

熊本大学学位論文

育薬による新規治療薬の探索および薬物投与設計の
最適化に基づく慢性腎臓病に対する包括的治療戦略

2020

福永 雅樹

Comprehensive treatment strategy for chronic kidney disease based on the
exploration of new therapeutics through drug fostering and evolution and
the optimization of drug dosing regimen

Masaki Fukunaga

Comprehensive treatment strategy for chronic kidney disease based on the exploration of new therapeutics through drug fostering and evolution and the optimization of drug dosing regimen

Masaki Fukunaga

Chronic kidney disease (CKD) is one of the typical kidney diseases, and there are 13.3 million patients with CKD, about one in eight adults, in Japan, and is now positioned as a serious national disease that threatens health maintenance. Further, concerns over the prevalence of CKD are increasing because its onset and progression have been attributed to aging and modern lifestyles in recent years. However, CKD is one of unmet medical needs and there is still no useful therapeutic agent for it. Thus, the development of innovative CKD therapeutic agent is urgently needed. On the other hands, oxidative stress is collecting attention as a mechanism of its onset and progression recently, and new CKD therapeutic agent targeting it has been developed.

Furthermore, in case CKD progresses to end stage kidney disease (ESKD), renal replacement therapy (RRT) such as artificial dialysis and kidney transplantation is required for CKD patients. Hemodialysis (HD) is the mainstream of RRT, but the drug dosing regimen in HD patients has a problem. In general, drug excretion from kidney is also replaced by HD in HD patients. Therefore, it is important to calculate the drug removal by hemodialysis (HD) for drug dosing regimen in HD patients. However, there are a few and inconsistent information about the dialyzability of drug by HD.

So, the aim of our study is 1) to evaluate the antioxidant ability and nephroprotective effect of neurotrophin (NTP) and acetaminophen (APAP), and 2) to evaluate the drug removal utilizing rat model of HD (HD rat) and extrapolate the drug removal rate in HD patients. The results obtained in this study were summarized as follow:

1) Treatment strategy for CKD with NTP and APAP focusing on antioxidant effects

The antioxidant ability and nephroprotective effect of NTP and APAP was examined. Firstly, the direct radical scavenging ability of NTP was evaluated, and NTP had scavenging ability against reactive oxygen species (ROS). The antioxidant effect of NTP on irritant-induced oxidative stress was also evaluated using HK-2 cells. The irritant-induced ROS production was inhibited under the preincubation of NTP for 9 hours. Further, the renoprotective effect of NTP was evaluated by *in vivo*. It was suggested that NTP had the renoprotective effect by the antioxidant and antifibrotic effect.

Secondly, the direct radical scavenging ability of APAP and its metabolites was evaluated, and they had an antioxidant effect by a direct radical scavenging ability. The antioxidant effect of APAP metabolites on indoxyl sulfate (IS)-induced oxidative stress was also evaluated using HUVEC. APAP metabolites showed a significant ROS inhibitory effect. In addition, APAP had the renoprotective

effect through antioxidant activity, and the accumulation of APAP metabolites was observed in 5/6 nephrectomy (5/6 Nx) CKD model rat.

2) *In vivo* evaluation of drug dialyzability utilizing HD rat

The evaluation of drug dialyzability utilizing HD rat was conducted. Firstly, we evaluated the drug removal utilizing HD rat. HD rat received bilateral nephrectomy and HD for 2 hours. The dialysis removal of 6 drugs [amikacin (AMK), aprindine (AP), vancomycin (VCM), doripenem (DRPM), valproic acid (VPA), and APAP] was evaluated by HD rat. Dialysis efficiency and plasma protein binding and distribution volume of drugs were also measured. the clearance of urea (CL_{Urea}) and creatinine (Cr) (CL_Cr) and normalized dialysis dose (Kt/V) by HD rat were 0.83 ± 0.07 mL/min, 0.70 ± 0.08 mL/min, and 0.13 ± 0.06 . The drug dialyzability by HD rat were similar to reported clinical data except for doripenem (DRPM). Lower dialyzability of DRPM was observed in HD rat than reported clinical data (HD rat vs reported clinical data; $32.2 \pm 3.8\%$ vs $46.3-56.1\%$) and HD rat reflected the species difference of protein binding. Secondly, we examined the correlation between the dialyzability of drug in HD rat and human and constructed the prediction formula of the drug dialyzability in HD patients. As the results, higher correlation of drug dialyzability was observed between reported clinical data and HD rat adjusted for protein binding ($R^2=0.916$; $p < 0.05$) compared to unadjusted ($R^2=0.788$; $p < 0.05$). Therefore, we constructed the prediction formula of the drug dialyzability in HD patients by utilizing HD rat model and protein binding.

The prediction formula (%) = $2.1434 \pm 1.0651 \times$ Drug removal rate of HD rat $\times F$

[F = non-protein binding proportion (non-protein binding rate in human / non-protein binding in rat)]

In conclusion, NTP exerted direct and indirect antioxidant effects *in vitro*. In addition, NTP had the antifibrotic effect in kidney. It was suggested that NTP may contribute the renoprotective effect by not only the antioxidant effect but also the antifibrotic effect. APAP and its metabolites also had direct and indirect antioxidant effects. Further, APAP had the renoprotective effect and the accumulation of its metabolites in CKD model rat. It was suggested that APAP metabolites accumulated with a decrease in renal excretion had an antioxidant action and could have the renoprotective effect.

We also established the HD model mimicking the HD patients. In addition, it was suggested that HD rat reflected the influence of factors associated with drug dialyzability such as protein binding rate and we could predict the drug dialyzability in HD patients by using our HD rat model and the protein binding rate of drug.

This study can be a comprehensive CKD treatment strategy by finding new CKD therapeutic agent from existing drugs and helping to optimal drug dosing regimen in HD patients.

本論文で使用した略語一覧

AAPH		2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride
ADL	日常生活動作	activities of daily living
AKI	急性腎障害	acute kidney disease
ALT	アラニン アミノトランスフェラーゼ	alanine aminotransferase
AMK	アミカシン	amikacin
AOPP	タンパク質過酸化物	advanced oxidation protein products
AP	アプリンジン	aprimidine
APAP	アセトアミノフェン	acetaminophen
AP-glu	アセトアミノフェン グルクロン酸抱合体	acetaminophen glucuronide
AP-sul	アセトアミノフェン 硫酸抱合体	acetaminophen sulfate
AST	アスパラギン酸 アミノトランスフェラーゼ	aspartate aminotransferase
AII	アンギオテンシンII	angiotensin II
BUN	血中尿素窒素	blood urea nitrogen
Ca	カルシウム	calcium
c.i.	持続静注	continuous infusion
CKD	慢性腎臓病	chronic kidney disease
CKD-MBD	慢性腎臓病に伴う 骨ミネラル代謝異常	chronic kidney disease -mineral and bone disorder
Cl	クロライド	chloride

CM-H ₂ DCFDA		5-(and-6-)-chloromethyl-2',7'-dichloro-dihydrofluorescein diacetate, acetyl ester
CL _{Urea}	尿素クリアランス	urea clearance
CL _{Cr}	クレアチニンクリアランス	creatinine clearance
COL1A1	I型コラーゲン α1	collagen type I alpha 1 chain
COPD	慢性閉塞性肺疾患	chronic obstructive pulmonary disease
CS	シラスタチン	cilastatin
DHE	ジヒドロエチジウム	dihydroethidium
DHP-I	ジヒドロペプチダーゼ-I	dehydropeptidase-I
DHR 123		dihydrorhodamine 123
DMPO		5,5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide
DPPH		2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
DRPM	ドリペネム	doripenem
ERK1/2		extracellular signal-regulated kinase 1/2
ESR	電子スピン共鳴	electron spin resonance
ESKD	末期腎不全	end-stage kidney disease
GAPDH	グリセルアルデヒド-3-リン酸 デヒドロゲナーゼ	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
HCT	ヘマトクリット	hematocrit
HD	血液透析	hemodialysis
HE		hematoxylin-eosin
HGB	ヘモグロビン	hemoglobin
HIF-1α	低酸素誘導因子-1α	hypoxia inducible factor-1α
HK-2 cells	ヒト近位尿細管上皮細胞	human renal proximal tubule epithelial cells

HO-1	ヘムオキシゲナーゼ-1	heme oxygenase-1
HCT	ヘマトクリット	hematocrit
HUVEC	ヒト臍帯静脈内皮細胞	human umbilical vein endothelial cells
H ₂ O ₂	過酸化水素	hydrogen peroxide
IC ₅₀	50%阻害濃度	half maximal inhibitory concentration
IS	インドキシル硫酸	indoxyl sulfate
JNK	分裂促進因子活性化 プロテインキナーゼ	c-jun N-terminal kinase
K	カリウム	potassium
K/DOQI		kidney disease outcome quality initiatives
Kt/V	標準化透析量	normalized dialysis dose
LOO [•]	ペルオキシラジカル	peroxy radical
MAPK	MAP キナーゼ	mitogen-activated protein kinase
Na	ナトリウム	sodium
NAC	N-アセチルシステイン	N-acetylcysteine
NADPH	ニコチンアミドアデニン ジヌクレオチドリン酸	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NOX4	NADPH オキシダーゼ 4	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase 4
Nrf2		NF-E2-related factor 2
NSAIDs	非ステロイド性抗炎症薬	non-steroidal anti-inflammatory drugs
NTP	ノイロトロピン	neurotrophin
NZ-419		5-hydroxy-1-methylhydantoin
O ₂ ^{•-}	スーパーオキシドアニオン	superoxide anion
OH [•]	ヒドロキシラジカル	hydroxy radical

ONOO ⁻	ペルオキシナイトライト	peroxynitrite
ORAC	活性酸素吸収能力	oxygen radical absorbance capacity
P	リン	phosphorus
PAS		periodic acid-schiff
PBS	リン酸緩衝生理食塩水	phosphate buffered saline
PCS	p-クレジル硫酸	p-cresyl sulfate
PES	ポリエーテルスルホン	polyether sulfone
PG	プロスタグランジン	prostaglandin
PHD	プロリル水酸化酵素	prolyl hydroxylases
PTH	副甲状腺ホルモン	parathyroid hormone
QOL	生活の質	quality of life
RBC	赤血球数	red blood cell
ROS	活性酸素種	reactive oxygen species
RRT	腎代替療法	renal replacement therapy
Scr	血清クレアチニン	serum creatinine
SIN-1		3-(4-morpholinyl) sydnonimine
SOD	スーパーオキシドジスムターゼ	superoxide dismutase
TGF- β	トランスフォーミング 増殖因子- β	transforming growth factor- β
Trx	チオレドキシシン	thioredoxin
U _{Cr}	尿中クレアチン	urine creatinine
UUO	片側尿管結紮	unilateral ureteral obstruction
UV	紫外線	ultraviolet
VC	アスコルビン酸	vitamin C
VCM	バンコマイシン	vancomycin

VPA	バルプロ酸	valproic acid
X	キサンチン	xanthine
XO	キサンチンオキシダーゼ	xanthine oxidase
5/6 Nx	5/6 腎臓摘除術	5/6 nephrectomy
8-OHdG	8-ヒドロキシ- 2'-デオキシグアノシン	8-hydroxy-2'-deoxyguanosine

本論文は、学術雑誌に掲載された次の論文を基礎とするものである。

- 1) *In vivo* evaluation of drug dialyzability in a rat model of hemodialysis

PLOS ONE, submitted for publication.

Masaki Fukunaga, Daisuke Kadowaki, Mika Mori, Satomi Hagiwara, Yuki Narita, Junji Saruwatari, Ryota Tanaka, Hiroshi Watanabe, Keishi Yamasaki, Kazuaki Taguchi, Hiroki Ito, Toru Maruyama, Masaki Otagiri, and Sumio Hirata

目次

第 1 章 緒言.....	1
第 2 章 NTP の抗酸化能に着目した新規 CKD 治療薬としての有用性評価.....	6
第 1 節 序.....	6
第 2 節 ROS に対する NTP の直接的なラジカル消去能評価.....	7
第 3 節 NTP の細胞内 ROS 産生および生存率に与える影響評価.....	10
第 4 節 低酸素状態における NTP の HIF-1 α タンパク発現への影響評価.....	12
第 5 節 5/6 腎摘除術 CKD ラットに対する NTP の有効性評価.....	13
第 6 節 片側尿管結紮ラットに対する NTP の有効性評価.....	16
第 7 節 高リン食マウスに対する NTP の有効性評価.....	21
第 8 節 考察.....	24
第 9 節 小括.....	27
第 3 章 APAP の抗酸化能に着目した新規 CKD 治療薬としての有用性評価.....	28
第 1 節 序.....	28
第 2 節 ROS に対する APAP およびその代謝物の直接的なラジカル消去能評価.....	29
第 3 節 APAP およびその代謝物の細胞内 ROS 産生に与える影響評価.....	37
第 4 節 5/6 腎摘除術 CKD ラットに対する APAP の有効性評価.....	38
第 5 節 考察.....	43
第 6 節 小括.....	46
第 4 章 <i>In vivo</i> 血液透析モデルラットの構築とヒト透析除去率の予測.....	47
第 1 節 序.....	47
第 2 節 HD rat の構築と生理学的パラメータおよび透析効率の評価.....	48
第 3 節 HD rat における薬物の透析性の検討.....	51
第 4 節 ヒトおよびラット間でのタンパク結合率と分布容積の相違.....	53
第 5 節 HD rat を用いた HD 患者における薬物の透析除去率予測式の構築.....	54
第 6 節 考察.....	55
第 7 節 小括.....	58
第 5 章 総括.....	60
実験の部.....	63

参考文献..... 82

第1章 緒言

腎臓病の有病者数は世界で8億5000万人といわれており、その有病者数は糖尿病の2倍、がんの20倍以上に相当するため¹、「サイレントディゼーズ」ともいえる疾患である。特に慢性腎臓病（CKD）は代表的な腎臓疾患の1つであり、Kidney Disease Outcome Quality Initiatives（K/DOQI）が2002年に提示した診療ガイドラインにおいて定義された（Fig. 1）²。このCKDの全世界的な罹患率は男性10.4%、女性11.8%と推計されており¹、本邦においても成人の約8分の1にあたる1,330万人がCKD患者と推測されている³。そのため、CKDは健康を脅かす重大な国民病であり、その進展により死亡リスクも上昇することが複数のコホート研究で報告されている^{4,7}。さらに、CKDの発症および進展に関わる代表的な因子として高血圧や糖尿病などの生活習慣病や高齢化が挙げられ、超高齢化社会である本邦において今後も更なるCKD患者の増加が危惧されている⁸。しかしながら、CKDはアンメット・メディカル・ニーズの1つであり、現状では有効な治療薬は存在せず、画期的なCKD治療薬開発が急務となっている。

近年、このCKD発症・進展のメカニズムとして酸化ストレスに注目が集まっている。通常、活性酸素種（ROS）は免疫系や細胞シグナル伝達に必要不可欠であるため、生体内でのROS産生バランスはわずかに亢進している（Fig. 2A）⁹。その一方、酸化ストレス亢進時は酸化反応と抗酸化反応のバランスが崩れ、ROSが過剰となるため（Fig. 2A）、生体内においてROSが生体高分子と反応し、分子レベルで様々な障害を引き起こすことで多くの臓器が損傷を受ける（Fig. 2B）⁹⁻¹²。そのため、酸化ストレスは多くの疾患の発症原因の一つであることが認知されている¹³⁻¹⁶。実際にCKDにおいても酸化ストレスは病態増悪因子であることが報告されており、酸化ストレスを制御することがCKDの発症および進展抑制に重要だと考えられている¹⁷⁻²⁰。

K/DOQI CKD診療ガイドライン2002によるCKDの定義

- | |
|--|
| ①、②のいずれか、または両方が 3 カ月以上持続することで診断する |
| ① 尿異常、画像診断、血液、病理で腎障害の存在が明らか、特に 0.15 g/gCr 以上の蛋白尿 (30 mg/gCr 以上のアルブミン尿) の存在 |
| ② GFR < 60 mL/分/1.73 m ² |

Cr: クレアチニン、GFR: 糸球体濾過量

Fig. 1 Criteria for CKD by K/DOQI Clinical Practice Guideline.

