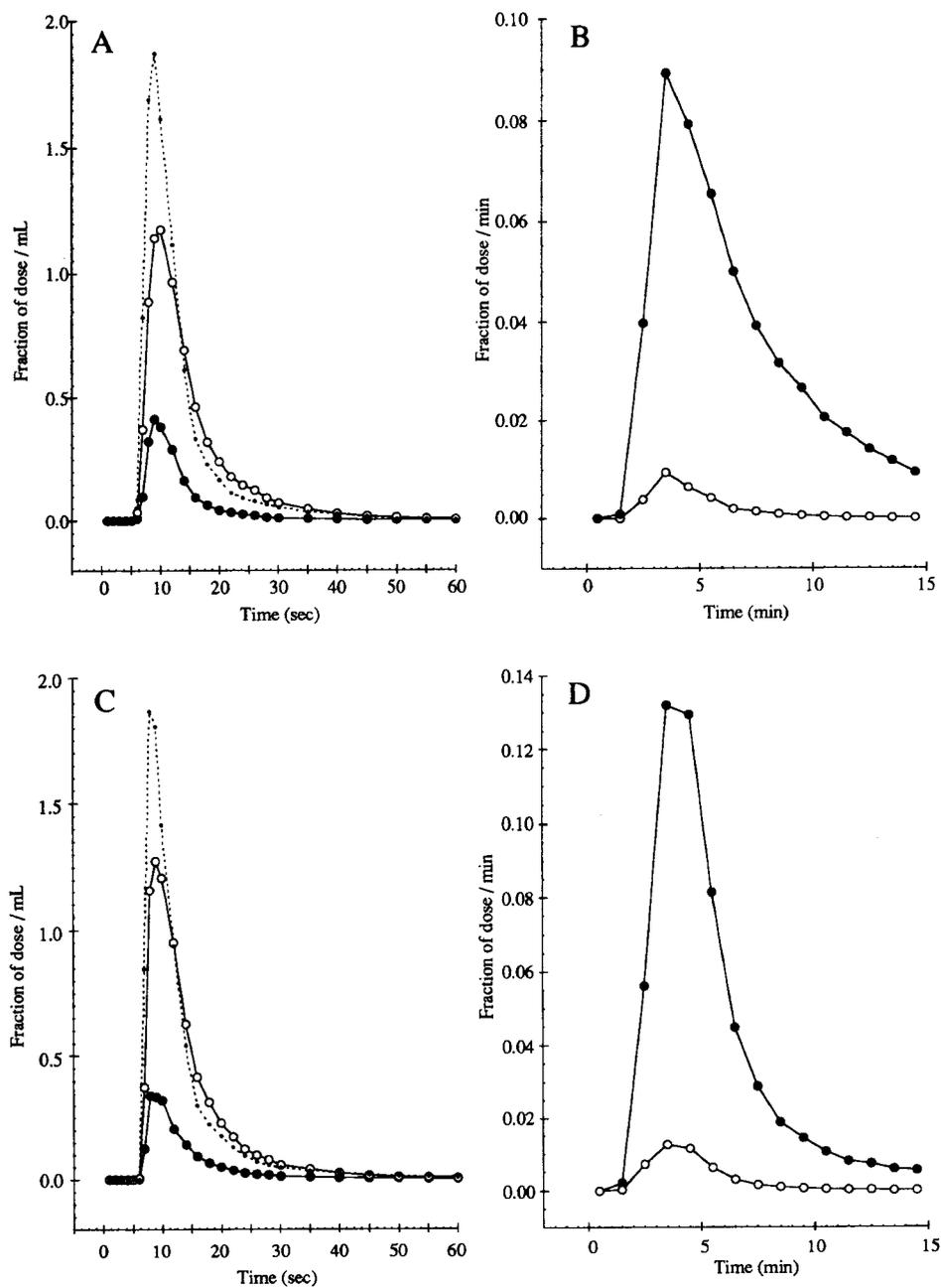


Fig. 1-12. Typical outflow profiles of typical ionized model compounds, tetraethylammonium (panel A and B) and *p*-aminohippurate (panel C and D). For the convenience of readers, the same outflow profiles as those in Fig.1-5 are displayed again. See the legend of Fig. 1-5.

り込まれた薬物が細胞内を通過して管腔内へ分泌されるまでの時間、即ち上皮細胞平均通過時間 \bar{T}_{cell} は、TEAで約 77 秒、PAHで約 48 秒と計算された。

Table 1-1 Parameters representing the renal handling of two typical model substances in the bolus administration study. These recovery ratios were corrected, inulin being regarded that it was recovered completely from venous and urinary outflow, and kidney. TEA and PAH were dissolved into the injection solution at the concentration of 1mM and 0.1mM, respectively. The venous and urinary outflow were expressed as plasma and urine, respectively.

	Tetraethylammonium		<i>p</i> -Aminohippurate	
Drug Recovery (%)				
Plasma	35.42	± 4.35	32.57	± 4.40
Urine	38.74	± 10.21	49.01	± 5.76
Inulin Recovery (%)				
Plasma	95.21	± 0.60	95.49	± 0.65
Urine	3.51	± 0.49	3.84	± 0.59
Availability	0.37	± 0.04	0.34	± 0.04
Distribution volume (mL)				
EB-albumin	0.70	± 0.04	0.76	± 0.04
Inulin	0.97	± 0.07	0.97	± 0.03
MTTv Ratio	2.27	± 0.56	1.57	± 0.07
MTTu Ratio	1.17	± 0.06	1.16	± 0.08
\bar{T}_{cell} (sec)	76.5	± 9.6	48.4	± 13.8

2-b 考察

以上、摘出灌流腎実験より得られる流出曲線にモーメント解析法を適用し、マーカ物質の挙動に基づいて薬物の流出曲線からそれぞれのモーメント・パラメータを算出することによって、モデル非依存的に薬物の腎挙動を定量的に解析できることを示してきた。即ち、典型的な有機イオン性モデル薬物である PAH, TEA の流出曲線をこの手法で解析し、腎上皮細胞との相互作用の大小を示す MTTv Ratio と MTTu Ratio、並びに薬物分泌の際の経細胞輸送に要する時間である上皮細胞平均通過時間 \bar{T}_{cell} を算出した。

今回得られた数値の幾つかと、これに相当し既にインビボ系で報告がなされている数値⁴²⁾との比較を行なうと、マーカ物質の分布容積は若干小さな値を示す傾向にあり、一方 PAH の上皮細胞平均通過時間は大きく算出される傾向にあった。こ

これは本実験系と実験・測定手法が異なることに加え、灌流液組成や酸素供給能といった摘出灌流腎を取り巻く環境が、まだ完全なものではないことが影響しているものと考えられる。生体の恒常性維持機構から切り離された臓器の生理機能を完全に保つための研究は、臓器移植や人工臓器開発のための基礎的研究として非常に興味深い分野ではあるが、本研究の目的とその性質が異なるため腎機能維持に関する更なる検討は次の機会に託すことにする。

本章で行ったモーメント解析法による動態解析に関しても、これをより精密なものにしていくためには、更に検討を重ねていくべき点が存在することは事実である。例えば今回 $\bar{T}cell$ として定義した数値は上皮細胞が管腔内へ薬物を分泌する過程を強く反映するパラメータであり、そして各種の知見を考慮すると、この薬物分泌過程とは尿細管刷子縁膜に存在する担体の薬物輸送能を示すと考えられる。しかし本来薬物分泌は、血管側から取り込まれた薬物が細胞内で側底膜から解離する過程、細胞内を薬物が拡散していく過程、更に尿中へ分泌されるために薬物分子が管腔側刷子縁膜の輸送系に捕えられる過程等々、幾つかの速度過程の積み重なりであることも明らかである。残念ながらこれらの微過程のひとつひとつを検証し考察していくことを考えた場合、Fig.1-7 に示した diagram は精密なものであるとは必ずしも言い難く、また今回は簡略化のため無視せざるを得なかった応答関数も、本来は考慮すべきものであることはいうまでもない。また灌流実験系自体の更なる改良の必要性も先に述べたとおりである。従って本実験で得られた各パラメータの意味を解釈する際には、実験条件やマーカ物質の挙動に加え、他の各種実験系による従来からの知見をも十分に踏まえることによって上記の点を補うことが必要である。

しかし本灌流実験系は、解剖学的及び生理的性質を維持した腎臓における薬物挙動の解析を細胞レベルで行うに適した種々の利点を有する。即ち、本実験系では灌流圧や灌流速、更にはこれらを介して尿流速をも調節することができ、これにより安定な腎の状態をある程度自由に設定することが可能である。更にインビボ系の血液に相当する灌流液組成の管理・変更が容易であり、腎動脈中の薬物やタンパク質濃度を任意の値で一定に保つこと等、実際には困難である条件設定も容易である。くわえてモデル非依存的な解析法であるモーメント法を用いたことによって、構築した動態モデルと腎組織構造の不一致に煩わされることなく、薬物挙動を詳細に解析できるようになった。このように本摘出腎灌流実験系は、薬物体内挙動に果たす腎臓の役割を探るうえで有用な手段である。

第II章 有機イオン性薬物の輸送機構の解析

3万種を優に越える医薬品が現在本邦において使用されていることに示されているように、現代医療によって成し遂げられた疾病治癒率の向上は、このような目覚ましい医薬品開発によって支えられてきた。各種疾患治療のために開発された数々の医薬品はそれぞれが独特の分子構造を有してはいるが、繁用される降圧剤・抗生物質・解熱鎮痛剤などを取り上げただけでも、その多くは体循環血液中で正または負の電荷を帯びて存在するため、これらの体内動態は基本的に有機イオン性物質の挙動として考えることができる。

さて、医薬品の有効性は、血液中の薬物濃度推移によって強く支配されることが示されており、この濃度推移に大きな影響を与える臓器のひとつが腎臓である。これは心拍出量の約20%にも及ぶ大量の腎血流量が、糸球体における薬物の非特異的な尿中排泄をより効果的なものに加えて、尿細管上皮細胞に存在する比較的基質特異性が低い能動輸送機構によって、このイオン化した薬物分子が認識されるため、効率的な尿細管分泌の経路がその体外排泄に大きく寄与するからである^{8,43,44})。このため従来より、医薬品の効果的な臨床使用を考える上で薬物の腎挙動を把握することの重要性が認識されてその解析が積極的に行われており、特に培養上皮細胞系や単離膜小胞系に代表されるミクロの系を中心とした研究は、近年の分子生物学的技術の著しい展開と相俟って近位尿細管における薬物能動輸送に関する幾多の知見を見出している。しかし、これらはともすれば限定された実験条件下での知見となる可能性も少なくはなく¹⁰)、また、実際これが、インビボにおける薬物腎排泄過程、更には体循環血中濃度推移にどの程度関与しているのかについて、その評価を行なうことは容易ではない。なぜならば、既に述べてきたように、腎組織は極めて複雑不均一な構造であることに加えて、薬物腎挙動は薬物分子とネフロン各分節との相互作用が積み重なった結果として生じているからである。

第I章において著者は、生理機能ならびに構造上の特徴を保持したまま臓器レベルでの薬物動態を解析できる摘出腎灌流系を確立し、そしてこの灌流腎で、有機イオン性モデル薬物が血管側から管腔側へ実際に輸送され尿中へと排泄されることを確認した。そこで本章では、各種条件下における有機イオン性薬物の臓器レベ

ルでの挙動を詳細に検討することによって、腎上皮細胞の薬物輸送特性を明らかにするとともに、この特性を *in vivo* 及び *in vitro* 双方の知見を考慮して総合的に解釈する。

第1節 有機イオン性薬物の腎挙動特性

1-a 薬物排泄動態の用量依存的変化

有機イオン性薬物のように電荷を帯び極性を持った物質は、リン脂質二重層からなる細胞膜を単純拡散によって通過することは困難である。このため薬物分子の血管側から尿細管内への分泌過程に何等かの輸送機構が介在していることは十分に考えられる。従ってまず薬物の尿中への排泄過程が飽和性を有することを示すことによって、薬物輸送機構の存在を確認することにした。

まず、モデル薬物として用いる有機カチオン TEA と有機アニオン PAH をそれぞれ各種濃度で溶解した投与溶液を調製し、急速投与実験を行った。そしてこの際に得られる各種薬物の静脈側並びに尿管側流出曲線をモーメント法により解析し、静脈側流出液中の薬物の回収率と挙動特性値 MTT Ratio、並びに上皮細胞平均通過時間 \bar{T}_{cell} を算出した。その結果を Table 2-1 に示す^{注1)}。TEA, PAH それぞれの静脈側回収率は投与量の増加にともなっても増加し、そしてこれに呼応した MTTv Ratio の減少がみられた。また \bar{T}_{cell} にも濃度依存的変化が認められた。

これら各パラメータの変化要因を順に推察していくと、まず静脈側での薬物回収量の増加は、静脈内つまり上皮細胞側底膜側に大量の薬物が送り込まれたことによって側底膜における薬物取り込み能が飽和し、通常で薬物を処理することが不可能になったことに起因すると考えられる。この飽和現象は MTTv Ratio の値が小さくなるといった変化にも反映されている。即ち MTTv Ratio の減少は投与量の増加にともなって個々の薬物分子と輸送系との接触の機会が少なくなったため、相互作用つまり薬物分子と細胞膜の輸送系との結合・解離プロセスの繰り返しが減少した結果であると考えられる。あるいは一度取り込まれた薬物が上皮細胞

注1) 本論文においては、特に記述が無い限り、* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$, **** $p < 0.001$ を用いて統計的有意差が認められていることを表した。

Table 2-1 Parameters calculated with the moment analysis. The data in the left column for each compound were used as control value in statistical analysis.

	Tetraethylammonium		
	1 mM	3 mM	10 mM
Recovery Ratio (%)			
Plasma	35.42 ± 4.35	50.58 ± 6.88	70.95
Urine	38.74 ± 10.21	28.82 ± 7.74	17.23
MTTv Ratio	2.27 ± 0.56	1.67 ± 0.11	1.29
\bar{T}_{cell} (sec)	76.5 ± 9.6	171.8 ± 21.8*	111.8
	<i>p</i> -Aminohippurate		
	0.1 mM	1 mM	10 mM
Recovery Ratio (%)			
Plasma	32.57 ± 4.40	37.51	62.97 ± 4.01**
Urine	49.01 ± 5.76	48.47	28.26 ± 3.72**
MTTv Ratio	1.57 ± 0.07	1.55	1.08 ± 0.01***
\bar{T}_{cell} (sec)	48.4 ± 13.8	65.6	84.1 ± 8.4

内で貯留する時間が短縮した可能性もこの原因として考えられるが、この場合有機イオン性薬物の細胞膜透過プロセスが極めて迅速であって、且つ実験濃度範囲でこの透過が飽和しないことが前提であり、今回の場合あまり妥当ではない。先の値に加え、上皮細胞平均通過時間 \bar{T}_{cell} の値にも用量依存的な増加傾向が認められた。これは、上皮細胞刷子縁膜における薬物分泌過程、即ち細胞内から尿細管腔内へ薬物を輸送するプロセスに、飽和性を有する機構が臓器レベルにおいても介在していることを示すものである。

投与量増加にともなう各パラメータの増加・減少の方向性は同じであったが、両薬物間での比較において、変化の変動幅は TEA の方が大きくなる傾向にあった。このことから腎上皮細胞における TEA の輸送は、血管側の取り込み過程と管腔側の分泌過程、いずれにおいても PAH の場合より濃度の影響を受け易いものと思われる。

さて、上述の急速投与実験において、腎臓での有機イオンの輸送系が血管側

と管腔側の双方に存在すること、更にその輸送過程に飽和性があることを確認した。しかし急速投与法を用いた今回の非平衡実験系においては、投与直後に薬物の灌流液による希釈がおこるため、血管内薬物濃度の急激な変化が生じ、これにともなうて、薬物とタンパク質や細胞内成分との結合、細胞内における薬物の分布形態が動的変化を起こしていることが十分に考えられる。また生体に適用された薬物と腎臓組織との接触状態は多くの場合、急速投与の際にみられるような血中濃度の急激な変化をとまなうものではない。このため先に得られた薬物腎挙動に関する知見を確かめる意味で、また非平衡条件では捕えられなかった挙動特性を探る意味で、次に定常条件、即ち予め灌流液中に薬物を溶存させた条件で急速投与実験を行ない、薬物の腎挙動を検討した。

定常条件における薬物腎挙動パラメータを Table 2-2 に示し、またこれを非平

Table 2-2 Parameters calculated with the moment analysis under the steady state conditions. The values of the concentration, at which the compound was dissolved in the perfusate, were described under the name of the model compound. The concentration of the drug in the injection solution was the same as that in the perfusate. The data in the left column for each compound were used as control value in statistical analysis.

	Tetraethylammonium			
	0.03 mM	0.1 mM	0.3 mM	1 mM
Recovery Ratio (%)				
Plasma	32.21	35.42 ± 4.35	68.05	89.30
Urine	50.18	38.74 ± 10.21	26.08	8.63
MTTv Ratio				
\bar{T}_{cell} (sec)	4.42	2.27 ± 0.56	2.30	1.56
\bar{T}_{cell} (sec)				
	95.6	76.5 ± 9.6	41.6	-0.5
	<i>p</i> -Aminohippurate			
	0.01 mM	0.1 mM	1 mM	
Recovery Ratio (%)				
Plasma	38.72 ± 1.77	52.68 ± 7.09	84.70 ± 0.56****	
Urine	49.79 ± 9.08	37.94 ± 7.26	13.11 ± 1.15*	
MTTv Ratio				
\bar{T}_{cell} (sec)	1.61 ± 0.07	2.40 ± 0.15*	2.19 ± 0.05*	
\bar{T}_{cell} (sec)				
	84.3 ± 6.5	93.3 ± 12.9	50.9 ± 9.8	

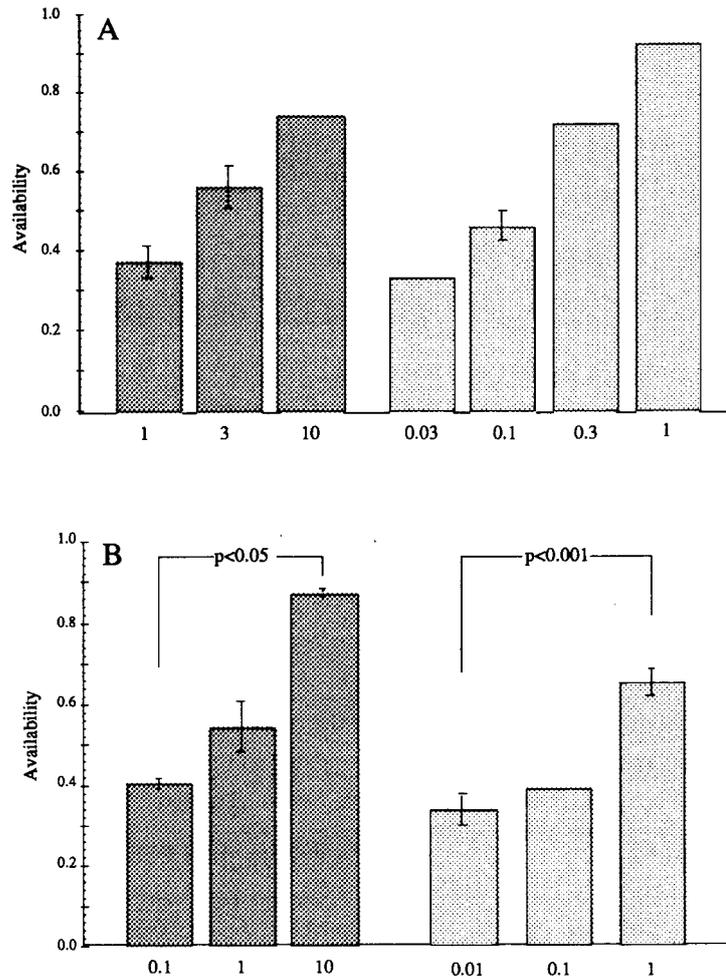


Fig. 2-1. Dose-dependent extraction of tetraethylammonium (panel A) and *p*-aminohippurate (panel B) from the perfusate by renal epithelia. The data obtained from the bolus administration study were shown with dark gray and those from the steady-state study were indicated with light gray hatched column. The value under the column is the concentration (mM) at which the drug was dissolved in the injection solution, and in the perfusate in the steady-state study. The availability was given by subtracting the extraction ratio from the unity.

平衡条件と定常条件とで比較した結果を Fig.2-1, 2-2, 2-3 にそれぞれ示す。急速投与条件で認められた両薬物の静脈側回収率の用量依存性は、定常条件下においても再確認することができた。(Fig.2-1)

有機カチオン TEA の腎血管内挙動特性を示す MTTv Ratio は、定常条件においても非平衡条件同様に、投与液中の薬物濃度増加にともなって減少する傾向にあ

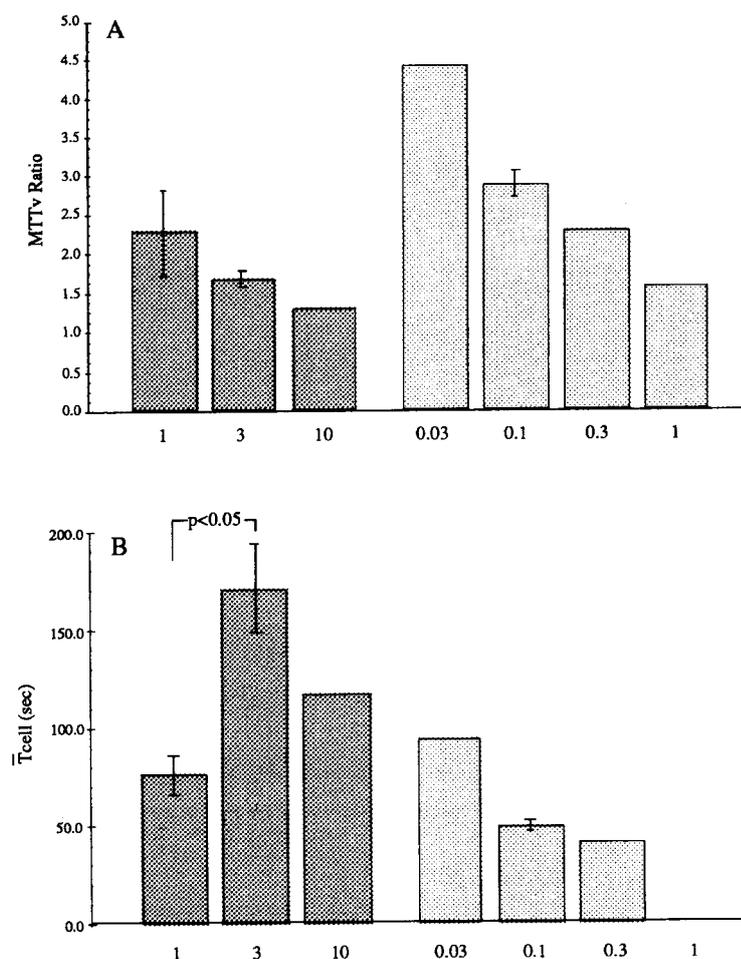


Fig. 2-2. MTTv Ratio (panel A) and \bar{T}_{cell} (panel B) of tetraethylammonium obtained from the bolus administration study (dark gray) and the steady-state study (light gray). The values under the column mean the same as those in Fig. 2-1. \bar{T}_{cell} obtained from the 1mM steady-state experiments was nearly equal to zero.

り、血管側からの取り込み機構の飽和性がここでも示された(Fig.2-2A)。しかしながら定常条件での \bar{T}_{cell} は、非平衡時に認められたような投与量増加にともなう延長を示さず、各投与量間で一定、若しくは、非平衡時とは逆に濃度増加に従って減少する傾向にあることが認められた(Fig.2-2B)。一方の有機アニオンPAHの場合には、定常条件においては高濃度ほど MTTv Ratio が大きくなる傾向を示したが、各パラメータともに明確な濃度依存性を示すには至らなかった(Fig.2-3)。このような TEA と PAH の腎挙動の違いは、各薬物分子固有の親水性・疎水性や電荷といった性質の違い、更には両薬物移行がそれぞれ異なった機構により行われていることに起因すると考えられる。

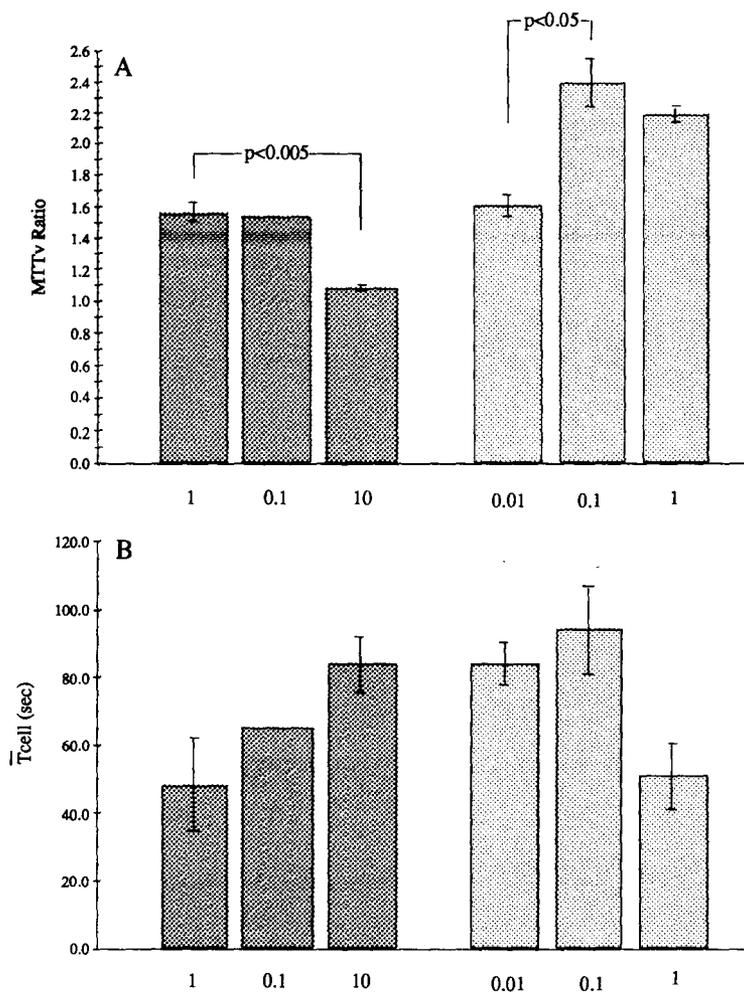


Fig. 2-3. MTTv Ratio (panel A) and \bar{T}_{cell} (panel B) of *p*-aminohippurate obtained from the bolus administration study (dark gray) and the steady-state study (light gray). The values under the column mean the same as those in Fig. 2-1.

