

氏 名 苗 代 一 郎
 学位(専攻分野) 博 士 (農 学)
 学 位 記 番 号 論 農 博 第 2241 号
 学位授与の日付 平 成 11 年 5 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 Studies on the Mechanism of Therapeutics-Induced Renal Anemia in Rats
 (ラットにおける薬剤投与による腎性貧血の発現機作に関する研究)

論文調査委員 (主 査)
 教 授 佐々木隆造 教 授 伏 木 亨 教 授 天 知 輝 夫

論 文 内 容 の 要 旨

腎性貧血の主な原因は腎臓で生産される糖蛋白質エリスロポエチン (Epo) の欠乏である。Epo は赤芽球系前駆細胞に作用して赤芽球の増殖と分化を促進する。Epo 産生は腎臓に存在する酸素センサーが酸素濃度を感知することにより制御される。また、Epo は幼年期では肝臓、若年期以降では腎臓で産生されており、腎臓におけるその産生細胞は尿細管の間質細胞あるいは内皮細胞である。産生された Epo は血流を介して骨髓や脾臓の造血組織に作用して赤血球の産生を促す。したがって、Epo 産生部位の腎臓が障害されると腎性貧血が発現する。毒性試験において血漿中 Epo 濃度の測定は生体における赤血球産生の指標となり、貧血の評価に有用であるが、動物や測定条件が血漿中 Epo 濃度に及ぼす影響についてはあまり調べられていない。本研究では、まず、ラットにおける血漿中 Epo 濃度の絶食及び加齢による変動について検討して Epo の測定条件を決定した。ついで、既知の貧血惹起薬剤であるフェニルヒドラジン及びカプトプリルを投与することにより、血漿中 Epo 濃度測定法の有用性を確かめた。次に、ゲンタマイシン及びカンデサルタン・シレキセチル (TCV-116) による貧血の発現機作について検討した。

I. ラットにおける血漿中エリスロポエチン濃度の絶食、加齢及び貧血による変動

医薬品のラットを用いた毒性試験では週齢の若い動物が使用されており、その際に実施される血液検査は一晩絶食させた動物から採取した血液を用いて行われている。そこで、5 から 19 週齢の雌雄の F 344 ラットを用いて、絶食、加齢及び採血時間による血漿中 Epo 濃度の変動について検討した。

雄性ラットにおいて血漿中 Epo 濃度は絶食により低下し、昼間より夜間の方が高かった。ラットの成長期である 5 週齢から 10 週齢にかけて雌雄共に赤血球数は増加し、網状赤血球数及び血漿中 Epo 濃度は減少した。その後、これらのパラメータは 10 あるいは 13 週齢以降 19 週齢まではほぼ一定の値を示した。これらの結果は赤血球産生活性の高い時期に血漿中 Epo 濃度が高く、摂餌パターンと血漿中 Epo 濃度にも関連があることを示している。

次に、溶血性貧血を惹起するフェニルヒドラジン (50 mg/kg) を 7 週齢の雄性ラットに単回皮下投与、あるいは、貧血及び血漿中 Epo 濃度を低下させるアンジオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害薬カプトプリル (1000 mg/kg/日) を 6 週齢の雄性ラットに反復経口投与し、赤血球数、網状赤血球数及び血漿中 Epo 濃度の変化を調べた。フェニルヒドラジン投与の場合には、赤血球数が減少した後、速やかに血漿中 Epo 濃度が増加し、次いで網状赤血球数が増加した。その後、Epo 濃度は徐々に減少し、2 週間後には元のレベルに回復した。カプトプリル投与の場合には、投薬第 7 日に網状赤血球数及び血漿中 Epo 濃度の低値がみられ、投薬第 28 日に赤血球数の低値が認められた。このように代償性の造血亢進を示す溶血性貧血の場合には血漿中 Epo 濃度の高値がみられ、造血抑制を伴う貧血の場合には血漿中 Epo の低値が認められたことから、血漿中 Epo 濃度によって貧血の分類が可能になった。

以上の結果から、薬剤による貧血の発現機作を検討する際に血漿中 Epo 濃度を測定することは生体における赤血球産生を把握するために有用である。また、血漿中 Epo 濃度を評価する場合には、ラットの摂餌条件、採血時間及び週齢を十分に考慮する必要がある。これらの成績を考慮して、以下の貧血発現機作の検討には、6 週齢の雄性ラットを用いて実施し、血

液は非絶食下で採取した。

II. ラットにおけるゲンタマイシンによる貧血の発現機作

アミノグリコシド系抗生物質のゲンタマイシンは実験動物において急性腎毒性を惹起する薬物として知られている。また、腎障害の発現後に貧血が現れるが、その発現機作について詳細は知られていない。そこで、ゲンタマイシン (100 mg/kg/日) を6週齢の雄性ラットに反復皮下投与し、貧血の発現機作を血液学的、生化学的及び病理組織学的に検討した。

ゲンタマイシンを21日間皮下投与すると、投薬群で投薬第21日に赤血球数、ヘマトクリット値及びヘモグロビン濃度が対照群と比較して15-17%減少した。また、投薬第7及び14日には網状赤血球数及び血漿中Epo濃度の低値が認められた。しかし、血液学的検査、血液生化学的検査、剖検、器官重量及び病理組織学的検査では、出血、溶血及び代償性の造血亢進を示唆する所見はみられなかった。更に赤血球の形態学検査及び浸透圧脆弱性検査で赤血球に異常はなかった。一方、腎臓の病理組織学的検査では投薬第14日及び21日に尿細管の壊死及び再生像がみられ、広範囲な腎障害が示唆された。更に、投薬第21日に骨髓で細胞充実性の低下、投薬第14日に脾臓で髄外造血の減少が認められた。腎尿細管の間質細胞あるいは内皮細胞がEpo産生部位であることを考え合わせると、このような腎臓障害によりEpo産生細胞が障害され、血漿中Epo濃度が減少し、骨髓や脾臓での赤血球産生が抑制されたと考える。以上の結果から、ゲンタマイシンによる貧血は、Epo産生部位である腎尿細管近傍が障害されることによるEpo産生の減少に起因すると考えられる。