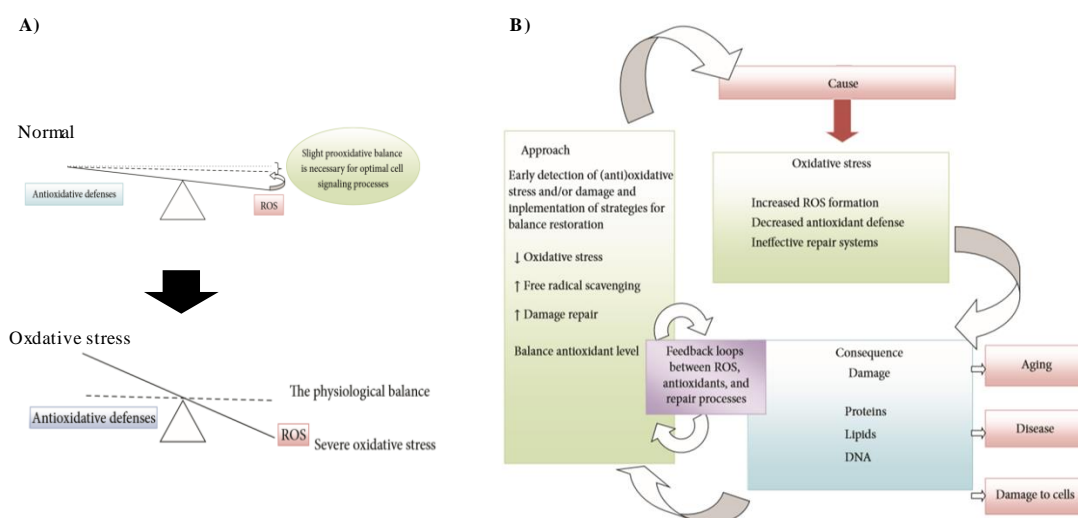


Fig. 2 Summary of oxidative stress in human. (Poljsak B, et al., *Oxid Med Cell Longev.*, 2013, Partial modification)⁹

A) Model antioxidative/oxidative balance of human, and B) Cause and consequences of oxidative stress, and methods for its control.

現在、CKD は腎機能により G1 から G5 の 5 段階のステージ（病期）に分けられている。CKD が進展し腎機能が正常時の 10-15% 以下に低下した末期腎不全（ESKD）といわれる G5 へと移行すると血液透析（HD）や腹膜透析、腎移植などの腎代替療法（RRT）が必要となり、RRT 施行患者は G5D のステージとなる。本邦の ESKD 罹患率は台湾に次いで第 2 位であり²¹、RRT を必要とする患者が多く存在するが、腎移植はドナー数が少ないことや生体適合性などの問題から HD が RRT 治療の第 1 選択となっている。実際に HD 患者は年々増加しており^{22,23}、現在では 33 万人以上と世界有数の透析大国となっている。HD は、体内の血液を体外に出し、ダイアライザーと呼ばれる専用の浄化器を用いて老廃物や不要な水分の除去および電解質や pH の是正を行うことで生体の恒常性を維持している。このため HD は ESKD 患者が生きていくうえで必要不可欠な手段の 1 つであるが、HD を施行する上でいくつかの課題が挙げられている。まず、HD は週に 3 回、1 回につき 4 時間施行が主流であるため、患者を長時間拘束しなければならず、患者の生活の質（QOL）の低下が問題視されている。さらに透析にかかる医療費は、年間 1 兆 6000 億円に上ると推計されており、総医療費の 4% を占める。そのため、厚生労働省は「2028 年までに年間新規透析導入患者を 3 万 5000 人以下に減少させる」（腎疾患対策検討会報告書）との目標を掲げたが、新規導入患者の増加傾向は今なお続いている。加えて HD 患者は様々な合併症を併発するが、代表的なものに CKD に伴う骨・ミネラル代謝異常（CKD-MBD）がある。CKD-MBD は RRT が必要となる以前の保存期から発症する高リン（P）血症、低カルシウム（Ca）血症、活性化ビタミン D₃ の低下、副甲状腺ホルモン（PTH）分泌亢進などを

含み、CKD 患者の骨病変の要因となるだけでなく、血管石灰化を介して心血管疾患 (CVD) の重要なリスク因子でもある。そのため、CKD-MBD に対しては生命予後の改善を目的に管理を行うことが望ましいとされている。実際に、P や Ca、PTH 値は基準値から外れるにつれて死亡リスクが増大するという報告が数多くなされており²⁴⁻²⁶、透析患者の主な死因の1つである心不全は P や Ca の管理不足による血管石灰化が一因として指摘されている^{27,28}。この他にも HD 患者では便秘や貧血、高 K 血症、感染症など様々な合併症リスクが増大する。

前述したように、CKD は腎機能低下のみならず、多くの合併症を惹起する。CKD 治療で最も重要なことは ESKD への進展や人工透析導入を抑制または遅らせることであり、CKD 初期からの薬学的な介入が必要である。とりわけ新規 CKD 治療薬の開発が必要不可欠であり、現在、酸化ストレスをターゲットとした新規 CKD 治療薬の開発が数多く進められているが、その中でも bardoxolone methyl という抗酸化剤が脚光を浴びている。Bardoxolone methyl は NF-E2-related factor 2 (Nrf2) 活性化剤であり、転写因子である Nrf2 を活性化させることでチオレドキシシン (Trx) やヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1) などの内因性の抗酸化・抗炎症物質を誘導し、生体内ストレスを制御することで抗酸化作用を示す²⁹。実際に CKD ステージ 4 の 2 型糖尿病患者を対象とした第 2 相臨床試験において Bardoxolone methyl は腎機能を改善するという結果が得られている³⁰。これらのことから抗酸化剤による酸化ストレスの制御は CKD に対して適応可能な新規治療戦略となり得ることが期待されている。また CKD が進展して HD 導入となった場合、薬物適正使用が薬学的介入において重要となる。一般的に腎機能低下患者においては、薬物の腎排泄率および患者の残腎機能に応じて、投与量の調節を行う必要があり、血清クレアチニンから算出した GFR に基づいて行うことが推奨されている。また、親化合物だけでなく、代謝物についても活性の有無および腎排泄の寄与を評価しなければならない。例えばアロプリノールの場合、代謝物のオキシプリノールは活性代謝物でかつ腎排泄型である。そのため、腎機能低下患者に常用量を投与するとオキシプリノールが蓄積し、中毒性の副作用が発現する。他方、HD 患者においては、薬物の排泄が透析により代替されているため、HD による薬物の除去量 (率) に応じて投与設計を行う必要がある。しかしながら、実際には、透析による薬物の除去率を調べた報告が少ないことや、透析終了後、薬物が組織から血漿へ再分布することで血中濃度の再上昇 (リバウンド現象) がみられるため、薬物血中濃度の変化のみでは正確な除去率評価が困難である。結果として、適切な薬物投与設計が行えずに、治療不良や副作用発現につながることを懸念される^{31,32}。そのため HD 患者における薬物適正使用には薬物の透析性の評価・測定が必要不可欠である。

このように CKD においては、正常・軽度低下 (G1-2)、保存期 (G3-4)、ESKD (G5)、HD (G5D) と病期により、その背景や病態から薬物動態に至るまで多彩な変化を伴いながらもシームレスに連動している。そのため CKD においては包括的な管理・治療戦略が必要であり、その中心的な役割を薬物療法が果たすことになる。そこで本論文では育薬の観

点から、①保存期 CKD 対策として既存薬のプレイオトロピック効果としての抗酸化作用を活用した新規治療戦略を提案し、②HD 患者については薬物の適正使用のため、透析による薬物除去（透析性）を予測する HD 動物モデルの開発および薬物透析除去率予測式の構築を試みることで、包括的な CKD 治療戦略を展開する。

まず初めに CKD 患者では、加齢に伴う関節痛、腰痛など種々の痛みに加え、骨疾患や尿毒症性ニューロパシーなど腎機能低下に伴う疼痛を抱えている場合が多く³³、QOL や日常生活動作（ADL）の低下が懸念される。ここで非ステロイド性消炎鎮痛薬（NSAIDs）を代表とする鎮痛薬は患者の QOL や ADL を維持するうえで必要不可欠なものであるが、CKD 患者においてはその腎毒性による腎障害発症リスクが高いため³⁴、腎機能や腎臓への影響を考慮した疼痛管理が重要である。NSAIDs はプロスタグランジン（PG）合成抑制による薬理作用を示すが、腎臓において PG は腎血流の維持、調節に関与しており、その合成が抑制されると腎血流量低下による腎障害を起こしやすく^{35,36}、尿細管壊死³⁷ やアレルギー性の間質性障害を誘発することも報告されており³⁸、NSAIDs の多くは重篤な腎障害には禁忌となっている。そのため、臨床現場において、CKD 患者の疼痛管理にはアセトアミノフェン（APAP）の優先的使用が推奨されている³⁹。また、作用機序の異なる鎮痛薬として古くから用いられているノイロトロピン（NTP）については、長年の臨床使用経験から腎障害を惹起しないことでコンセンサスが得られている。そこで今回は、これら 2 つの薬物に着目して CKD 治療薬としての応用を試みた。

まず APAP は 100 年以上に渡り臨床で用いられている中枢性の解熱鎮痛薬である⁴⁰。APAP は同じく鎮痛効果を有する NSAIDs と比較して、臨床用量における副作用が少ないことから安全性の高い薬剤として、小児から高齢者まで幅広く用いられている。また APAP は NSAIDs と異なり、その主な作用機序が中枢性であるため⁴⁰、腎臓への影響は少ないと考えられている。さらに興味深いことに近年の研究では、抗酸化作用を示唆する報告がある⁴¹⁻⁴⁵。他方 NTP はワクシニアウイルス接種家兔炎症皮膚抽出液という多成分を含む医薬品であり、古くから帯状疱疹後神経痛など神経障害性疼痛の治療に用いられている。最近の NTP に関する研究では酸化ストレスに関連する病態に対する改善効果が報告されている⁴⁶⁻⁵⁰。そこで、第 2 章においては NTP、第 3 章では APAP について、育薬によるプレイオトロピック効果としての抗酸化能を評価し腎保護効果へと展開させる検討を行った。

つぎに HD 患者の薬物投与設計を行う際、薬物透析除去率を考慮しなければならないが、臨床においてはその情報が限られている。HD 患者での臨床研究以外にも *in vitro* や *ex vivo* を中心とした薬物透析性評価モデルはあるが、生体側因子の影響を考慮できないため⁵¹、正確な薬物透析性評価には至っていない。また *in vivo* による HD モデルもあるが、その多くが大型動物を使用しているため実用性に乏しく、薬物の透析除去率を論じた報告もほとんどない。また、薬物の透析性に影響を及ぼすタンパク結合率や分布容積には種差が報告されており⁵²⁻⁵⁴、動物モデルを用いて得られた結果をヒトへ外挿する場合には種々の生体内因子を考慮する必要があるなどの問題点が挙げられる^{55,56}。そこで第 4 章では *in*

vivo 血液透析モデルラットの構築とヒト透析除去率の予測に関する検討を行った。以下に得られた知見を詳述する。

第2章 NTPの抗酸化能に着目した新規CKD治療薬としての有用性評価

第1節 序

近年、酸化ストレスがCKDの発症および進展に寄与しており¹⁷⁻²⁰、治療のターゲットとして注目を浴びている³⁰。酸化ストレスはROSと抗酸化システム（抗酸化物質、抗酸化酵素）のバランスが崩れ、ROSが過剰となった状態であり、生体内においてROSが分子レベルで様々な臓器障害を引き起こすため¹⁰⁻¹²、多くの疾患の発症や進行に関与していることが明らかとなっている¹³⁻¹⁶。この酸化ストレスはCKDにおいても病態増悪の一因であり、腎障害の進行抑制のために酸化ストレスを抑制することが重要である¹⁷⁻²⁰。そのため最近、CKDを中心に様々な領域において酸化ストレスの亢進を改善する研究や抗酸化薬の開発が活発に行われている^{30,57}。

この章では前述したNTPについて、育薬の観点から新規CKD治療への応用を考えてみる。NTPはワクシニアウイルス接種家兎炎症皮膚抽出液という約300種の非蛋白質成分を含む医薬品であり、下行性疼痛抑制系を活性化することで鎮痛作用を示す。最近のNTPに関する研究では、肺細胞において酸化還元調節分子であるTrxの発現を誘導し、酸化ストレスを抑制することで細胞保護効果をもたらすこと⁴⁶や海馬神経細胞においてHIF-1 α やmitogen-activated protein kinase (MAPK) シグナル経路を抑制することによる神経保護効果などの臓器保護効果が報告されている⁴⁷。さらに、NTPの成分の一つであるNZ-419が抗酸化作用を有し腎保護効果に寄与することが示唆されている⁴⁸⁻⁵⁰。

このような背景のもと、まず初めに、NTPが抗酸化作用を有するか*in vitro*において評価し、続いてCKDおよび腎線維化モデルにおける腎保護効果を検証した。

第2節 ROS に対する NTP の直接的なラジカル消去能評価

生体内の ROS は主に酸素に由来し、スーパーオキシド ($O_2^{\cdot-}$) はキサンチンオキシダーゼ (XO)、NADPH oxidase およびミトコンドリアの電子伝達系により主に産生される。腎臓においては、NADPH oxidase により産生された $O_2^{\cdot-}$ から変換されて発生したヒドロキシラジカル (OH^{\cdot}) および一酸化窒素 (NO) との反応で生成される ONOO $^{\cdot-}$ により腎障害が引き起こされる。そこで本検討では、これらの3つの ROS に加えて、細胞内シグナル伝達物質として機能している過酸化水素 (H_2O_2) に対する NTP のラジカル消去能を評価した。

酸素由来の ROS 産生経路の起点である $O_2^{\cdot-}$ に対する NTP の消去能を検討するために、キサンチン (X) とキサンチンオキシダーゼ (XO) の反応により $O_2^{\cdot-}$ を発生させ、電子スピン共鳴 (ESR) 法および化学発光法にて評価を行った。ESR 法においてスペクトル強度比が 1:1:1:1 の 4 本線の波形が確認され、 $O_2^{\cdot-}$ とスピントラップ剤 5,5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide (DMPO) のスピニアダクトである DMPO-OOH が検出される。この系に NTP を添加したところ、濃度依存的なスペクトル強度の減少が確認された (Fig. 3A)。この結果から、NTP は濃度依存的に $O_2^{\cdot-}$ に対する消去能を有することが示された (Fig. 3B)。さらに、化学発光法において検討を行った結果、ESR 法による結果と同様に NTP は濃度依存的に $O_2^{\cdot-}$ を消去することが確認された (Fig. 3C)。

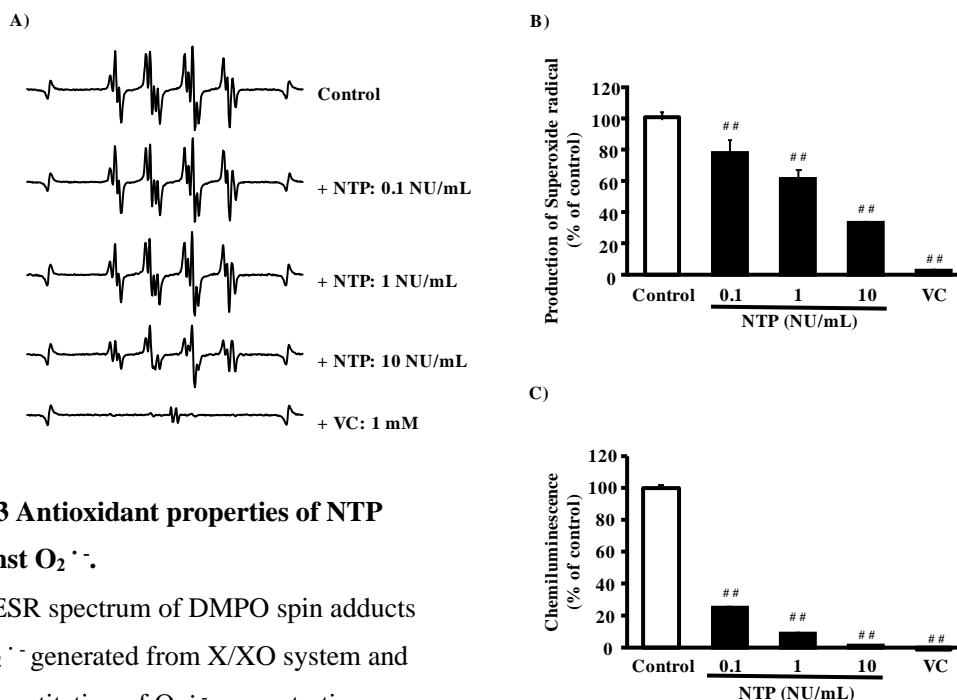


Fig. 3 Antioxidant properties of NTP against $O_2^{\cdot-}$.