定常条件における TEA の \bar{T}_{cell} の変化に、非平衡条件でのそれとは異なる濃度依存性が観察されたことから、TEAの腎排泄挙動を評価・検討していく場合には、血管内から上皮細胞への薬物の取り込み過程以降に存在する細胞内での薬物の移動プロセスについても、十分な考察を行なうことが要求されよう。特に薬物分子が分泌を受ける際に血液側から管腔側へ経細胞的に移動するプロセスは、単純拡散として捉えるのではなく、薬物分子が細胞内成分と数々の相互作用を起こしながら運搬されるプロセスであると把握する必要がある。濃度増加にともなう \bar{T}_{cell} の延長が、定常条件で認められなかったことに対する明確な説明を行うためには、更に薬物の腎における排泄挙動をより詳細に検討しなければならないが、これに対するひとつ

の作業仮説として次のような理由を考えることができる。定常条件においては、平衡期間中に灌流液中の非標識薬物によって細胞内の相互作用部位がマスクされるような現象が起きるのであろう。このため、平衡期間終了後に急速投与された標識薬物は、生体成分との相互作用が小さくなるために比較的容易に細胞内を通過できるようになる。そして灌流液中薬物濃度の増加にともなってより十分なマスクングが起こるために、細胞内での薬物の易移動性が増加して、刷子縁膜での薬物輸送の飽和性が相殺される。このため管腔側での薬物輸送能の変化が \bar{T}_{cell} の変化に反映され難くなっているのではないだろうか。

一方、非平衡実験では \bar{T}_{cell} の用量依存的増加が認められている。このことを考慮すると、細胞内でのマスクングプロセスは比較的速いプロセスであろう。つまり非平衡条件の場合、薬物分子が急速投与されてから上皮細胞内を移動して刷子縁膜に到達するまでに要する時間は、細胞内でこれらの薬物分子が十分にマスクングを起こすためには短い時間であるため、刷子縁膜上の輸送過程における飽和現象が \bar{T}_{cell} の変化として直接反映されたものと思われる。いずれにせよ、薬物分子と細胞内成分との相互作用は、薬物の経細胞輸送を更に詳細に解析していく場合には、十分に評価されなければならない因子であると考えられる。

単離膜小胞あるいは培養上皮細胞を用いた実験系より、近位尿細管上皮細胞の血管側側底膜及び管腔側刷子縁膜には有機イオンの輸送系が存在することが示されている^{69,104,5,46)}。本実験では有機イオン性モデル薬物の腎挙動を灌流実験系で解析することによって、血管側での薬物取り込み過程に加え、管腔側での分泌過程にも飽和性が存在することを腎の臓器レベルで示し、そしてこれら血管側・管腔側の両過程が、ともに単純拡散によるプロセスではなく、輸送系を介するものであることを確認した。またこれら一連の検討は、ミクロな系からの報告を臓器レベルでの薬物挙動の解析をとおして検証したものであるといえよう。

1-b 尿細管腔内 pH の変動と薬物腎挙動の変化

近位尿細管上皮細胞は、数多くの生体成分を能動的に輸送する機構を有しており、ナトリウム勾配や膜電位更には ATP の加水分解エネルギーをその駆動力とすることによって、濃度勾配に逆らった物質輸送を行っている⁴⁷⁻⁵¹⁾。上皮細胞の有機イオン性薬物の分泌過程に関しては、単離膜小胞及び培養上皮細胞を用いた研究が

進められて、TEA に代表される有機カチオンの上皮細胞刷子縁膜における輸送は、上皮細胞・管腔間の水素イオンの濃度勾配を駆動力とする能動輸送であること、他方 PAH に代表される有機アニオン性薬物の輸送は、主に膜電位依存的な輸送であることが示されている⁵²⁻⁵⁴)。しかしながら薬物の体内挙動並びに腎排泄とこれらの輸送機構との関係についての直接的な検討例は少なく、*in vitro* 実験系と生体内環境との相違が懸念されるところである。そこで著者は摘出腎灌流実験系を用いて腎における有機イオン性薬物の輸送特性を検討し、特に有機カチオンの尿中排泄において、その水素イオン濃度勾配を駆動力とする輸送系が腎の臓器レベルで如何に機能しているのか明らかにすることにした。

摘出腎灌流実験系の特徴のひとつに腎の生理機能を損なうことなく多様な実験条件を設定できることが挙げられる。そこで本実験では灌流液に炭酸水素ナトリウム NaHCO_3 またはリン酸水素ナトリウム NaH_2PO_4 を添加することによって、通常よりアルカリ性あるいは酸性 pH を示す尿が生成される実験条件を設定し、この条件下で TEA と PAH の両モデル薬物の腎排泄挙動を検討した。上記の NaHCO_3 並びに NaH_2PO_4 の添加量は、灌流液自身の pH が変化することを避けるため、灌流液の緩衝能が働く範囲に設定した。また一般に腎皮質細胞内の pH は血液の pH に連動して調節されることが報告されており^{54,56})、このため細胞内 pH は酸・アルカリ添加の有無にかかわらず、どの条件においても一定であると考えられる。仮に薬物の挙動に影響を及ぼすような上皮細胞や腎組織構造の非特異的な変化が起きた場合は、常に同時投与されているマーカ物質の挙動変化によってこれを把握することができる。

生理条件における近位尿細管腔内の pH 値即ち水素イオン濃度には、近位尿細管での Na^+ / H^+ 交換輸送系や H^+ -ATPase による H^+ の分泌、並びに重炭酸イオン HCO_3^- の再吸収が関係している (Fig.2-4)^{57,58})。しかし近位尿細管で分泌された H^+ は、糸球体濾過によってもたらされる HCO_3^- と反応して H_2CO_3 を生成することで消費されてしまう。この生成した H_2CO_3 は炭酸脱水酵素の作用で CO_2 へと分解され、次いで上皮細胞内への受動拡散を経て最終的に HCO_3^- として再吸収される。従って、管腔内 pH は事実上 HCO_3^- の再吸収によって支配されている。ちなみに Henderson-Hasselbalch の式、

$$\text{pH} = 6.1 + \log \frac{[\text{HCO}_3^-]}{[\text{H}_2\text{CO}_3]}$$

を用いることによって、尿 pH は管腔内の HCO_3^- 濃度と関係付けられる^{59,60})。

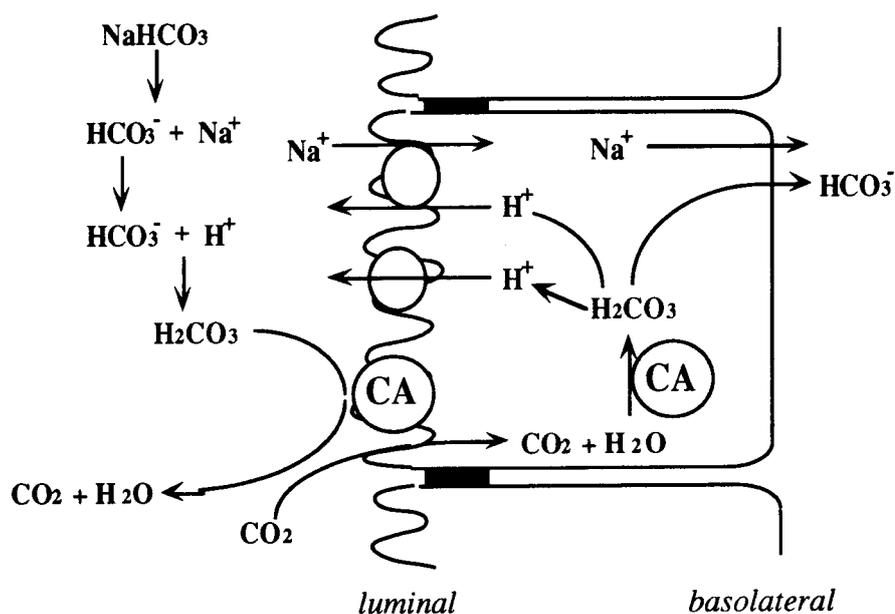


Fig. 2-4. Illustration of the reabsorption of bicarbonate by the renal proximal epithelia. Carbonic anhydrase (CA) on the brush border membrane converts carbonic acid into water and carbon dioxide. This carbon dioxide diffuses into the cell where it were converted into carbonic acid again by another CA located in the cytosol. Then bicarbonate from the carbonic acid goes back into blood. Consequently, one bicarbonate was absorbed.

灌流液への炭酸水素ナトリウム NaHCO_3 の添加は、糸球体濾液中の HCO_3^- 濃度を増加させ管腔内の pH を上昇させる。先にも述べたが、このような場合においても上皮細胞内 pH は血液側 pH を基準に調節されるため変化しない。この結果、本摘出灌流腎において上皮細胞刷子縁膜でのプロトン勾配が減少した実験条件が設定される。一方リン酸水素ナトリウム NaH_2PO_4 が添加された場合、糸球体濾液中の H^+ が通常より増加するため、管腔内でより多くの H_2CO_3 が生成し、上記 pH 算出式の分母が大きくなって尿 pH 値は低下する。これは NaHCO_3 添加の場合とは逆に、プロトン勾配が増加する実験条件となる。

薬物挙動の解析は前節に準じて行った。しかしながら前節において、平衡と非平衡条件とで薬物の細胞内の挙動が異なることが示されているため、解析の際の非平衡要因を取り除くことを考慮して、灌流液中薬物濃度を 0.1mM に設定した定常条件で検討を行なった。また灌流腎において尿細管近位部の pH を直接測定することは困難であるため、カテーテルから採取直後の尿 pH が管腔内の pH をある程度反映するものと考え、以下の結果はこの測定 pH 値を用いて表示した。

Table 2-3 Parameters confirming the experimental conditions in which the effects of urine pH on the renal handling of the typical ionized compounds were investigated. There are no significant differences from the control, except the value of urine pH. Glomerular filtration rate (GFR) was estimated from the creatinine clearance, and plasma flow rate (PFR) was calculated from the perfusate flow rate and the hematocrit.

	Control	Urine pH	
		Alkalinization	Acidification
Parameters of inulin's			
Recovery Ratio (%)			
Plasma	95.86 ± 0.17	95.64 ± 0.93	95.04 ± 1.05
Urine	3.90 ± 0.27	14.12 ± 0.91	4.75 ± 1.04
Distribution volume (mL)	1.08 ± 0.09	1.04 ± 0.10	1.06 ± 0.15
GFR (mL/min)	0.31 ± 0.06	0.31 ± 0.07	0.38 ± 0.07
PFR (mL/min)	4.08 ± 0.39	4.14 ± 0.19	4.03 ± 0.25
Urine pH	6.4	7.1*	6.0*

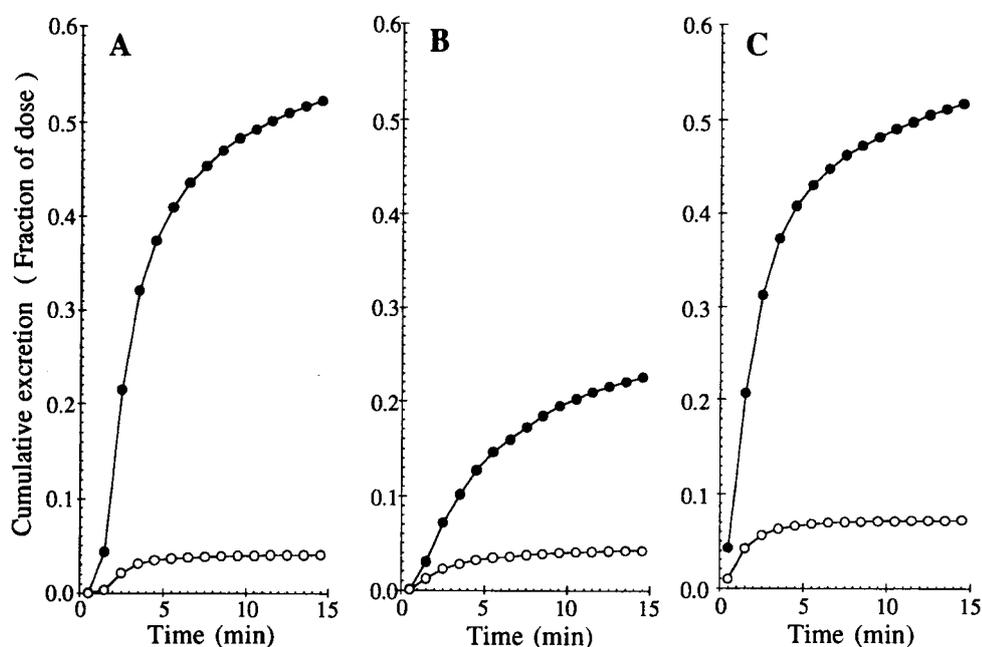


Fig. 2-5. Typical cumulative excretion profile of tetraethylammonium under the conditions in normal urine pH (panel A), urine alkalinization (panel B), and urine acidification (panel C). The excretion of tetraethylammonium, whose profile was indicated by ●, was decreased in urine alkalinization. On the contrary, the excretion of inulin (○) was not affected under any conditions.

最初に各実験群の腎機能並びにマーカ物質の挙動パラメータを Table 2-3 に示す。このように実験群間で尿 pH 以外に差は認められなかった。

本実験で得られた典型的な TEA の尿中累積排泄曲線を Fig.2-5 に示し、また TEA, PAH 両薬物の腎挙動パラメータの変化を Fig.2-6 に示す。PAH の腎排泄挙動を示す各パラメータは尿 pH 変化の影響を受けず、コントロール群と同程度の値であった。しかし TEA の尿細管分泌は、尿 pH 上昇群即ちプロトン勾配の減少群で強く抑制を受けることが明らかとなった。これらの結果は、PAH に代表される有機アニオンの腎排泄は、刷子縁膜におけるプロトン勾配の大小に影響を受けない機構で行われているのに対し、有機カチオンである TEA の輸送にはそのプロトン勾配に強く依存した輸送機構が深く係わっていることを意味している。

TEA の各パラメータの変化をみると、静脈側の挙動特性値 MTTv Ratio の変化は認められないが、細胞内平均通過時間 \bar{T}_{cell} には大きな変化が現れている。従って、TEA の尿中排泄量の減少は上皮細胞の管腔側における輸送が抑制されたためであると考えられ、これは取りも直さず上皮細胞と管腔間のプロトン勾配が減少した結果、これを駆動力としている刷子縁膜の有機カチオン輸送機構が阻害されたことに他ならない。

ではその駆動力となるプロトン勾配を増加させた場合つまり尿 pH 酸性化群において、TEA の輸送特性はどのように変化しただろうか。予想に反して、酸性化条件での TEA 輸送特性にコントロール群との差異は認められなかった。この原因として次の2つが挙げられる。第1は、膜小胞実験系より報告されている薬物輸送における至適プロトン勾配値の存在である⁶¹⁾。生理条件下での上皮細胞刷子縁膜におけるプロトン勾配は、既に有機カチオン分泌にとって最適な値となっていることは十分に考えられる。従って生理条件における腎臓での有機カチオンの分泌つまりコントロール群における TEA の排泄は、それ以上増加し得ず、また更なる濃度勾配の負荷はこの至適条件を崩す方向にしか働かない。即ち TEA 分泌の増加はもともと望めない状態にあったと考えられる。第2は、近位における尿酸性化の程度に限界が存在するということである⁵⁹⁾。NaH₂PO₄の添加によって糸球体濾液中の H⁺ 量は確かに HCO₃⁻ より優位になるが、近位尿細管では再吸収された HCO₃⁻ が血管側よりリークしてくることが知られているため⁶²⁾、その優位性はあまり確固としたものではない。また先の Henderson-Hasselbalch 式の分母となる管腔内 H₂CO₃ 濃度も、炭酸脱水酵素の存在のため大きく上昇することはない。くわえて、生理条件下での最終的な

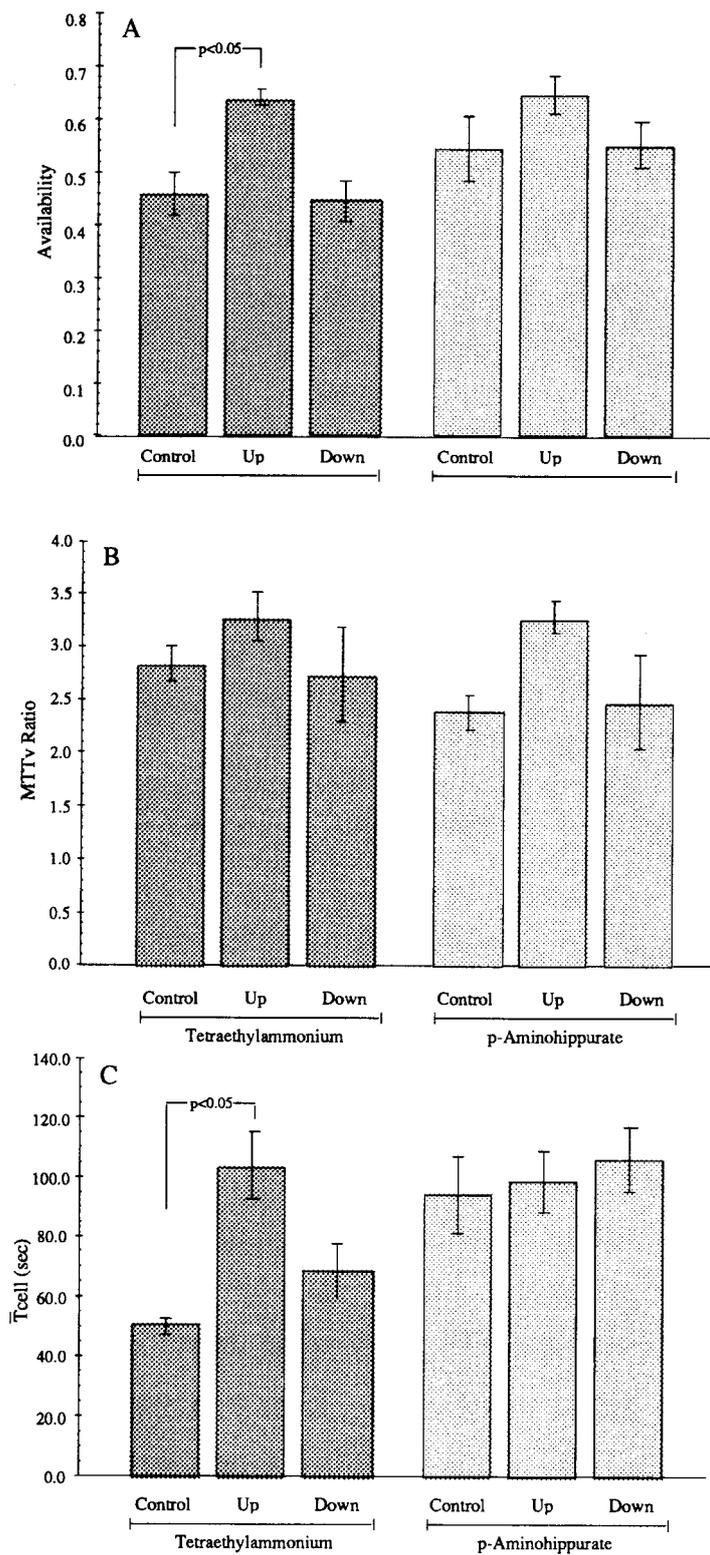


Fig. 2-6. Effects of the alteration of urine pH on the renal handling of tetraethylammonium and *p*-aminohippurate. The conditions where the values of urine pH were normal, increased and decreased were indicated as control, up and down, respectively. These experiments were carried out under the steady state condition in which the drug was dissolved in the perfusate and the injection solution at the concentration of 0.1mM.

尿 pH の決定は集合管のプロトンポンプによる H^+ 分泌が大きく寄与していることが知られている⁶²⁾。従って、 NaH_2PO_4 の添加によって確かに尿 pH の測定値は低下したが、この測定値は近位尿細管の pH を正確に反映するものではなく、近位尿細管でのプロトン勾配はコントロール群と殆ど同じであった可能性を否定できない。もしこのような状況が起きているならば TEA の分泌増加は起こり得ない。

灌流腎実験系を用いて PAH 及び TEA の腎挙動を検討した結果、腎臓における有機カチオン及びアニオンの輸送特性は、特に管腔側の分泌特性に関して異なることが示された。即ち TEA 輸送の解析においてのみ MTTv Ratio の変化をとまわずに $\bar{T}cell$ の延長が認められたことから、腎上皮細胞は、管腔側のプロトン勾配の影響を受けない機構によって有機アニオンを分泌するのに対し、有機カチオンの分泌の際には、このプロトン勾配に強く依存する輸送機構を用いることが明らかとなった(Fig.2-7)。これらの結果は、従来より膜小胞を用いた実験によって報告されている上皮細胞刷子縁膜のプロトン勾配依存性の輸送機構^{50,53,61)}が、生理的条件下での有機カチオンの腎排泄に実際に係わっていることを示したものであり、腎の臓器レベルにおける薬物排泄にとって、このプロトン勾配の増減が大きな影響を与え得る因子であることを、はじめて明らかにしたものである。

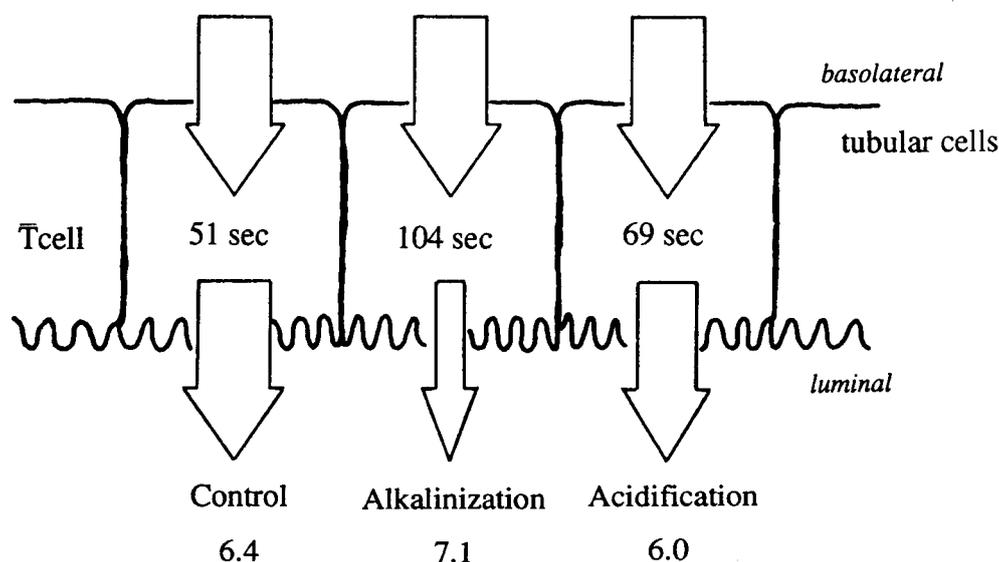


Fig. 2-7. Scheme of conclusion. Under the condition of urine alkalization, the excretion of tetraethylammonium was suppressed, indicating that the proton gradient at the brush border membrane plays an important role in the renal handling of organic cations.

1-c 考察

本節では、薬物の体循環血中濃度推移と腎の薬物輸送特性との関係を詳細に把握するために、まず膜小胞や培養細胞実験系でその挙動が精査されている有機イオン性モデル薬物 TEA 並びに PAH を用いその臓器レベルでの挙動を検討した。そして両モデル薬物が腎において投与量依存的に排泄されることを示し、これらの排泄に何等かの輸送系が関与していること、即ち、血管側における薬物の取り込み過程と細胞から管腔への薬物分泌過程に、飽和性を有する機構が介在していることを臓器レベルで明らかにした。ここで得られた結果は、従来から単離膜小胞その他の実験系で示されていた知見を臓器レベルで実証したものであるとともに、薬物の腎排泄を評価する場合には、その排泄過程が血管内からの取り込み過程並びに細胞から管腔内への分泌過程、更には薬物の細胞内挙動や分布等さまざまな要素のバランスの上で行われていることを、十分に考慮しなければならないことをも意味している。特に細胞内挙動の検討は医薬品の腎貯留性や腎毒性の観点からも重要な項目であると思われるが、いまだ十分には検討されていない。残念ながら本研究では薬物の細胞内挙動について詳しい検討を行うことができなかった。今後各種実験系で詳細な検討がなされることを期待したい。

本節では次いで、上皮細胞刷子縁膜におけるプロトン勾配の変化が TEA, PAH の腎挙動にどのような影響を与えるかについて検討を行った。その結果、有機カチオン TEA の排泄挙動に著しい変化が観察され、この輸送にはプロトン勾配に強く依存する輸送系が関与していることを腎の臓器レベルにおいて明らかにすることができた。しかし残念ながら、有機アニオン PAH の刷子縁膜における輸送や TEA, PAH の血管側での取り込み機構に関しては、積極的な議論を行なうに足る知見を得られず、これらの輸送過程はプロトン勾配には依存しないものであるとする消極的な結論しか導き出せなかった。とはいえ、*in vivo* 系においては従来困難であった細胞レベルでの薬物輸送機構の解析が、このように摘出腎灌流実験系を用いることによってなされたことは評価されよう。

腎臓は体内の酸塩基平衡の調節を担う臓器であり、このため尿細管腔内の水素イオンや重炭酸イオンの濃度は恒常性の維持機能が働くさまざまな条件下で、大きく変動するものである。特にアシドーシス・アルカローシスといった病態条件下では管腔内 pH は当然変化しているであろうし、これにともなってそのプロトン勾配も増減しているであろう。医薬品はこのような病態時に多く投与されるものであり、

そのような状況下で薬物の体内挙動の変化や毒性発現の可能性の予測を行なう場合に、灌流実験系で得られた今回の知見は大きな意味をもつ。ここに示してきたような腎の薬物輸送特性に関する検討を、*in vivo* で行なう場合には相当の困難が予想され、また *in vitro* 実験系で行う場合には、得られた知見を個体レベルでどのように解釈していくかが、かなり難しい問題となる。本実験法は *in vivo* と同等の腎機能を保持しながら上皮細胞レベルでの薬物挙動を把握しようとするものであり、そして実際に生体内における薬物腎挙動を細かく解析するうえで、有用な手法であると考えられる。

第2節 実験的腎障害と有機イオン性薬物排泄能の変化

2-a カチオン排泄能とアニオン排泄能

医薬品の体内挙動に薬物の腎挙動が大きな影響を与えていることはこれまでに繰り返し述べてきた。このような腎挙動の変動要因として医薬品の併用による薬物間相互作用、血液中のタンパク質や各種内因性物質濃度の変化、腎血流量の変動そして病態時の腎機能不全を挙げることができる。腎疾患時における薬物体内動態の変化については既に多くの研究がなされているが、腎上皮細胞の薬物輸送機能の減弱にともなって薬物の腎挙動がどのように変化していくのか詳細に検討した例は少ない。そこで Uranyl Nitrate の投与によって実験的に腎機能を障害した病態モデルラットを作成し、これより構築した灌流腎での薬物挙動を検討することにした。そして腎排泄能の減少にともなう薬物腎挙動の変化に対する解析を行って、腎の薬物輸送特性を把握することを試みた。但し、疾患時には腎の薬理学的な感受性が増加していることが予想されるため⁶³⁾、灌流液への薬物添加を行う定常条件での検討は避け、非平衡条件における解析を行うことにした。

Uranyl Nitrate による腎不全の発症は、血中尿素窒素並びに血清クレアチニン濃度を指標として確認した。Fig.2-8 に示すこれらの指標の変化より、Uranyl Nitrate 投与後24時間以降、腎機能障害が急激に進行することがうかがえる。そこで主に、投与後24時間あるいは72時間経過したラットを用いた摘出灌流腎におけるTEA、PAHの挙動を解析し、病態進行の影響を検討した。

24時間あるいは72時間後における両モデル薬物の典型的な静脈側・尿管

側流出曲線を Fig.2-9, 2-10 に挙げた。ここで明らかなように腎障害進行にともなって糸球体濾過量や尿中薬物排泄量が減少し、また静脈側流出曲線が大きなものになっていくことがわかる。この薬物尿中排泄率の減少について各実験群間で整理したものを Fig.2-11 に示し、また薬物流出曲線からモーメント解析法を用いて算出した MTTv Ratio, \bar{T}_{cell} を、各実験群での灌流速度・糸球体濾過量とあわせて Table 2-4 に示した。先の血液成分の変化において示されていたように、Uranyl Nitrate 処理後 72 時間を経過すると腎の薬物排泄機構は殆ど機能しなくなっている。しかし TEA の尿中回収率の変化を見ると、これは腎不全の兆候がようやく現れ始めた 24 時間経過時において既に有意に低下し始めている。マーカ物質である Inulin の静脈側並びに尿管側回収率や分布容積は、腎機能が高度に傷害されている 72 時間経過群を除いて変化していないことから、24 時間経過時における TEA 輸送の低下は Uranyl Nitrate の影響が腎の組織構造に及んだためではなく、TEA 輸送機構そのものがいち早く影響を受けたためであると考えられる。一方、有機アニオン PAH の排泄能は、24 時間経過時でもあまり低下して影響おらず、腎障害の影響を比較的受けにくい輸送機構であることが示された。

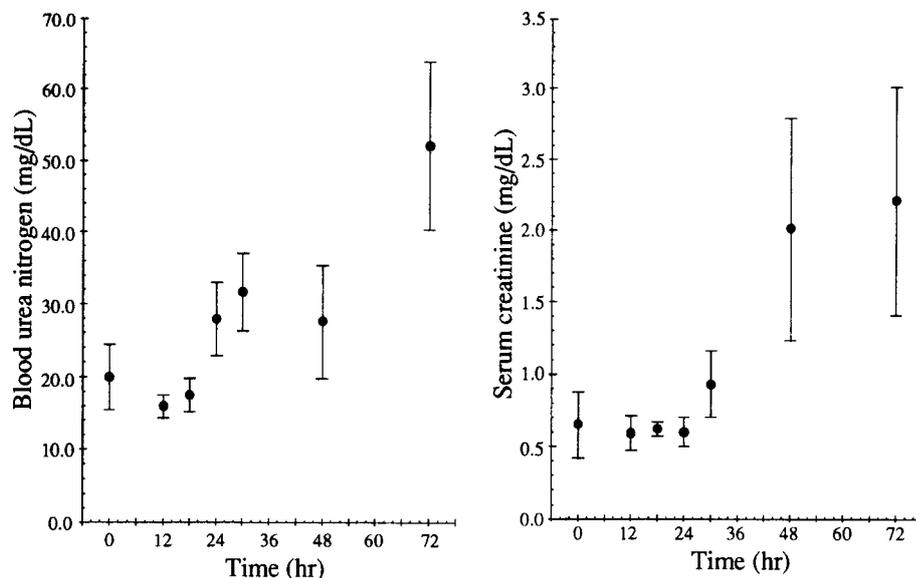


Fig. 2-8. Increasing of the serum concentrations of blood urea nitrogen (panel A) and creatinine (panel B), which are usually referred to evaluate renal functions. The normal levels of these substances were shown at the zero time. The acute renal failure was caused by uranyl nitrate which was administered subcutaneously in rats at the dose of 10mg/kg.

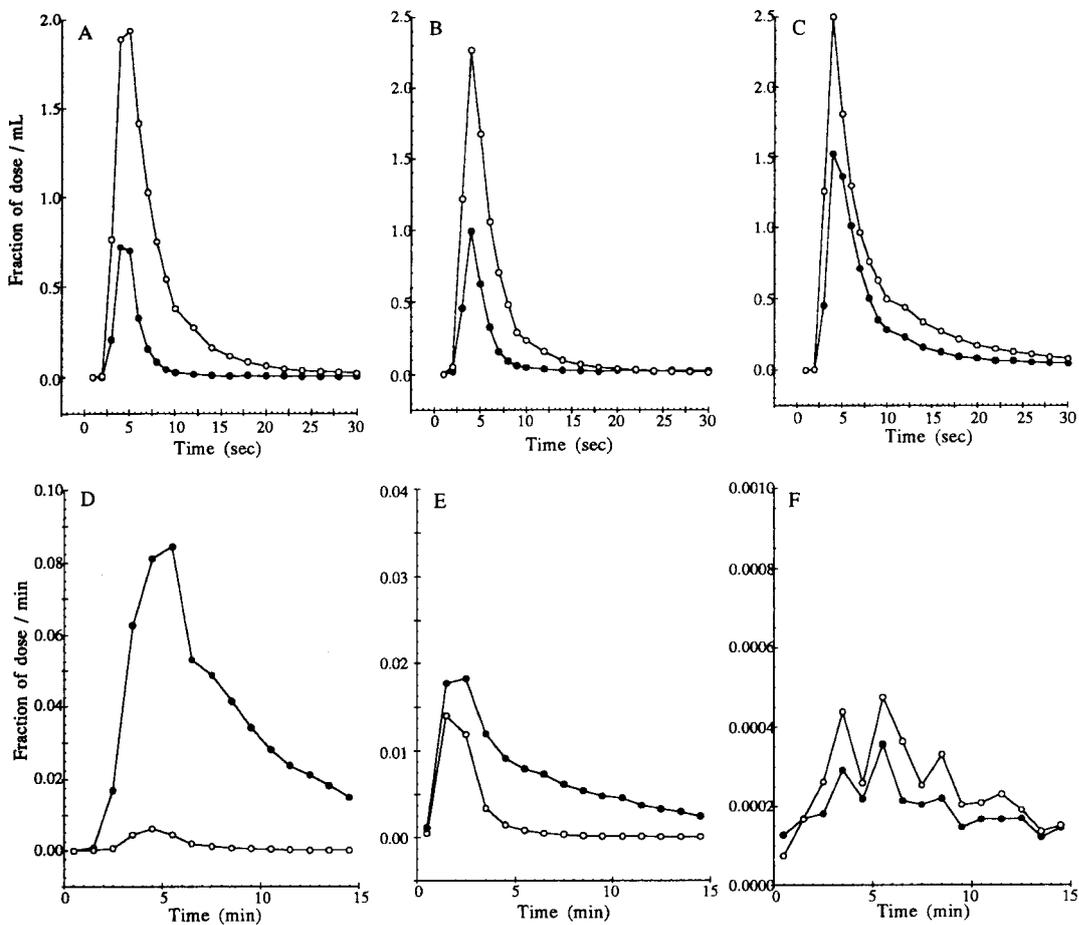


Fig. 2-9. Typical venous (panel A,B,C) and urinary (panel D,E,F) outflow profiles of tetraethylammonium (●) and inulin (○). The control profiles were in panel A and D. The profiles at 24hr and 72hr after the treatment with uranyl nitrate were in panel B and E, and in panel C and F, respectively. To avoid confusion, the venous outflow profile of EB-albumin was omitted. Tetraethylammonium was dissolved in the injection solution at the concentration of 1mM. Since the urinary excretion of the drug was reduced in the acute renal failure, the ordinate of an urinary profile was not in the same digits as that of others.