III. ラットにおけるTCV-116による貧血の発現機作

TCV-116はAII拮抗作用を有する降圧薬であり、ラットの4週間経口投与毒性試験において300 mg/kg/日以上用量で赤血球数、ヘモグロビン濃度及びヘマトクリット値の低値が認められた。類薬であるAII拮抗薬のロサルタンやACE阻害薬のカプトプリルのラットの毒性試験でも同様の所見が認められ、更にACE阻害薬のラミプリルをラットに反復経口投与すると血漿中Epo濃度が減少する。また、ACE阻害薬による赤血球産生の抑制は腎血流量の増加に伴ってEpo産生が低下することに起因すると推測されている。TCV-116の場合もACE阻害薬と同様にEpo産生の低下が生じ、貧血が発現した可能性が考えられた。そこで、ラットにTCV-116 (1000 mg/kg/日) を6週齢の雄性ラットに反復経口投与し、血液学的検査、生化学的検査及び病理組織学的検査を実施すると共に、血漿中Epo濃度及び腎血流量を測定し、貧血の発現機作を検討した。更に、生理食塩水給与の貧血に及ぼす影響を調べ、その変化が本薬の薬理作用に起因する可能性を調べた。

TCV-116を28日間経口投与すると、投薬群で投薬第28日に赤血球数、ヘマトクリット値及びヘモグロビン濃度が対照群と比較して7-8%減少した。投薬第7日に血漿中及び腎臓中Epo濃度の低値並びに網状赤血球数の低値がみられ、骨髓検査では赤芽球系細胞数の低値及びM/E (顆粒系細胞数/赤芽球系細胞数) 比の高値が認められた。しかし、病理組織学検査でEpo産生部位である腎臓に障害性の変化はみられなかった。更に血液学的検査、血液生化学的検査、剖検、器官重量及び病理組織学的検査では、出血、溶血及び代償性の造血亢進を示唆する所見はみられず、赤血球の形態学検査及び浸透圧脆弱性検査でも赤血球に異常はなかった。また、TCV-116 (1000 mg/kg/日) をラットに単回あるいは7日間反復経口投与すると、腎血流量の高値並びに平均血圧の低値が認められた。この腎血流量の増加が腎臓の「酸素センサー」にfalse signalを提供したことによってEpo産生が低下し、赤血球産生が抑制されたと考えられる。

一方、生理食塩水給水下ではTCV-116をラットに反復経口投与しても貧血並びに血漿中Epo濃度及び網状赤血球数の低値、腎血流量の高値及び血圧の変化は認められなかった。生理食塩水を給与すると、体液恒常性の維持におけるレニン-アンジオテンシン系(RAS)の生理学的役割が小さくなることから、本薬の薬理作用であるRASへの効果が減少すると考えられている。したがって、貧血及びその関連所見並びに血漿中Epo濃度及び腎血流量の変化はTCV-116の薬理作用と考える。

以上の結果から、TCV-116による貧血は、本薬の薬理作用で生じた腎血流量の高値が腎臓への酸素供給を増加させ、腎臓のEpo産生細胞におけるEpo産生が減少し、血漿中Epo濃度が低下することにより骨髓での赤血球産生が抑制されることによって発現したと考えられる。

論文審査の結果の要旨

医薬品開発における毒性研究で、代表的な標的組織は肝臓、腎臓及び赤血球であり、これらの組織に対する毒性発現機作を明らかにすることが最も重要である。本論文は、ラットにおいて薬剤投与による腎性貧血の発現機作を、血漿中エリスロ

ポエチン濃度の測定を含め、血液学的、生化学的、生理学的及び病理組織学的解析を行った研究成果をまとめたものである。本論文の評価すべき主要な点は以下のとおりである。

1. 薬剤による貧血の発現機作を検討する際に血漿中エリスロポエチン濃度を測定することは生体における赤血球産生を把握するために必須であることを明らかにした。また、血漿中エリスロポエチン濃度を評価する場合には、ラットの摂餌条件、採血時間及び週齢を考慮する必要があることを示した。

2. アミノグリコシド系抗生物質のゲンタマイシンによる貧血は、エリスロポエチンの産生部位である腎尿細管近傍が障害され、エリスロポエチン産生が減少し、血漿中エリスロポエチン濃度が低下することによって骨髓での赤血球産生が抑制されることに起因することを示した。

3. アンジオテンシン II 受容体拮抗作用を有する降圧薬カンデサルタン・シレキセチルによる貧血は、本薬の薬理作用で生じた腎血流量の増加が腎臓への酸素供給を増加させ、腎臓のエリスロポエチン産生細胞におけるエリスロポエチン産生が減少し、血漿中エリスロポエチン濃度が低下することによって骨髓での赤血球産生が抑制されることに起因することを示した。

以上のように、本論文は、ラットにおける血漿中エリスロポエチンの変動を詳細に検討し、薬剤投与によるエリスロポエチン産生に起因した貧血の発現機作を解析している。また、薬剤によって惹起される一般的な貧血発現機作の検討方法についても言及している。したがって、本研究は医薬品開発に貢献し、薬理学、応用生命科学に寄与するところが多い。

よって、本論文は、博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。なお、平成 11 年 3 月 11 日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。