A) ESR spectrum of DMPO spin adducts of $O_2^{\cdot-}$ generated from X/XO system and
 B) Quantitation of $O_2^{\cdot-}$ concentration;
 C) $O_2^{\cdot-}$ produced by X/XOX system, and

luminol-dependent chemiluminescence was measured. vitamin C (VC): 1 mM. Values are expressed as the mean \pm SD (n = 3-4). ## P < 0.01 in comparison to the control.

X と XO の反応は酵素反応であるため XO 活性を阻害すると $O_2^{\cdot-}$ が発生しない。そのため X/ XO 系において $O_2^{\cdot-}$ と同時に産生される尿酸を定量することで、 $O_2^{\cdot-}$ に対する消去能が直接的な $O_2^{\cdot-}$ スカベンジ能によるものか XO 阻害による間接的な抑制によるものか検討した。その結果、NTP は尿酸産生を抑制しないことが確認され (Fig. 4)、XO 活性を阻害せず直接 $O_2^{\cdot-}$ を消去することが示唆された。

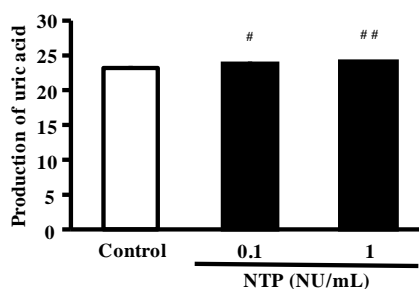


Fig. 4 Effect of NTP on X/XO reaction activity.

Uric acid was produced by X/XO. Absorbance was measured at 290 nm. Values are expressed as mean \pm SD (n = 4). #: P < 0.05 versus control, ##: P < 0.01 versus control.

またラジカル産生剤 3-(4-morpholinyl) sydnonimine (SIN-1) によって放出された $O_2^{\cdot-}$ および NO が反応し、生成された ONOO $^-$ に対する消去能を蛍光試薬 dihydrorhodamine 123 (DHR 123) を用いて蛍光分析法により評価した結果、SIN-1 を添加することで有意に ONOO $^-$ が発生したことが確認され、検討した NTP の全ての濃度において ONOO $^-$ を消去することが示された (Fig. 5)。

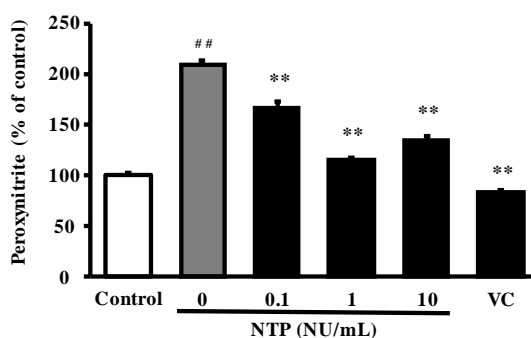


Fig. 5 Scavenging ability of NTP for ONOO $^-$ induced by SIN-1.

ONOO $^-$ generated by SIN-1, and fluorescence intensity was measured with DHR 123 at Ex: 485 nm, Em: 535 nm. VC: 1 mM. Values are expressed as mean \pm SD (n = 4). ##: P < 0.01 versus control, **: P < 0.01 versus NTP 0 NU/mL.

次に H_2O_2 に紫外線 (UV) を直接照射することで産生する $\text{OH}\cdot$ に対する消去能に関してスピントラップ剤を用いて ESR 法により評価した。この系においては、スペクトル強度比が 1:2:2:1 の 4 本線の波形が確認され、 $\text{OH}\cdot$ とスピントラップ剤 DMPO のスピンアダクトである DMPO-OH が検出される。この系に NTP を添加したところ、スペクトル強度は高濃度の NTP で減少が確認された (Fig. 6A)。この結果から、 $\text{OH}\cdot$ に対しては NTP の高濃度において消去能を有することが示された (Fig. 6B)。さらに ESR 法により NTP の $\text{OH}\cdot$ スカベンジ能が確認されたため、NTP が過酸化水素 (H_2O_2) を分解することで $\text{OH}\cdot$ が減少した可能性を考慮し、分解能について確認した結果、NTP は H_2O_2 を分解することが示された (Fig. 6C)。

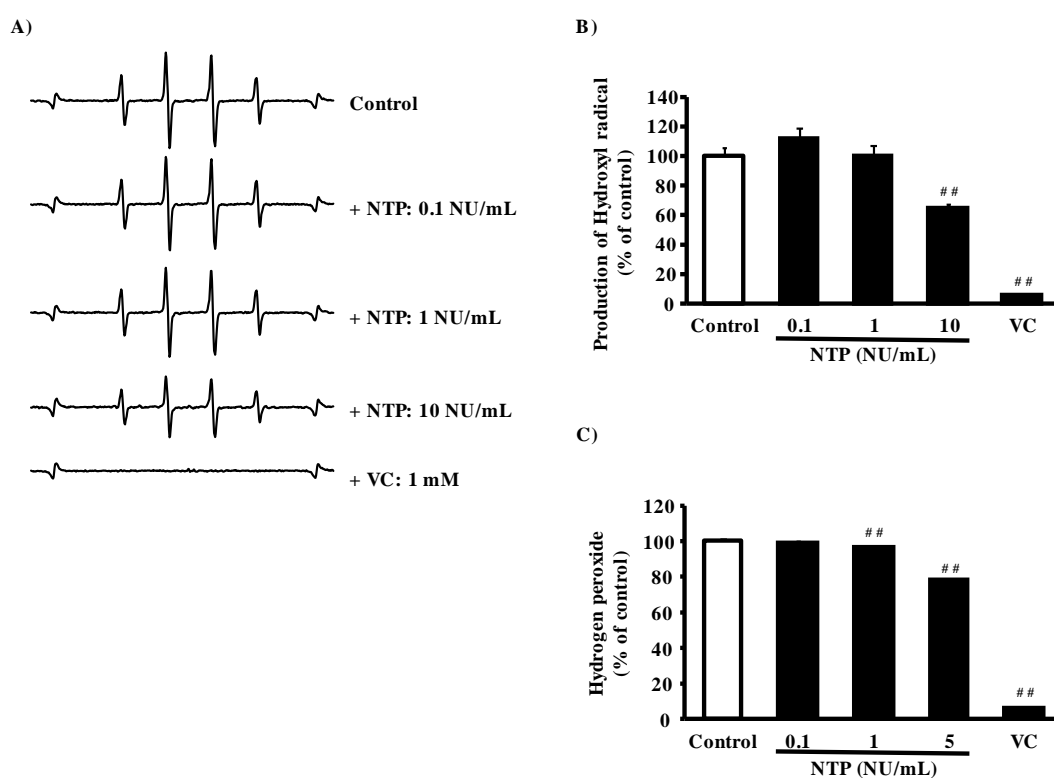


Fig. 6 Antioxidant properties of NTP against $\text{OH}\cdot$.

A) ESR spectrum of DMPO spin adducts of $\text{OH}\cdot$ generated from UV-irradiated H_2O_2 and B) Quantitation of the $\text{OH}\cdot$ concentration; C) Decomposing effect of NTP on H_2O_2 . The reaction of potassium iodide (KI) and H_2O_2 generated triiodide (I_3^-), and its absorbance was measured at 350 nm. VC: 1 mM. Values are expressed as the mean \pm SD ($n = 3-4$). ^{##} $P < 0.01$ in comparison to control.

第3節 NTPの細胞内ROS産生および生存率に与える影響評価

NTPが細胞内ROS産生を抑制し、細胞保護効果を有するか評価した。ヒト近位尿細管上皮細胞であるHK-2細胞を用いてH₂O₂とNTPを同時添加し、H₂O₂により誘導された細胞内ROS産生をNTPが抑制するか検討した。その結果、NTP1 NU/mLでROS産生を抑制した (Fig. 7)。またH₂O₂とNTPを同時添加し、HK-2細胞の生存率を評価したところ、H₂O₂添加により細胞生存率が80%程度まで減少した。またNTP添加により細胞生存率の回復傾向を示したが、統計学的な有意差は認められなかった (Fig. 8)。

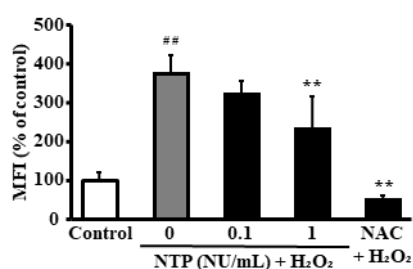


Fig. 7 Effect of NTP on intracellular ROS production induced by H₂O₂ in HK-2.

Intracellular ROS production were measured by mean fluorescence intensity at excitation 485 nm and emission 535 nm after 3 hours incubation with NTP and H₂O₂. Values are expressed as mean \pm SD (n = 6). N-acetylcysteine (NAC): 1 mM. #: P < 0.01 versus control, **: P < 0.01 versus NTP 0 NU/mL.

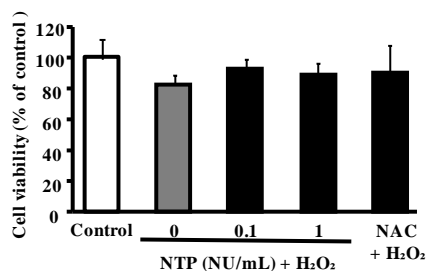


Fig. 8 Effect of NTP on cell viability against H₂O₂ in HK-2.

Cell viability were evaluated with Cell Counting Kit-8 (WST-8) after 24 hours incubation with NTP and H₂O₂, and its absorbance was measured at 450 nm. NAC: 1 mM. Values are expressed as mean \pm SD (n = 6).

次に CKD において蓄積する尿毒症物質により誘導される酸化ストレスに対する NTP の効果の評価した。NTP を 9 時間前処理した後に尿毒症物質を中心とした ROS 誘導剤（インドキシル硫酸 (IS)、p-クレジル硫酸 (PCS)、アンジオテンシンII (AII)、 H_2O_2) を添加し、各種刺激剤誘発 ROS に対する NTP の抑制効果を検討した。その結果、いずれの刺激剤に対しても ROS 産生を抑制する結果が得られた (Fig. 9)。

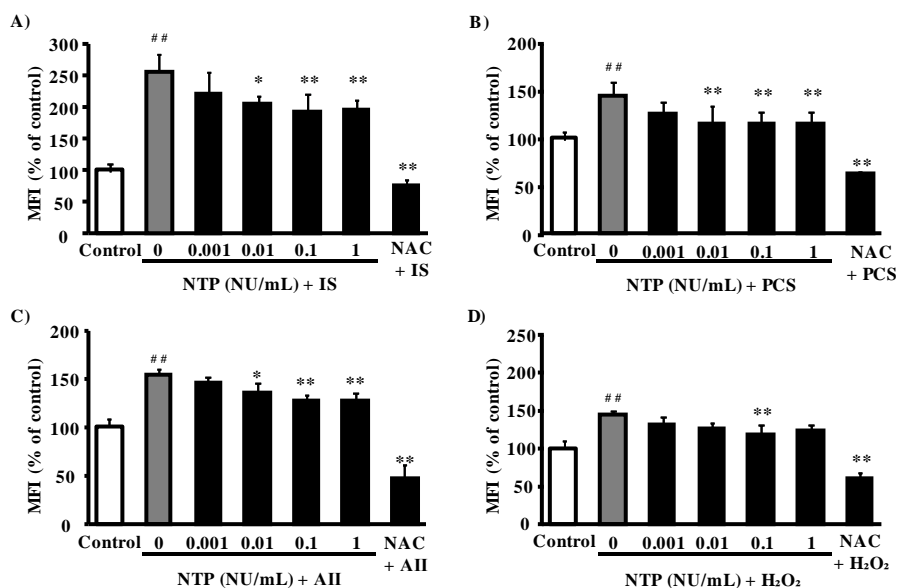


Fig. 9 Pretreatment effect of NTP on ROS production induced by stimulants in HK-2.

NTP was pre-incubated for 9 hours before addition of A) Indoxyl sulfate (IS), B) p-cresyl sulfate (PCS), C) angiotensinII (AII), and D) hydrogen peroxide (H_2O_2). Intracellular ROS production were measured by mean fluorescence intensity at excitation 485 nm and emission 535 nm. NAC: 1 mM. Values are expressed as mean \pm SD (n = 6). ^{##}: P < 0.01 versus control, ^{*}: P < 0.05 versus NTP 0 NU/mL, ^{**}: P < 0.01 versus NTP 0 NU/mL.

第4節 低酸素状態における NTP の HIF-1 α タンパク発現への影響評価

腎臓は酸素消費量の多い臓器として知られているが、これは尿細管での能動的な物質の分泌および再吸収を行っているためである。そのため、裏を返せば酸素供給が低くなると容易に酸欠となり細胞障害が惹起される。一方、低酸素状態においては細胞応答分子として HIF-1 α の発現が上昇し細胞障害から保護している。そこで尿細管細胞に対する NTP の HIF-1 α タンパク発現への影響を western blot 法を用いて評価した。その結果、通常状態では NTP の有無による HIF-1 α への影響は認められなかった。興味深いことに、低酸素状態では HIF-1 α タンパク発現が上昇し、NTP を添加することでそのタンパク発現は低下した (Fig. 10)。

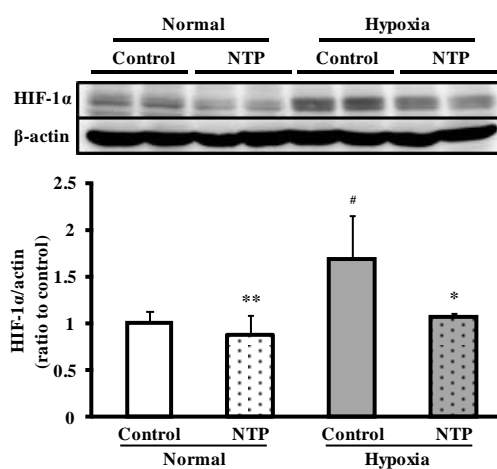


Fig. 10 Effect of NTP on HIF-1 α expression in hypoxia condition.