次に、この腎障害時に認められた臓器レベルにおける薬物挙動の変化を、血管側での薬物取り込みプロセスに生じている変化と、管腔側の分泌プロセスに起きている変化とにそれぞれ分離して把握するために、上皮細胞血管側での薬物取り込み能を反映する値として静脈内での薬物抽出率を用い、また管腔側の薬物分泌能を反映する値としては上皮細胞平均通過時間 \bar{T}_{cell} をそれぞれ用いて、各薬物の腎挙

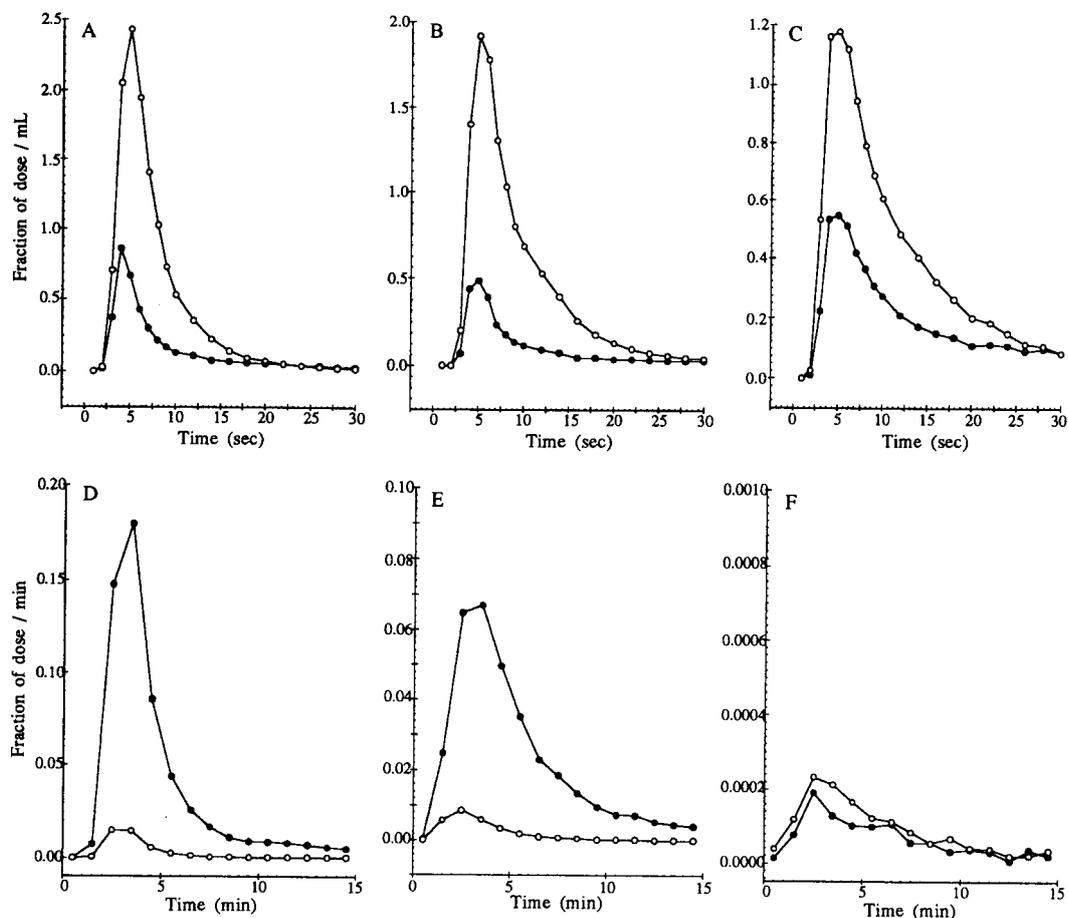


Fig. 2-10. Typical venous (panel A,B,C) and urinary (panel D,E,F) outflow profiles of *p*-aminohippurate (●) and inulin (○). The control profiles were in panel A and D. The profiles at 24hr and 72hr after the treatment with uranyl nitrate were in panel B and E, and in panel C and F, respectively. *p*-Aminohippurate was dissolved in the injection solution at the concentration of 0.1mM. Please note that the ordinate of an urinary profile was not in the same digits as that of others, since the urinary excretion of the drug was inhibited in the acute renal failure.

動を解析した。薬物抽出率は、第 I 章第 2 節 (19 ページ式[38]) で求められる F (Availability) を用いて $1-F$ で示される値である。この両パラメータの関係を TEA, PAH それぞれについて Fig.2-12 示した。

TEA 挙動の場合、静脈内抽出率の減少は \bar{T}_{cell} の増加即ち管腔側刷子縁膜における薬物輸送能の低下をともなって起きていることがわかる。このことは腎機能

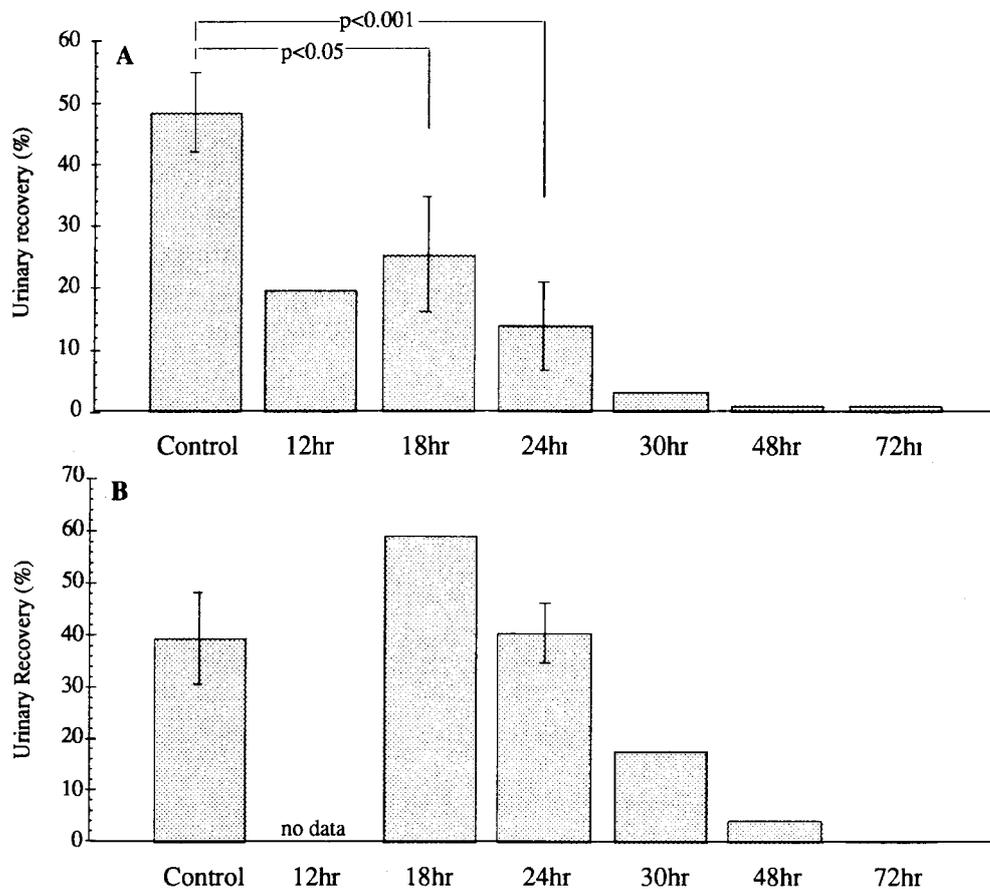


Fig. 2-11. Decreasing of the urinary recovery of tetraethylammonium (panel A) and *p*-aminohippurate (panel B) with worsening of the renal failure. At 72hr after the treatment, the urinary excretion of both drug was almost negligible.

障害の発生により、まず管腔側の分泌機構が機能低下してこれが \bar{T} cell の延長として現れ、次にこの分泌障害のため、血管側から取り込まれた TEA が細胞内に鬱滞して細胞内薬物濃度が上昇し、その結果静脈内と上皮細胞間の薬物濃度勾配あるいは電気化学勾配の減少が起こって、血管側の薬物取り込み能が低下したためであると推察される。Uranyl Nitrate による腎不全発症のメカニズムは、硝酸塩として投与されたこの重金属が近位尿細管上皮へ蓄積し、細胞の活動に必要とされる酵素反応が非特異的に阻害されることによると考えられる。このため本実験条件では近位尿細管上皮細胞の諸機能がほぼ一律に低下しているものと思われる。しかし、それにもかかわらず TEA 輸送における管腔側の薬物輸送系が早期により強く阻害される理由

Table 2-4 Moment parameters on the renal handling of tetraethylammonium (TEA) and *p*-aminohippurate (PAH) in the perfused kidney isolated from uranyl-nitrate induced acute renal failure rat were shown, respectively. Parameters confirming the experimental conditions in which the renal handling of these typical ionized compounds were also indicated. The physiological condition of the kidney from those rats being often unstable, some group have no data. In addition to this, not every item can has been analyzed statistically. Glomerular filtration rate and plasma flow rate were abbreviated as GFR and PFR, respectively.

	Control	12 hr	18 hr	24 hr	30 hr	48 hr	72 hr
TEA							
MTTv Ratio	3.25 ± 0.37	4.94	5.46 ± 0.63*	5.50 ± 0.71**	6.50	3.53	2.60 ± 0.07
\bar{T}_{cell} (sec)	2.02 ± 0.51	4.02	3.85 ± 0.54	4.48 ± 0.59*	4.86	4.47	-----
Inulin Recovery (%)							
Plasma	96.97 ± 0.36	97.24	96.41 ± 0.18	96.5 ± 0.38	97.35	99.06	99.48 ± 0.04****
Urine	2.78 ± 0.31	2.45	3.34 ± 0.20	3.27 ± 0.39	2.51	0.68	0.22 ± 0.05****
GFP (mL/min)	0.33 ± 0.05	0.24	0.39	0.26 ± 0.03	0.19	0.05	0.02 ± 0.00
PFR (mL/min)	4.32 ± 0.27	4.24	4.51 ± 0.08	4.21 ± 0.21	4.68	4.07	4.10 ± 0.11
PAH							
MTTv Ratio	2.45 ± 0.15	-----	2.84	5.07 ± 0.77***	4.03	4.01	3.22
\bar{T}_{cell} (sec)	1.01 ± 0.33	-----	1.26	1.96 ± 0.53	0.86	1.24	5.12
Inulin Recovery (%)							
Plasma	96.87 ± 0.59	-----	96.69	96.6 ± 0.57	97.62	98.37	99.48
Urine	2.91 ± 0.60	-----	3.19	3.17 ± 0.57	2.22	1.32	0.08
GFP (mL/min)	0.32 ± 0.07	-----	0.34	0.21	0.16	0.11	0.01
PFR (mL/min)	4.20 ± 0.30	-----	4.56	3.91 ± 0.09	4.44	4.48	4.08

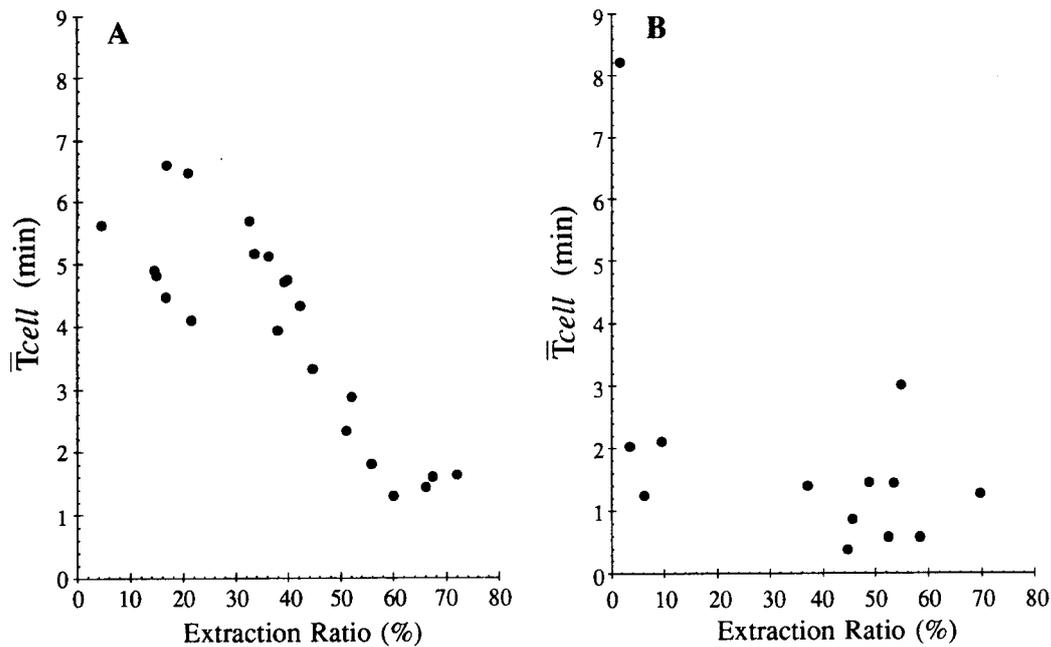


Fig. 2-12. Relationship between the extraction ratio and \bar{T}_{cell} of tetraethylammonium (panel A) and *p*-aminohippurate (panel B) in the perfused kidney isolated from the acute renal failure rats. The negative correlation can be seen clearly in the study with tetraethylammonium.

として、ひとつに、この輸送プロセスが数多くの因子によって細かく調節を受けているプロセスであることが、もうひとつに、血管側の取り込みプロセスは他方に比べ比較的簡単な様式で輸送を行うプロセスであることが推測される。くわえて TEA の腎排泄においては管腔側での薬物分泌機能の低下が血管側での薬物取り込みに直接反映していることから、有機カチオン性薬物の腎排泄では、この管腔側の分泌プロセスがその全排泄過程に影響を与える重要なプロセスであることがわかる。

一方 PAH の場合、血管側での薬物抽出率の低下と \bar{T}_{cell} の延長との間に相関が認められない。このことは、PAH をはじめとする有機アニオン性薬物の管腔側での分泌機構は、腎障害の影響を殆ど受けないプロセスであることを示しており、TEA に代表される有機カチオンのものとはその様式が異なることを意味している。管腔側とは異なり、血管側における PAH の取り込み能力は、腎障害時の腎機能低下にともなってその輸送能力が減少していると思われる。本実験条件では、上皮細胞の各生理機能が同様に障害を受けていると考えられるため、管腔側の輸送機構においても何らかの障害は発生しているであろう。しかしながら \bar{T}_{cell} の延長は観察さ

れず、また \bar{T} cell とは無関係に抽出率のみが減少していることから、有機アニオンの場合には血管側の輸送機構が特異的に障害されている可能性が高い。また腎障害時における有機アニオンの腎排泄率の低下には、血管側におけるこの薬物の取り込みプロセスの機能低下が大きく関与していることは明らかである。そしてこの血管側の輸送機能の障害によって PAH の腎排泄率の減少が生じるため、血管側でのプロセスが有機アニオンの腎排泄挙動全体を支配するプロセスであるといえる。

以上、本節で得られた知見を Fig.2-14 に纏めた。

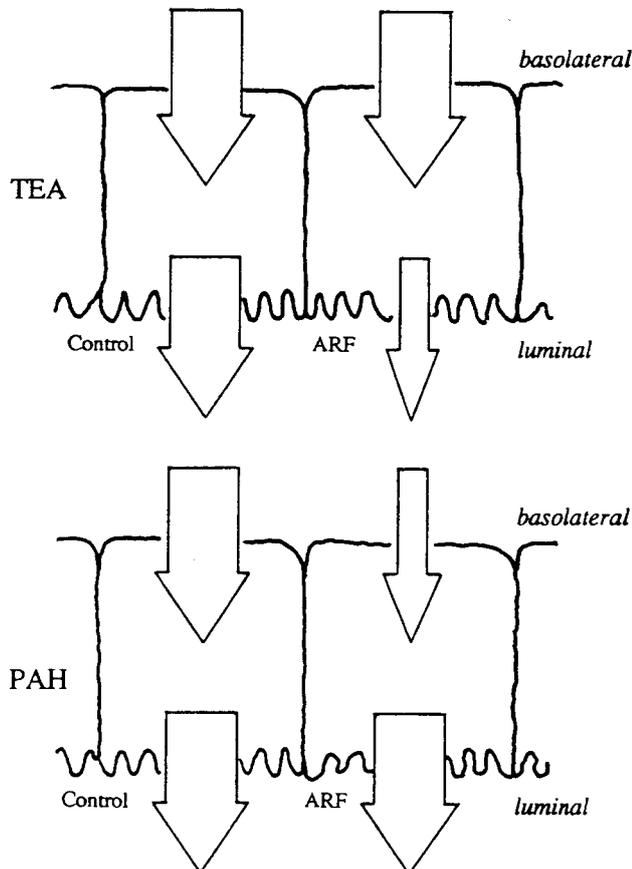


Fig. 2-13. Scheme representing the suppression manners which were observed after the treatment with uranyl nitrate in the study on the renal handling of two typical ionized organic compounds in rat. On the excretion of tetraethylammonium, the process on the brush border membrane was more sensitive to the treatment than that on the basolateral membrane. On the contrary, the process for the secretion of *p*-aminohippurate on the basolateral membrane was more sensitive than the other.

2-b 考察

医薬品は少なからず疾病疾患を持つ場合に投与されるものであって、このため病態時における体内挙動の検討は必要不可欠である。特に多くの薬物が主要排泄

臓器としている腎臓に関する研究は重要であり、腎機能不全の場合に生じる薬物挙動の著しい変化を予測し制御するために、さまざまな角度から研究が進められている⁶⁴⁻⁶⁷⁾。しかし、それらの中には医薬品の血液中濃度の変化の考察に傾注したものが多く⁶⁸⁻⁷⁰⁾、血液中濃度の変化の原因となっている腎そのものにおける薬物挙動が、腎障害の進行にともなってどのように変化していくのかを検討したものは少ない。これは、*in vivo* 系で病態を扱う際の問題、つまり確実な病態モデルを作成することも然ることながら、実験群内での偏差を小さくすることがかなり困難であることがその一因であろう。また *in vitro* 系で類似の検討を行なう場合でも同種の問題は避けて通れず、また「病態実験系」と実際の病態との同一性がしばしば問題となる。本節で示したように病態モデル動物より灌流臓器実験系を構築する手法は、このような病態時の薬物臓器挙動を取り扱うために非常に有用であった。一連の実験の結果、腎不全にともなう薬物の腎排泄機構の抑制は、その薬物が有機カチオンであるか、あるいは有機アニオンであるかにより、異なる経緯を辿って進行するということが今回初めて明らかにすることができた。実験的腎障害において最初に影響を受ける薬物輸送過程、即ちアニオンの場合には血管側での取り込みプロセスであり、カチオンの場合には管腔側の分泌プロセスであるが、これらの過程は各有機イオン性薬物の腎排泄過程全体に影響を与えるような重要なプロセスであることは容易に想像がつく。今回得られた知見は、それが腎上皮細胞の特定の機能のみに影響を与えるものでなければ、他の手段あるいは他の薬剤で惹起させた腎障害モデルにおいても同様に得られるであろう。

ところで、今回有機カチオンの場合において、その Tcell に腎障害の進行にともなう延長傾向が認められたということは、腎障害時にはそれだけ腎組織中の薬物濃度が上昇して薬物蓄積が起こり、腎機能不全を増悪させる可能性があることを意味している。従来より医薬品の添付文書には、血液中薬物濃度上昇の観点から必ず「腎障害時の投与は慎重に行なうこと」の記載があるが^{71,72)}、今回の知見によって薬物腎挙動の観点からも同種の留意事項が掲げられることになろう。

本章では前章で確立された摘出腎灌流実験系を用いて、有機イオン性モデル薬物の腎挙動に飽和性を有する輸送系が介在していることを示し、細胞内の薬物移動過程に関しても若干の考察を加えることができた。また尿 pH を変化させる手法

を用いて薬物分泌過程と上皮細胞・管腔間のプロトン勾配との関係を探り、このプロトン勾配の増減が臓器レベルでの有機カチオン性薬物の分泌挙動に大きく影響を与える因子であることを明らかにした。更に上述したように、腎障害の進行にともなう薬物腎排泄挙動の経時的変化を検討した結果、カチオン性薬物とアニオン性薬物とではその排泄過程を支配するプロセスがそれぞれ異なるものであることを示すことができた。

このように灌流実験系を用いて腎上皮細胞の薬物輸送特性を詳細に検討することによって、ミクロの系で得られた知見を薬物の体内挙動というマクロな視点から、また逆に臨床で得られた知見を上皮細胞における薬物輸送機構というミクロな観点から考察することが可能となった。本手法によって薬物の体内動態やこれに大きく依存する薬効の時間推移に関して総合的な解釈がなされ、医薬品に対する理解がより一層進むことが期待される。

第Ⅲ章 アミノグリコシド系抗生物質の腎蓄積機構に関する検討

腎臓は恒常性維持に必要不可欠な臓器であり、血液成分の排泄・再吸収を通じ、体液量・pH平衡に代表される生体の内部環境を一定の範囲内に保つ役割を果たしている。特に近位尿細管上皮細胞には、この血漿中各成分の分泌・再吸収を積極的に行なうための特異的な経細胞輸送機構が数多く存在しており、これにより腎臓に流入する毎分1,000-1,200 mLにもものぼる大量の血液が、短時間で処理されることが可能となって、生体内部環境の維持管理が効率よく営まれている。

このように腎上皮細胞は、その恒常性維持機能を最大限に発揮できるように高度に最適化された環境におかれている。しかしその一方で、体循環中の老廃物や有害な成分と頻繁な接触を行うこととなり、毒性物質の易蓄積性や組織障害からの回避を考えると著しく不利な状況におかれているともいえる⁷³⁾。こうしたある意味での瑕疵は、薬物自身もしくは代謝物が腎臓を主な排泄臓器とするような場合に問題となることが多い。このため医薬品の臨床使用においては、その投与設計を十分に行なって先に述べた腎の特殊性に配慮することが必要であり、そのため薬物の腎挙動に対する詳細な検討をとおして、その体内挙動を把握することが求められている。現在、臨床上繁用されている薬物の中には腎を主要な排泄臓器とするものが多く、こうした薬物の幾つかは腎臓へ高度に濃縮されることが知られている。更に、これらはときとして腎機能不全を誘発するため、自分自身が持つ臨床上の有効性を相殺してしまう場合がある。

このような医薬品のひとつが、アミノグリコシド系抗生物質である。

1944年にWaksmanによって、最初のアミノグリコシド系抗生物質Streptomycinが結核の特効薬として紹介されて以来、その優れた抗菌作用、特に抗ブドウ球菌・抗グラム陰性桿菌作用が乞われて数々の類縁化合物が開発され、多くの感染症治療に繁用され続けてきた⁷⁴⁾。第3世代セフェム系抗生剤が登場した現在でもなお、アミノグリコシド系抗生物質は腹膜炎・敗血症をはじめとする重篤な感染症の治療に用いられており、更に近年メチシリン耐性黄色ブドウ球菌感染症治療のための新規薬剤も開発されるなど、その重要性は依然として失われていない⁷⁵⁻⁷⁷⁾。しかしながらアミノグリコシド系抗生物質には、近位尿細管上皮細胞に高濃度に蓄積するとい

う薬物動態上の特徴があつて重篤な腎障害が惹起されることが知られており、このため本抗生剤の使用を諦めざるを得ない状況が少なからず存在する。

近位尿細管上皮細胞に対するアミノグリコシド系抗生物質の親和性と腎障害性との因果関係、並びに細胞内における毒性発現機構に関しては、単離膜小胞及び培養腎上皮細胞等を用いて様々な検討が行われ次第に明らかになりつつある⁷⁸⁻⁸¹⁾。しかしながらこれらは所謂ミクロな系での検討であり、薬物動態上の性質としての腎蓄積性・腎毒性を検討し、そして得られた知見をその薬剤の効果的な臨床使用や投与設計に反映させていくためには、更に薬物の生体における実際の移行過程を直接的に評価・検討し、腎臓という臓器をひとつの単位として考察することが必要である。

前2章にわたり著者は、生理的条件下の薬物挙動の解析に摘出腎灌流系が有用であることを示してきた。本章では、この手法を用いてアミノグリコシド系抗生物質の腎挙動を臓器レベルで詳細に解析し、得られた知見をもとに本剤の上皮細胞移行性や組織蓄積性に係わる腎の薬物輸送特性について論述する。

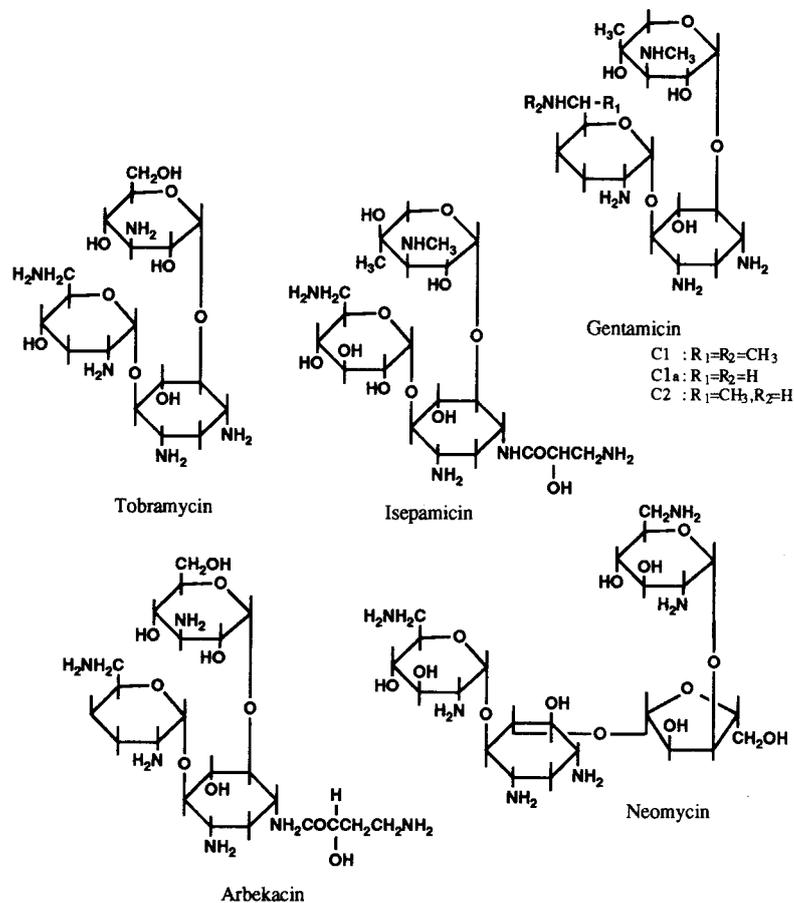


Fig. 3-1. Structures of moieties of aminoglycoside antibiotics.

