

氏 名	あい ば てつ や 合 葉 哲 也
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学位記番号	論 葉 博 第 533 号
学位授与の日付	平 成 7 年 7 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	摘出臓器灌流法による薬物の腎輸送特性に関する研究

(主 査)
論文調査委員 教授 乾 賢一 教授 横山 陽 教授 橋田 充

論 文 内 容 の 要 旨

腎臓における薬物の挙動を正確に捉えることは、医薬品の有効且つ安全な臨床使用を考える上で必要不可欠である。腎臓の薬物分泌や再吸収に関与する輸送機構の詳細は、培養細胞系や単離膜小胞系を用いた検討により明らかにされてきている。しかしながら、ネフロンや血管系が入り組んだ複雑な構造を持つ腎臓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、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。そこで本研究では、腎臓の構造的特徴と生理機能を保持した条件下で薬物挙動が解析できる摘出腎灌流系を確立し、有機イオン性モデル薬物並びにアミノグリコシド系抗生物質に対する腎輸送特性について検討を加えた。

I. 摘出腎灌流実験系の確立

従来より、摘出臓器灌流実験系では臓器の生理機能を維持することが非常に困難であった。そこで本研究では、灌流液中に牛赤血球を体積比 10-20% で添加することによって、臓器への酸素供給能の改善を図った。その結果、糸球体濾過速度やグルコース再吸収率に代表される腎生理機能を安定に維持することが可能となり、灌流臓器における薬物挙動を十分な信頼性のもとで解析できるようになった。また、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、複雑な数学モデルを構築することなく薬物臓器輸送特性の把握を試みた。具体的には、灌流腎の腎動脈に薬物を急速投与した後、静脈側流出挙動から薬物の静脈内平均通過時間 MTT_v を算出し、種々の実験条件で MTT_v の増減を調べることによって、上皮細胞の血管側細胞膜に存在する薬物輸送系の性質を解析できることを示した。同様に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管腔内へ分泌されるまでに要する時間、即ち、上皮細胞平均通過時間 \bar{T}_{cell} を算出可能なことを見出し、この値の変化から腎尿管刷子縁膜の薬物輸送特性を臓器レベルで評価できることを示した。以上の実験系の確立により、尿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。

II. 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、有機イオン性モデル薬物として Tetraethylammonium (カチオン) 並びに *p*-Aminohippurate (アニオン) を用い、灌流腎における排泄挙動を、 MTT_v , $\bar{T} cell$ の値と各薬物の尿中排泄率を基に検討した。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 上昇条件で著しく阻害され、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の薬物輸送機構が抑制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、有機カチオンの分泌挙動において、上皮細胞管腔側のプロトン勾配が臓器レベルでも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、薬物の体内挙動が腎疾患時に大きく変化することから、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、 MTT_v , $\bar{T} cell$ 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、刷子縁膜側の分泌機構は腎疾患時でも殆ど影響を受けず、血管側の薬物輸送系が主に障害されることが示された。一方、有機カチオンの場合には血管側の輸送能に変化は認められなかったが、刷子縁膜側において著しく輸送能の低下することが明らかとなった。以上より、腎疾患時の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取り込み過程が律速段階となること、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って、腎蓄積性を示すことが推察された。

III. 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

アミノグリコシド系抗生物質は腎組織に高度に蓄積し、その腎毒性が臨床上市しばしば問題とされる。そこでアミノグリコシド系抗生物質の腎取り込み機構の特性を、Tobramycin をモデルに摘出腎灌流系で検討した。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 の管腔内での取り込み率が減少することから、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。一方、有機カチオン Tetraethylammonium やアミノ単糖の Glucosamine を用いた実験では、正電荷を有しているにも拘らず取り込み阻害は認められなかった。さらに塩基性低分子量タンパク質 Lysozyme の存在下でアミノグリコシド系抗生物質の腎挙動を検討したところ、同時投与実験で薬物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。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、薬物挙動の影響因子を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。

論文審査の結果の要旨

腎臓の機能は、ネフロンすなわち糸球体とそれに続く尿細管を一つの構造・機能上の単位として営まれている。薬物の尿中排泄は糸球体濾過、尿細管分泌並びに尿細管再吸収の三つの過程からなっているが、臓器レベルにおける薬物動態の定量的な評価・解析については不明の点が多い。本論文は腎臓の構造的特徴と生理機能を保持した条件下で薬物挙動が解析できる摘出腎灌流系を確立し、薬物の尿細管輸送特性について解析したものであり、得られた成果は以下の通りである。

摘出腎灌流系は、従来臓器の生理機能を維持することが困難であったが、灌流液中に牛赤血球を添加することによって酸素供給効率を上げ、血圧、血流を生理的条件に維持し得る腎灌流法を確立した。その結果、糸球体濾過速度やグルコース再吸収率など腎生理機能を維持することが可能となり、灌流臓器における薬物挙動を十分な信頼性の下で解析できるようになった。また薬物を血管内容積や細胞外液量のマーカーと共に、腎動脈内に急速注入し、得られた腎静脈血及び尿中への流出曲線の解析にモーメント法を応用することにより、複雑な数学モデルをたてることなく薬物挙動の把握を可能とした。すなわち、腎動脈に薬物を急速投与した後、静脈側流出挙動から薬物の静脈内平均通過時間 MTT_v を算出し、上皮細胞の血管側細胞膜に存在する薬物輸送系の性質を解析できること、同様に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へ分泌されるまでに要する時間、即ち、上皮細胞平均通過時間 \bar{T}_{cell} を算出可能なことを見だし、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。以上より、尿細管上皮細胞の側底膜、刷子縁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初めて可能となった。

イオン性モデル薬物として Tetraethylammonium (カチオン) 並びに p-Aminohippurate (アニオン) を用い、灌流腎における排泄挙動を、 MTT_v 、 \bar{T}_{cell} の値と各薬物の尿中排泄率をもとに検討した。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、また有機カチオンの分泌挙動において、上皮細胞管腔側のプロトン勾配が臓器レベルでも重要な因子となっていることを明らかにした。更に腎疾患時の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取込み過程が律速段階となること、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ることが判明した。

さらに、アミノグリコシド系抗生物質の腎蓄積機構を、Tobramycin をモデルに摘出腎灌流系で検討した。Tobramycin の取り込みは管腔側でのみ行われること、またこの取込み過程は飽和性を有すること、アミノグリコシド系抗生物質は相互に取込み過程を阻害すること、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明らかとなった。

以上の研究は、臓器レベルにおいて薬物の腎挙動や尿細管輸送機構の解明に貢献するところ大であり、

医療薬剤学の発展に寄与するものとする。よって、本論文は博士（薬学）の論文として価値あるものとする。

更に、平成7年6月8日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。