NTP was pre-incubated for 3 hours after culturing HK-2 cells for 24 hours in normal or hypoxia (0.1% O₂), and HIF-1 α expression was assessed by western blotting. The intensity of each band was quantified using ImageJ software and normalized against β -actin expression. Values are expressed as mean \pm SD (n = 4). #: P < 0.05 versus control in normal condition, *: P < 0.05 versus control in hypoxia condition, **: P < 0.01 versus control in hypoxia condition.

第5節 5/6腎摘除術CKDラットに対するNTPの有効性評価

CKDモデルである5/6腎摘除術(5/6Nx)ラットを用いてNTPの腎保護効果を検討した。本検討ではCKDモデル完成後、5/6Nxラットに対して生理食塩水(5 mL/kg/day)またはNTP 1 NU/kg (5 mL/kg/day)の4週間連日経口投与を行った。プロトコルをFig. 11に示す。4週間の試験期間中の生存率は、5/6Nx+Vehicle群および5/6Nx+NTP群ともに良好であり生存率に大きな差は認められなかった(Fig. 12)。

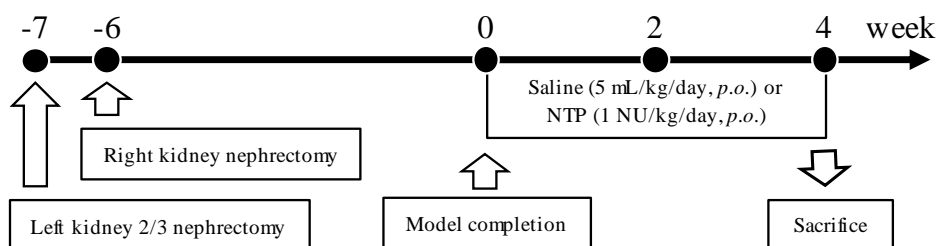


Fig. 11 Experimental scheme for evaluation of NTP on CKD rats.

Rats received 5/6 nephrectomy. At 6 weeks after final surgery, rats were randomly divided into 2 groups: (1) 5/6Nx rats receiving saline (5 mL/kg/day); (2) 5/6Nx rats receiving NTP (1 NU/kg/day). Saline or NTP was administered once daily for 4 weeks through a stomach tube after model completion.

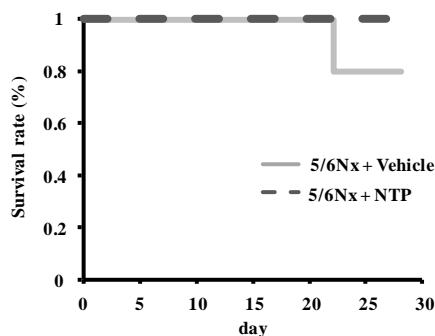


Fig. 12 Survival rates of 5/6Nx rats administered NTP, as estimated by the Kaplan-Meier method.

また試験期間中の腎機能パラメータの変動については4週目において5/6Nx + Vehicle群と比較し、5/6Nx+NTP群は血中尿素窒素 (BUN) や血清クレアチニン (Scr)、尿蛋白の抑制およびクレアチニンクリアランス (CL_{Cr}) の低下抑制傾向が観察された (Fig 13)。さらに酸化ストレスに関して、抗酸化の指標である血中チオール濃度は5/6Nx + Vehicle群と比較して5/6Nx+NTP群で上昇しており、酸化の指標である血中のタンパク質過酸化物質 (AOPP) 濃度は5/6Nx + NTP群で低下傾向を示した (Fig. 14)。腎組織中の線維化評価をするためにMasson's trichrome染色を行ったところ、5/6Nx+NTP群で腎組織中の線維化面積の減少傾向が観察された (Fig. 15)。

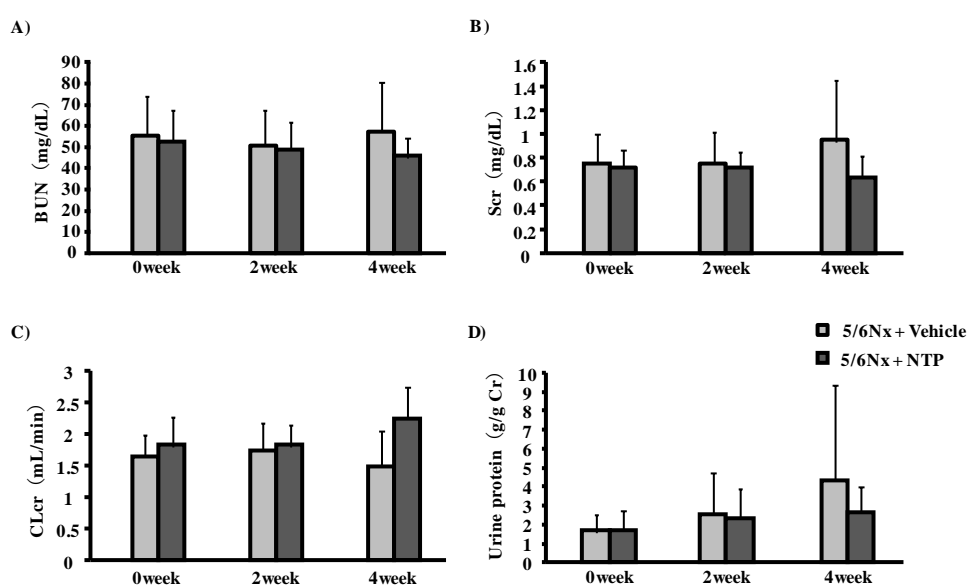


Fig. 13 Effect of NTP on Kidney function parameters in 5/6 Nx rats.

Time dependent changes in the levels of A) blood urea nitrogen (BUN), B) serum creatinine (Scr), C) creatinine clearance (CL_{Cr}), D) Urine protein. Values are expressed as the means \pm SD (n = 5-6).

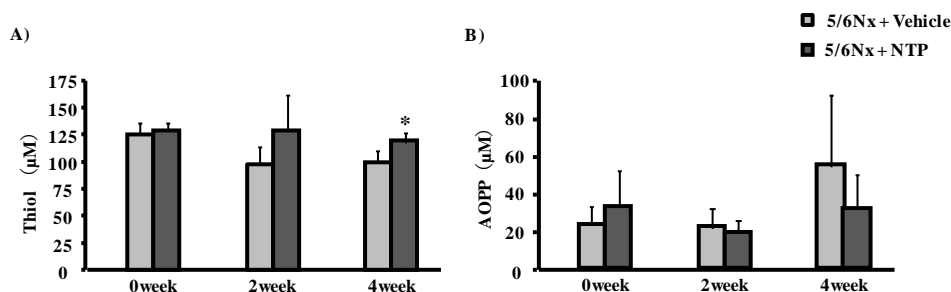


Fig. 14 Effect of NTP on blood oxidative stress markers in 5/6 Nx rats.

Changes in the plasma levels of A) thiol and B) AOPP in blood were measured. Values are expressed as the means \pm SD (n = 5-6). *P < 0.05 compared with 5/6Nx + vehicle group at the same week.

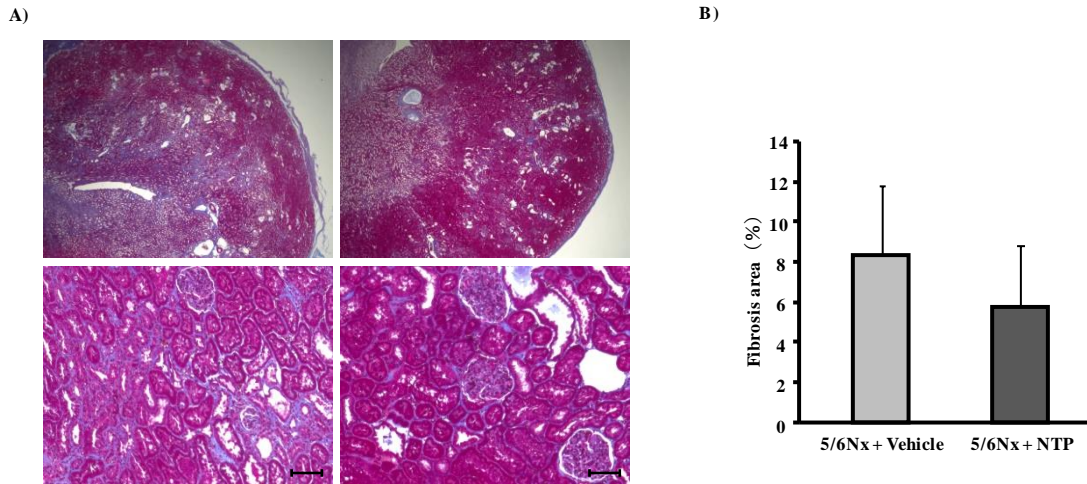


Fig. 15 Effect of NTP on renal fibrotic response in 5/6 Nx rats.

A) Paraffin section of the kidney tissue was stained with Masson's trichrome-staining and B) image analysis of the extent and intensity of Masson's trichrome staining was performed. Original magnification: $\times 20$ (upper panels); $\times 200$ (lower panels). Values are expressed as mean \pm SD (n = 5-6).

第 6 節 片側尿管結紮ラットに対する NTP の有効性評価

腎線維化モデルである片側尿管結紮 (UUO) ラットを用いて NTP の腎保護効果を検討した。本検討では UUO 処置の 1 週間前からラットに対して生理食塩水 (5 mL/kg/day) または NTP 1 NU/kg (5 mL/kg/day) を 3 週間連日経口投与することで検討した (Fig. 16)。

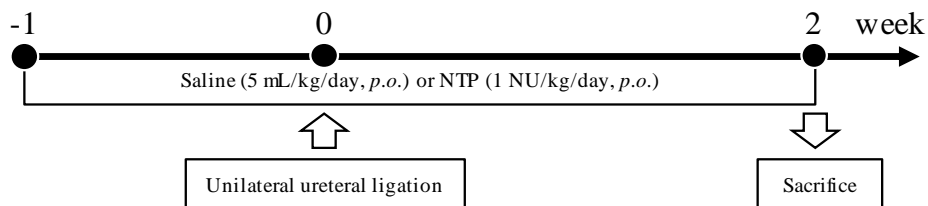


Fig. 16 Experimental scheme for evaluation of NTP on UUO rats.

Rats received unilateral ureteral obstruction. Rats were randomly divided into 3 groups: (1) control rats, sham-operated; (2) UUO rats receiving saline; (3) UUO rats receiving NTP (1 NU/kg/day). Saline or NTP was orally administered once daily for 3 weeks from 1 week before to 2 weeks after ligating unilateral ureter.

UUO 処置 14 日後における腎機能を評価したところ、BUN は 3 群間で変化は認められず、Scr についても UUO + Vehicle 群および UUO + NTP 群で軽微に上昇した程度であった (Fig. 17A,B)。また periodic acid-schiff (PAS) 染色では UUO モデルに特徴的な尿細管肥大が UUO + Vehicle 群および UUO + NTP 群で観察された。一方、UUO + Vehicle 群で認められた糸球体の萎縮が UUO + NTP 群では抑制された (Fig. 17C)。次に、腎線維化について評価した。Azan-mallory 染色によって腎線維化の比較を行ったところ、UUO + Vehicle 群では間質の線維化が生じていた (Fig. 18A,B)。一方、UUO + NTP 群によりこれらの組織障害および線維化が抑制されていた (Fig. 18A,B)。さらに腎組織中ヒドロキシプロリン量を測定した。その結果、Control 群と比較し、UUO + Vehicle 群で腎組織中ヒドロキシプロリン量が増加し、UUO + NTP 群では抑制が認められた (Fig. 18C)。

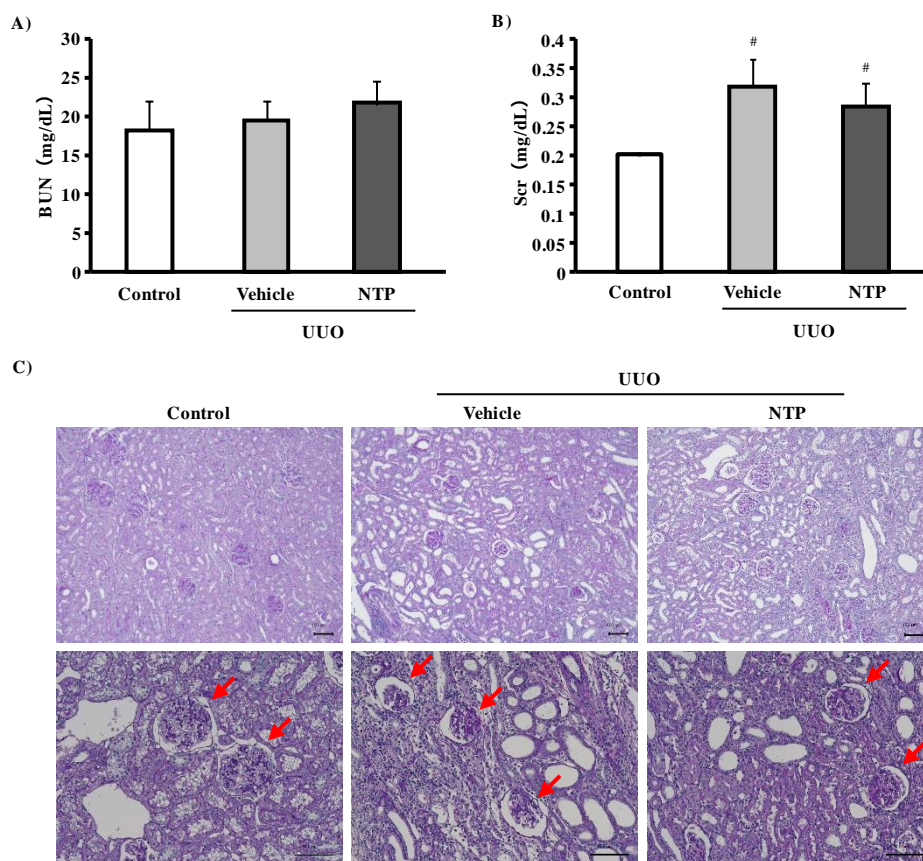


Fig. 17 Effect of NTP on renal function and histological features in UUO rats.

The levels of A) blood urea nitrogen (BUN) and B) serum creatinine (Scr). C) Representative photomicrographs of PAS-stained kidney sections were shown at 14 day after the ligating unilateral ureter. Original magnification: ×100 (upper panels); ×200 (lower panels). Scale bars represent 100 μm. Values are expressed as the means ± SD (NTP; n=6, others; n=5). # P < 0.05 compared with control group.