第1節 アミノグリコシド系抗生物質の腎移行特性

1-a アミノグリコシド系抗生物質 Tobramycin の腎挙動

アミノグリコシド系抗生物質は Fig.3-1 に示すように、3分子のアミノ糖より構成される分子量 500 前後の塩基性化合物である。この抗生物質群は分子内に複数の正電荷と水酸基を有するため水溶性に富み、そのため細胞膜を構成する脂質二重層を拡散によって透過する可能性は極めて低いものと考えられる。従ってアミノグリコシド系抗生物質の腎組織内への移行及び蓄積には何等かの特殊な輸送機構が関与していると考えられ、これに関する検討が現在までに多様な実験系を用いて数多く行われている⁸²⁻⁹³⁾。そしてこれらの実験の結果、この薬物の腎移行過程はエネルギー要求性⁹⁴⁾であること、近位尿細管上皮細胞における薬物結合部位は管腔側の刷子縁膜よりも血管側の側底膜に多く存在すること⁹⁵⁻⁹⁸⁾等、多くの知見が見出されてきた。しかし一連の移行過程並びに蓄積過程の全般にわたり未だ不明な点が多く残されており、また腎の構造的・生理的特性を考慮してこの薬物挙動を検討した例も少ない。本抗生物質の腎上皮細胞への蓄積機構もこうした未だ十分に検討されていないもののひとつである。近位尿細管上皮細胞は腎組織の構造上、血液及び糸球体濾液の両方と接しており、側底膜並びに刷子縁膜の双方で、各々特徴を有する輸送機構によって積極的に溶存物質の輸送に係わっている。このためアミノグリコシド系抗生物質の蓄積に対し、この両細胞膜がそれぞれ異なる様式で関与していることが十分に予想されるため、本抗生物質の腎移行過程を検討するためには血管側と管腔側の双方における薬物挙動を分離して評価する必要がある。

前章において、臓器レベルでの薬物の腎挙動を解析する場合にその有効性を示してきた摘出腎灌流実験系は、静脈側と尿管側とで薬物の流出曲線をそれぞれ個別に解析できるという利点を持つ。そこで本節では本実験法を用いて代表的なアミノグリコシド系抗生物質である Tobramycin の腎挙動を検討し、薬物と上皮細胞間の相互作用を血管側と管腔側とにそれぞれ分離評価することにした。

最初に、薬物の糸球体濾過量を尿管側 Inulin の回収量から見積るため、薬物濃度約 8 μ M、灌流液中の BSA 濃度約 5% の条件で Tobramycin のタンパク結合率を測定したところ約 19% であった。しかしながら、測定値の変動がかなり大きいことや、実際の非平衡条件での急速投与実験では投与直後に薬物濃度の急激な変化が起こることなどから、補正計算値へのかなりの誤差の混入が予想されたため、本章で

はタンパク結合率による補正を施さずに測定値をそのまま表示し、もし必要であれば補正を施した値をも併記することにした。

トレーサー濃度 $7.4\mu\text{M}$ の標識 Tobramycin を含む投与液 $50\ \mu\text{L}$ を、腎動脈内へ急速投与した際に得られる典型的な静脈側及び尿管側の薬物流出曲線を Fig.3-2 に示し、また Tobramycin の回収率並びにモーメント・パラメータを Table 3-1 に示す。Fig.3-2 における Tobramycin 及び Inulin の静脈側流出曲線から明らかなように、両者の曲線はほぼ同一で回収率もほとんど同じであったことから、血管側において上皮細胞への Tobramycin の取り込みは行われていないものと考えられる。上皮細胞には有機カチオン性薬物を血液中から取り込むための輸送系が存在していることが、第 I 章・第 II 章において確かめられているが、今回の挙動解析の結果、Tobramycin は分子内に正電荷を有するにもかかわらず有機カチオン輸送系によって認識されないことが示唆された。しかし、薬物の静脈内挙動特性を示す MTTv Ratio は 1 より大きい値となり、Tobramycin は血管内において取り込みこそ行われぬものの、上皮細胞の側底膜との間で結合・解離を繰り返しながら移動していることが明らかとなった。

静脈側での挙動と対照的に、Fig.3-2 右側に示されている Tobramycin と Inulin の尿管側の流出曲線は、この 2 つの薬物の管腔内挙動が互いに異なることを表している。そして Tobramycin の流出曲線は糸球体濾過量のマーカーである Inulin のそれよりも小さなものであることから、尿細上皮細胞の管腔側細胞膜に Tobramycin を捕捉する機構が存在することが明らかになった。またこの流出曲線より Tobramycin の管腔側捕捉率^{注1)} は、糸球体濾過量の約 33% (タンパク結合を考慮した場合は約 17%) であると計算された。Tobramycin の尿管側挙動特性値 MTTu Ratio は、静脈側での特性値とほぼ同じ値であった。(Table 3-1)

さて上記では Inulin と Tobramycin の尿管側回収率の違いを管腔側捕捉率として表現した。これは Tobramycin が管腔側で実際に上皮細胞内へ取り込まれているのか、あるいは単に結合したままそこに貯留し細胞内への取り込みには至っていないのか、区別できていないからである。そこでこの 2 つを分離評価することを試み、

注 1) 以下本章で、管腔側捕捉率あるいは取り込み率並びに luminal uptake (%) が示された場合、その値は糸球体で濾過された全アミノグリコシド系抗生物質の量を 100% として計算されている。

注 2) (次ページ表中表記に関して) 灌流腎実験系における灌流液の流速 (血球体積分を除く) を PFR で、糸球体濾過速度を GFR でそれぞれ示した。以下本論文中ではこれらの表記を用いる。

Table 3-1 Recovery ratio and moment parameters of [³H]tobramycin in the control experiments. Radiolabeled tobramycin and the marker compound inulin were dissolved in the injection solution at the concentration of 7.4 μ M and ca. 60mg/L, respectively. Then a 50 μ L of the solution was administrated into the renal artery. Glomerular filtration rate and plasma flow rate were abbreviated as GFR and PFR, respectively.

Drug Recovery (%)			
Plasma		97.42	\pm 0.31
Urine		2.15	\pm 0.27
Inulin Recovery (%)			
Plasma		96.73	\pm 0.39
Urine		3.18	\pm 0.38
MTTv Ratio		1.13	\pm 0.03
MTTu Ratio		1.19	\pm 0.02
PFR (mL/min)		5.13	\pm 0.20
GFR (mL/min)		0.46	\pm 0.03
Glucose reabsorption (%)		96.9	\pm 0.5

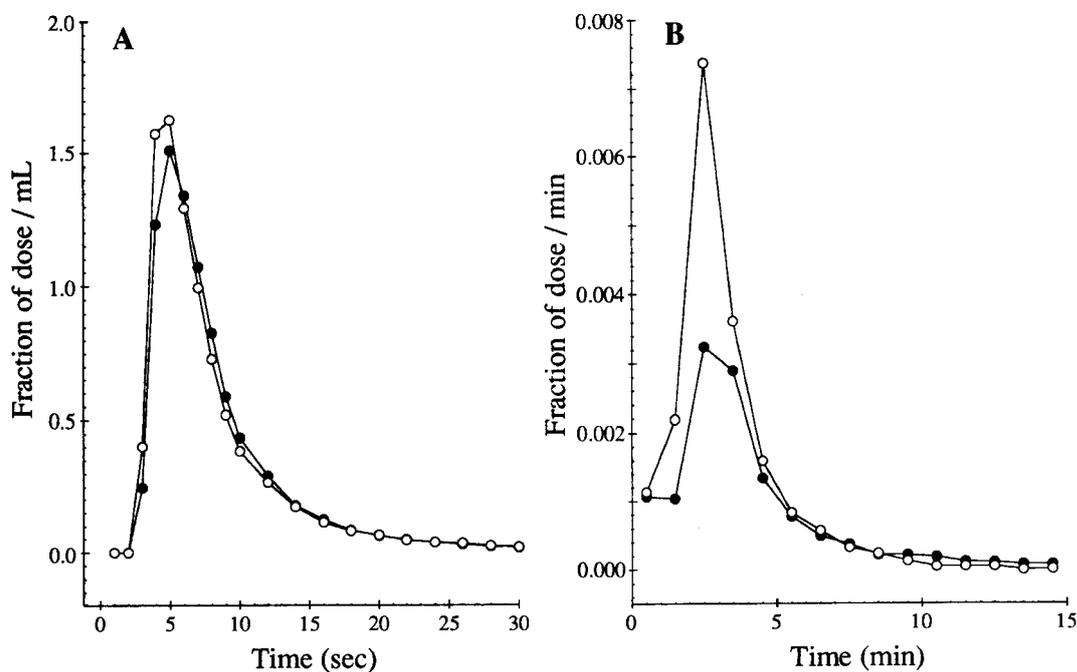


Fig. 3-2. Typical venous (panel A) and urinary (panel B) outflow profiles of [³H]tobramycin (●) and [¹⁴C]inulin (○) obtained in the control study in which the concentration of tobramycin in the injection solution was 7.4 μ M. In this experiment, the luminal uptake of tobramycin was 31%. The moment parameters, MTTv and MTTu of tobramycin were 7.7 sec and 3.9 min, respectively, and those of inulin were 7.0 sec and 3.2 min. From these values, MTTu Ratio of tobramycin was calculated at 1.2.

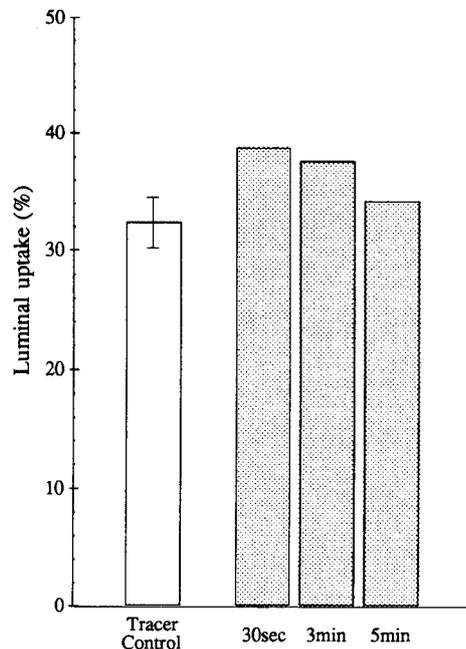


Fig. 3-3. Luminal uptake ratio of radiolabeled tobramycin in the displacement study. First, a 50 μ L-injection solution in which radiolabeled tobramycin was dissolved at the concentration of 7.4 μ M was administered rapidly. Then another 50 μ L-solution in which non-radiolabeled tobramycin was dissolved at the concentration of 50mM was injected in the same manner at 30 sec, 1 min, or 5 min after the first administration. This concentration was enough to decrease the luminal uptake of radiolabeled tobramycin. The collection of the urine flowed out was started just after the first administration, and it was stopped at 15 min after the second administration was done.

次の検討を行なった。

まず管腔側に捕捉された Tobramycin 分子の結合状態を調べるために、トレーサー濃度の標識 Tobramycin を急速投与後、一定時間の経過を待って引き続き高濃度の非標識 Tobramycin を同様に追加投与する実験をおこなった。もし管腔側における Tobramycin の捕捉が可逆的結合によるものであって細胞内へ取り込まれていないのであれば、この非標識体の追加投与による所謂「追い出し」によって、先に投与された標識体は置換され、尿中での標識体の回収量が増加するはずである。しかしながらどの時刻で追加投与が行われたかにかかわらず、尿中標識体回収率はコントロール群とほぼ同じ値であった。(Fig.3-3)

次に、上記とは逆に標識体投与に先立って非標識 Tobramycin を投与する前処理実験を行った。この場合先に投与された非標識体が管腔側の薬物結合部位を占有することが予想されるため、続いて投与される標識体と上皮細胞との相互作用が起りにくくなり、その結果として標識 Tobramycin の尿中回収率が増加すると思われる。しかしこの実験においても得られた結果は予想に反し、標識体尿中回収量に目立った増加は認められなかった。(Fig.3-4)

このように前処理・後処理の両実験で標識 Tobramycin の管腔側捕捉率に変化が認められなかったことから、糸球体で濾過された Tobramycin は管腔側で直ちに上

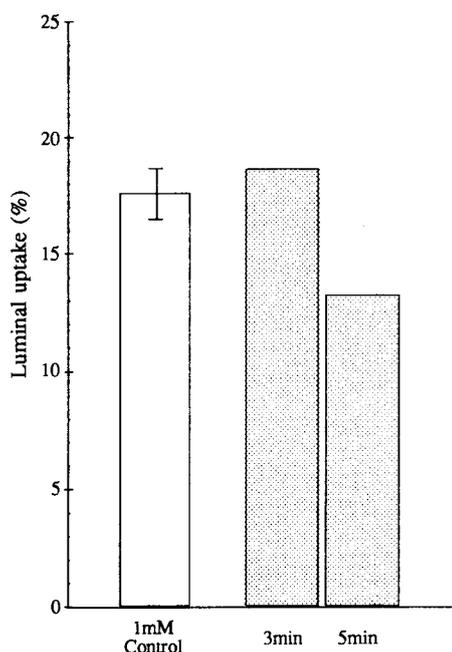


Fig. 3-4. Luminal uptake ratio of radiolabeled tobramycin in the pre-treatment study. First, a 50 μ L-solution in which non-radiolabeled tobramycin was dissolved at the concentration of 1mM was injected. At 3 min or 5 min after that, another 50 μ L-solution in which radiolabeled tobramycin was dissolved at the concentration of 1mM was then injected. Since it was unlikely that the non-radiolabeled tobramycin was washed away before the second injection was performed, the concentration of the second injection was adjusted to the same as that of the first solution to avoid unexpected effects.

皮細胞と非可逆的な結合を強固に形成するものと推定される。結合状態を解析するためにはより詳細な検討が必要であるが、これら一連の結果は、オートラジオグラフィによって標識 Gentamicin の腎取り込みを *in vivo* で追跡した実験や、Micro-injection の手法を用いた追い出し実験の結果と符合するものであった^{86,99-101)}。従って管腔側膜で「捕捉」された Tobramycin 分子は、尿細管上皮細胞と強力な結合を形成しており、比較的速やかに細胞内に取り込まれている、あるいは取り込まれる運命にあると考えることができよう。このため本章ではこれ以降、Tobramycin とマーカ物質である Inulin との尿中回収率の違いは、管腔側における Tobramycin の取り込み量を反映する数値として扱うことにする。

1-b Tobramycin の腎挙動における用量依存的変化

投与液中の Tobramycin 濃度をトレーサーレベルから 100mM までの各濃度に調製し、管腔側での Tobramycin の取り込み率の変化を検討した。各実験群における灌流腎の状態、並びにマーカ物質である Inulin の挙動については Table 3-2 に示したが、いずれの値も各群においてほぼ一定であった。また Tobramycin の血管側での挙動は投与量の増加による影響を受けなかったが、尿管側流出曲線は次第に Inulin の

Table 3-2 Renal handling of inulin and kidney functions during the experiment.
The values from the control experiments were already represented in Table 3-1.

	Tobramycin concentration in the injection solution	
	0.1mM	1mM
Inulin Recovery (%)		
Plasma	96.55 ± 0.43	96.98 ± 0.38
Urine	3.35 ± 0.38	2.95 ± 0.43
PFR (mL/min)	5.00 ± 0.10	4.54 ± 0.40
GFR (mL/min)	0.58 ± 0.04	0.44 ± 0.10
Glucose reabsorption (%)	-----	93.0 ± 1.9
<hr/>		
	10mM	100mM
Inulin Recovery (%)		
Plasma	95.91 ± 0.86	97.11 ± 0.84
Urine	4.04 ± 0.87	2.74 ± 0.87
PFR (mL/min)	4.55 ± 0.20	4.89 ± 0.25
GFR (mL/min)	0.51 ± 0.07	0.44 ± 0.11
Glucose reabsorption (%)	97.8	93.0

それと類似したものとなり、管腔側における薬物の取り込み過程に濃度依存性があることが見出された。Fig.3-5には高投与量実験で得られる典型的な流出曲線を示し、また投与量増加にともなう標識 Tobramycin の管腔側取り込み率の変化を、各濃度における Tobramycin のタンパク結合率で補正を施した値を併記するかたちで、Fig.3-6にまとめた。補正の結果、結合率測定の見誤差によると思われる若干の食い違いが未補正值との間に見られるが、ここで示されている取り込み率の用量依存傾向に本質的な変化を与えるものではないと考えている。

今回、管腔側での標識 Tobramycin の取り込み率に投与量依存性が認められたことは、本薬物が単純拡散によって腎上皮細胞の脂質二重層を通過するのではなく、何等かの輸送機構がこの取り込み過程に介在していることを示すものである。

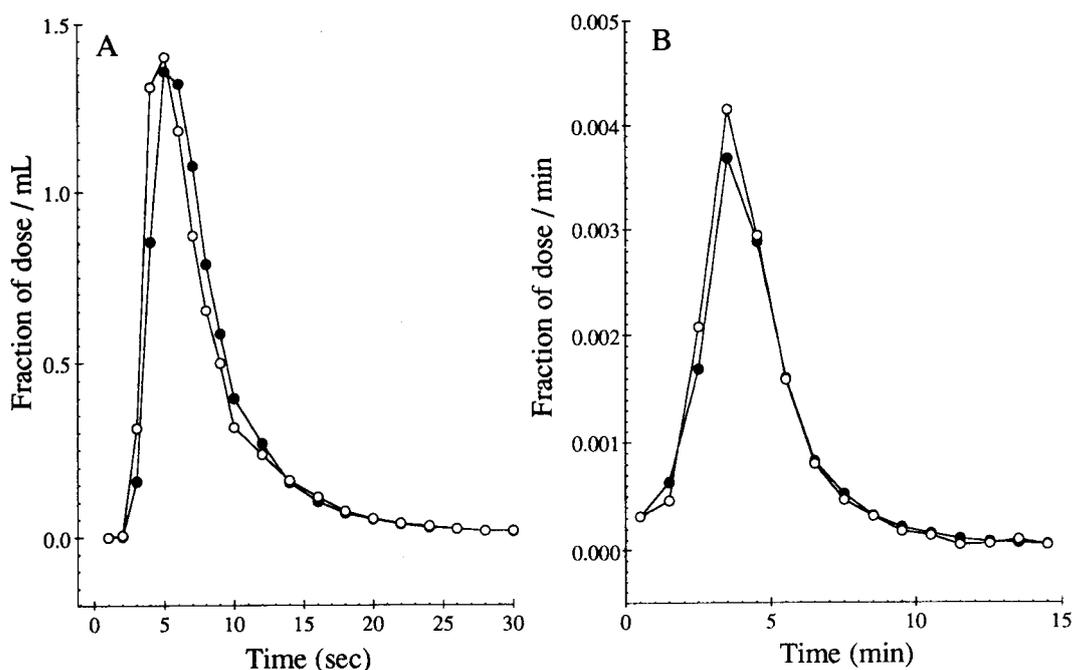


Fig. 3-5. Typical venous (panel A) and urinary (panel B) outflow profiles of [³H]tobramycin (●) and [¹⁴C]inulin (○) obtained in a dose-dependent experiment in which tobramycin was dissolved in the injection solution at the concentration of 100mM. In this experiment, the luminal uptake of tobramycin was 3%. The values of MTT_v and MTT_u of tobramycin were 7.9 sec and 4.6 min, respectively, and those of inulin were 7.5 sec and 4.4 min. From these values, MTT_u Ratio was calculated at 1.0.

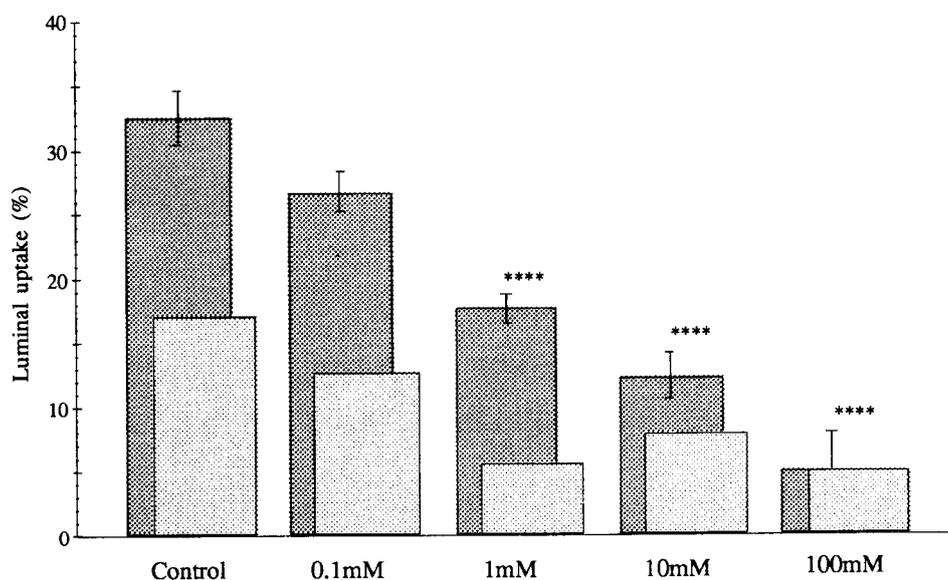


Fig. 3-6. Dose-dependent decrease of the luminal uptake of tobramycin. The values corrected (light gray column) and not corrected (dark column) by the protein binding ratio were shown, respectively. The protein binding ratio of tobramycin were 19.1% at the concentration of 7.4μM, 16.1% at 0.1mM, 12.8% at 1mM, 3.7% at 10mM, and negligible at 100mM.

取り込み率に加えて Tobramycin の尿管側挙動特性値 MTTu Ratio にも用量依存的変化が認められた。各濃度間でこの値を比較すると、取り込み率が最も大きいトレーサー濃度実験群では MTTu Ratio も他に比べて大きな値を示し、一方ほとんど取り込みが認められなかった 100mM 投与群での値はほぼ 1 と最も小さな値であった。100mM 投与群におけるこの値は、管腔側において Tobramycin が Inulin と同程度の相互作用しか示さない状態になっていることを意味している。各濃度における管腔側取り込み率と挙動特性値 MTTu Ratio との関係を Fig.3-7 に示す。これより明らかかなように管腔側取り込み率と MTTu Ratio との間には良好な相関が認められた。Tobramycin をはじめとするアミノグリコシド系抗生物質は一般に極めて水溶性が高いこと、また腎臓に蓄積したアミノグリコシド系抗生物質の消失半減期はかなり長

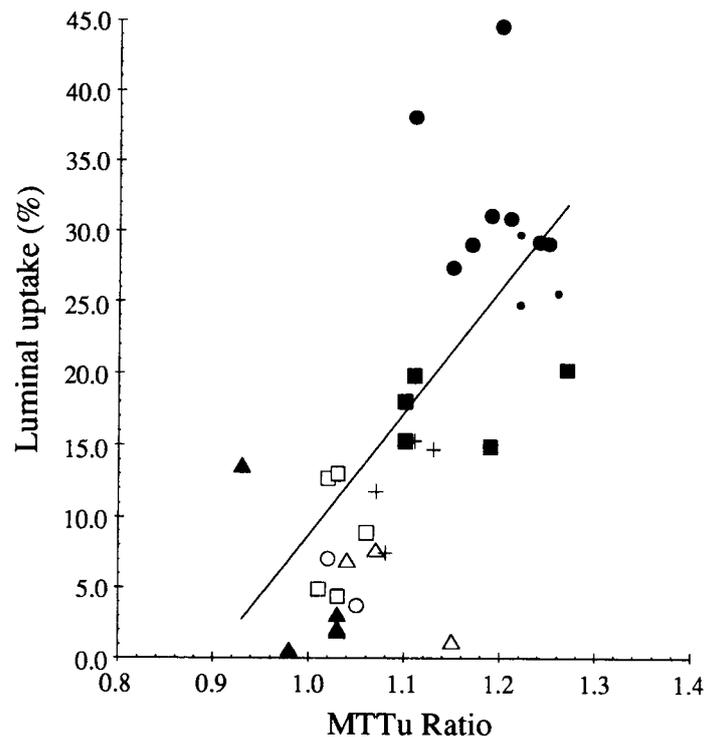


Fig. 3-7. Relationship between the luminal uptake ratio of [³H]tobramycin and its MTTu Ratio to that of inulin. The correspondence of the symbols to the experiments is following: (●) indicates the value from the experiment in which tobramycin was dissolved in the injection solution at tracer concentration, (·) is from the experiment in which tobramycin was dissolved at the concentration of 0.1mM, 1mM(■), 10mM(+), 100mM(▲). The regression line ($r=0.68$) was calculated with these values from the dose-dependent study. To be referred in the following section, the values from the inhibition study were also indicated: inhibition by neomycin(○), by gentamicin(□), by kanamycin(△).

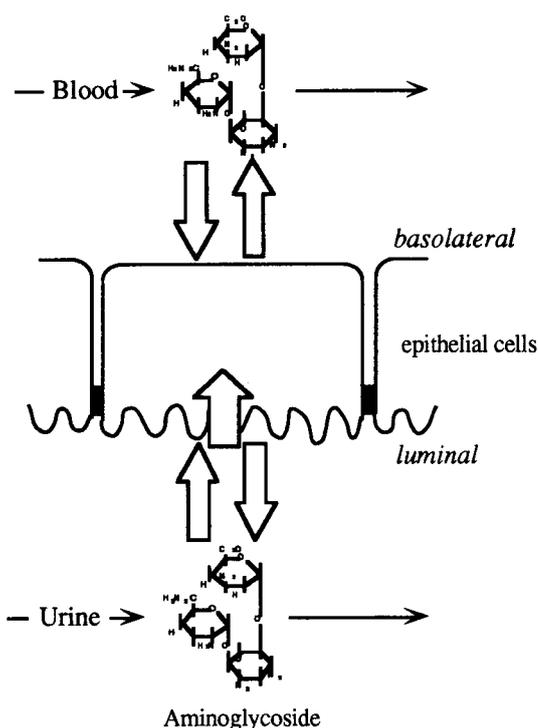


Fig. 3-8. Schema illustrating how aminoglycoside antibiotics interact with the brush border membrane and the basolateral membrane of the renal epithelia. The degree of its interaction with the basolateral membrane is the same as that with the brush border membrane, but the uptake occurs on the luminal side.

いという臨床報告^{102,103)}を考慮すると、Tobramycinが尿細管内と上皮細胞内とを自由に往来しているとは考えられない。従って管腔側でのTobramycinとInulinの分布空間は等しいとみなすことができ、これよりMTTu Ratioの減少は薬物と上皮細胞間の相互作用の減少を反映していると解釈することができる。Fig.3-7においてMTTu Ratioと取り込み率との間に良好な相関が認められることから、Tobramycinの取り込みのプロセスは、まず管腔側で薬物と上皮細胞との結合・解離が繰り返し行なわれ、次にその一部が細胞内へ取り込まれていくという2段階より成り立っているものと推定される(Fig.3-8)。高投与量実験で認められた取り込み率の低下は、上皮細胞の管腔側に存在する薬物結合部位が有限個であるために、標識薬物とその結合部位との接触の機会が減少したことに原因があると考えられ、先に述べた取り込み過程の第一段階が抑制されたためであると解釈される。

1-c アミノグリコシド系抗生物質間における取り込み機構の共通性

尿細管腔側における Tobramycin の取り込み機構が、アミノグリコシド系抗生物質に共通な取り込み機構であることを確かめるために、投与液に Gentamicin, Neomycin, Kanamycin の各種アミノグリコシド系抗生物質をそれぞれ共存させた条

件で、Tobramycin の流出曲線の変化を検討した。Table 3-3 に示されているように上記のアミノグリコシド系抗生物質を共存させることによって、Tobramycin の管腔側での取り込み率は著しく減少し、また MTTu Ratio もこれに応じて1に近づくことが明らかとなった。取り込み率と MTTu Ratio との関係は先の濃度依存性の実験結果 (Fig.3-7, 60ページ) に重ねて示したが、共存阻害実験で得られた値も先に得られた回帰直線に従うようにプロットされることがわかる。このことから本共存実験における標識 Tobramycin の管腔側取り込み率の減少は、取り込み過程の第一段階つまり薬物がその結合部位へ接近し結合するプロセスが、投与液中に共存している他のアミノグリコシド系抗生物質によって阻害されたことによるものであると推察される。

このことを重ねて確かめるために、更に別のアミノグリコシド系抗生物質である Isepamicin 並びに Arbekacin の放射標識体を用いて急速投与実験を行い、Tobramycin の場合と同様にその流出曲線を調べた。これらの実験より得られる代表的な流出曲線を Fig.3-9, 3-10 に、またこれらの腎挙動パラメータを Table 3-4 に示す。Isepamicin 並びに Arbekacin の腎挙動は Tobramycin のそれと同様であった。即ち静脈側の流出曲線は Inulin のものとはほぼ等しいものであり、腎上皮細胞血管側で薬物移行が起きないことが再び示された。また尿管側流出曲線においては、これら2種のアミノグリコシド系抗生物質も Tobramycin 同様に、糸球体で濾過された後に管腔側で取り込まれることが確認された。更に Isepamicin 並びに Arbekacin の両アミノグリコシド系抗生物質の管腔側での取り込み率は、Tobramycin の共存下でともに著しく減少することも併せて示された。(Fig.3-11)

Table 3-3 Effects of other aminoglycosides on the luminal uptake of [³H]tobramycin. All of them affected the luminal uptake significantly in comparison with the control (P<0.001). Aminoglycoside listed below was dissolved in the injection solution at the concentration of 100mM.

	Luminal uptake (%)	MTTu Ratio	n
Control	32.4 ± 2.1	1.19 ± 0.02	8
+Neomycin	2.7 ± 2.8	1.03 ± 0.01	3
+Gentamicin	8.8 ± 1.8	1.03 ± 0.01	5
+Kanamycin	4.5 ± 1.7	1.07 ± 0.03	4

Table 3-4 Parameters representing the renal handling of [¹⁴C]isepamicin and [³H]arbekacin. Isepamicin and arbekacin was dissolved in the injection solution at the concentration of 0.1mM and 10mM, respectively. This difference was due to the specific activity of the radio-labeled compound of each aminoglycoside.

	[¹⁴ C]Isepamicin	[³ H]Arbekacin
Luminal uptake (%)	26.4 ± 3.1	24.2 ± 2.9
MTTv Ratio	1.05 ± 0.02	1.25 ± 0.09
MTTu Ratio	1.12 ± 0.03	1.15 ± 0.03
PFR (mL/min)	4.71 ± 0.25	4.31 ± 0.28
GFR (mL/min)	0.55 ± 0.08	0.45 ± 0.04
Glucose reabsorption (%)	96.5 ± 1.7	96.8 ± 1.1

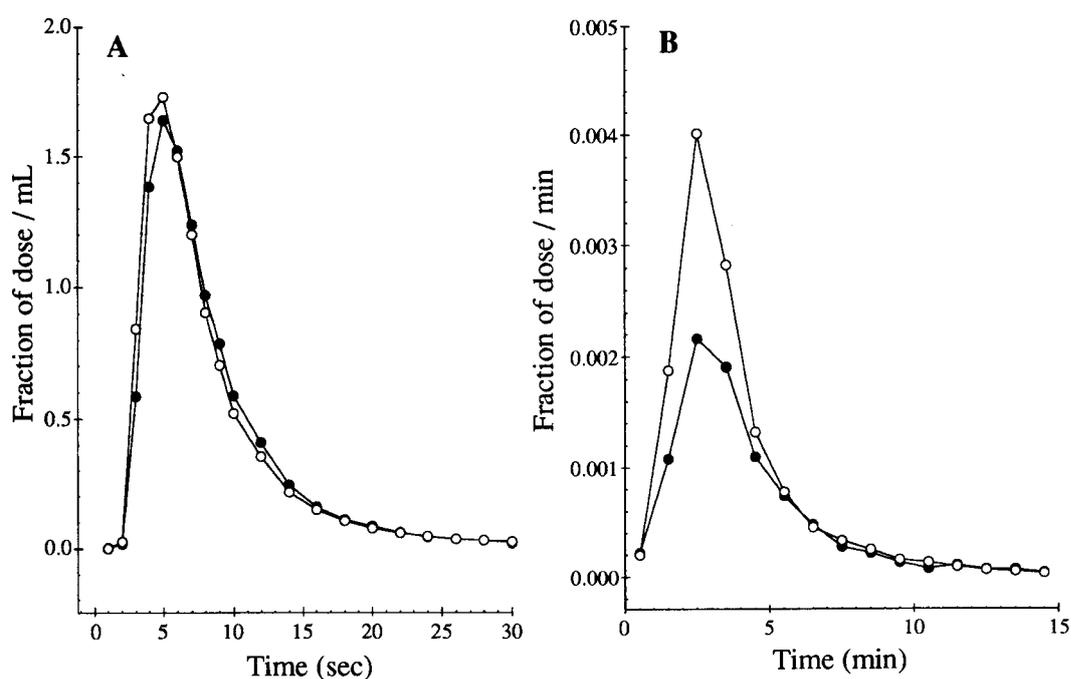


Fig. 3-9. Typical venous (panel A) and urinary (panel B) outflow profiles of [¹⁴C]isepamicin (●) and [³H]inulin (○) obtained in the control study. The concentration of isepamicin in the injection solution was 0.1mM. This concentration was determined from the specific activity of its radiolabeled compound. In this experiment, the luminal uptake of isepamicin was 31%. The values of MTTv and MTTu of tobramycin were 7.5 sec and 4.1 min, respectively, those of inulin were 7.3 sec and 3.7 min, and MTTu Ratio was 1.1.