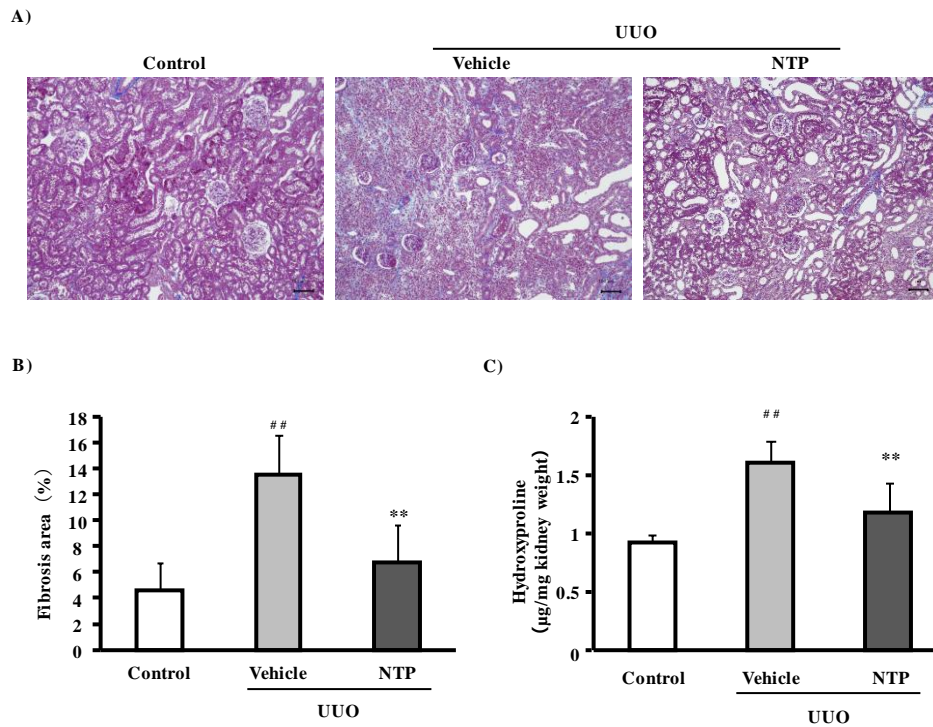


Fig. 18 Effects of NTP on renal fibrotic response in UUO rats.

A) Representative photomicrographs of azan mallory-stained kidney sections were shown at 14 day after the ligating unilateral ureter and B) image analysis of the extent and intensity of azan staining was performed. Original magnification: $\times 100$. Scale bars represent 100 μm . C) The levels of hydroxyproline in kidney tissue. Values are expressed as mean \pm SD (NTP; n=6, others; n=5). ^{##} P < 0.01 compared with control group. ^{**} P < 0.01 compared with UUO + vehicle group.

次に線維化のイニシエーターである酸化ストレスについて評価した。その結果、腎組織中マロンジアルデヒドは UUO + Vehicle 群で顕著に上昇し、UUO + NTP 群で有意に抑制された (Fig. 19A)。また生体内抗酸化能の指標である腎組織中チオールおよびスーパーオキシドディスムターゼ (SOD) 活性は Control 群と比較し、UUO + Vehicle 群で低下していたものの、UUO + NTP 群で改善傾向が観察された (Fig. 19B,C)。チロシン残基が酸化ストレスにより修飾を受けた Nitrotyrosine (Nitro-Tyr) に対して免疫染色を行ったところ、UUO + Vehicle 群で Nitro-Tyr を由来とする染色部位の増大が観察されたが、UUO + NTP 群で抑制された (Fig. 19D)。そこで酸化ストレスについてより詳細な検討をするために western blotting 法を用いて、線維化および酸化ストレスに関連するタンパク質の発現を評価した。Control 群と比較し、線維化を誘発する HIF-1 α 、トランスフォーミング増殖因子- β (TGF- β)、Collagen1A1 (COL1A1) のタンパク発現は UUO + Vehicle 群で上昇したものの、NTP 投与により全てのタンパク質において約 50%に抑制することが認められた (Fig. 20A-C)。さらに

酸素から $O_2^{\cdot-}$ を産生する NADPH oxidase 4 (NOX4) のタンパク発現についても UUO + Vehicle 群で上昇しており、UUO + NTP 群で有意に低下した (Fig. 20D)。

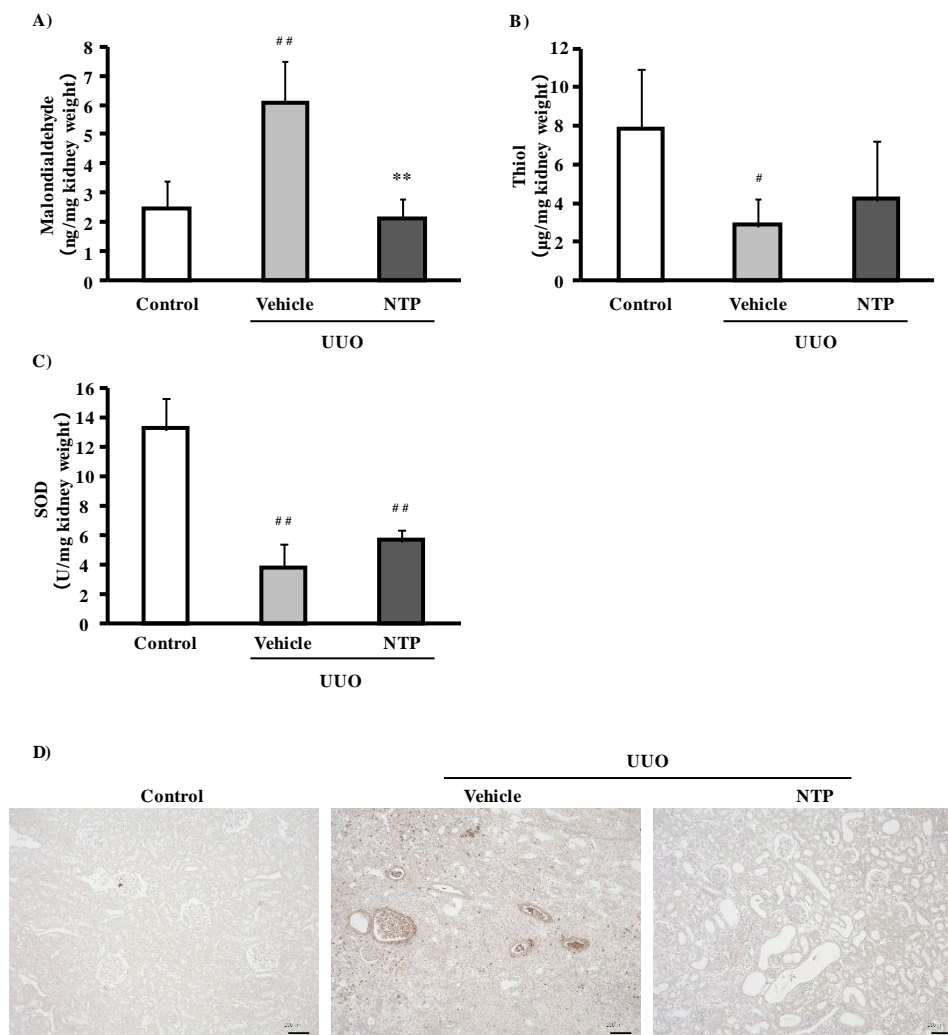


Fig. 19 Effect of NTP on renal oxidative stress markers in UUO rats.

The levels of A) malondialdehyde, B) thiol, and C) the activity of super oxide dismutase (SOD) in kidney were measured. D) Representative photomicrographs of nitrotyrosine (Nitro-Tyr)-stained kidney sections were shown at 14 day after the ligating unilateral ureter. Original magnification: $\times 100$. Scale bars represent 100 μm . Values are expressed as the means \pm SD (NTP; n=6, others; n=5). [#] P < 0.05 compared with control group. ^{##} P < 0.01 compared with control group. ^{**} P < 0.01 compared with UUO + vehicle group.

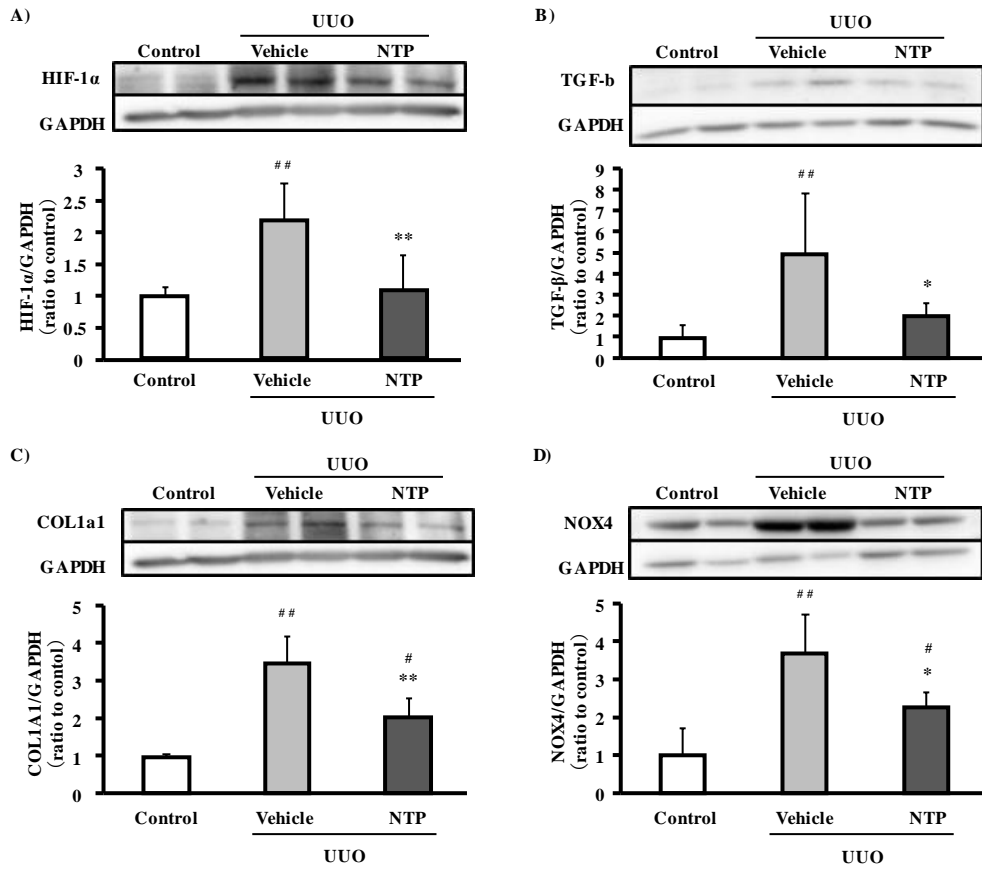


Fig. 20 Effect of NTP on the renal expression of fibrosis and oxidative stress related protein in UUO rats.

A) hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α), B) transforming growth factor- β (TGF- β), C) collagen type I alpha 1 chain (COL1A1), and D) NADPH oxidase 4 (NOX4) expression in kidney were assessed by western blotting. The intensity of each band was quantified using ImageJ software and normalized against glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) expression. Values are expressed as mean \pm SD (NTP; n=6, others; n=5). #: P < 0.05 versus control group, ##: P < 0.01 versus control group, *: P < 0.05 versus UUO + vehicle group, **: P < 0.01 versus UUO + vehicle group.

第7節 高リン食マウスに対する NTP の有効性評価

マウスに高リン (P) 食負荷を行うと、CKD-MBD の病態のように高 P 血症および低 Ca 血症を呈するとともに腎線維化が惹起される。高 P 食マウスは前述した UUO モデルよりもよりマイルドな病態モデルであり、さほど腎機能低下をきたすことなく線維化が誘発される。そのため、この高 P 食マウスを用いて、より早期の CKD に対する NTP の腎保護効果を検討した。本検討では高リン食 (2%P 含有餌) 摂餌開始時からマウスに対して生理食塩水 (10 mL/kg/day) または NTP 1 NU/kg (10 mL/kg/day) を摂餌終了時までの 12 週間連日経口投与することで検討した (Fig. 21)。

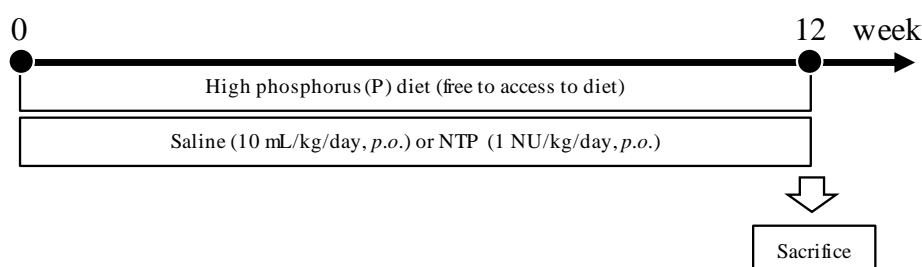


Fig. 21 Experimental scheme for evaluation of NTP on high P diet mice.

Mice received unilateral high P diet. Mice were randomly divided into 3 groups: (1) control mice, normal diet (P 0.35%); (2) high P diet (P 2.0%) mice receiving saline; (3) high P diet mice receiving NTP (1 NU/kg/day). Mice were fed normal or high P diet for 12 weeks. Saline or NTP was also orally administered once daily for 12 weeks.

その結果、摂餌量は高 P 食マウスで増大したものの、NTP 投与の有無による影響は観察されなかった (Fig. 22A)。試験終了後の血中 P および Ca 濃度については、Control 群と比較し、血漿 Ca 濃度は高 P 食 + Vehicle 群および高 P 食 + NTP 群で低下したが、血漿 P 濃度は高 P 食 + Vehicle 群で上昇したのに対し高 P 食 + NTP 群で Control 群程度まで抑制された (Fig. 22B,C)。続いて腎機能を評価したところ、Scr の上昇が高 P 食 + Vehicle 群で認められ、高 P 食 + NTP 群では抑制された (Fig. 22D)。また Sirius red 染色によって腎線維化を評価したところ、高 P 食 + Vehicle 群で線維化面積が増大したのに対し、高 P 食 + NTP 群では抑制されていた (Fig. 23)。

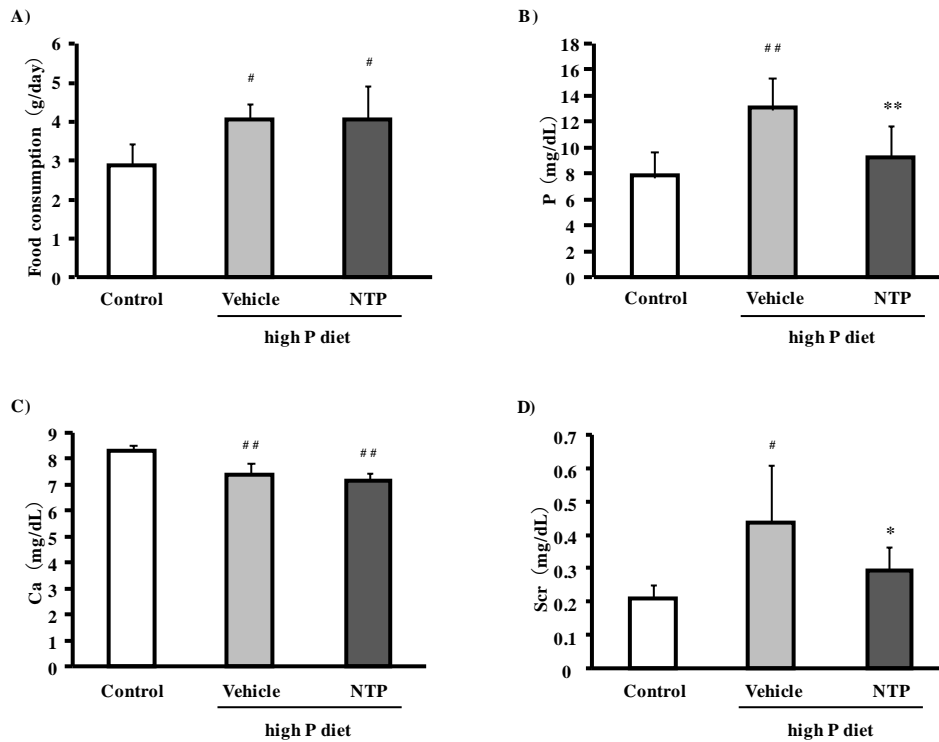


Fig. 22 Effect of NTP on physiological and kidney function parameters in high P diet mice.

A) food consumption and the levels of B) phosphorus (P), C) calcium (Ca), D) serum creatinine (Scr). Values are expressed as the means \pm SD (control; n = 4, others; n = 10). #: P < 0.05 versus control group, ##: P < 0.01 versus control group, *: P < 0.05 versus high P diet + vehicle group, **: P < 0.01 versus high P diet + vehicle group.

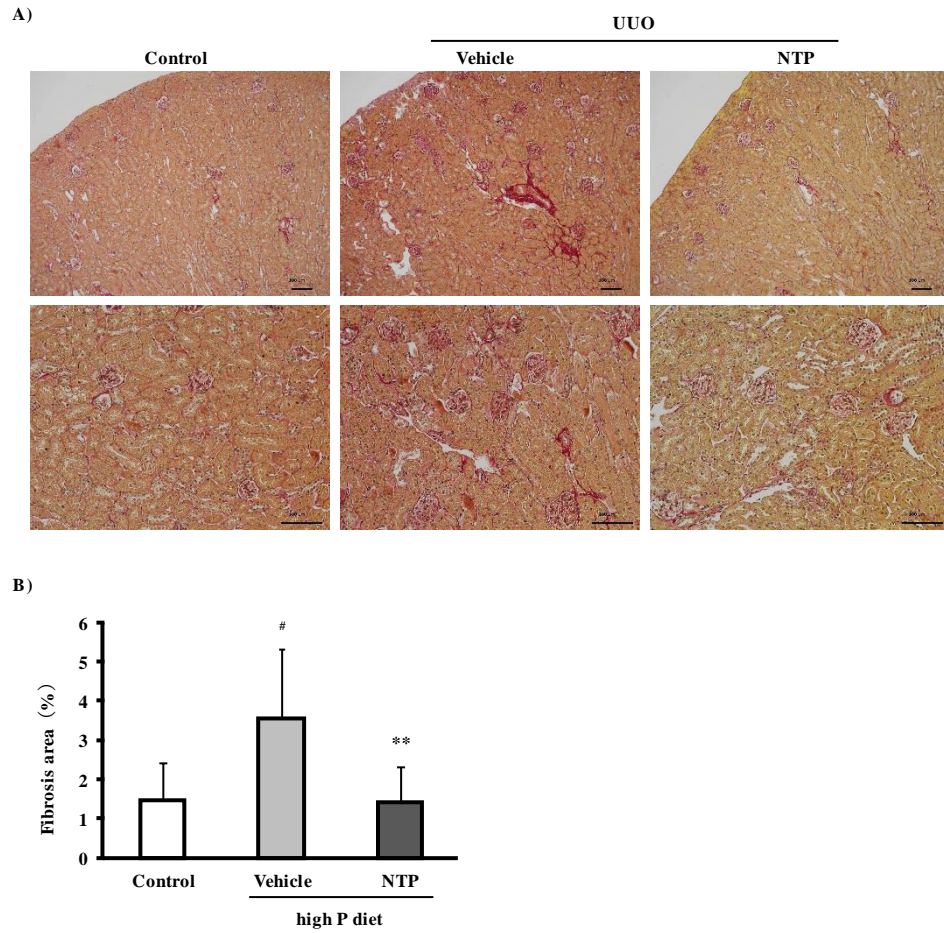


Fig. 23 Effect of NTP on renal fibrotic response in high P diet mice.

A) Paraffin section of the kidney tissue was stained with Sirius red-staining and B) image analysis of the extent and intensity of Sirius red-staining was performed. Original magnification: $\times 100$ (upper panels); $\times 200$ (lower panels). Scale bars represent $100\ \mu\text{m}$. Values are expressed as the means \pm SD (control; $n = 4$, others; $n = 10$). #: $P < 0.05$ versus control group, **: $P < 0.01$ versus high P diet + vehicle group.

第8節 考察

近年の疫学研究から CKD はその進展により HD 導入や死亡リスクが上昇するため、CKD ステージが初期から薬学的介入を行い、その発症および進展を抑制することが重要となる。さらに CKD の発症および進展に酸化ストレスが深く関わっていることが明らかになっており¹⁷⁻²⁰、酸化ストレスをターゲットとした CKD 治療薬の開発が進められている³⁰。本章では既存の鎮痛薬である NTP が抗酸化作用を介した腎保護効果を有することを明らかにした。これまでの報告より NTP は COPD やアルツハイマーなどの酸化ストレスが病態の進展に関連する疾患に対して抗酸化作用を介した臓器保護効果を有することが明らかになっている^{46,47}。そのため NTP が抗酸化作用を介して腎保護効果を有するか検討を行った。

まず初めに、本検討において生体内に存在する代表的な ROS である $O_2^{\cdot-}$ や ONOO $^-$ 、OH \cdot に対する NTP の直接的なラジカル消去能の評価を行った。その結果、X と XO の反応阻害による尿酸生成の抑制は起らなかったため (Fig. 4)、NTP は $O_2^{\cdot-}$ の産生に影響を及ぼさず、 $O_2^{\cdot-}$ に対して直接的かつ濃度依存的なラジカルスカベンジ能を有することが明らかとなった (Fig. 3)。一方、OH \cdot について、NTP は濃度依存的な OH \cdot 消去能も有するが (Fig. 6A, B)、同時に H_2O_2 分解抑制能が観察されたために (Fig. 6C)、OH \cdot 消去能には直接的なラジカルスカベンジ能だけではなく、 H_2O_2 分解による OH \cdot 生成の抑制作用が OH \cdot 消去能に関与している可能性がある。これらの知見を踏まえると NTP は濃度により各種ラジカルに対する消去能に差はあるものの、直接的な ROS 消去を介した抗酸化作用を有することが明らかとなり、腎保護効果に寄与することが示唆された。

次に HK-2 細胞を用いて NTP と H_2O_2 の同時添加による細胞内 ROS 産生および細胞生存率を評価したところ、NTP による細胞内 ROS 抑制効果が観察され (Fig. 7)、細胞率も改善する傾向が認められた (Fig. 8)。そのため、NTP による細胞内での直接的または間接的な ROS 消去能が細胞保護に働いたことが示唆された。興味深いことに、NTP を 9 時間プレインキュベーションしたのちに各刺激剤 (IS、PCS、AII、 H_2O_2) を添加した検討においても NTP は刺激剤によって産生された ROS を抑制した (Fig. 9)。この結果から NTP は直接的な ROS 消去能だけではなく、細胞内に取り込まれた後に酸化ストレス抑制機構に関与する分子やそのシグナル伝達経路に影響を与えた可能性が考えられる。NTP は抗酸化酵素である Trx の活性化や酸化ストレスによって活性化される MAPK の抑制による抗酸化用メカニズム作用が過去に報告されており^{46,47}、今回の検討でもそれらのシグナルが寄与した可能性が考えられる。実際に HK-2 細胞において NTP の 9 時間前処理により Nrf2 の発現が濃度依存的に上昇するというプレリミナリーな結果が得られているため (data not shown)、NTP が Nrf2 を活性化し標的遺伝子である Trx の誘導を増加させた可能性もあるが、今後より詳細な検討が必要である。さらに HK-2 細胞を用いて低酸素状態における HIF-1 α のタンパク発現を評価したところ、通常状態においては NTP 添加の有無による HIF-1 α への影響は認められなかったのに対し、低酸素状態では増大した HIF-1 α タンパク発現が NTP 添加によって減

少した (Fig. 10)。HIF-1 α は細胞内が低酸素状態に陥った際に、prolyl hydroxylases (PHD) による分解が抑制されるために核内移行することで活性化される転写因子であり、種々の遺伝子の転写を亢進させる。この他に、細胞内で発生した ROS によって Fe²⁺ が Fe³⁺ に酸化されるため、PHD の機能が阻害され、HIF-1 α タンパク質が安定化するメカニズムも報告されており⁵⁸、今回の低酸素状態における HIF-1 α の発現増大および NTP による HIF-1 α の発現抑制には ROS の関与が示唆された。また HIF-1 α が転写を亢進させる遺伝子の中には腎線維化を誘発する PAI-1 や TIMP-1、CTGF なども含まれており⁵⁹⁻⁶²、HIF-1 α 誘発による腎線維化に関する報告もされている^{63,64}。実際に糖尿病性腎症患者においてもその重症度と HIF-1 α 発現は正の相関を示し⁶³、HIF-1 α の腎線維化作用を介した CKD 進展への関与が示唆されている。また、現在の腎臓研究では、腎障害は虚血などによる尿細管の低酸素状態が起点であるとのことでコンセンサスが得られている⁶⁵。そのため、今回の HK-2 細胞を用いた低酸素状態における HIF-1 α 発現の増大は CKD の進展をよく反映しており、NTP による HIF-1 α 発現の抑制が抗線維化作用を介した CKD 進展抑制に一部関与している可能性が明らかとなった。

上記の *in vitro* における検討において抗酸化作用が認められたため、CKD モデルである 5/6Nx ラットを用いた NTP の腎保護効果の検討を行った (Fig. 11)。その結果、NTP 投与により抗酸化の指標であるチオールの上昇や酸化ストレスマーカーである AOPP の抑制傾向に加えて (Fig. 14)、腎機能の改善傾向が認められた (Fig. 13)。このことから NTP は *in vitro* と同様に *in vivo* においても抗酸化作用を有し、腎保護効果を発揮することが示唆された。さらに興味深いことに、Masson's trichrome によって線維化面積の減少傾向が観察されたため、NTP は抗酸化作用だけではなく、抗線維化も有することが示唆された (Fig. 15)。実際に酸化ストレスは線維化と密接に関与しており、酸化ストレスの抑制により腎の線維化を抑制する報告がなされているため⁶⁶、今回の結果も抗酸化作用を介した腎線維化抑制効果の可能性が考えられた。次に腎線維化モデルである UUO ラットを用いて NTP の抗線維化作用を評価した (Fig. 16)。その結果、腎組織中 hydroxyproline 量および Azan-mallory 染色による線維化面積が減少していたことから NTP による抗線維化作用が認められた (Fig. 18)。また腎臓中のタンパク発現を評価したところ、UUO + Vehicle 群では HIF-1 α の誘導に加えて、線維化の指標でもある COL1A1 および TGF- β の発現も増大していた (Fig. 20A-C)。その一方で、NTP 投与でそれらのタンパク発現が一様に抑制されていたことから、NTP の効果は *in vitro* での検討と同様の結果であり、HIF-1 α の抑制が抗線維化作用の一因として寄与していることが示唆された。さらに NTP の腎組織中における抗酸化能を検討したところ、NTP 投与により腎組織中の酸化ストレスの指標であるマロンジアルデヒドの減少や Nitro-Tyr 染色による酸化ダメージ部位の消失が確認されたのに加え (Fig. 19)、NADPH oxidase のサブユニットの 1 つである NOX4 のタンパク発現も抑制されたことから (Fig. 20D)、NTP は *in vitro* で認められた直接的な ROS に対するラジカル消去能に加えて、抗酸化作用に NOX4 の抑制が一部関与する可能性が明らかとなった。NADPH oxidase は ROS 産生を介して様々な

生理学的役割を果たすとともに、酸化ストレスや腎線維化の亢進による腎障害に寄与していることが報告されている⁶⁶⁻⁶⁸。中でも NOX4 は恒常的な活性をもち、 $O_2^{\cdot-}$ を直接的に産生することで腎障害において酸化ストレスを制御する中心的な役割を果たしており、血管炎症やアポトーシス、線維化を促進する⁶⁶⁻⁶⁹。腎の線維化に関しては TGF- β 由来の腎線維化経路に NOX4 の関与が報告されており⁶⁷、今回の検討における NTP による腎線維化抑制作用は HIF-1 α に加え、NOX4 の関与も示唆された。さらに初期の腎線維化モデルであり CKD-MBD モデルでもある高 P 食マウスを用いた NTP の腎保護効果について評価した (Fig. 21)。本モデルにより高 P 血症および低 Ca 血症、Scr の上昇が認められたことから、本モデルが CKD-MBD モデルとして有用なことが示唆された (Fig. 22)。また NTP の投与により摂餌量には影響を与えずに血漿中 P および Cr 濃度の低下が観察されたことから、NTP は CKD-MBD による腎機能低下への進展も抑制する可能性が見出された (Fig. 22)。線維化について評価するために Sirius red 染色を行ったところ、高リン食によって増大した線維化面積は NTP により抑制された (Fig. 23)。このことから NTP の抗線維化作用が CKD-MBD の悪化抑制に寄与し、最終的には腎保護効果につながったことが示唆された。

本研究では NTP の腎保護効果について検討を行ったが、NTP は抽出液であり単一で有効な成分は同定されていないため、腎保護効果に寄与している成分やその程度は明らかとなっていない。これまでの報告より NTP の含有成分の 1 つである NZ-419 は OH \cdot 消去能による抗酸化作用を介した腎保護効果を有することが示唆されている。しかしながら、NZ-419 は約 300 種類の NTP 含有成分の中の 1 つであり、その含有量が少ないことから本検討で観察された腎保護効果には NZ-419 を含む多数の NTP 含有成分が寄与していると考えられる。他方、NZ-419 などの単一成分における腎保護効果およびそのメカニズムを明らかにすることでより画期的な CKD 治療薬の開発につながる可能性もあるため、今後より詳細な検討が必要である。

以上より、*in vitro* において NTP はラジカルに対する直接的または間接的な ROS 消去能を有するとともに、細胞内に取り込まれ、分子シグナル機構に作用することで抗酸化作用を有することが示唆された。分子シグナル機構における抗酸化作用メカニズムには以前の報告もふまえると様々な遺伝子の関与が考えられるが、今回の UUO モデルにおける検討により NOX4 が一部関与している可能性が明らかとなった。加えて、NTP は ROS 消去能や NOX4 抑制による抗酸化作用または HIF-1 α 抑制を介した腎線維化抑制効果も有することが示唆された。今後、より詳細なメカニズムを明らかにする必要があるが、NTP は疼痛管理とともに抗酸化作用および抗線維化作用を介した腎障害の進行抑制や腎保護効果に寄与することが期待される。日常臨床において、長年の使用経験に基づいた副作用がない鎮痛薬として認識されていることも、今後の臨床適応へ向けた大きなアドバンテージである。

第9節 小括

本章では、育薬による新規治療薬の探索により、既存薬である NTP の抗酸化作用を介した腎保護効果を検証し新規治療戦略を提案した。以下に得られた知見を小括する。

- 1) 代表的な ROS ($O_2^{\cdot-}$, $ONOO^{\cdot-}$, OH^{\cdot}) に対する NTP の消去能を評価した結果、直接的な ROS 消去能が観察された。また NTP を 9 時間プレインキュベーションしたのちに刺激剤を添加したところ、刺激剤によって誘発される細胞内 ROS 産生を抑制したことから、NTP は直接的な ROS 消去能に加え、細胞内に取り込まれた後に酸化ストレス抑制機構に参与する分子やそのシグナル伝達経路に影響を与えることで抗酸化作用を有することが示唆された。
- 2) HK-2 細胞を用いて低酸素状態における HIF-1 α のタンパク発現を評価したところ、低酸素状態で増大した HIF-1 α の発現が NTP 添加によって減少した。低酸素状態における HIF-1 α の増大には ROS が関与している可能性があり、NTP による抗酸化作用によって HIF-1 α を抑制したことが示唆された。また NTP による HIF-1 α 抑制が抗線維化作用を介した CKD 進展抑制に一部関与する可能性が明らかとなった。
- 3) 5/6Nx および UUO モデルを用いて NTP の腎保護効果を検討したところ、酸化ストレスおよび腎線維化抑制効果を介した腎保護効果が観察された。UUO モデルにおいて詳細なメカニズムを解明したところ、NTP における抗酸化作用には直接的な ROS に対するラジカル消去能に加えて、NOX4 の抑制が一部関与する可能性が明らかとなった。また NTP による腎線維化抑制作用は HIF-1 α に加え、NOX4 の関与も示唆された。さらに初期の腎線維化モデルである高 P 食マウスに NTP を投与することで腎線維化抑制効果および腎保護効果が認められた。以上より、NTP は抗酸化作用に加えて抗線維化作用を有することで腎保護効果を示すことが明らかとなった。