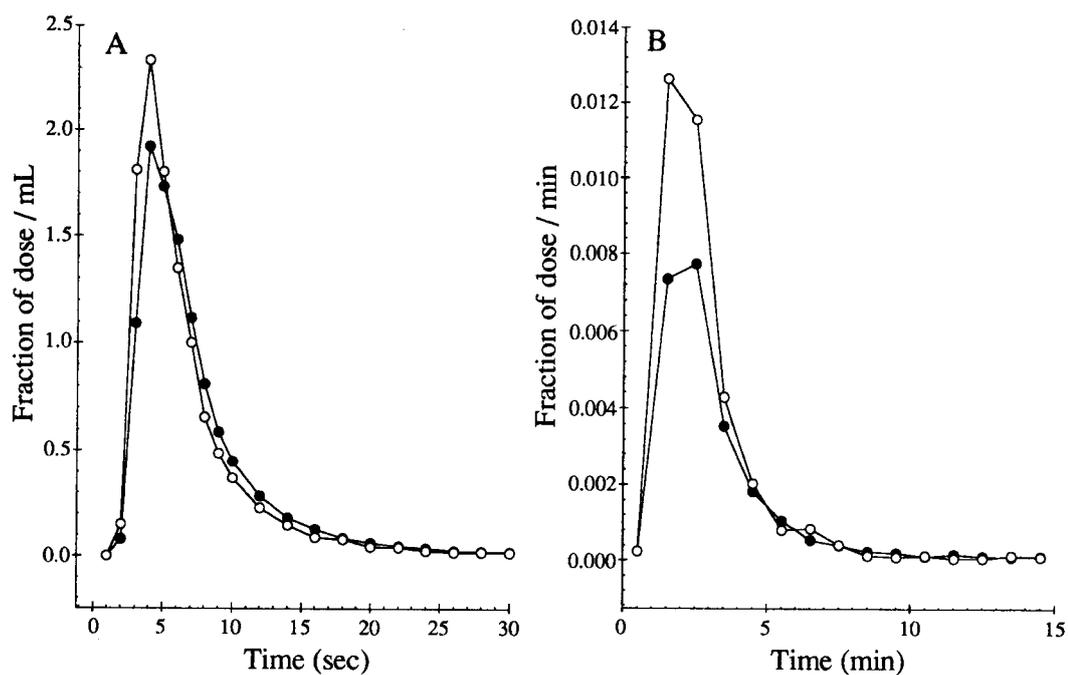
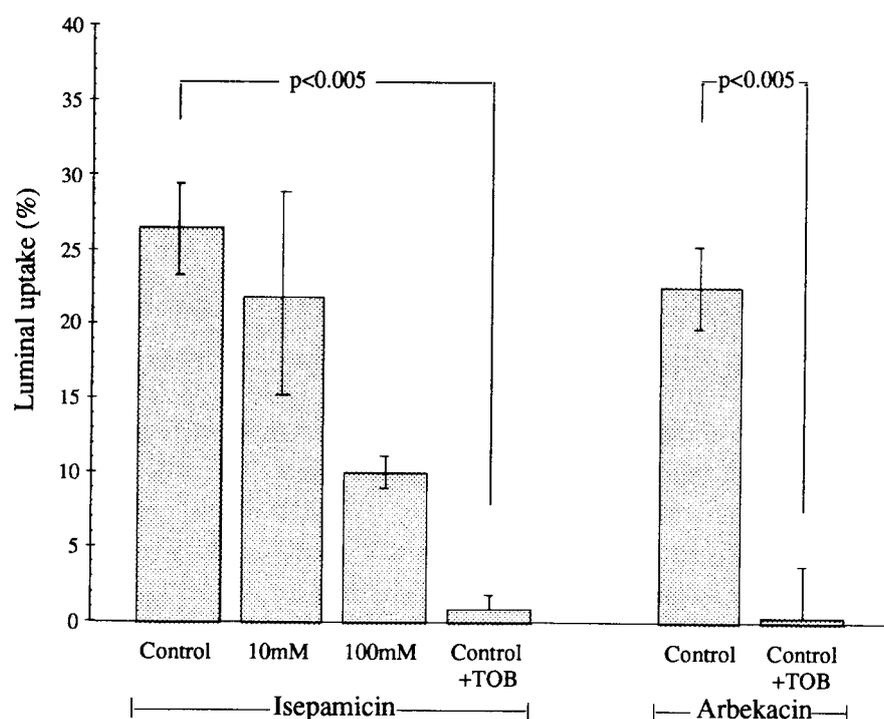


Fig. 3-10. Typical venous (panel A) and urinary (panel B) outflow profiles of [³H]arbekacin (●) and [¹⁴C]inulin (○) obtained in the control study where arbekacin was dissolved in the injection solution at the concentration of 10mM. This concentration was determined from the specific activity of its radiolabeled compound. In this experiment, the luminal uptake of arbekacin was 26%. The values of MTT_v and MTT_u of arbekacin were 7.1 sec and 3.2 min, respectively. Since those of inulin were 5.7 sec and 2.8 min, MTT_u Ratio was 1.1.



以上の結果から、Tobramycin の急速投与実験で認められた管腔側における取り込み機構の存在は、アミノグリコシド系抗生物質に共通した機構であることが確かめられた。

1-d 考察

アミノグリコシド系抗生物質はしばしば重篤な腎障害を惹起することが知られており、これは本抗生物質が近位尿細管上皮細胞への高い親和性・蓄積性を有するためであると考えられている。しかし本抗生剤の毒性発現機構に加え腎組織への移行様式に関しても不明な点が多く、このことが、本抗生剤の副作用の発現を抑制し且つ抗菌作用を最大限に引き出すような効果的な臨床使用を考える上での隘路となっている。このため本研究では、まずアミノグリコシド系抗生物質の腎挙動を検討することによって、その腎組織移行過程を明らかにすることを試みた。

アミノグリコシド系抗生物質が高濃度に蓄積する近位尿細管上皮細胞は、その組織構造上、血管側側底膜を介して血液中の薬物と、また管腔側刷子縁膜を介して糸球体濾液中の薬物と接するため、本抗生剤の上皮細胞移行性を検討する際には、この各々特徴を有する2種類の細胞膜それぞれの関与について評価検討する必要がある。そこで薬物挙動を血管側・管腔側とで分離解析することが可能である摘出腎灌流法を用いて Tobramycin の腎挙動を検討した結果、血管側から腎組織への薬物移行は認められず、管腔側のみで薬物の取り込みが行われていることが確認された。更に管腔側での Tobramycin の取り込み率は投与液中の薬物濃度の上昇とともに減少する用量依存性を示し、この取り込み過程は単純拡散あるいは非特異的な吸着反応ではなく、何等かの輸送系が関与する機構によるものであることが示された。また Tobramycin の管腔側取り込みは、他のアミノグリコシド系抗生物質の共存下で阻害されることが確認され、更に標識 Isepamicin や Arbekacin の腎挙動も Tobramycin と同じ性質を示すことも明らかとなった。

[Left page]

Fig. 3-11. Luminal uptake of [¹⁴C]isepamicin and [³H]arbekacin which could be suppressed by the coadministration of 100mM tobramycin. The concentration in the control study was 0.1mM for isepamicin and 10mM for arbekacin, respectively. For isepamicin, the data from the dose-dependent study, where the luminal uptake ratio was decreased significantly ($p < 0.005$) from the control when isepamicin was dissolved in the injection solution at the concentration of 100mM, were also indicated.

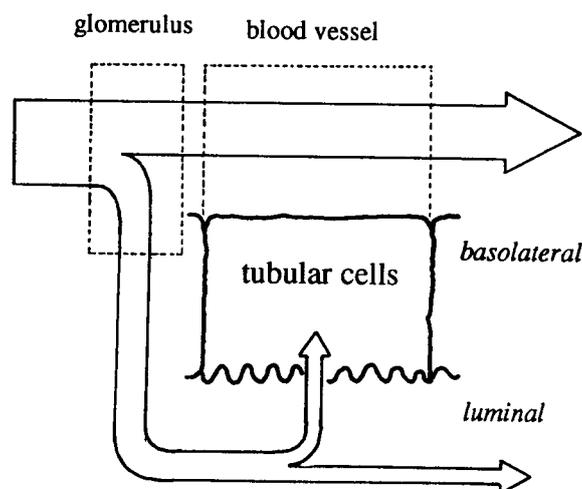


Fig. 3-12. Schema of the route by which aminoglycoside antibiotics accumulate in the epithelia.

このように、アミノグリコシド系抗生物質に共通の取り込み機構が管腔側においてのみ存在することが示されたことによって、従来議論の対象となっていた薬物の腎への蓄積経路は、血液中から糸球体濾過によって排泄された後に尿細管から再吸収される Fig.3-12 に示す一連の過程であることを明らかにすることができた。

今回の実験のみで血管側からの薬物取り込み過程の存在を完全に否定することはできない。なぜならば非常にゆっくりとしたプロセスが関与する検出限界以下の薬物移行が、血管側で生じている可能性も十分に考えられるからである。しかしながら、本検討で用いたトレーサー濃度における血管側薬物濃度推移は、かなり明確な薬物取り込みが認められる 1mM 投与時の尿管側の薬物濃度推移とほぼ同じレベルであるものの、本実験ではトレーサー濃度において血管側からの薬物移行は認められてはいない。従って僅かな量の薬物移行が静脈側で起きていたとしても、管腔側からの移行経路がアミノグリコシド系抗生物質の腎蓄積機構においては遥かに重要であると考えることができよう。

今回明らかにしてきたアミノグリコシド系抗生物質の腎臓への蓄積経路を改めて見直すと、薬物取り込みは糸球体・尿細管腔・上皮細胞刷子縁膜といった腎臓に特徴的な構造や器官に密接に関係していることがわかる。このことは、なぜアミノグリコシド系抗生物質が肝臓その他の臓器には殆ど移行せず、腎臓に特異的に蓄積するのか、という疑問に対するひとつの解答になろう。

薬物の腎移行性への関与は認められなかったものの、薬物と血管側側底膜との間には、ある程度の相互作用が存在することが Tobramycin の静脈内挙動特性値 MTTv Ratio からうかがえる。この他にも膜小胞へのアミノグリコシド系抗生物質 3',4'-dideoxykanamycin の結合様式を解析した実験から、その結合親和性は同程度であるが、血管側側底膜上の薬物結合部位数は刷子縁膜の約2倍であることが報告されている⁹⁵⁾。しかし今回の解析において、急速投与された各標識薬物の MTTv Ratio と MTTu Ratio を比較した結果、いずれの場合も両者間に有意な差は認められなかった。このことから先の報告とは異なり、灌流腎実験系におけるアミノグリコシド系抗生物質と上皮細胞との相互作用は血管側と管腔側ではほぼ同程度であろうと考えられた。この両者の結論の差異は実験系の違いによるものと思われる。単離膜小胞実験系の場合、薬物結合の測定は定常条件で静的になされているのに対し、今回の灌流実験では薬物濃度が変化するという条件に加えて、細胞膜表面に常に灌流液や糸球体濾液の流れが存在するという非平衡且つ動的な条件下で相互作用が評価されている。このことが薬物分子と細胞膜との相互作用に無視し得ない影響を与えたものと考えられる。

共存阻害実験より、投与液中に共存させたアミノグリコシド系抗生物質はいずれも Tobramycin の管腔側取り込みを阻害することが明らかとなったが、アミノグリコシド系抗生物質の種類によってその阻害能力に違いがあることも示され、その阻害の強さは、Neomycin > Kanamycin > Gentamicin の順であった。また3種類の放射標識アミノグリコシド系抗生物質を用いた急速投与実験の結果を比較することによって、Tobramycin, Isepamicin, Arbekacin それぞれの腎挙動に若干の差異があることも明らかとなっており、これらの管腔側の取り込み率並びに挙動特性値 MTTu Ratio を投与液中薬物濃度 10mM の同一条件で比較したところ、ほぼ Arbekacin > Isepamicin \geq Tobramycin の順となった。アミノグリコシド系抗生物質間でこのような違いが存在するという事は、薬物の分子構造や親水性・疎水性などの諸性質が尿細管での相互作用やその腎蓄積性に関係し、更には、その蓄積性に相関のあることが報告されている腎毒性の強さに影響を与えること示している。今回得られた先の序列は、*in vivo* や *in vitro* で報告^{104,105)}されている各薬物の腎毒性の強さと正確に一致するものではなかった。しかしアミノグリコシド系抗生物質の腎毒性を論じるためには、薬物分子構造や脂溶性あるいは細胞膜への親和性といった性質だけではなく、薬物の細胞内挙動や毒性発現機構まで踏み込んだ議論が必要であることを考慮すれば¹⁰⁶⁾

¹²³⁾、こうした違いが起きることはもっともなことであろう。

上皮細胞内におけるアミノグリコシド系抗生物質の毒性発現メカニズムが解明されていない現状では、本薬物の腎蓄積を抑制することがその腎毒性発現抑止並びに毒性軽減手段として最も期待できる。また本節では既にアミノグリコシド系抗生物質の尿細管での相互作用は、本抗生物質が腎臓への蓄積に至る全過程のうちの第一段階として捉えられることを論じてきた。これらを踏まえると、管腔側での相互作用を減少させる措置を講じることで、薬物の組織内蓄積を阻害し毒性発現を抑えることができるものと考えられる。即ち、尿細管でのアミノグリコシド系抗生物質の取り込み過程に投与量依存性があることから、薬物の全投与量が同じ場合には少量頻回投与方法よりも大量単回投与方法を選択した方が毒性軽減の観点から有利であろう。この場合、尿細管への薬物移行が高濃度で起こるため取り込み機構が飽和し、全体としての薬物取り込み量が減少することが予想される。従来からのアミノグリコシド系抗生物質の投与計画においては、その血中濃度をMIC（最小発育阻止濃度）以上に保つことに注意が配られていた。しかしながら抗生物質は一般にPAE (Post Antibiotic Effect) といわれる性質を有し^{124,125)}、必ずしも血中濃度がMIC以上であり続ける必要はない。特にアミノグリコシド系抗生物質のPAEはその期間が長いことで知られており、一日一回投与でも十分抗菌効果を示すことが期待できる。また実際に頻回投与と単回投与でその治療成績や副作用を比較した報告もなされており、それによると単回投与方法が頻回投与に劣る点はなく、場合によっては治療成績が良いものもあった¹²⁶⁻¹³²⁾。また単回投与で血中薬物濃度が一時的に上昇することによる悪影響も特に存在しない¹³³⁾。

次に、尿管内の尿流量を常に十分確保しておく手法も腎毒性軽減のために有効であると考えられる。尿流量の増加によって薬物の尿細管での絶対的な滞留時間が短くなり、このため上皮細胞と相互作用を起こす機会が減少して薬物取り込み量が低く抑えられると期待される。予備的検討ではあるが、標識 Isepamicin の管腔側取り込み率とその実験における平均尿流速との関係を調べた結果を Fig.3-13 に示す。両者間には負の相関が認められ、尿流速が大きいほど Isepamicin の取り込み率が減少することが示されている。従ってアミノグリコシド系抗生物質を使用する際には、十分な尿流量を確保しておくことが毒性軽減の点で有利であろう。但し、利尿剤特にループ系利尿剤の使用は本抗生剤の腎毒性を増悪させるという報告¹³⁴⁾がなされているため注意が必要であり、またこれ以外の利尿剤の場合でも、腎血流の増加は薬

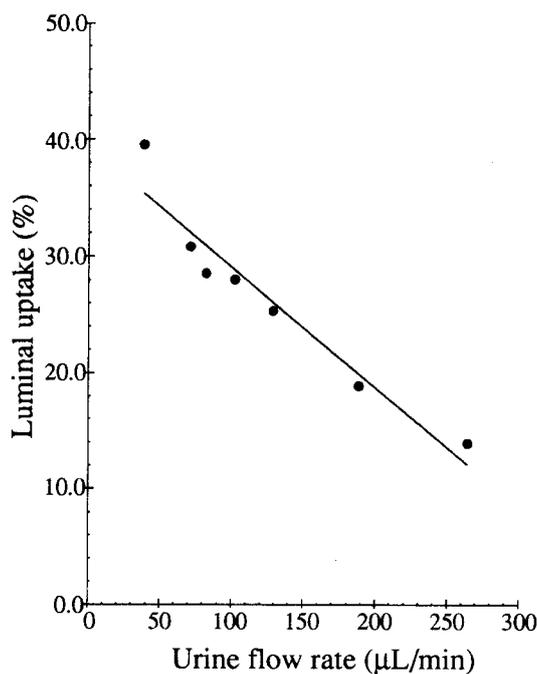


Fig. 3-13. Decrease of the luminal uptake of [¹⁴C]-isepamicin correlated with the increase of the urine flow rate in the isolated perfused rat kidney. These data were given from 7 control experiments whose values of the urine flow rate depend on the condition of the perfused kidney. The correlation coefficient was -0.96.

物の排泄を必要以上に速くしてその薬効を減少させる虞があり、安易な使用は避けるべきである。従って敢えて尿量を増加させるのではなく、治療中の乏尿を避ける工夫が大切であることを指摘しておきたい。以上のような、今回得られた知見に基づくアミノグリコシド系抗生物質の臨床使用法は、現在用いられている薬剤の投与方法に若干の変更を加えるだけでその副作用を軽減できる可能性を示している。

近年アミノグリコシド系抗生物質の腎毒性を、硫酸デキストランやポリアスパラギン酸あるいはセフェム系抗生物質の併用によって減弱可能であるとの報告がなされている¹³⁵⁻¹⁵⁰。当然のことながら上皮細胞内におけるこのような併用物質の薬理的作用の考慮が必要ではあるが、これらは自らが負電荷を有することによってアミノグリコシド系抗生物質との間で複合体を形成¹⁵¹するために、管腔側でのアミノグリコシド系抗生物質と上皮細胞との相互作用が抑制され、取り込み量及び蓄積量が低下して腎毒性が軽減するものと思われる。

ところで、近位尿細管の上皮細胞が専らアミノグリコシド系抗生物質を取り込むためだけに、こうした輸送機構を元来備えているとは考えにくい。本来違う目的のための輸送系に誤って認識される結果、本抗生物質が細胞内へ運ばれてしまうと考えるのが自然であろう。そこで次節では管腔側に存在するこの輸送機構の生理的意義について検討を加える。

第2節 アミノグリコシド系抗生物質の腎蓄積機構の解析

2-a アミノグリコシド系抗生物質の正帯電性と腎移行性

近位尿細管上皮細胞が有する様々な物質輸送系は、本来生体の内部環境を一定に保つために、生体に必要な物質を保持し不必要なものを排泄する機構である。従って、アミノグリコシド系抗生物質のような生命活動に直接関係しない外来物質のための輸送機構が、この上皮細胞に元来備わっているとは考え難い。そこで本節では、この管腔側でのアミノグリコシド系抗生物質物の取り込み機構が、生体内でどのような働きを担っているのか明らかにするために更に検討を加えた。

まず、アミノグリコシド系抗生物質以外の分子構造を持つ化合物として、有機カチオン性モデル薬物という観点から TEA を、またアミノグリコシド系抗生物質の基本骨格構成要素の類縁化合物という観点からアミノ糖である Glucosamine をそれぞれ用いて、管腔側の Tobramycin 取り込みにこの2種類の化合物が及ぼす阻害効果を検討した。その結果、Tobramycin の取り込み率はこれらの化合物いずれによっても影響を受けず、両化合物には阻害活性が認められなかった (Table 3-5)。このため管腔側に存在する Tobramycin の取り込み機構は、アミノグリコシド系抗生物質に特異的な機構であると考えられる。

次に、灌流腎実験系を第II章第1節の手法を用いて pH 8 以上のアルカリ尿が生成される条件に設定し、Tobramycin の管腔側取り込み率に現れる影響を同様に検討した。本条件において灌流腎の生理機能やマーカ物質 Inulin の挙動に変化は認められなかったが、Tobramycin の管腔側取り込み率及び MTTu Ratio には有意な減少が認められた (Table 3-5)。Tobramycin の等電点は $pK_a = 7.18$ と報告¹⁵²⁾されており、アルカリ尿生成条件で薬物分子の尿細管における帯電性は通常より弱いものと考えられる。こうした分子の正帯電性の低下が細胞膜上での相互作用の減少をきたし、結合が抑制されて取り込み率の減少へと繋がっていったのであろう。従って薬物分子の持つ正電荷が、輸送機構の分子認識に重要な役目を果たしていると考えられる。このような薬物と細胞膜との相互作用が静電気的な結合であることを示す結果は、既に報告されているいくつかの実験結果と同じものであった¹⁵³⁻¹⁵⁵⁾。

さて、いずれも1価の正電荷を持ちながら TEA や Glucosamine は阻害効果を示さなかったことを考慮すると、この輸送機構は単なる正電荷の有無で薬物を認識しているとは考え難い。また Neomycin のようにアミノ糖3分子以外に更にペントー

Table 3-5 Effects of non-aminoglycoside compounds and urine alkalization on the luminal uptake of [³H]tobramycin. Each of tetraethylammonium and glucosamine was dissolved in the injection solution at the concentration of 100mM. The alkalization, in which urinary pH increases to 8 and more, is prepared by the addition of NaHCO₃ in the perfusate. The luminal uptake of [³H]tobramycin in the control study was 32.4 ± 2.1%.

	Compounds injected simultaneously		
	Tetraethylammonium	Glucosamine	Alkalization
[³H]tobramycin			
Luminal uptake (%)	27.9 ± 1.5	30.8 ± 2.0	21.9 ± 2.3***
MTTv Ratio	1.28 ± 0.08	1.20 ± 0.04	1.13 ± 0.02
MTTu Ratio	1.21 ± 0.02	1.19 ± 0.02	1.09 ± 0.03****
PFR (mL/min)	4.28 ± 0.46	4.95 ± 0.37	4.21 ± 0.50
GFR (mL/min)	0.54 ± 0.03	0.51 ± 0.07	0.43 ± 0.05
Glucose reabsorption (%)	97.6 ± 1.1	95.9 ± 2.3	91.3 ± 5.4

スとその骨格として持つものや、Isepamicin や Arbekacin のように長い側鎖を有しているものなど、同じアミノグリコシド系抗生物質の中にも様々な分子骨格を持ったものがあることから、輸送系がある一定の分子構造を認識している可能性も少ない。これらに加え、膜小胞実験系からの報告^{99,156)}を考慮すると、管腔側でのアミノグリコシド系抗生物質の取り込みは、本抗生剤がその構造上複数の正電荷を持つことに原因があると考えられる。逆にいえば、近位尿細管上皮細胞の刷子縁膜に存在するこの取り込み機構は、分子内に複数の正電荷を有する生体内物質を再吸収するための機構であると推察される。

2-b 低分子量タンパク質の輸送機構との関連

このように、管腔側におけるアミノグリコシド系抗生物質の取り込み機構は、複数の正電荷を持つ物質の再吸収機構であると考えられる。従ってこのような性質を持つ生体内物質の腎挙動を検討し、またこれがアミノグリコシド系抗生物質の腎挙動にどのような影響を与えるのか調べることによって、輸送機構の生理的意義を

見いだせる可能性がある。

アミノグリコシド系抗生物質は上皮細胞に取り込まれた後にリソソームに集積することが知られており、標識 Gentamicin の腎組織内動態をオートラジオグラフィによって追跡した報告^{100,101)}では、本抗生物質のリソソーム集積に至る一連の経過は次のように述べられている。はじめに尿細管刷子縁膜に一様に結合した標識 Gentamicin は、時間とともに一定の部位に集まり、やがて細胞質の小胞内へ取り込まれる。そしてこれらの小胞は互いに融合し、最終的にリソソームへと融合する結果、Gentamicin がリソソーム中へ濃縮されることになる。このような取り込み過程は、分子量7万以下の低分子量タンパク質の尿細管再吸収挙動に非常に類似している^{99,156-162)}。糸球体濾過によって尿細管へ排泄された低分子量タンパク質は、近位尿細管上皮細胞で endocytosis と呼ばれる機構で再吸収される。その後エンドソームと呼ばれる小胞内に取り込まれ、次いでリソソームへ輸送されて加水分解を受け、アミノ酸レベルにまで分解される¹⁶³⁻¹⁶⁵⁾。このタンパク質の再吸収機構は比較的基質特異性が低く、またグルコース輸送や有機イオン性薬物輸送とは異なり、明確な輸送担体が介在するものではないと考えられている¹⁶⁶⁻¹⁶⁸⁾。このような動態上の類似点が存在することから、まず低分子量タンパク質がアミノグリコシド系抗生物質の腎挙動に及ぼす影響を検討することとし、このようなタンパク質として約 14,400 の分子量を持つ Lysozyme と α -Lactalbumin を用いることにした。

投与溶液中に Lysozyme が共存する条件で同時投与実験を行った結果、標識 Tobramycin の管腔側取り込み率は減少することが示された(Table 3-6)。またタンパク質の再吸収阻害剤であるヨード酢酸¹⁶⁹⁾で灌流腎を前処理した場合にも、Tobramycin の取り込みは抑制された。同様な低分子量タンパク質による取り込み阻害効果は、標識 Isepamicin を用いた急速投与実験においても確認された(Table 3-6)。このような効果が示されたことから、アミノグリコシド系抗生物質の尿細管内での挙動は、低分子量タンパク質の再吸収機構と何等かの関係を持つものと考えられる¹⁷⁰⁾。

尿細管でのタンパク質の再吸収様式である endocytosis は細胞膜の大幅な変化をとともなうものであることから¹⁷¹⁾、endocytosis によって低分子量タンパク質の再吸収が活発に行われている場合には、細胞膜表面の広い範囲がかなり動的に変化しているものと考えられる。そしてこのような条件下でアミノグリコシド系抗生物質の尿管側挙動を検討した場合、その挙動に何等かの影響が現れるものと予想される。このため次に Lysozyme あるいは α -Lactalbumin を予め灌流液に溶存させて、これら

Table 3-6 Effects of lysozyme and other compounds on the luminal uptake of aminoglycoside. Lysozyme was dissolved only in the injection solution which contained radiolabeled aminoglycoside, and a 50 μ L-bolus administration into the renal artery was performed. The protein reabsorption inhibitor, iodoacetic acid (IAA) was dissolved in the perfusate at the concentration of 10mM.

	Tobramycin	
	Luminal uptake (%)	MTTu Ratio
Control	32.4 \pm 2.9	1.15 \pm 0.03
+ Lysozyme	11.05	1.21
IAA treatment	5.4	1.11

	Isepamicin	
	Luminal uptake (%)	MTTu Ratio
Control	26.4 \pm 3.1	1.12 \pm 0.03
+ Lysozyme	19.2 \pm 2.9*	1.02 \pm 0.03*
+ α -Lactalbumin	12.3 \pm 0.9**	1.09 \pm 0.05

のタンパク質が常に濾過され尿細管へ流れ込む定常条件を設定し、この条件でアミノグリコシド系抗生物質の腎挙動を検討した。

100 μ M Lysozyme の溶存実験で認められた典型的な標識 Tobramycin の流出曲線を Fig.3-14 に示す。この条件においてマーカ物質 Inulin の腎挙動の変化は認められなかったが、Tobramycin の尿管側流出曲線は大きく変化することが示され、またこれを反映して MTTu Ratio も著しく大きな値となった。急速投与後 15 分迄の測定値をもとに計算した標識 Tobramycin の取り込み率と MTTu Ratio との関係を、既に得られた測定値と重ねて Fig.3-15 に示す。今回得られた値は明らかに今までの傾向とは異なっており、そして Lysozyme 定常状態下では取り込み率よりも上皮細胞との相互作用が著しく亢進していることがわかる。Lysozyme による相互作用の亢進効果つまり MTTu Ratio の増加効果は、灌流液中の Lysozyme 濃度の上昇とともに増加する傾向にあった(Fig.3-16)。また Isepamicin 並びに Arbekacin の両アミノグリコシド系抗生物質の標識体を用いた検討でも、このような MTTu Ratio 増加は同様に観察された(Fig.3-16)。いずれのアミノグリコシド系抗生物質においても、その静脈側流出曲線に変化は認められなかった。

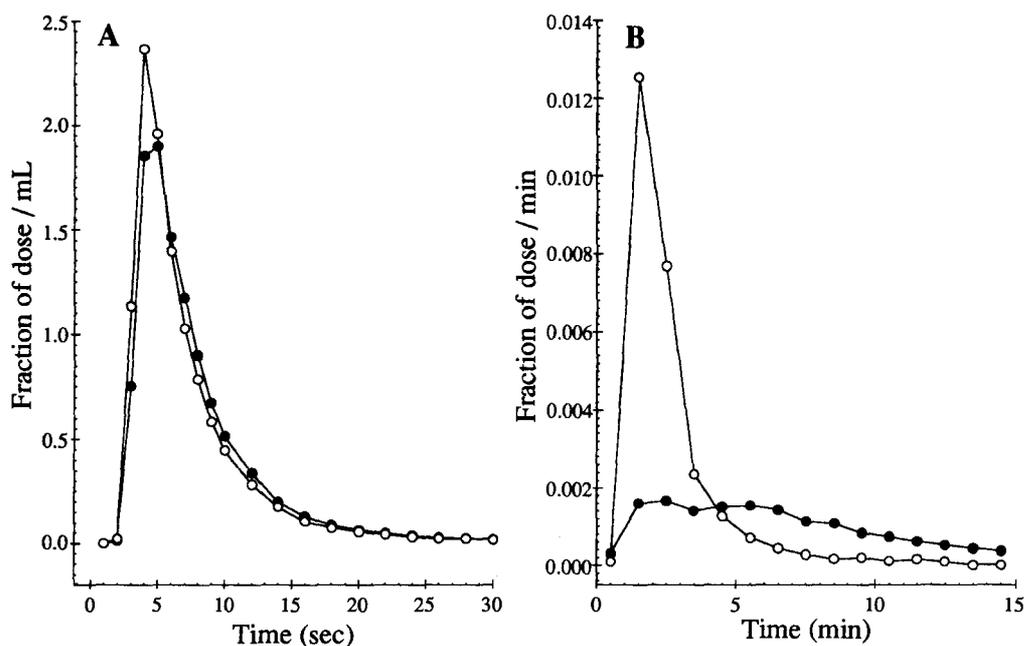


Fig. 3-14. Typical venous (panel A) and urinary (panel B) outflow profiles of [³H]tobramycin (●) and [¹⁴C]inulin (○). These profiles were given in the steady-state experiment in which lysozyme was dissolved in the perfusate at the concentration of 100μM, and a 50μL of the injection solution of [³H]tobramycin (7.4μM) was administered in the same way described previously. The MTTu Ratio was increased to 2.2 ± 0.1 from the control value 1.2 ± 0.0. There were not any detectable changes in the [¹⁴C]inulin profiles.