以上の知見より、NTP は既存薬の鎮痛薬でありながら、プレイオトロピック効果としての抗酸化作用および抗線維化作用を介した新規 CKD 治療薬となり得ることが示唆された。

第3章 APAPの抗酸化能に着目した新規CKD治療薬としての有用性評価

第1節 序

APAPは中枢性の解熱鎮痛薬であり⁴⁰、副作用が少ないことから安全性の高い薬剤として、小児から高齢者まで幅広く用いられている。またCKD患者に使用する鎮痛薬に関してもAPAPを選択することが推奨されており³⁹、腎機能障害を有する患者の鎮痛薬としてNSAIDsを避けAPAPを使用することが一般的となっている。

そのため、この章では育薬の観点からAPAPのプレイオトロピック効果として新規CKD治療薬への応用を考える。前述したようにCKDを含む様々な疾患の発症や進展に関して酸化ストレスの関与が明らかとなっており、近年のAPAPの研究では、脳神経細胞や脳内皮細胞において抗酸化作用を示すことでアルツハイマー病などの脳神経疾患に有効であることが報告されている^{41,42}。さらにAPAPは抗酸化作用によるAKI発症の抑制効果が報告されており⁴³、APAPによるCKDの発症および進展抑制に期待が持てる。これらの報告は、全てAPAP未変化体の抗酸化作用を示唆する報告である。一方、APAPは生体内でその90%以上が転移酵素により肝臓で抱合を受け、AP-gluもしくはAP-sulとなり、速やかに腎臓で排泄される。当研究室のこれまでの検討において、腎不全時にはAP-gluおよびAP-sulの血中濃度が上昇し^{70,71}、APAP代謝物も抗酸化作用を有する可能性が示唆されている⁴⁵。

このような背景のもと、本章ではAPAPおよびその代謝物の抗酸化作用を*in vitro*で評価するとともに、CKDモデルに対するAPAP長期投与による腎機能および酸化ストレスへの影響を検討した。

第2節 ROS に対する APAP およびその代謝物の直接的なラジカル消去能評価

まず初めに、人工的に作られたラジカルであり、食品などの抗酸化を評価する際によく用いられている 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) を用いて APAP およびその代謝物の不対電子スカベンジ能を評価した。その結果、APAP は DPPH ラジカルスカベンジ能を有していたものの、その代謝物である AP-glu および AP-sul においては確認されなかった (Fig. 24)。

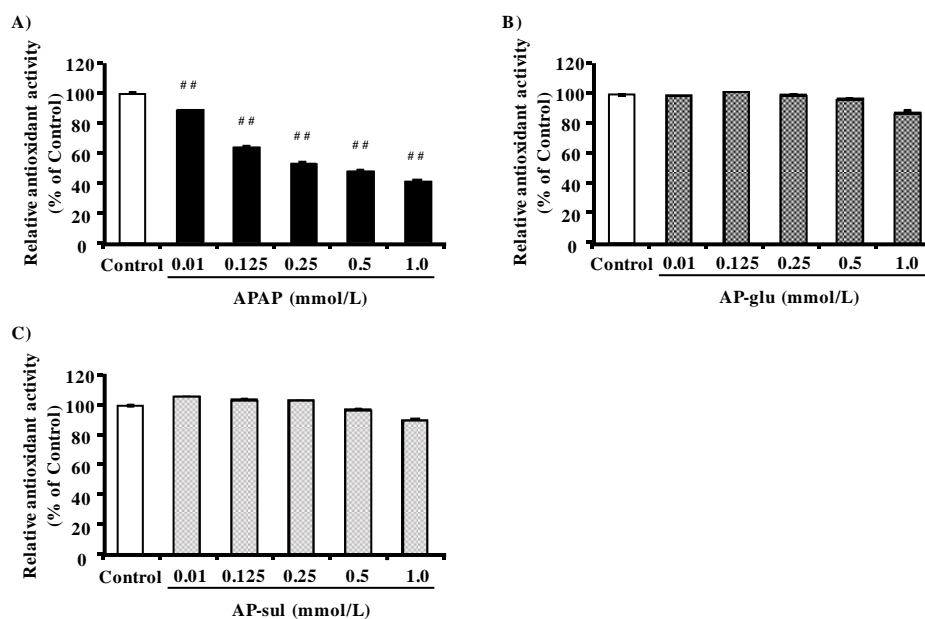


Fig. 24 Concentration-dependent antioxidant properties of APAP and its metabolites against DPPH radical.

The concentration-dependent DPPH radical scavenging ability of A) APAP, B) AP-glu, C) AP-sul were measured by mean fluorescence intensity at 540 nm. Values are expressed as the mean \pm SD (n = 4). ## < 0.01 in comparison to the control.

次に代表的な ROS である $O_2^{\cdot -}$ 、 $ONOO^-$ 、 $OH\cdot$ 、ペルオキシラジカル ($LOO\cdot$) に対する APAP およびその代謝物の直接的なラジカル消去能を評価した。酸素由来の ROS 産生経路の起点である $O_2^{\cdot -}$ に対する APAP およびその代謝物の影響を検討するために化学発光法にて評価を行った結果、APAP およびその代謝物の全てにおいて $O_2^{\cdot -}$ スカベンジ能が確認された (Fig. 25)。また APAP、AP-glu、AP-sul それぞれの 50% 阻害濃度 (IC_{50}) は、 $0.34\ \mu M$ 、 $101\ \mu M$ 、 $259\ \mu M$ となった (Table 1)。

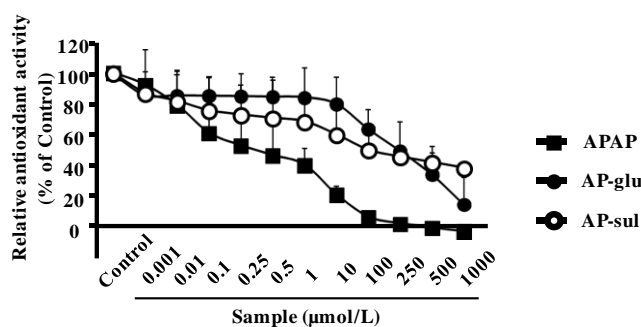


Fig. 25 Concentration-dependent antioxidant properties of APAP and the metabolites against $O_2^{\cdot -}$.

The concentration-dependent scavenging ability of APAP and the metabolites against $O_2^{\cdot -}$ derived from X/XO system were evaluated by luminol-dependent chemiluminescence. Values are expressed as the mean \pm SD ($n = 3$).

Table 1. IC_{50} of Acetaminophen and the metabolites for several ROS.

ROS	APAP (μM)	AP-glu (μM)	AP-sul (μM)
Superoxide radical ($O_2^{\cdot -}$)	0.34	101	259
Hydroxyl radical ($OH\cdot$)	—	448	554
Peroxyl radical ($LOO\cdot$)	0.76	153	605
Peroxynitrite ($ONOO^-$)	1.48	323	—

The IC_{50} values were calculated using 4-parameter logistic approximate expression obtained by the Image J program.

次に ONOO⁻に対する APAP およびその代謝物の影響について蛍光試薬を用いて評価した結果、APAP およびその代謝物の全てにおいて ONOO⁻スカベンジ能が確認され、AP-sul は 1 mM で阻害率が 70%程度であった (Fig. 26)。また、APAP および AP-sul の IC₅₀ は、それぞれ 1.48 μM、323 μM となった (Table 1)。また APAP およびその代謝物の OH[•] に対するラジカルスカベンジ作用について ESR により評価したところ、APAP の添加により、濃度依存的に減少する OH[•] のピークと新たに出現するピークが観察された (Fig. 27)。このことから、OH[•] とは別の APAP 由来のラジカルが産生された可能性が示唆された。一方、AP-glu および AP-sul では、濃度依存的に OH[•] のピークが減少したものの、新たなピークは検出されなかった (Fig. 28,29)。この結果から、AP-glu および AP-sul の IC₅₀ は、それぞれ 448 μM、554 μM となった (Table 1)。

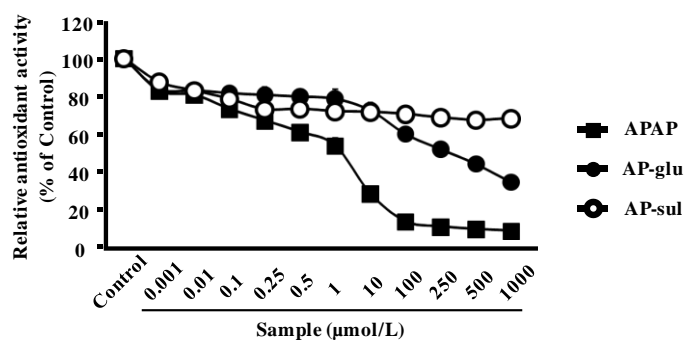
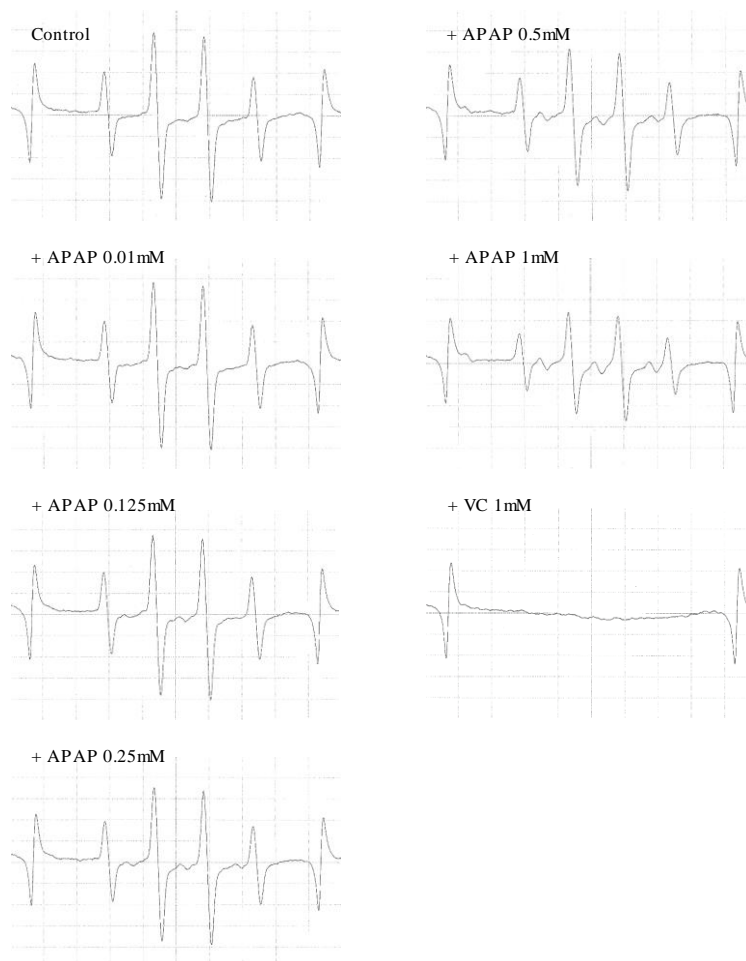


Fig. 26 Concentration-dependent scavenging ability of APAP and its metabolites for ONOO⁻ induced by SIN-1.

The concentration-dependent scavenging ability of APAP and the metabolites against ONOO⁻ generated by SIN-1 were assessed. fluorescence intensity was measured with DHR 123 at Ex: 485 nm, Em: 535 nm. Values are expressed as the mean ± SD (n = 3).

A)



B)

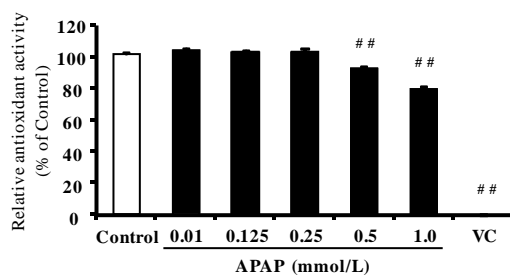


Fig. 27 ESR spectra of APAP against OH· generated by H₂O₂ / UV system.

A) ESR spectra of DMPO spin adducts of OH· ; B) Relative antioxidant activity. The reaction solution contained DTPA (100 μM), DMPO (9 mM), H₂O₂ (0.5 mM) in the control or presence of APAP (0.01, 0.1, 0.25, 0.5, 1mM). VC was used as positive control. The sample was put into the ESR flat cell and irradiated with UV for 30 sec. Immediately after the UV-irradiation, ESR spectra were obtained. Values are expressed as the mean ± SD (n = 3) . ## P < 0.01 in comparison to the control.

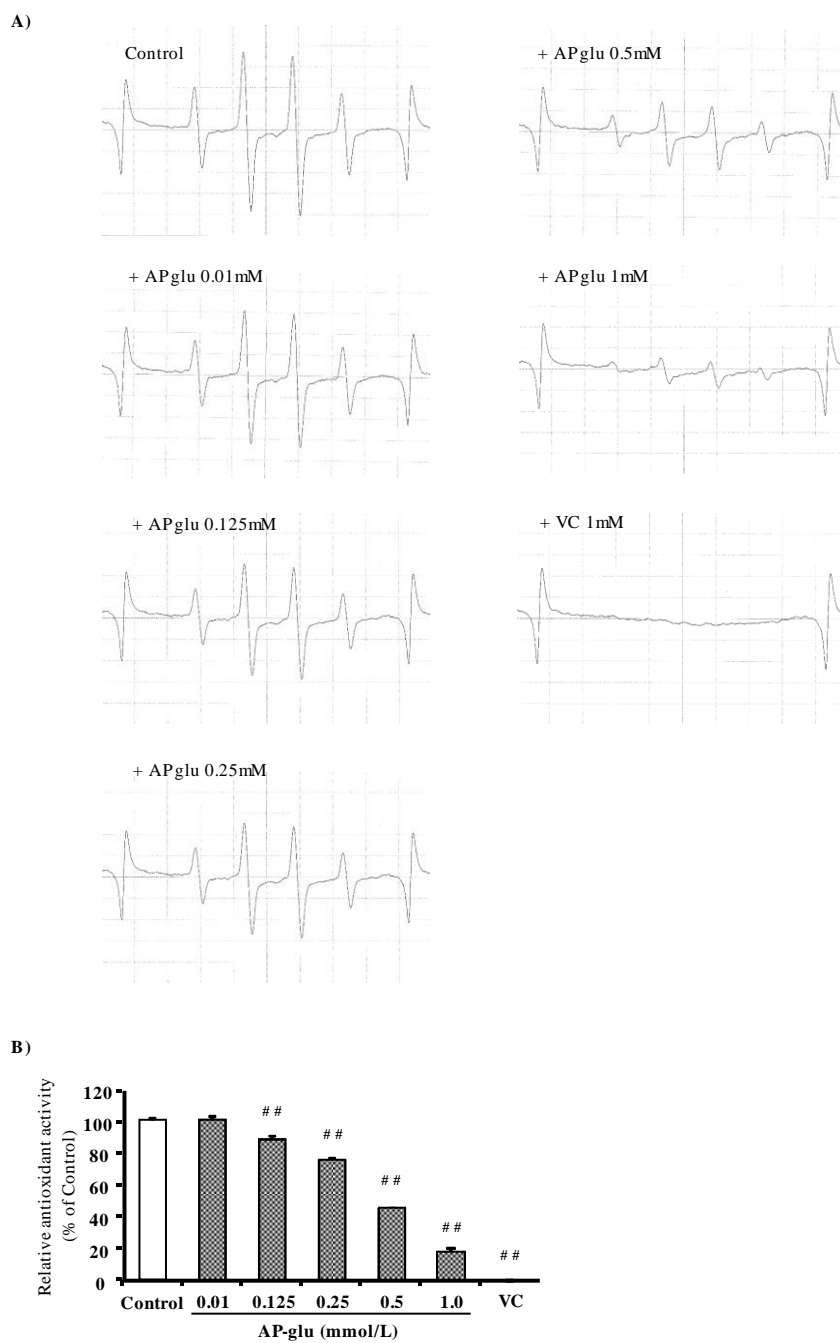


Fig.28 ESR spectra of AP-glu against $\text{OH} \cdot$ generated by H_2O_2 / UV system.