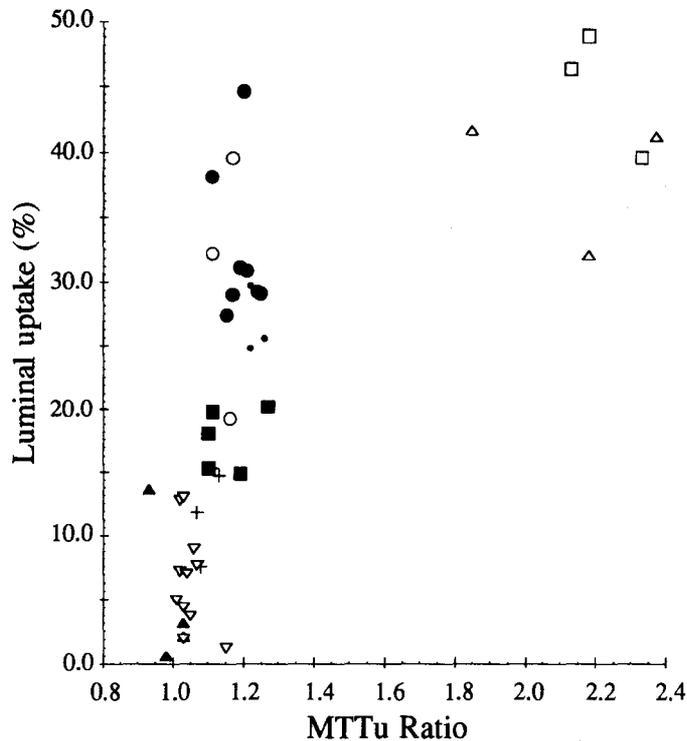


Fig. 3-15. Relationship between the luminal uptake of [³H]tobramycin and its MTTu Ratio was shown, figure 3-7 being overlaid. The data obtained from the steady-state experiments in which lysozyme was dissolved in the perfusate at the concentration of 1, 10, and 100μM were indicated by ○, △, and □, respectively. To avoid the jumble, all data from the inhibitory study were indicated by the same symbol ∇. See also the legend of figure 3-7.

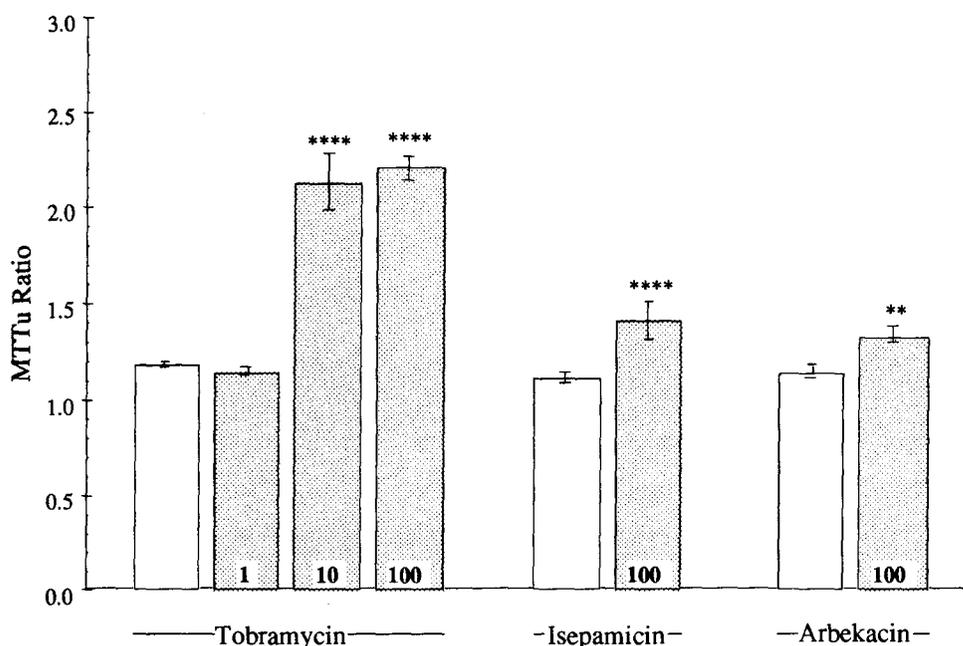


Fig. 3-16. Effect of lysozyme on MTTu Ratio of aminoglycoside antibiotics in the isolated perfused rat kidney. The concentration (μM) at which lysozyme was dissolved in the perfusate was indicated at the bottom of the closed column. The control value for each aminoglycoside was shown by the open column. In the control study, tobramycin, isepamicin, and arbekacin were dissolved in the injection solution at the concentration of $7.4\mu\text{M}$, 0.1mM , and 10mM , respectively.

Table 3-7 Effects of low molecular weight compounds on the luminal uptake of [^{14}C]isepamicin in the steady-state study. Each of compounds described below was dissolved in the perfusate and the injection solution at the concentration of $100\mu\text{M}$.

	Luminal uptake (%)	MTTu Ratio
Control	26.4 ± 3.1	1.12 ± 0.03
+ Lysozyme	24.5 ± 1.7	$1.41 \pm 0.10^{****}$
+ α -Lactalbumin	$15.2 \pm 2.5^*$	1.12 ± 0.04
+ Tobramycin	$13.3 \pm 0.8^*$	1.07 ± 0.01

一方、もう一つの低分子量タンパク質である α -Lactalbumin やアミノグリコシド系抗生物質自身 (Tobramycin) を同じく灌流液中に溶存させた定常条件では、上記のような MTTu Ratio の増加を認めることはできなかった (Table 3-7)。

2-c 考察

前節までに腎尿細管にアミノグリコシド系抗生物質の取り込み機構が存在することを示し、そしてこれが単なる受動的移行ではないことを見出してきた。本節ではこれに加えて、この取り込み機構と薬物との相互作用について検討し、薬物分子の持つ正帯電性が重要でありながらも単に正電荷を有するだけでは認識されないことを示してきた。しかし生体にとってアミノグリコシド系抗生物質は外因性物質であり、これを取り込むためだけの輸送機構であるとは考えにくい。

本実験において、Tobramycin や Isepamicin の取り込みが代表的な低分子量タンパク質 Lysozyme や α -Lactalbumin によって阻害されたことは、この疑問に対する解答を示すものであろう。尿細管上皮細胞には、糸球体濾過によって尿細管へ排泄された内因性の低分子量タンパク質を再吸収する機構が備わっていることが知られており、そしてアミノグリコシド系抗生物質は、低分子量タンパク質として上皮細胞に誤って認識されることによって取り込まれていくのであろう。そしてこの誤認識は、アミノグリコシド系抗生物質がその分子中に複数の正電荷を有することが原因であると考えられる。

では、そのタンパク質再吸収機構の性質・基質認識特性はどのようなものなのであろうか。Lysozyme の定常条件で認められた Tobramycin の腎挙動の変化から、その性質の一部を垣間見ることができそうである。上皮細胞のタンパク質の再吸収様式は細胞膜の流動・陥入をともなう receptor non-mediated endocytosis であると考えられている¹⁷²⁾。今回認められたアミノグリコシド系抗生物質の腎挙動の変化は、定常条件において尿細管へ大量に送り込まれた Lysozyme を再吸収するため、上皮細胞の endocytosis が活発になり¹⁷³⁾、そしてこの状態での細胞膜の変化が上皮細胞とアミノグリコシド系抗生物質との相互作用に影響し、これが流出曲線の変化となって現れたのであろう。相互作用の状態が変化しているということは、Fig.3-15 で取り込み率よりも MTTu Ratio の変化がより大きなものであることから推察できる。

今回用いた Lysozyme は等電点を 11.0 に持つ塩基性タンパク質である。このタンパク質は動植物界に広く分布している酵素であって、細菌細胞壁のムコペプチドに対する加水分解活性を有するため殺菌作用を示し、このため各種医薬品に配合されて臨床で使用されている。またもう一方の α -Lactalbumin は、この Lysozyme に非常によく類似した乳汁中に多く見られるタンパク質である。これらの、ともに分

分子量約 14,400 の低分子量タンパク質である Lysozyme と α -Lactalbumin は、アミノ酸配列において約 40% の相同性を示し、更に立体構造においても高い類似性を有している¹⁷⁴⁻¹⁷⁶⁾。しかし α -Lactalbumin は等電点を 4.5 に持つ酸性タンパク質であるため、pH 約 7.2 の灌流液中では、この 2 つのタンパク質は互いに正反対の電荷を帯びる。Lysozyme の共存実験で認められた Isepamicin の MTTu Ratio の変化が、 α -Lactalbumin の定常条件で認められなかったことは、両タンパク質の持つ電荷に起因するであろう。更に Lysozyme と同じ複数の正電荷を有する塩基性物質であっても、分子量約 470 の Tobramycin (この分子量は Lysozyme の 1/30 である) を定常条件で用いた場合には上述の変化が認められなかったことを考えると、これはあくまで推測の域を出るものではないが、複数の正電荷を有し、且つ、ある程度の分子量を持つということが、このタンパク質再吸収機構に認識される条件であると考えられる。

本節で行った検討を通して、アミノグリコシド系抗生物質の腎蓄積機構には、尿細管に存在するタンパク質の再吸収機構が深く関わっていることを強く示唆する知見を得ることができた。腎毒性の発現機構の解明には今回のような薬物移行特性の解析に加えて、薬物の細胞内挙動や生体成分との相互作用の解明など、更なる検討が必要である。しかしながら今回明らかにされた薬物移行過程とその性質に関する知見を基に、今後多くの研究が進展していくであろう。本研究がアミノグリコシド系抗生物質をより効果的に臨床使用していくための礎となるに留まらず、多くの医薬品副作用の抑止に繋がることを期待したい。

結 論

以上3章6節にわたり、薬物動態解析手法としての摘出臓器灌流実験系の確立について述べ、また本手法を用いて見出された知見に基づき薬物の腎輸送特性を論じてきた。以下に結論としてこれを纏める。

第I章 摘出腎灌流実験系の確立

ネフロンや血管系が入り組んだ複雑な構造を持つ腎の臓器レベルにおいて、尿細管上皮細胞が持つ薬物の輸送機構が如何に機能し、また制御されているかについては、未だ十分に検討が行われているとは言い難い。そこでまず最初に、腎の臓器レベルにおける薬物挙動に対する解析系の確立を試みた。その結果、牛赤血球を体積比10-20%で含有した灌流液の使用によって灌流臓器への酸素供給性を高め、生理機能が安定に維持された条件で、腎臓における薬物挙動を十分な信頼性のもとで解析可能な摘出腎灌流実験系を確立することができた。また、複雑な数学モデルを構築することなく薬物の臓器輸送特性を把握するために、モデル非依存的評価法であるモーメント法を動態解析に適用した。即ち、薬物を灌流腎の腎動脈に急速投与した際に得られる静脈側流出曲線から、その静脈内平均通過時間 MTT_v が算出でき、また薬物並びに糸球体濾過の指標であるイヌリンの尿中排泄挙動より、血管から上皮細胞に取り込まれた薬物が尿細管腔内へ分泌されるまでに要する時間、つまり上皮細胞平均通過時間 \bar{T}_{cell} が算出可能なことを見出した。そして種々の実験条件で、 MTT_v の増減より上皮細胞血管側に存在する薬物輸送系の性質を、また \bar{T}_{cell} の変化より尿細管刷子縁膜の薬物輸送特性を評価できることを示した。以上の実験系の確立により、尿細管上皮細胞の側底膜、刷子縁膜という2種類の膜を介した薬物の経細胞輸送過程を、臓器レベルで評価解析することがはじめて可能となった。

第II章 有機イオン性薬物の輸送機構の解析

多くの薬物は血液中でイオン型として存在していることから、第I章で確立した摘出腎灌流実験系を用いて、有機カチオン Tetraethylammonium 並びに有機アニ

オン *p*-Aminohippurate の 2 種類のモデル薬物を用い、腎の臓器レベルにおけるこれらの挙動を $MTTv$, $\bar{T}cell$ の両パラメータと尿中排泄率をもとに解析した。その結果、両薬物の尿中回収率は投与量の増加に伴って減少し、それぞれ飽和過程を有する輸送機構により尿細管分泌を受けることが示された。また Tetraethylammonium の尿中排泄は尿 pH 上昇条件で著しく抑制されること、そしてこのとき $\bar{T}cell$ が延長することを認めた。これは上皮細胞刷子縁膜での薬物輸送機構が阻害されていることを示すものであり、膜小胞系で報告されている有機カチオン輸送のプロトン勾配依存性とよく一致する結果であった。このように腎の臓器レベルでも上皮細胞管腔側のプロトン勾配が、有機カチオン分泌挙動の重要な因子となっていることを明らかにすることができた。

次に腎疾患と薬物輸送能との関係を明らかにする試みとして、実験的に腎障害を惹起した病態モデルラットから摘出腎灌流系を構築して、上記モデル薬物の腎挙動を解析した。両薬物の尿中排泄率はともに腎障害の進行に伴って減少することが確認されたが、 $MTTv$, $\bar{T}cell$ を用いて経細胞輸送能を評価したところ、有機アニオン輸送の場合、血管側の薬物輸送系が主に障害され、刷子縁膜側の分泌機構は殆ど影響を受けないことが示された。一方有機カチオンの場合には、血管側の輸送能は変化せず、刷子縁膜側の輸送能が著しく低下することが見出された。以上より、腎疾患時において有機アニオンとカチオンでは異なる経路を辿って腎排泄能が減弱していくことが明らかとなった。そしてアニオン性薬物の腎排泄においては、血管から上皮細胞内への薬物の取り込み過程が律速段階になること、一方カチオン性薬物の場合には、上皮細胞内から管腔内への分泌過程が律速となり腎蓄積性を示すことが推察された。

第III章 アミノグリコシド系抗生物質の腎蓄積機構に関する検討

摘出腎灌流実験系を用いて、その腎毒性が臨床上しばしば問題となるアミノグリコシド系抗生物質の腎挙動を Tobramycin をモデルに解析した。その結果、Tobramycin の取り込みは管腔側でのみ行われることが見出され、またこの取り込み過程は飽和性を有することや、アミノグリコシド系抗生物質は相互にこの取り込み過程を阻害することが明らかとなった。更に尿 pH 上昇条件で Tobramycin の取り込み率が減少したことから、薬物分子の持つ正電荷が取り込みの際に重要であること

が示唆された。しかし、有機カチオンである Tetraethylammonium やアミノ単糖の Glucosamine は正電荷を有しているにもかかわらず、Tobramycin の取り込みに対する阻害効果を示さなかった。さらに塩基性低分子量タンパク質 Lysozyme がアミノグリコシド系抗生物質の腎挙動に与える影響を検討したところ、同時投与実験でアミノグリコシド系抗生物質の取り込みが抑制される等、腎挙動の大幅な変化が観察された。これらの知見より、アミノグリコシド系抗生物質の腎蓄積性は、管腔内に存在する低分子量タンパク質の再吸収機序と密接に関係しているものと推察された。

以上、著者は腎臓の構造的特徴と生理機能を保持し、薬物挙動の詳細な解析が可能な摘出腎灌流実験系を確立した。そして本法を用いて有機イオン性薬物の腎挙動を検討し、尿pHや病態など薬物腎挙動の変動因子を臓器レベルにおいて定量的に明らかにした。さらにアミノグリコシド系抗生物質の腎特異的な蓄積が管腔側からの飽和性を有する取り込みに基づくことを示し、またこの挙動に影響を及ぼす因子についても明らかにすることができた。本研究で得られた結果は、薬物の腎排泄挙動を上皮細胞の膜輸送機構に基づいて解析し、また全身の薬物動態を予測する上で、重要な基礎的知見となるものと考えられる。

謝 辞

終わりに臨み、本研究に際して終始御指導御鞭撻並びに御訓誡を賜りました、前京都大学医学部教授・同附属病院薬剤部長・現近畿大学薬学総合研究所教授 堀了平 京都大学名誉教授に深甚なる謝意を申し上げます。

並びに、終始森厳なる御指導を賜ると共に、本研究を纏めるにあたり種々の御配慮を賜りました 乾賢一 京都大学医学部教授・同附属病院薬剤部長に篤く御礼申し上げます。また若輩の跋扈なる奢謬にも拘らず、その深識を御教授くださいました 小泉保 富山医科薬科大学薬学部教授、安原真人 東京医科歯科大学医学部教授に深謝いたします。

更に、研究当初非常な御苦勞を戴き、また実験全般にわたり有益な助言並びに援助を賜りました、山口大学医学部 神谷晃 教授、神戸大学医学部 谷川原祐介 助教授、及び、山口大学医学部 吉田久博 助教授に感謝いたします。

最後になりましたが、各種実験に際し貴重且つ献身的な御協力を賜りました、金田（旧姓林）美江修士、糸賀淑恵修士、清水宏賢学士、並びに諸先生に心より感謝の意を表し、謝辞といたします。

実験の部

第 I 章 摘出腎灌流実験系の確立

1 摘出灌流腎の構築

摘出灌流腎は Nishiitsutsuji-Uwo¹³⁾ の方法に準じて構築し、また必要箇所には若干の修正を加えた。以下に手順を示す。

Wistar 系雄性ラット (240-280g) に Pentobarbital (Nembutal[®], Abbott Laboratories) を 50 mg/kg の割合で左下腹部に投与する。そして麻酔下において下腹部より胸骨剣状突起直前までを、肝臓を傷つけぬように正中線に沿って開腹する。その後腎臓と周辺の血管系を露出させるため、脱脂綿を用いて小腸及び大腸腸管をラット体側左へ引き出して軽く固定する。次に右側輸尿管を確認し、付随する血管及び脂肪層を軽く剥離した後、当該輸尿管に縫合糸を 2 本通してそれぞれを軽く結わえる。この 2 本のうちの 1 本を尾部側へ引き下げ、そこで輸尿管を結紮する。輸尿管へのカニューレーションを容易にするために、尿管の結紮後、右大腿静脈より 10% Mannitol の生理食塩水溶液を 0.5 mL/Rat で投与する。

小綿球を用いて腹腔内及び脈管系周辺の脂肪を丁寧に取り除いた後、下大動脈と下大静脈とを左腎静脈分岐点尾部側で剥離し、Fig.4-1 に示すように下大静脈に 5 本 (剥離点から 3 本、腎静脈出口を挟んで 2 本) の縫合糸を掛ける。また右腎動脈に 1 本、そして腸管膜動脈にも 2 本の縫合糸をそれぞれ通し、軽く結わえる。

Mannitol の投与によって輸尿管が膨大するのを待って、ポリエチレン製医療チューブ (PE-10, Becton Dickinson & Co., NJ) を輸尿管尾部側より右腸腰静脈付近ま

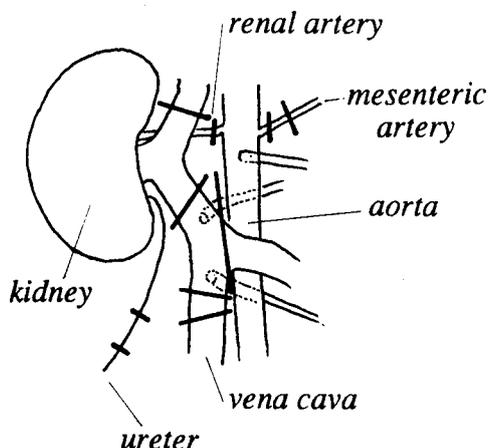


Fig. 4-1. Illustration of the vessels around the right kidney of Wistar male rat. The thick lines indicate where the vessels and ureter should be tied. The upper half of this schema is usually in the shade of the liver.

で挿入し、もう一方の縫合糸で確実に固定する。この際、先の輸尿管結紮に用いた縫合糸を支持糸とするとよい。また、このときに滑らかな尿流出が起きることを確認しておく。

腹腔内に大きな出血が無いことを確認した後、右大腿静脈より Heparine を 1,000 unit / kg で投与し、続いて速やかに左腎静脈を結紮する。次に下大静脈の最も尾部側に通した縫合糸を結紮し、これを支持糸として下大静脈にカテーテル (OD 2.0 mm, ID 0.8 mm) を挿入する。カテーテルの先端が右腎静脈付近で開口するようにカテーテルの位置を決めた後、静脈に通した残り 3 本の縫合糸のうち尾部側の 2 本を用いてこの静脈カテーテルを固定する。

次に灌流装置に接続された動脈カテーテル (20G needle, Terumo) を腎動脈に挿入する。まず腸管膜動脈に掛けられた 2 本の縫合糸のうち外側の 1 本を結紮し、更に大動脈とこの結紮点の間の腸管膜動脈をクランメルで挟み血流を止める。続いて先程結紮した縫合糸を支持糸として、速やかに腸管膜動脈に動脈カテーテルを挿入すると同時にクランメルを解放し、直ちにペリスタ・ポンプを作動させて動脈血が灌流回路へ逆流することを防ぐ。

動脈カテーテルの先端を腸管膜動脈内壁に沿わせながら大動脈内まで進ませ、これを右腎動脈開口部より腎動脈内へ挿入する。右腎動脈内への挿入を確認した後、ペリスタ・ポンプを静かに調節し、灌流圧が異常に高くない範囲内である程度の灌流速度を確保する。そして動脈カテーテルを腎動脈及び腸管膜動脈に掛けた残りの縫合糸で固定する。

最後に右腎静脈肝臓側に掛けた縫合糸で下大静脈を結紮して、右腎臓をラットの血流から切り離す。その後直ちに横隔膜を切断、開胸し、致死量の Pentobarbital を心臓に投与することによって、できる限り速やかにラットを死亡させる。

術式終了後、灌流液流量及び尿量と灌流圧が設定範囲内に収まるように確認しながらペリスタポンプを調節する。乾燥防止のため腹腔上には脱脂綿を数枚載せ、また保温の目的を兼ねて白熱灯で照明をおこなう。

2 灌流装置・灌流回路

灌流液は二重底ビーカー (リザーバ) に入れ、実験期間中 37°C に保温するとともに、攪拌子により常に攪拌を行ない血球が沈殿することのないように配慮した。

このリザーバと動脈カテーテルはポリエチレン製医療用チューブにより接続し、また灌流液はペリスタ・ポンプを動力源にして灌流した。また灌流回路内には、蛇管式冷却管を用いた保温器、エアートラップ、ラインフィルター（カワスミ輸血セットBF1、川澄化学工業）、灌流圧測定用の水銀柱及び、投与液投入部位となる輸血用Y字管（ディスプレイブル輸液用点滴セット病棟用VI、JMS大塚製薬）を設置した。灌流実験は腎一回通過型で行ない、再灌流形式即ち静脈流出液を再びリザーバに導入する形式での実験は行なわなかった。

3 灌流液の調製

(1) 濃厚赤血球液の調製

新鮮な牛血液（京都市第二市場）を脱脂綿を用いて濾過した後、3,000 rpm x 5min, 4°Cの条件で遠心を行い、その後の上清を白血球及び血小板層まで含めてアスピレータで吸引除去する。分離した赤血球と別途調製した Krebs-Henseleit Bicarbonate Buffer Solution (KHBB) とを等容に混合し、ここに4 unit/mLのHeparinを添加して、転倒混和する。その後再び上記条件で遠心分離を行なう。この操作を計4回繰り返すことにより牛赤血球を洗浄した。KHBBの組成はTable 4-1に示す。

Table 4-1 The composition of Krebs-Henseleit's Bicarbonate Buffer Solution

NaCl	115	mM
KCl	4.7	mM
CaCl ₂	2.5	mM
KH ₂ PO ₄	1.2	mM
MgSO ₄	1.2	mM
NaHCO ₃	25	mM

(2) 血球懸濁液の調製

血球懸濁液 500mL は酸素気流下 (95% O₂ + 5% CO₂) において次のように用時調製した。濃厚赤血球液 160mL に、一昼夜透析した14% アルブミンのKHBB溶液、KHBB、Glucoseをそれぞれ170mL, 170mL, 0.43g 加えて静かに転倒混和し、次いで

医療用スワンクフィルター (Nipro) を用いた濾過を行って血球懸濁液とした。この血球懸濁液は更に次の (3) に用いる。

(3) 灌流液の調製

血球懸濁液 475mL に 8 種のアミノ酸、Creatinine, Mannitol を添加し、全量を 500mL に調製して実験で使用する灌流液とした。最終的な灌流液組成は Table 4-2 に示した。更にこの灌流液に、投与溶液中の標識 Inulin と等しい濃度^{注1)}になるように非標識 Inulin を添加した。定常状態実験を行う際には、更にこれに加えて、投与液中の薬物濃度が灌流液中の薬物濃度と等しくなるように、その薬物を灌流液に添加した。Mannitolを除く添加薬物はすべて溶液にし、メンブラン・フィルター(0.22 μ m, Millipore) を用いて濾過を行なった後に灌流液へ添加した。

Table 4-2 The basic composition of the perfusate

Bovine Erythrocyte	10-20	v/v%
BSA	5	%
Amino acids		
Methionine	0.5	mM
Alanine	2.0	mM
Glycine	5.0	mM
Serine	2.0	mM
Arginine	1.0	mM
Proline	2.0	mM
Isoleucine	1.0	mM
Aspartic acid	3.0	mM
Glucose	5.0	mM
Creatinine	0.1	mg/mL
Mannitol	10.0	mg/mL
KHBB	ad 500	mL

4 投与液の調製

投与液は KHBB を基に調製し、これに最終濃度がそれぞれ 5%, 3.5 mg/mL に

注1) 標識 Inulin の購入ロットによりその値は異なるが、概ね ³H-Inulin を用いる場合には 60mg/L、¹⁴C-Inulin を用いる場合には 600mg/L 程度である。

なるように BSA 及び Evans Blue (以下EB)を加えた。また、投与液中にトリチウム標識体を 37 kBq 及びカーボン標識体を 3.7 kBq の割合で存在させた場合に、液体シンチレーションカウンタで適度な計数值(トリチウムの計数効率を 45%、37 kBq = 1×10^6 cpm として計算)が得られるため、これに基づき投与液中の薬物濃度は、必要最小限の標識薬物に非標識薬物を加えて、Tetraethylammonium (TEA) の場合は 1mM、*p*-Aminohippurate (PAH) の場合は 0.1 mM に調製した。

5 灌流条件の設定と実験条件の確認

灌流速度は、灌流圧がほぼ 120-200 mmHg 及び尿流量が 50-200 μ L/min の範囲に収まり、且つ灌流速度自身が 5-6 mL/min 程度になるように調節した。また予め静脈側流出液を 1 分間メスシリンダに採取し、流速が所定の範囲に設定されていることを確認した後に実験を開始した。灌流圧は灌流回路に接続されている水銀柱を用いて目測した。灌流実験系の状態は術式の熟練度に加えてラット側の因子に左右されるため、ある程度のバラツキがあることを前提に実験を行なう必要がある。従って実験毎に Creatinine の尿中排泄速度を測定して糸球体濾過速度を推定し、更にグルコースやナトリウム並びに水の再吸収率を考慮に加えて、実験条件が良好か否かの判定基準とした。これらの他に実験開始前の尿 pH や終了後の腎重量、更に灌流液のヘマトクリット値やアルブミン濃度も実験毎に測定した。これらが異常値を示した場合、その実験より得られた値は解析の際に除外した。

6 腎灌流実験及び薬物挙動の検討

術式終了後、20 分の平衡期間をおき、灌流圧・尿流速等の実験指標が安定したことを確認した上で薬物の腎挙動実験を開始した。また薬物急速投与直前の尿管側流出液を 2 分間採取してグルコース及びナトリウム再吸収率算出用のサンプルとした。尿 pH は尿管カテーテルから流出直後の流出液 pH を pH 試験紙 (BTB type, MR type, アドバンテック東洋) を用いて測定した。更に実験期間の前後 2 回、灌流液をリザーバより直接採取してヘマトクリット値を測定し、2 値の平均を個々の実験におけるヘマトクリット値とした。平均灌流速度は実験期間中に腎を通過した灌流液の全体積を実験時間の 15 分で除して求めた。また一方で、各採取間隔で採取

された静脈側サンプルの液量よりその時点における灌流速度を算出して、実験期間中の灌流速度の変動を評価した。灌流圧は実験開始後1分毎に測定した。糸球体濾過率は実験開始前後のリザーバ中灌流液と、実験開始直前並びに3分毎の尿サンプル中の Creatinine 濃度を測定して求めた。

平衡期間終了後、灌流回路に設けられた投与部位より専用注射針を腎動脈内へ挿入し、投与液 50 μ L を急速投与すると同時に静脈側流出液及び尿の採取を開始した。実験期間は15分とし、尿は1分毎に、また静脈側は、投与直後は1秒毎に、以後適宜間隔を2秒、5秒、15秒、1分と広げてサンプリングを行なった。灌流実験に用いた腎臓は、実験終了後に被膜を剥離し軽く水分を除いて秤量した。その後 20 w/v% ホモジネートを精製水を用いて調製し、腎臓内薬物定量用サンプルとした。各尿サンプルはそれぞれ秤量し風袋との差をもって尿流量とした。また定量操作に必要な体積(約50 μ L)に満たない尿サンプルについては、生理食塩水あるいは精製水を適宜添加して再び秤量した。尿サンプルは定量まで凍結保存した。静脈側サンプルは秤量後 12,000 rpm x 2 min、あるいは量が多いものについては 3,000 rpm x 10 min の条件で遠心し、上清部分(便宜上プラズマと呼ぶ)を分取して薬物定量に供した。サンプリングには予め秤量したマイクロチューブ(Eppendorf)を用いた。

静脈側流出液中の薬物濃度推移は、採取サンプルチューブ中の薬物濃度を投与薬物量を1とした値、即ち Fraction of dose / mL で表記した。尿中薬物排泄速度は同様に Fraction of dose / min で示した。

7 定量法

(1) 標識薬物の定量

[³H]-Inulin, [¹⁴C]-Tetraethylammonium, [¹⁴C]-*p*-Aminohippurate の定量は液体シンチレーション・カウンタを用いて行なった。計測時間は通常5分とした。シンチレーション用サンプルは以下のように調製した。まずプラズマ、尿、腎ホモジネート及び投与液を適宜希釈し、各々 50 μ L をバイアルに分取した。これに 0.5mL の NCS tissue solubilaizer (Amersham Laboratories) を加えて均一な溶液とし、これに 7mL のシンチレーション・カクテル (POPOP 0.5 %, PPO 0.03 % Toluene Solution) を加えて測定用サンプルとした。またバックグランドカウントは実験開始前に採取したプラズマと生理食塩水、並びに別のラットの腎より調製したホモジネートを用いて測定した。

またこれとは別に、プラズマ、尿、ホモジネートの各サンプル間のクエンチング比率を測定し、くわえて溶血状態が測定値に与える影響や、EBによる着色とクエンチングとの関係に関する予備検討を行なって、各事象に対する補正係数を算出した。

液体シンチレーション・カウンタはダブルレンジで運用した。即ち β 線エネルギー18keVまでをトリチウム由来のものとし、それより高エネルギーのものはカーボン由来のものとして計測した。またこの場合カーボン由来の18 keV以下の β 線がトリチウムレンジで検出されるため、予めカーボン標識化合物のみをダブルレンジで測定し、この場合にトリチウムレンジで測定される β 線の割合を求めてこのspill overに対する補正係数を決めた。各サンプルの測定値はこの値で補正した。

(2) EBの定量

10 μ Lまたは50 μ Lのプラズマサンプルに精製水1 mLを加えた後、610 nmの吸光度を測定した。

(3) Creatinineの定量

アルカリ・ピクレート法により発色させ520 nmの吸光度を測定した。

プラズマサンプルの場合、0.2mLのサンプルに、精製水、タングステン酸ナトリウム(10%)、2/3規定の硫酸をそれぞれ0.6mL,0.2mL,0.4mL加えて攪拌し、10分間の室温インキュベーションの後、12,000 rpm x 10 minの遠心を行なって上清を分取した。この上清をCreatinine定量用に供した。

(4) グルコース、ナトリウム並びにアルブミンの定量

グルコース定量に際しては市販のアッセイキット(o-トルイジン・ほう酸法、グルコーステスト・ワコー、和光純薬工業)を用いた。各サンプル中のナトリウム濃度はナトリウム電極(堀場製作所)を用いて測定し、アルブミンはビュレット反応を用いて分光光度計で測定した。

(5) PAH代謝率の測定

PAHの灌流腎における代謝量は常法に従って、高速液体クロマトグラフで測定した。まず灌流実験法に準じて0.1 mM PAHを含む灌流液でラット腎臓を15分間灌流しプラズマ及び尿を採取した。その後各サンプルの波長275nmにおける吸光度を測定し、PAHとその代謝物であるN-acetyl-PAHを定量した。移動相は10% Methanol - 90% Phosphate buffer (10 mM pH 7.0 with 10 mM Tetrabutylammonium bromide)とし、流速1.0 mL/minで用いた。カラムはreversed-phase Chemcosorb 5-ODS-Hを使用した。

(6) 赤血球への薬物移行性の検討

標識及び非標識薬物を用いて最終濃度 0.1 mM になるように灌流液中へ PAH 及び TEA を添加した。5分間のインキュベーションの後に遠心分離を行ない、得られた上清及赤血球分画の放射線量をそれぞれカウントして赤血球への薬物分配率を算出した。その結果、両薬物の血球分配率は1%以下であり、無視できるものと判断した。

(7) タンパク結合率の測定

KHBB 溶液のアルブミン濃度5%の条件で、薬物濃度 0.1 mM における PAH 並びに TEA のタンパク結合率を、標識化合物を用いた限外濾過法により測定した。即ち薬物溶液 1 mL を Micropartition System, YMT-membrane (Amicon) に適用し、室温で 1500 rpm x 10min の遠心操作を施すことによって、結合及び非結合分画を得、両者の薬物量の比率を測定した。

8 試薬

[³H]-Inuline (104 GBq/mmol) は New England Nuclear (Boston, MA) より、[¹⁴C]-PAH (2.13 GBq/mmol) および [¹⁴C]-TEA (137 MBq/mmol) は Amersham Laboratories (Buckinghamshire, U.K.) より購入した。アルブミン (脱塩) は Bovine Serum Albumin (以下BSA) を用い、これは Organon Teknika (Boxtel, Holland) のものを使用した。また Heparine (1000unit/mL) は小玉・ノボインダストリーのものを用いた。この他の各試薬はすべて特級、若くはより高純度のものを使用した。以下、試薬は特に表記がない限り試薬特級を用いた。

9 データ解析並びに統計処理

実験結果は Mean ± S.E. で表示した。統計的有意差は分散分析を行なった後に Student t-test を用いて検出し、危険率 5% 以下を以て有意差ありと判定した。有意差に関する危険率 P は記号 * を用いて、別途記載の無い限り *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.005, ****p<0.001 と統一的に表示した。

第II章 有機イオン性薬物の輸送機構の解析

1 摘出灌流腎の構築

第I章（上述）に準じる。以下特に記述がない限り、実験手法はすべて先例に従った。

2 灌流液の調製

（1）灌流液の調製

本章第1節1-aの用量依存性の検討、並びに本章第2節の腎障害時の薬物挙動の検討においては、第I章の3に準じて灌流液の調製を行った。第1節1-bの定常条件における灌流実験では、灌流液中の非標識 TEA あるいは PAH の濃度が投与溶液中と等しくなるように、即ち両薬物が最終濃度 0.1 mM に添加されるように、灌流液中の各組成の最終濃度を変更することなくこれを調製した。

（2）尿 pH の増減

尿酸性度の増加（酸性化）は上記の灌流液を調製した後、更に 4.15% のリン酸二水素ナトリウム NaH_2PO_4 水溶液を 7 mL 添加したものをを用いた。

尿酸性度の減少（アルカリ化）は上記の灌流液を調製した後、5%の炭酸水素ナトリウム NaHCO_3 水溶液を 7 mL 添加したものをを用いた。これらの添加容積は、その添加によって灌流液の pH が変動しないように、予め KHBB の緩衝能を検討して決定した。

3 投与液の調製

投与液は上述第I章の4に準じて調製した。また第1節1-bでは TEA あるいは PAH の投与溶液中濃度が 0.1 mM になるように調製した。第2節の急速投与実験では TEA, PAH の投与液中濃度はそれぞれ 1mM, 0.1mM に調製した。

4 実験的腎障害ラットの作成

Uranyl Nitrate の 10 mg/mL 生理食塩水溶液を調製し、ラット背部皮下にこれを 10 mg/kg の用量で投与して腎障害を惹起した。投与時刻は、そのラットを用いて

摘出腎灌流系を構築する時刻より逆算して決めた。このため本論中に記述した「薬物投与後の時刻」はその前後に1時間程度の誤差がある。また灌流腎構築の術式開始直前にこれら腎障害ラットの右頸静脈より血液を採取し、腎障害の進行を把握するため腎機能の指標である血中尿素窒素BUNと血清 Creatinine 濃度の測定に供した。

5 定量法

(1) 血中尿素窒素の定量

尿素窒素の定量は diacetylmonoxime 法 佐々木の変法 を用いて行った。即ち、diacetylmonoxime 6.0g/L, tiousemicarbazide 0.3g/L の水溶液 20 mL を 34% リン酸 100mL と混合したものを用時調製し、試料 20 μ L にこれを 3 mL 加え、20分間の煮沸による呈色操作の後、吸収波長 540nm で各サンプルを測定した。

(2) 血清 Creatinine の定量

第 I 章の 7 定量法 の (3) Creatinine の定量 に準じた。

6 備考

特に記述のない調製法、定量法、試薬、その他については第 I 章に準じた。

第III章 アミノグリコシド系抗生物質の腎蓄積機構に関する検討

1 摘出灌流腎の構築

第I章に準じる。

2 灌流装置・灌流回路

第I章の2の装置及び回路に、以下に述べる若干の改良を加えたものを用いた。いずれも灌流腎の機能を明らかに向上させるためのものであり、改良前後においてマーカ物質の腎挙動に本質的な変化は認められなかった。

主な改良点は、灌流回路の保守及び点検を容易にするために各種装置の簡素化を図った点である。まずリザーバとペリスタ・ポンプとの間にスワンクフィルター(Nipro)を配し、微粒子の除去をインライン方式とした。これにともない従来のラインフィルターは廃止した。またエアトラップをより大型のものに変更し、また灌流液の保温をウォータージャケット方式とした。更に酸素負荷方式として微多孔質ポリプロピレン中空糸(KPF190M, 三菱レイヨン)を用いる方法を採用し、負荷効率を向上させた。

またより正確に薬物挙動を把握するために、急速投与の際に生じる投与液の逆流を抑制し投与波形をより δ に近づけるために、従来のY字管を用いる投与方式に換えて、皮下針1/6(村中医療器)を用いた灌流回路直接^{せんさく}穿鑿方式を採用した。

3 灌流液の調製

灌流液中に混入する微細粒子を極力除くために濾過過程を強化した。まず上述のようにスワンクフィルターを灌流回路に組み込んだインライン方式の微粒子濾過過程を追加した。更にBSA溶液の取り扱いについても変更し、一昼夜平衡透析を施した溶液を孔径1.2, 0.45, 0.22 μm のメンブラン・フィルター(Millipore-Filter, typeRA, HA, GS, Millipore)を用いて順次濾過した後、第I章の3に準じた灌流液調製法に供することにした。

また実験期間中、安定した尿流量を確保するために、Mannitolの濃度を最終濃度で1%から3%に変更した。この変更によるマーカ物質の腎挙動に質的な変化は認められなかった。

尿 pH 変動時の薬物挙動の検討は、第 II 章の 2 の手法に準じて行なった。

低分子量タンパク質の再吸収阻害剤のモノヨード酢酸は、これを最終濃度 10mM で灌流液に溶存させ、当該実験に供した。

定常状態実験で使用した低分子量タンパク質並びに Tobramycin は、最終濃度 100 μ M でそれぞれを灌流液に溶存させた。Lysozyme の場合には、更に最終濃度 1 μ M, 10 μ M に調製した灌流液も用意した。定常条件における灌流腎は術式終了直後より実験終了まで、この灌流液を用いて灌流される。

4 投与液の調製

今回使用可能であったアミノグリコシド系抗生物質の放射標識体は、薬物によってトリチウム標識体、あるいはカーボン標識体であったため、マーカ物質として用いた Inulin の放射標識体は、使用するアミノグリコシド系抗生物質がトリチウム標識体である場合にはカーボンで、カーボン標識体の場合にはトリチウムで標識されたものをそれぞれ用いた。

また第 I 章において、薬物挙動は Inulin の挙動との比較のみで十分に論じられることが示され、EB-albumin の挙動を必ずしも必要としなくてもよいことが明らかとなり、また投与液中の EB による着色に起因するクエンチングをなるべく避ける意味から、本章で行った実験では投与液中の EB 濃度を従来の半分の 1.75 mg/mL とした。それでも EB を添加した大きな理由は、実験操作上その青色により投与後の薬物挙動の概要を視覚的に捉えることが必要であったからである。

濃度依存実験での投与液は上記に準じ、標識薬物に非標識薬物を加えて希望濃度に調製した。標識体のみを用いて調製できる各薬物の現実的な最低濃度は、Tobramycin 7.4 μ M, Isepamicin 0.1mM, Arbekacin 10mM であった。これらの濃度は総論の部でトレーサー濃度あるいはコントロール濃度と表記した。

共存阻害実験では、併用薬物を 100mM の濃度で投与液中に共存させた。但し Kanamycin はその溶解度の制約から約 63 mM の濃度で阻害実験を行なった。この Kanamycin 濃度は Ames TDA Tobramycin assay kit (マイルス・三共) を用い、抗体の交差認識を利用して測定した値である。また薬物共存条件での Tobramycin のタンパク結合率は第 I 章の 7 に準じて測定し、データ解析の際の参考資料とした。

Lysozyme による共存実験の場合は、溶解度の関係上、投与液中の Lysozyme 濃度を 100 μ M とすることが困難であったので、調製上可能な最高濃度である約 10 μ M で同時投与実験を行なった。

低分子量タンパク質再吸収阻害剤であるモノヨード酢酸は、灌流液にのみ添加することとし、薬物の状態が投与以前に変化することを避けるために、これを投与液中には添加しなかった。

5 薬物挙動の検討

静脈側流出液のサンプリング・プロトコルを一部変更した。即ちモーメント・パラメータの算出には5分までの測定値で十分であるため、この時点までのサンプリング・プロトコルは従来どおりとし、それ以降の15分までの静脈側流出液は一括して集め、回収率計算にのみに用いることとした。尿採取プロトコル及びその他の手順は第I章の6に準じた。

非標識薬物による灌流腎の前処理実験においては、非標識 Tobramycin の濃度 1 mM の投与溶液を調製し、まずこの投与液 50 μ L を通常の手法で急速投与した。そして3分後若くは5分後に標識 Tobramycin を含んだ濃度 1mM の通常の投与液を従来どおり急速投与し、得られる流出曲線を解析した。

後処理実験、所謂「追い出し」実験の場合には、トレーサー濃度の Tobramycin を含んだ投与液を通常どおりに急速投与した後、30秒、3分または5分経過後に非標識 Tobramycin の濃度 50mM の投与液 50 μ L を同様に投与した。この場合のサンプリング・プロトコル及びその他の手順はすべて通常と同じものとした。

なお、これら2種の実験については予備検討的な性格が強く、また安定した条件で実験が行なわれて実験群間の差がかなり小さいことが予想されたため、実験例数を各1例として行なった。

6 定量法

各薬物の定量法並びにタンパク結合率の測定は第I章の7に準じた。また Tobramycin の血球移行性を検討したところ、その値は測定限界以下であった。

7 試薬

[³H]-Tobramycin (181GBq/mmol) は Amersham Laboratories (Buckinghamshire, U.K.) より購入した。また [³H]-Arbekacin (17.6MBq/mmol) は明治製菓 (株) (Tokyo, Japan)、また [¹⁴C]-Isepamicin (888MBq/mmol) は東洋醸造 (株) (Shizuoka, Japan) (現旭化成) の御好意により提供されたものを使用した。[³H]-Inuline (13.1GBq/g) 及び [Methoxy-¹⁴C]-Inulin (380-620MBq/g) は New England Nuclear (Boston, MA) より入手した。非標識の Tobramycin, Gentamicin, Neomycin, Kanamycin は Sigma Chemical Co. (St.Louis, MO) のものを使用し、また非標識 Isepamicin は標識体同様に東洋醸造から供された物を用いた。モノヨード酢酸及び塩化 Lysozyme (refined) は Nacalai tesque (Kyoto, Japan)、 α -Lactalbumin (Enzymatic Hydrolysate) は Sigma Chemical Co. よりそれぞれ購入した。この他各試薬はすべて特級若くはより高純度のものを使用した。

8 備考

第I章・第II章との比較において、第III章では灌流液調製法の変更に起因するものと思われるヘマトクリット値の若干の上昇が認められ、その値は約 17% 前後を示した。また投与方法の変更にともなってマーカ物質 Inulin の静脈内平均通過時間の短縮が認められた。このため上述の一連の変更ににより薬物腎挙動が受ける影響の大きさを把握するために、新旧の灌流実験装置での Inulin 及び PAH (0.1mM) の分布容積を比較したところ、第I章の装置ではそれぞれ 0.97 ± 0.02 , 7.48 ± 0.94 であり、第III章のものでは 0.57 ± 0.03 , 5.8 ± 0.8 であった。このように灌流手法と投与方法の変更にともなう入力波形の変化が、流出波形にある程度の影響を及ぼすため、両章での測定値を直接比較する際には各種の補正が必要である。

論文目録

本研究は、以下の論文として発表した。

Moment Analysis of Drug Disposition in kidney: Transcellular Transport Kinetics of *p*-Aminohippurate in the Isolated Perfused Rat Kidney

Journal of Pharmaceutical Sciences **77**: 471-476, 1988

Moment Analysis of Drug Disposition in kidney II: Urine pH Dependent Tubular Secretion of Tetraethylammonium in the Isolated Perfused Rat Kidney

Journal of Pharmaceutical Sciences **79**: 692-697, 1990

Moment Analysis of Drug Disposition in kidney III: Transport of *p*-Aminohippurate and Tetraethylammonium in the Perfused Kidney Isolated from Uranyl Nitrate-induced Acute Renal Failure Rats

Journal of Pharmaceutical Sciences **79**: 249-256, 1990

Renal Handling of Tobramycin in the Isolated Perfused Rat Kidney

Journal of Pharmaceutical Sciences **83**: 723-726, 1994

引用文献

- 1) TISHER, C.C.: Anatomy of the kidney. In: *The kidney*, ed., by BRENNER, B.B., AND RECTOR, F.C.Jr., W.B.Saunders Company, Philadelphia, pp. 3-75, 1981.
- 2) MAFFLY, R.H.: The body fluids: volume, composition, and physical chemistry. In: *The kidney*, ed., by BRENNER, B.B., AND RECTOR, F.C.Jr., W.B.Saunders Company, Philadelphia, pp. 76-115, 1981.
- 3) HEBERT, S.C., SCHAFFER, J.A., AND ANDREOLI, T.E.: Principles of membrane transport. In: *The kidney*, ed., by BRENNER, B.B., AND RECTOR, F.C.Jr., W.B.Saunders Company, Philadelphia, pp. 116-143, 1981.
- 4) 堀了平、「生物薬理学」、有田隆一・村田敏郎共編、南江堂、pp.175-202, 1982
- 5) RENNICK, B., ZIEMNIAK, J., SMITH, I., TAYLOR, M., AND ACARA, M.: Tubular transport and metabolism of cimetidine in chicken kidneys. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **228**: 387-392, 1984.
- 6) KINSELLA, J.L., HOLOHAN, P.D., PESSAH, N.I., AND ROSS, C.R.: Transport of organic ions in renal cortical luminal and antiluminal membrane vesicles. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **209**: 443-450, 1979.
- 7) PRATT, W.B.: The entry, distribution, and elimination of drugs. In: *Principles of drug action*, ed., by PRATT, W.B., AND TAYLOR, P., pp.201-296, Churchill Livingstone Inc., New York, 1990.
- 8) HORI, R., TOMITA, Y., KATSURA, T., YASUHARA, M., INUI, K-I., AND TAKANO, M.: Transport of bestatin in rat renal brush-border membrane vesicles. *Biochem. Pharmacol.* **45**: 1763-1768, 1993.
- 9) TAKANO, M., INUI, K-I., OKANO, T., SAITO, H., AND HORI, R.: Carrier-mediated transport systems of tetraethylammonium in rat renal brush-border and basolateral membrane vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* **773**: 113-124, 1984.
- 10) HORI, R., TAKANO, M., OKANO, T., KITAZAWA, S., AND INUI, K-I.: Mechanisms of *p*-aminohippurate transport by brush-border and basolateral membrane vesicles isolated from rat kidney cortex. *Biochim. Biophys. Acta* **692**: 97-100, 1982.
- 11) TAKANO, M., HIROZANE, K., OKAMURA, M., TAKAYAMA, A., NAGAI, J., AND HORI, R.: *p*-Aminohippurate transport in apical and basolateral membranes of the OK kidney epithelial cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **269**: 970-975, 1994.
- 12) HORI, R., OKAMURA, M., TAKAYAMA, A., HIROZAME, K., AND TAKANO, M.: Transport of organic anion in the OK kidney epithelial cell line. *Am. J. Physiol.* **264**: F975-980, 1993.
- 13) NISHITSUTSUJI-UWO, J.M., ROSS, B.D., AND KREBS, H.A.: Metabolic activities of the isolated perfused rat kidney. *Biochem. J.* **103**: 852-862, 1967.

- 14) HALL, S., AND ROWLAND, M.: Influence of fraction unbound upon the renal clearance of furosemide in the isolated perfused rat kidney. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **232**: 263-268, 1985.
- 15) LIEBERTHAL, W., VASILEVSKY, M.L., VALERI, C.R., AND LEVINSKY, N.G.: Interactions between ADH and prostaglandins in isolated erythrocyte-perfused rat kidney. *Am. J. Physiol.* **252**: F331-337, 1987.
- 16) MILLER, J.H.: Sodium-sensitive, probenecid-insensitive *p*-aminohippuric acid uptake in cultured renal proximal tubule cells of the rabbit. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **199**: 298-304, 1992.
- 17) STEFFGEN, J., SCHEYERL, F., GRÜNDEMANN, D., KIENLE, S., FRANZ, H.E., AND KOEPESELL, H.: Characterization of *p*-aminohippurate transport from rat kidney which is expressed after injection of size-selected mRNA into oocytes of *Xenopus laevis*. *Biochim. Biophys. Acta* **1149**: 145-150, 1993.
- 18) SHEIKH, M.I., AND STAHL, M.: Characteristics of accumulation of probenecid by rabbit kidney cortical slices. *Am. J. Physiol.* **232**: F513-523, 1977.
- 19) SPRINGATE, J., HASAN, M., RENNICK, B., FELD, F.L., AND ACARA, M.: Relation between transport maxima and inhibition of organic cation excretion in the chicken kidney. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **240**: 400-403, 1987.
- 20) WEINER, I.M., AND ROTH, L.: Renal excretion of cimetidine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **216**: 516-520, 1981.
- 21) FEI, Y-J., KANAI, Y., NUSSBERGER, S., GANAPATHY, V., LEIBACH, F.H., ROMERO, M.F., SINGH, S.K., BORON, W.F., AND HEDIGER, M.A.: Expression cloning of a mammalian proton-coupled oligopeptide transporter. *Nature* **368**: 563-566, 1994.
- 22) CAMARGO, M.J.F., SUMPPIO, B.E., AND MAACK, T.: Renal hydrolysis of absorbed protein: influence of load and lysosomal pH. *Am. J. Physiol.* **247**: F656-664, 1984.
- 23) 「理化学辞典」、岩波書店、1982
- 24) 北村元仕、塚田理康、長野弘、「生化学データブック」、日本生化学会編、東京化学同人、pp.1541-1563, 1979.
- 25) SHANLEY, P.F., AND JOHNSON, G.C.: Adenosine nucleotides, transport activity and hypoxic necrosis in the thick ascending limb of Henle. *Kidney Int.* **36**: pp.823-830, 1989.
- 26) SMITH, E.L., HILL, R.L., LEHMAN, I.R., LEFKOWITZ, R.J., HANDLER, P., AND WHITE, A.: Principles of biochemistry: Mammalian biochemistry.: 市川厚、鈴木旺、脊山洋右、富田謙吉、水上茂樹、山科郁男、山羽力共訳、廣川書店、pp.690-718, 1985.
- 27) LIEBERTHAL, W., STEPHENS, G.W., WOLF, E.F., RENNKE, H.G., VASILEVSKY, M.L., VALERI, C.R., AND LEVINSKY, N.G.: Effect of erythrocyte on the function and morphology of the isolated perfused rat kidney. *Renal Physiol. (Basel)* **10**: 14-24,

- 1987.
- 28) CARVALHO, J.S.: Renal perfusion disorders. In: *Renal pathophysiology. The essentials*, ed., by ABUELO, J.G., pp. 164-180, Williams & Wilkins, Baltimore, 1989.
 - 29) HIGAKI, K., KADONO, K., GOTO, S., AND NAKANO, M.: Stereoselective renal tubular secretion of an organic anion in the isolated perfused rat kidney. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **270**: 329-335, 1994.
 - 30) PAGEL, H., AND STOLTE, H.: On the glomerular mechanism of the renal protein excretion. *Renal Physiol. Biochem.* **15**: 249-256, 1992.
 - 31) STEINHAUSEN, M., ENDLICH, K., AND WIEGMAN, D.L.: Glomerular blood flow. *Kidney Int.* **38**: 769-784, 1990.
 - 32) ROSS, B.D.: The isolated perfused rat kidney. *Clin. Sci. Mol. Med.* **55**: 513-521, 1978.
 - 33) YAMAOKA, K., NAKAGAWA, T., AND UNO, T.: Statistical moments in pharmacokinetics. *J. Pharmacokin. Biopharm.* **6**: 547-558, 1978.
 - 34) HE, Y-L., Ph. D. Thesis; Kyoto University, Kyoto, Japan, 1991.
 - 35) MIHARA, K., Ph. D. Thesis; Kyoto University, Kyoto, Japan, 1994.
 - 36) 角谷敏之、橋田充、「生物薬剤学 最近の進歩」、伊賀立二、奥村勝彦共編、薬業時報社、pp.142-155, 1989.
 - 37) 山岡清、「マイコンによる薬物体内動態解析法」、山岡清著、南江堂、1984.
 - 38) 山岡清、中川照真、森隆治、宇野豊三、「線形ガスクロマトグラフィーにおける直列カラムのモーメントベクトルの加成性」、*分析化学* **24**: 84-88, 1975.
 - 39) 谷川原祐介、「最新生物薬剤学」、小泉保、粟津莊司共編、南江堂、pp.257-282, 1991.
 - 40) ROBERTS, G.W., LARSON, K.B., AND SPAETH, E.E.: The interpretation of mean transit time measurements for multiphase tissue systems. *J. Theor. Biol.* **39**: 447-475, 1973.
 - 41) RENNICK, B.R.: Renal tubular transport of organic cations. *Am. J. Physiol.* **240**: F83-89, 1981.
 - 42) HORI, R., HE, Y-L., SAITO, Y., KAMIYA, A., AND TANIGAWARA, Y.: Moment analysis of drug disposition in kidney. V: in vivo transepithelial transport of *p*-aminohippurate in rat kidney. *J. Pharmacokin. Biopharm.* **19**: 51-70, 1991.
 - 43) GRIFFITHS, D.A., HALL, S.D., AND SOKOL, P.P.: Interaction of 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT) with organic ion transport in rat renal basolateral membrane vesicles. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **257**: 149-155, 1991.
 - 44) GRIFFITHS, D.A., HALL, S.D., AND SOKOL, P.P.: Effect of 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT) on organic ion transport in rat renal brush border membrane vesicles. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **260**: 128-133, 1992.
 - 45) INUI, K-I., TAKANO, M., OKANO, T., AND HORI, R.: Role of chloride on carrier-mediated transport of *p*-aminohippurate in rat renal basolateral membrane vesicles.

- Biochim. Biophys. Acta* **855**: 425-428, 1986.
- 46) TAKANO, M., INUI, K-I., OKANO, T., AND HORI, R.: Cimetidine transport in rat brush border and basolateral membrane vesicles. *Life Sci.* **37**: 1579-1585, 1985.
 - 47) KINNE-SAFFRAN, E., AND KINNE, R.K.H.: Isolation of luminal and contraluminal plasma membrane vesicles from kidney. *Methods Enzymol.* **191**: 450-469, 1990.
 - 48) HORI, R., OKAMURA, N., AIBA, T., AND TANIGAWARA, Y.: Role of p-glycoprotein in renal tubular secretion of digoxin in the isolated perfused rat kidney. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **266**: 1620-1625, 1993.
 - 49) 乾賢一、「最新生物薬剤学」、小泉保、粟津莊司共編、南江堂、pp.139-154, 1991.
 - 50) INUI, K-I., TAKANO, M., OKANO, T., AND HORI, R.: H⁺ gradient-dependent transport of aminocephalosporins in rat renal brush border membrane vesicles: role of H⁺/organic cation antiport system. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **233**: 181-185, 1985.
 - 51) FRANCO, R., CENTELLES, J.J., AND KINNE, R.K.H.: Further characterization of adenosine transport in renal brush-border membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **1024**: 241-248, 1990.
 - 52) 乾賢一：「腎尿細管上皮細胞における薬物輸送機構」
In: 「薬学研究の進歩・研究成果報告集3」、薬学研究奨励財団、pp.69-88, 1987
 - 53) HORI, R., MAEGAWA, H., KATO, M., KATSURA, T., AND INUI, K-I.: Inhibitory effect of diethyl pyrocarbonate on the H⁺/organic cation antiport system in rat renal brush-border membranes. *J. Biol. Chem.* **264**: 12232-12237, 1989.
 - 54) HORI, R., MAEGAWA, H., OKANO, T., TAKANO, M., AND INUI, K-I.: Effect of sulfhydryl reagents on tetraethylammonium transport in rat renal brush border membranes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **241**: 1010-1016, 1987.
 - 55) KLEINMAN, J.G., BROWN, W.W., WARE R.A., AND SCHWARTZ, J.H.: Cell pH and acid transport in renal cortical tissue. *Am. J. Physiol.* **239**: F440-444, 1980.
 - 56) ADAM, W.R., KORETSKY, A.P., AND WEINER, M.W.: ³¹P-NMR in vivo measurement of renal intracellular pH: effects of acidosis and K⁺ depletion in rats. *Am. J. Physiol.* **251**: F904-910, 1986.
 - 57) RECTOR, F.C.JR: Sodium, bicarbonate, and chloride absorption by the proximal tubule. *Am. J. Physiol.* **244**: F461-471, 1983.
 - 58) MALNIC, G., AND MELLO-AIRES, M.: Kinetic study of bicarbonate reabsorption in proximal tubule of the rat. *Am. J. Physiol.* **220**: 1759-1767, 1971.
 - 59) 佐々木成、「腎臓」、黒川清、今井正共編、南江堂、pp.199-206, 1989.
 - 60) CLARK, D.D.: Acid-base disorders. In: *Renal pathophysiology. The essentials*, ed., by ABUELO, J.G., pp. 79-115, Williams & Wilkins, Baltimore, 1989.
 - 61) MAEGAWA, H., KATO, M., INUI, K-I., AND HORI, R.: pH sensitivity of H⁺/organic cation antiport system in rat renal brush-border membranes. *J. Biol. Chem.* **263**:

- 11150-11154, 1988.
- 62) 越川昭三、「腎臓」、黒川清、今井正共編、南江堂、pp.190-198, 1989.
 - 63) YASUHARA, M., AND LEVY, G.: Kinetics of drug action in disease states. XXVII.: Effect of experimental renal failure on the pharmacodynamics of zoxazolamine and chlorzoxazone. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **246**: 165-169, 1988.
 - 64) BENNETT, W.M., PLAMP, C.E., PARKER, R.A., GILBERT, D.N., HOUGHTON, D.C., AND PORTER, G.A.: Renal transport of organic acid and bases in aminoglycoside nephrotoxicity. *Antimicrob. Agents Chemother.* **16**: 231-233, 1979.
 - 65) INUI, K-I., TAKANO, M., MAEGAWA, H., KATO, M., AND HORI, R.: Decreased transport of *p*-aminohippurate in renal basolateral membranes isolated from rats with acute renal failure. *Pharm. Res.* **6**: 954-957, 1989.
 - 66) BENNETT, W.M., SINGER, I., AND COGGINS, C.H.: Guide to drug usage in adult patients with impaired renal function. *JAMA* **223**: 991-997, 1973.
 - 67) HORI, R., TAKANO, M., OKANO, T., AND INUI, K-I.: Transport of *p*-aminohippurate, tetraethylammonium and D-glucose in renal brush border membranes from rats with acute renal failure. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **233**: 776-781, 1985.
 - 68) LASKIN, O.L., LONGSTRETH, J.A, KRASNY, H.C., KEENEY, R.E., ROCCO, L., AND LIETMAN, P.S.: Effect of renal failure on the pharmacokinetics of acyclovir. *Am. J. Med.* **73**: 197-201, 1982.
 - 69) SHICHIRI, M., ITOH, H., IWAMOTO, H., HIRATA, Y., AND MARUMO, F.: Renal tubular hypouricemia: evidence for defect of both secretion and reabsorption. *Nephron* **56**: 421-426, 1990.
 - 70) SCHWARTZ, S., BRATER, D.C., POUND, D., GREEN, P.K., KRAMER, W.G., AND RUDY, D.: Bioavailability, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of torsemide in patients with cirrhosis. *Clin. Pharmacol. Ther.* **54**: 90-97, 1993.
 - 71) 「田辺製薬医療用医薬品添付文書集」、田辺製薬株式会社、1992
 - 72) 「武田医療用医薬品添付文書集」、武田薬品工業株式会社、1993
 - 73) MONKS, T.J., AND LAU, S.S.: Commentary: renal transport processes and glutathione conjugate-mediated nephrotoxicity. *Drug Metab. Dispos.* **15**: 437-441, 1987.
 - 74) PRICE, K.E.: Aminoglycoside research 1975-1985: prospects for development of improved agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* **29**: 543-548, 1986.
 - 75) ZASKE, D.F: Aminoglycosides. In: *Applied pharmacokinetics*, ed., by EVANS, W.E., SCHENTAG, J.J., AND JUSKO, W.J., Applied Therapeutics, Spokane, pp.331-381, 1986.
 - 76) BOWLES, K.B., AND SCHENTAG, J.J.: Aminoglycosides commentary. In: *Applied pharmacokinetics*, ed., by EVANS, W.E., SCHENTAG, J.J., AND JUSKO, W.J., Applied Therapeutics, Spokane, pp.382-398, 1986.

- 77) EDSON, R.S., AND TERRELL, C.L.: The aminoglycosides. *Mayo Clin. Proc.* **66**: 1158-1164, 1991.
- 78) HORI, R., YAMAMOTO, K., SAITO, H., KOHNO, M., AND INUI, K-I.: Effect of aminoglycoside antibiotics on cellular functions of kidney epithelial cell line (LLC-PK₁): a model system for aminoglycoside nephrotoxicity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **230**: 742-748, 1984.
- 79) GHOSH, P., AND CHATTERJEE, S.: Effects of gentamicin on sphingomyelinase activity in cultured human renal proximal tubular cells. *J. Biol. Chem.* **262**: 12550-12556, 1987.
- 80) MARCHE, P., KOUTOUZOV, S., AND GIRARD, A.: Impairment of membrane phosphoinositide metabolism by aminoglycoside antibiotics: streptomycin, amikacin, kanamycin, dibekacin, gentamicin and neomycin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **227**: 415-420, 1983.
- 81) WALKER, P.D., AND SHAH, S.V.: Gentamicin enhanced production of hydrogen peroxide by renal cortical mitochondria. *Am. J. Physiol.* **253**: C495-499, 1987.
- 82) KUHAR, M.J., MAK, L.L., AND LIETMAN, P.S.: Autoradiographic localization of [³H]-gentamicin in the proximal renal tubules of mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* **15**: 131-133, 1979.
- 83) SASTRASINH, M., KNAUSS, T.C., WEINBERG, J.M., AND HUMES, H.D.: Identification of the aminoglycoside binding site in rats renal brush border membranes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **222**: 350-358, 1982.
- 84) LIPSKY, J.J., CHENG, L., SACKTOR, B., AND LIETMAN, P.S.: Gentamicin uptake by renal tubule brush border membrane vesicles. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **215**: 390-393, 1980.
- 85) COLLIER, V.U., LIETMAN, P.S., AND MITCH, W.E.: Evidence for luminal uptake of gentamicin in the perfused rat kidney. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **210**: 247-251, 1979.
- 86) PASTORIZA-MUNOZ, E., BOWMAN, R.L., AND KALOYANIDES, G.J.: Renal tubular transport of gentamicin in the rat. *Kidney Int.* **16**: 440-450, 1979.
- 87) SENEKJIAN, H.O., KNIGHT, T.F., AND WEINMAN, E.J.: Micropuncture study of the handling of gentamicin by the rat kidney. *Kidney Int.* **19**: 416-423, 1981.
- 88) BENNETT, W.M., PLAMP, C.E., ELLIOTT, W.C., PARKER, R.A., AND PORTER, G.A.: Effect of basic amino acids and aminoglycosides on ³H-gentamicin uptake in cortical slices of rat and human kidney. *J. Lab. Clin. Med.* **99**: 156-162, 1982.
- 89) WILLIAMS, P.D., AND HOTTENDORF, G.H.: [³H]Gentamicin uptake in brush border and basolateral membrane vesicles from rat kidney cortex. *Biochem. Pharmacol.* **35**: 2253-2256, 1986.
- 90) HSU, C.H., KURTZ, T.W., AND WELLER, J.M.: In vitro uptake of gentamicin by rat

- renal cortical tissue. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **12**: 192-194, 1977.
- 91) SOKOL, P.P., HUIATT, K.R., HOLOHAN, P.D., AND ROSS, C.R.: Gentamicin and verapamil compete for a common transport mechanism in renal brush border membrane vesicles. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **251**: 937-942, 1989.
 - 92) HORI, R., OKUDA, M., OHISHI, Y., YASUHARA, M., AND TAKANO, M.: Surface binding and intracellular uptake of gentamicin in the cultured kidney epithelial cell line (LLC-PK₁). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **261**: 1200-1205, 1992.
 - 93) SHETH, A.U., SENEKJIAN, H.O., BABINO, H., KNIGHT, T.F., AND WEINMAN, E.J.: Renal handling of gentamicin by the Munich-Wistar rat. *Am. J. Physiol.* **241**: F645-648, 1981.
 - 94) SAITO, H., INUI, K-I., AND HORI, H.: Mechanisms of gentamicin transport in kidney epithelial cell line (LLC-PK₁). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **238**: 1071-1076, 1986.
 - 95) ARAMAKI, Y., TAKAHASHI, M., INABA, A., ISHII, Y., AND TSUCHIYA, S.: Uptake of aminoglycoside antibiotics into brush border membrane vesicles and inhibition of (Na⁺+K⁺)-ATPase activity of basolateral membrane. *Biochim. Biophys. Acta* **862**: 111-118, 1986.
 - 96) JOSEPOVITZ, C., LEVINE, R., FARRUGGELLA, T., LANE, B., AND KALOYANIDES, G.J.: [³H]Netilmicin binding constants and phospholipid composition of renal plasma membranes of normal and diabetic rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **233**: 298-303, 1985.
 - 97) WILLIAMS, P.D., BENNETT, D.B., GLEASON, G.R., AND HOTTENDORF, G.H.: Correlation between renal membrane bindings and nephrotoxicity of aminoglycosides. *Antimicrob. Agents Chemother.* **31**: 570-574, 1987.
 - 98) ISHIKAWA, Y., INUI, K-I., AND HORI, R.: Gentamicin binding to brush border and basolateral membranes isolated from rat kidney cortex. *J. Pharmacobio-Dyn.* **8** : 931-941, 1985.
 - 99) JUST, M., ERDMANN, G., AND HABERMANN, E.: The renal handling of polybasic drugs. 1. gentamicin and aprotinin in intact animals. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **300**: 57-66, 1977.
 - 100) SILVERBLATT, F.J., AND KUEHN, C.: Autoradiography of gentamicin uptake by the rat proximal tubule cell. *Kidney Int.* **15**: pp.335-345, 1979.
 - 101) WEDEEN, R.P., BATUMAN, V., CHEEKS, C., MARQUET, E., AND SOBEL, H.: Transport of gentamicin in rat proximal tubule. *Lab. Invest.* **48**: 212-223, 1983.
 - 102) LECOMPTE, J., DUMONT, L., HILL, J., DU SOUICH, P., AND LELORIER, J.: Effect of water deprivation and rehydration on gentamicin disposition in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **218**: 231-236, 1981.
 - 103) SCHENTAG, J.J., JUSKO, W.J., VANCE, J.W., CUMBO, T.J., ABRUTYN, E., DeLATTRE, M., AND GERBRACHT, L.M.: Gentamicin disposition and tissue

- accumulation on multiple dosing. *J. Pharmacokin. Biopharm.* **5**: 559-577, 1977.
- 104) SOBERON, L., BOWMAN, R.L., PASTORIZA-MUNOZ, E., AND KALOYANIDES, G.J.: Comparative nephrotoxicities of gentamicin, netilmicin and tobramycin in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **210**: 334-343, 1979.
- 105) LUFT, F.C., BLOCH, R., SLOAN, R.S., YUM, M.N., COSTELLO, R., AND MAXWELL, D.R.: Comparative nephrotoxicity of aminoglycoside antibiotics in rats. *J. Infect. Dis.* **138**: 541-545, 1978.
- 106) WALKER, P.D., AND SHAH, S.V.: Evidence suggesting a role for hydroxyl radical in gentamicin-induced acute renal failure in rats. *J. Clin. Invest.* **81**: 334-341, 1988.
- 107) CRONIN, R.E., NIX, K.L., FERGUSON, E.R., SOUTHERN, P.M., AND HENRICH, W.L.: Renal cortex ion composition and Na-K-ATPase activity in gentamicin nephrotoxicity. *Am. J. Physiol.* **242**: F477-482, 1982.
- 108) SCHWERTZ, D.W., KREISBERG, J.I., AND VENKATACHALAM, M.A.: Effects of aminoglycosides on proximal tubule brush border membrane phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **231**: 48-55, 1984.
- 109) WILLIAMS, P.D., TRIMBLE, M.E., CRESPO, L., HOLOHAN, P.D., AND ROSS, C.R.: Inhibition of renal Na⁺, K⁺-adenosine triphosphatase by gentamicin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **231**: 248-253, 1984.
- 110) HOLOHAN, P.D., SOKOL, P.P., ROSS, C.R., COULSON, R., TRIMBLE, M.E., LASKA, D.S., AND WILLIAMS, P.D.: Gentamicin-induced increases in cytosolic calcium in pig kidney cells (LLC-PK₁). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **247**: 349-354, 1988.
- 111) KNAUSS, T.C., WEINBERG, J.M., AND HUMES, H.D.: Alterations in renal cortical phospholipid content induced by gentamicin: time course, specificity, and subcellular localization. *Am. J. Physiol.* **244**: F535-546, 1983.
- 112) AHMED, K., GOUELI, S.A., AND WILLIAMS-ASHMAN, H.G.: Polyamine-like effects of aminoglycosides on various messenger-independent protein kinase reactions. *Biochim. Biophys. Acta* **966**: 384-389, 1988.
- 113) FELDMAN, S., WANG, M-Y., AND KALOYANIDES, G.J.: Aminoglycosides induced a phospholipidosis in the renal cortex of the rat: an early manifestation of nephrotoxicity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **220**: 514-520, 1982.
- 114) HAGIWARA, M., INAGAKI, M., KANAMURA, K., OHTA, H., AND HIDAKA, H.: Inhibitory effects of aminoglycosides on renal protein phosphorylation by protein kinase C. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **244**: 355-360, 1988.
- 115) ARAMAKI, Y., INABA, A., HOSODA, J-I., AND TSUCHIYA, S.: Interaction of aminoglycosides with heparan sulfate from rat kidney. *Chem. Pharm. Bull.* **35**: 756-760, 1987.
- 116) RAMSAMMY, L.S., JOSEPOVITZ, C., LANE, B., AND KALOYANIDES, G.J.: Effect of

- gentamicin on phospholipid metabolism in cultured rabbit proximal tubular cells. *Am. J. Physiol.* **256**: C204-213, 1989.
- 117) MORIYAMA, T., NAKAHAMA, H., FUKUHARA, Y., HORIO, M., YANASE, M., ORITA, Y., KANADA, T., KANASHIRO, M., AND MIYAKE, Y.: Decrease in the fluidity of brush-border membrane vesicles induced by gentamicin. A spin-labeling study. *Biochem. Pharmacol.* **38**: 1169-1174, 1989.
- 118) HORI, R., SAITO, H., IWATA, T., AND INUI, K-I.: Interaction of gentamicin with atrial natriuretic polypeptide receptors in renal cells. *Biochem. Pharmacol.* **38**: 1359-1361, 1989.
- 119) MINGEOT-LECLERCQ, M-P., PIRET, J., BRAUSSEUR, R., AND TULKENS, P.M.: Effect of acidic phospholipids on the activity of lysosomal phospholipases and on their inhibition by aminoglycoside antibiotics I. Biochemical analysis. *Biochem. Pharmacol.* **40**: pp.489-497, 1990.
- 120) MINGEOT-LECLERCQ, M-P., PIRET, J., TULKENS, P.M., AND BRAUSSEUR, R.: Effect of acidic phospholipids on the activity of lysosomal phospholipases and on their inhibition by aminoglycoside antibiotics II. Conformational analysis. *Biochem. Pharmacol.* **40**: pp.499-506, 1990.
- 121) SAITO, H., Ph. D. Thesis; Kyoto University, Kyoto, Japan, 1988.
- 122) OKUDA, M., TAKANO, M., YASUHARA, M., AND HORI, R.: Inhibition of apical membrane enzyme activities and protein synthesis by gentamicin in a kidney epithelial cell line LLC-PK₁. *Chem. Pharm. Bull.* **40**: 3307-3310, 1992.
- 123) BENNETT, W.B., MELA-RIKER, L.M., HOUGHTON, D.C., GILBERT, D.N., AND BUSS, W.C.: Microsomal protein synthesis inhibition: an early manifestation of gentamicin nephrotoxicity. *Am. J. Physiol.* **255**: F265-269, 1988.
- 124) CRAIG, W.A., AND VOGELMAN, B.: The postantibiotic effect. *Ann. Intern. Med.* **106**: 900-902, 1987.
- 125) VOGELMAN, B., AND CRAIG, W.A.: Kinetics of antimicrobial activity. *J. Pediatr.* **108**: 835-840.
- 126) BENNETT, W.M., PLAMP, C.E., GILBERT, D.N., PARKER, R.A., AND PORTER, G.A.: The influence of dosage regimen on experimental gentamicin nephrotoxicity: dissociation of peak serum levels from renal failure. *J. Infect. Dis.* **140**: 576-580, 1979.
- 127) POWELL, S.H., THOMPSON, W.L., LUTHE, M.A., STERN, R.C., GROSSNIKLAUS, D.A., BLOXHAM, D.D., GRODEN, D.L., JACOBS, M.R., DiSCENNA, A.O., CASH, H.A., AND KLINGER, J.D.: Once-daily vs. continuous aminoglycoside dosing: efficacy and toxicity in animal and clinical studies of gentamicin, netilmicin, and tobramycin. *J. Infect. Dis.* **147**: 918-932, 1983.
- 128) REINER, N.E., BLOXHAM, D.D., AND THOMPSON, W.L.: Nephrotoxicity of

- gentamicin and tobramycin given once daily or continuously in dogs. *J. Antimicrob. Chemother.* **4**: 85-101, 1978.
- 129) VERPOOTEN, G.A., GIULIANO, R.A., VERBIST, L., EESTERMANS, G., AND De BROE, M.E.: Once-daily dosing decreases renal accumulation of gentamicin and netilmicin. *Clin. Pharmacol. Ther.* **45**: 22-27, 1989.
- 130) WOOD, C.A., NORTON, D.R., KOHLHEPP, S.J., KOHNEN, P.W., PORTER, G.A., HOUGHTON, D.C., BRUMMETT, R.E., BENNETT, W. M., AND GILBERT, D.N.: The influence of tobramycin dosage regimens on nephrotoxicity, ototoxicity, and antibacterial efficacy in a rat model of subcutaneous abscess. *J. Infect. Dis.* **158**: 13-22, 1988.
- 131) PRINS, J.M., BÜLLER, H.R., KUIJPER, E.J., TANGE, R.A., AND SPEELMAN, P.: Once versus thrice daily gentamicin in patients with serious infections. *Lancet* **341**: 335-339, 1993.
- 132) LEVISON, M.E.: New dosing regimens for aminoglycoside antibiotics. *Ann. Intern. Med.* **117**: 693-694, 1992.
- 133) MENDELSON, J., PORTNOY, J., DICK, V., AND BLACK, M.: Safety of the bolus administration of gentamicin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **9**: 633-638, 1976.
- 134) NAKAHAMA, H., FUKUHARA, Y., ORITA, Y., YAMAUCHI, A., TAKAMA, T., AND KAMADA, T.: Furosemide accelerates gentamicin accumulation in cultured renal cells (LLC-PK₁ Cells). *Nephron* **53**: 138-141, 1989.
- 135) INOUE, S., NIIZATO, T., KOMIYA, I., YUDA, Y., AND YAMADA, Y.: Mode of protective action of fosfomycin against dibekacin-induced nephrotoxicity in the dehydrated rats. *J. Pharmcobio-Dyn.* **5**: 941-950, 1982.
- 136) WILLIAMS, P.D., HOTTENDORF, G.H., AND BENNETT, D.B.: Inhibition of renal membrane binding and nephrotoxicity of aminoglycosides. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **237**: 919-925, 1986.
- 137) KISHORE, B.K., VAN SCHEPDAEL, A., LAURENT, G., LAMBRICHT, P., CLAES, P.J., PIRET, J., TULKENS, P.M., AND MALDAGUE, P.: Co-Oxydextran as a protectant against gentamicin-induced renal lysosomal phospholipidosis and focal tubular necrosis. In: *Kidney, proteins and drugs, contributions to nephrology*, ed., by BIANCHI, C., BOCCI, V., CARONE, F.A., AND RABKIN, R., KARGER, Basel, vol 101, pp. 213-219, 1993.
- 138) JOSEPOVITZ, C., PASTORIZA-MUNOZ, E., TIMMERMAN, D., SCOTT, M., FELDMAN, S., AND KALOYANIDES, G.J.: Inhibition of gentamicin uptake in rat renal cortex in vivo by aminoglycosides and organic polycations. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **223**: 314-321, 1982.
- 139) KACEW, S.: Inhibition of gentamicin-induced nephrotoxicity by pyridoxal-5'-phosphate in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **248**: 360-366, 1989.

- 140) RAMSAMMY, L.S., JOSEPOVITZ, C., LANE, B.P., AND KALOYANIDES, G.J.: Polyaspartic acid protects against gentamicin nephrotoxicity in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **250**: 149-153, 1989.
- 141) RAMSAMMY, L., JOSEPOVITZ, C., LANE, B., AND KALOYANIDES, G.J.: Polyaspartic acid inhibits gentamicin-induced perturbations of phospholipid metabolism. *Am. J. Physiol.* **258**: C1141-1149, 1990.
- 142) BEAUCHAMP, D., LAURENT, G., MALDAGUE, P., ABID, S., KISHORE, B.K., AND TULKENS, P.M.: Protection against gentamicin-induced early renal alterations (phospholipidosis and increased DNA synthesis) by coadministration of poly-L-aspartic acid. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **255**: 858-866, 1990.
- 143) KISHORE, B.K., KÁLLAY, Z., LAMBRICHT, P., LAURENT, G., AND TULKENS, P.M.: Mechanism of protection afforded by polyaspartic acid against gentamicin-induced phospholipidosis. I. Polyaspartic acid binds gentamicin and displaces it from negatively charged phospholipid layers in vitro. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **255**: 867-874, 1990.
- 144) KISHORE, B.K., LAMBRICHT, P., LAURENT, G., MALDAGUE, P., WAGNER, R., AND TULKENS, P.M.: Mechanism of protection afforded by polyaspartic acid against gentamicin-induced phospholipidosis. II. Comparative in vitro and in vivo studies with poly-L-aspartic, poly-L-glutamic and poly-D-glutamic acids. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **255**: 875-885, 1990.
- 145) KOJIMA, R., ITO, M., AND SUZUKI, Y.: Studies on the nephrotoxicity of aminoglycoside antibiotics and protection from these effects (7): effect of latamoxef on binding of tobramycin to brush border membranes isolated from rat kidney cortex. *Jap. J. Pharmacol.* **51**: 465-473, 1989.
- 146) WHITTEM, T., SCHNELLMANN, R.G., AND FERGUSON, D.C.: Poly-L-aspartic acid does but triiodothyronine does not protect against gentamicin-induced cytotoxicity in the porcine kidney cell Line LLC-PK₁. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **262**: 834-840, 1992.
- 147) KISHORE, B.K., IBRAHIM, S., LAMBRICHT, P., LAURENT, G., MALDAGUE, P., AND TULKENS, P.M.: Comparative assessment of poly-L-aspartic and poly-L-glutamic acids as protectants against gentamicin-induced renal lysosomal phospholipidosis, phospholipiduria and cell proliferation in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **262**: 424-432, 1992.
- 148) KIKUCHI, S., ARAMAKI, Y., NONAKA, H., AND TSUCHIYA, S.: Effect of dextran sulfate on renal accumulation of gentamicin. *Pharm. Res.* **7**: 644-647, 1990.
- 149) GILBERT, D.N., WOOD, C.A., KOHLHEPP, S.J., KOHNEN, P.W., HOUGHTON, D.C., FINKBEINER, H.C., LINDSLEY, J., AND BENNETT, W.M.: Polyaspartic acid prevents experimental aminoglycoside nephrotoxicity. *J. Infect. Dis.* **159**: 945-953, 1989.

- 150) UEKAMA, K., SHIOTANI, K., IRIE, T., ISHIMARU, Y., AND PITHA, J.: Protective effects of cyclodextrin sulphates against gentamicin-induced nephrotoxicity in the rat. *J. Pharm. Pharmacol.* **45**: 745-747, 1992.
- 151) KITAMURA, S., KODA, S., AND MORIMOTO, Y.: Identification of organic salts formed by interaction with cefazolin and aminoglycoside antibiotics. *J. Pharm. Sci.* **77**: 468-470, 1988.
- 152) RAYMOND, G.G., AND BORN, J.L.: An updated pKa listing of medicinal compounds. *Drug Intelligence Clin. Pharmacy* **20**: 683-686, 1986.
- 153) CHIU, P.J.S., MILLER, G.H., LONG, J.F., AND WAITZ, J.A.: Renal uptake and nephrotoxicity of gentamicin during urinary alkalization in rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **6**: 317-326, 1979.
- 154) BRAUSSEUR, R., LAURENT, G., RUYSSCHAERT, J.M., TULKENS, P.: Interactions of aminoglycoside antibiotics with negatively charged lipid layers. Biochemical and conformational studies. *Biochem. Pharmacol.* **33**: pp. 629-637, 1984.
- 155) PETERSON, L.N.: Inhibition of tobramycin reabsorption in nephron segments by metabolic alkalosis. *Kidney Int.* **37**: pp.1492-1499, 1990.
- 156) JUST, M., AND HABERMANN, E.: The renal handling of polybasic drugs. 2. in vitro studies with brush border and lysosomal preparations. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **300**: 67-76, 1977.
- 157) BIRN, H., AND CHRISTENSEN, E.I.: The distribution of calcitonin in rat kidney: an immunocytochemical study. In: *Kidney, proteins and drugs, contributions to nephrology*, ed., by BIANCHI, C., BOCCI, V., CARONE, F.A., AND RABKIN, R., KARGER, Basel, vol 83, pp. 75-81, 1990.
- 158) VIAU, C., WOUTERS, J-R., AND CHOUINARD, S.: Inhibition of the renal tubular reabsorption of rat beta-2-microglobulin by lysozyme in perfused rat. In: *Kidney, proteins and drugs, contributions to nephrology*, ed., by BIANCHI, C., BOCCI, V., CARONE, F.A., AND RABKIN, R., KARGER, Basel, vol 83, pp. 88-92, 1990.
- 159) NIELSEN, J.T., NIELSEN, S., AND CHRISTENSEN, E.I.: Handling of lysozyme in isolated perfused proximal tubules. *Am. J. Physiol.* **251**: F822-830, 1986.
- 160) SCHÖTTKE, H., SCHWARTZ, R., AND BAUMANN, K.: Effect of low-molecular-weight proteins on protein (lysozyme) binding to isolated brush-border membranes of rat kidney. *Biochim. Biophys. Acta* **770**: 210-215, 1984.
- 161) HYSING, J., TOLLESHAUG, H., AND CURTHOYS, N.P.: Reabsorption and intracellular transport of cytochrome c and lysozyme in rat kidney. *Acta Physiol. Scand.* **140**: 419-427, 1990.
- 162) SIMONNET, H., GAUTHIER, C., GIRE, V., AND BAVEREL, G.: Protein endocytosis by a kidney tubule suspension: metabolic requirements. *Biochim. Biophys. Acta* **1189**:

- 152-162, 1994.
- 163) COJOCEL, C., MAITA, K., BAUMANN, K., AND HOOK, J.B.: Renal processing of low molecular weight proteins. *Pflügers Arch.* **410**: 333-339, 1984.
 - 164) HYSING, J., AND TOLLESHAUG, H.: Quantitative aspects of the uptake and degradation of lysozyme in the rat kidney in vivo. *Biochim. Biophys. Acta* **887**: 42-50, 1986.
 - 165) DORIS, W., AND MAACK, T.: Endocytic uptake, transport, and catabolism of proteins by epithelial cells. *Am. J. Physiol.* **248**: C12-20, 1985.
 - 166) NEUHAUS, O.W.: Renal reabsorption of low molecular weight proteins in adult male rats: α_{2u} -globulin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **182**: 531-539, 1986.
 - 167) MAACK, T.: Renal handling of low molecular weight proteins. *Am. J. Med.* **58**: 57-64, 1975.
 - 168) SUMPPIO, B.E., AND MAACK, T.: Kinetics, competition, and selectivity of tubular absorption of proteins. *Am. J. Physiol.* **243**: F379-392, 1982.
 - 169) MAACK, T., JOHNSON, V., KAU, S.T., FIGUEIREDO, J., AND SIGULEM, D.: Renal filtration, transport, and metabolism of low-molecular-weight proteins: a review. *Kidney Int.* **16**: pp.251-270, 1979.
 - 170) COJOCEL, C., AND HOOK, J.B.: Effects of acute exposures to gentamicin on renal handling of proteins. *Toxicology* **28**: 347-356, 1983.
 - 171) WILEMAN, T., HARDING, C., AND STAHL, P.: Receptor-mediated endocytosis. *Biochem. J.* **232**: 1-14, 1985.
 - 172) BIRN, H., CHRISTENSEN, E.I., AND NIELSEN, S.: Kinetics of endocytosis in renal proximal tubule studied with ruthenium red as membrane marker. *Am. J. Physiol.* **264**: F239-250, 1993.
 - 173) COJOCEL, C., FRANZEN-SIEVEKING, M., BERNDT, W., AND BAUMANN, K.: Dependence of renal protein reabsorption on glomerular filtration rate and infusion time. *Pflügers Arch.* **402**: 34-38, 1984.
 - 174) ACHARYA, K.R., STUART, D.I., WALKER, N.P.C., LEWIS, M., AND PHILLIPS, D.C.: Refined structure of baboon α -lactalbumin at 1.7Å resolution. Comparison with C-type lysozyme. *J. Mol. Biol.* **208**: 99-127, 1989.
 - 175) HALL, L., CRAIG, R.K., EDBROOKE, M.R., AND CAMPBELL, P.N.: Comparison of the nucleotide sequence of cloned human and guinea-pig pre- α -lactalbumin cDNA with that of chick pre-lysozyme cDNA suggests evolution from a common ancestral gene. *Nucleic Acids Res.* **10**: 3503-3515, 1982.
 - 176) FINDLAY, J.B., AND BREW, K.: The complete amino-acid sequence of human α -lactalbumin. *Eur. J. Biochem.* **27**: 65-86, 1972.