A) ESR spectra of DMPO spin adducts of $\text{OH} \cdot$; B) Relative antioxidant activity. The reaction solution contained DTPA (100 μM), DMPO (9 mM), H_2O_2 (0.5 mM) in the control or presence of AP-glu (0.01, 0.1, 0.25, 0.5, 1mM). VC was used as positive control. The sample was put into the ESR flat cell and irradiated with UV for 30 sec. Immediately after the UV-irradiation, ESR spectra were obtained. Values are expressed as the mean \pm SD (n = 3). ## < 0.01 in comparison to the control.

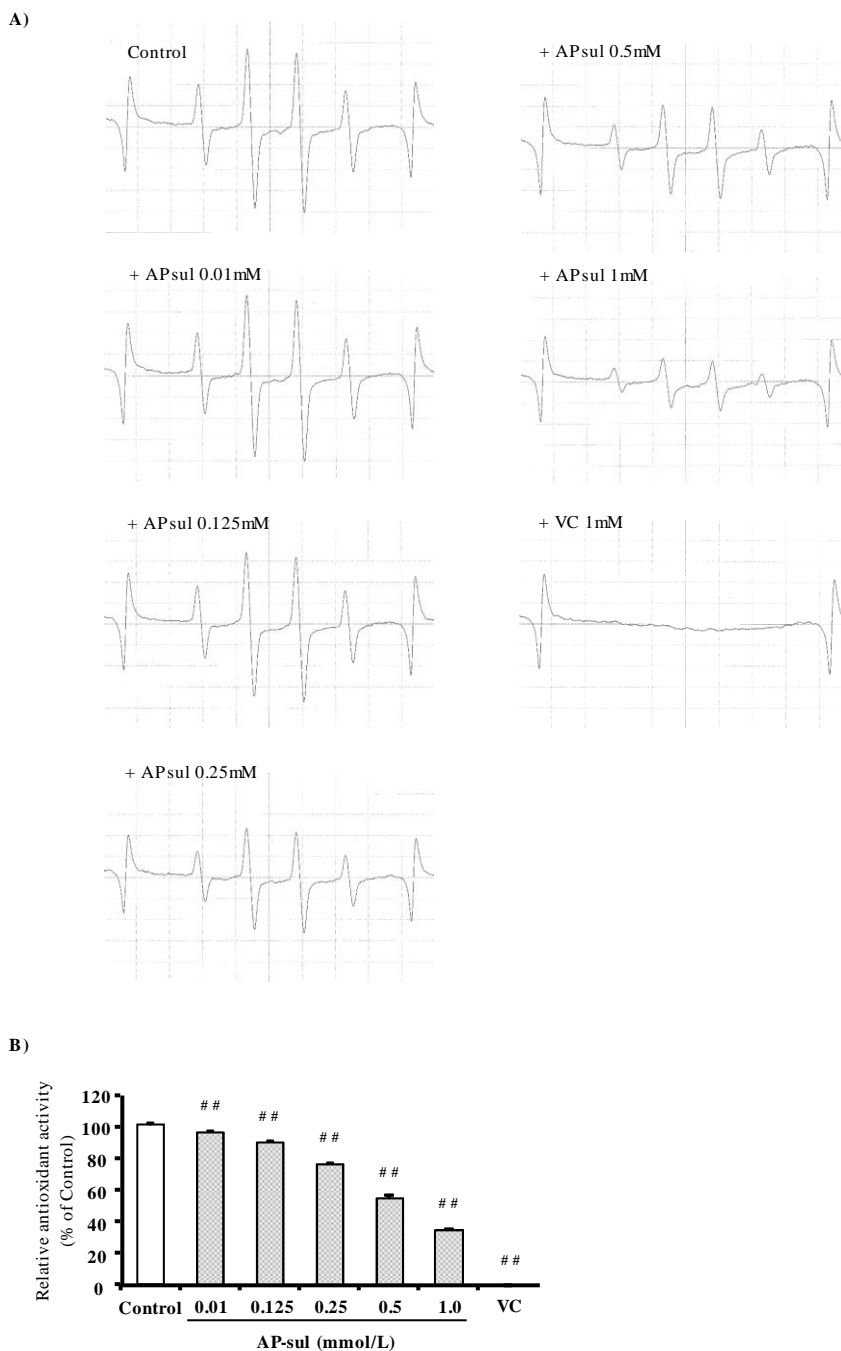


Fig. 29 ESR spectra of AP-sul against $\text{OH} \cdot$ generated by H_2O_2 / UV system.

A) ESR spectra of DMPO spin adducts of $\text{OH} \cdot$; B) Relative antioxidant activity. The reaction solution contained DTPA (100 μM), DMPO (9 mM), H_2O_2 (0.5 mM) in the control or presence of AP-sul (0.01, 0.1, 0.25, 0.5, 1mM). VC was used as positive control. The sample was put into the ESR flat cell and irradiated with UV for 30 sec. Immediately after the UV-irradiation, ESR spectra were obtained. Values are expressed as the mean \pm SD (n = 3). ## P < 0.01 in comparison to the control.

さらに ESR スピントラップ法により確認された AP-glu および AP-sul の OH・スカベンジ能に関して、APAP およびその代謝物の H₂O₂ 分解能について確認した結果、いずれにおいても H₂O₂ 分解能は確認されなかった (Fig. 30)。また 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) から生成するアルコキシルラジカルである LOO・に対する APAP およびその代謝物の影響を活性酸素吸収能力 (ORAC) 法にて評価した結果、APAP およびその代謝物の全てにおいて LOO・スカベンジ能が確認された (Fig. 31)。また、APAP、AP-glu、AP-sul それぞれの LOO・に対する抗酸化力は、代表的な抗酸化剤である Trolox 50 μM 相当換算濃度にして、0.76 μM、153 μM、605 μM となった (Table 1)。

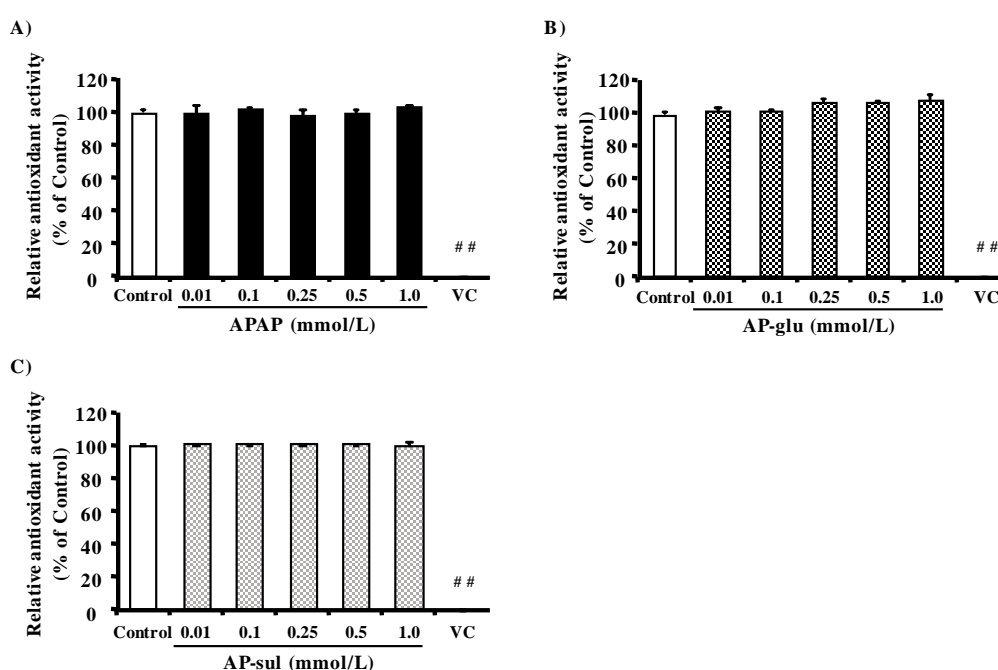


Fig.30 Decomposing ability for H₂O₂.

Decomposing ability of A) APAP, B) AP-glu, and C) AP-sul against H₂O₂ was evaluated. The reaction of KI and H₂O₂ generated I₃⁻, and its absorbance was measured at 350 nm. VC: 1 mM. Values are expressed as the mean ± SD (n = 3). ## P < 0.01 in comparison to the control.

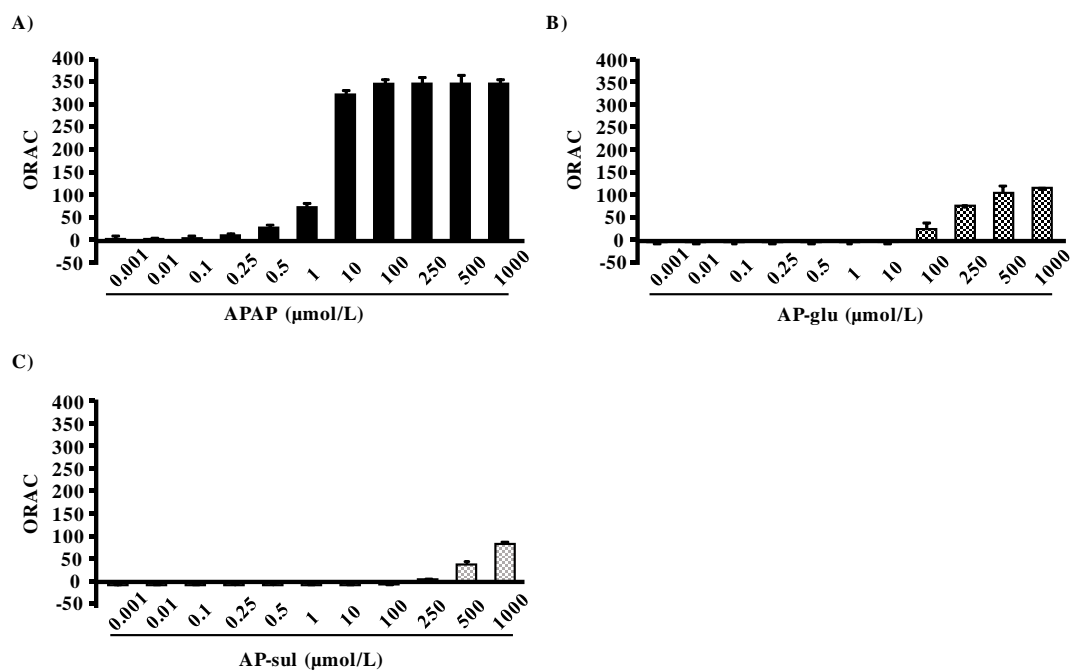


Fig. 31 Concentration-dependent scavenging ability of APAP and its metabolites against $LOO \cdot$ by ORAC method.

The concentration-dependent scavenging ability of A) APAP, B) AP-glu, and C) AP-sul against $LOO \cdot$ generated by AAPH were assessed by ORAC method. Values are expressed as the mean \pm SD (n = 4).

第3節 APAP およびその代謝物の細胞内 ROS 産生に与える影響評価

第2節の検討により、APAP およびその代謝物である AP-glu、AP-sul は ROS に対する直接的なラジカル消去能を有することが示唆された。また APAP は体内に投与されると比較的早期に AP-glu または AP-sul へと代謝される。そこでヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を用い、代表的な尿毒症物質である IS によって誘発された細胞内 ROS に対する APAP およびその代謝物の影響を評価した。その結果、IS を添加すると、有意な ROS 産生が認められた。また、各濃度の APAP およびその代謝物添加後の IS による ROS 産生を評価したところ、APAP では 0.01 mM 以上、AP-glu では 0.1 mM 以上、AP-sul では 1 mM 以上で濃度依存的な ROS 産生抑制効果が得られた (Fig. 32)。

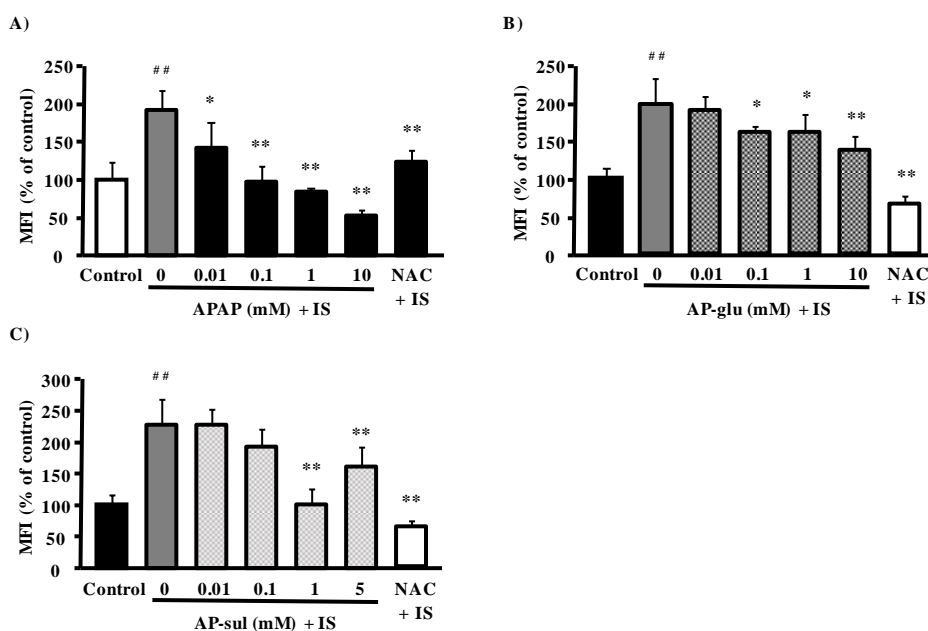


Fig. 32 Effect of APAP and its metabolites on intracellular ROS production induced by IS in HUVECs.

Intracellular ROS production were measured by mean fluorescence intensity at excitation 485 nm and emission 535 nm after 30 min incubation with APAP, AP-glu, or AP-sul and IS. Values are expressed as mean \pm SD (n = 4-6). N-acetylcysteine (NAC): 1 mM. ##: P < 0.01 versus control, *: P < 0.05 versus APAP or its metabolites 0 mM. **: P < 0.01 versus APAP or its metabolites 0 mM.

第4節 5/6腎摘除術CKDラットに対するAPAPの有効性評価

CKDモデルである5/6Nxラットを用いてAPAPの腎保護効果を検討した。本検討ではCKDモデル作成後、5/6Nxラットに対して生理食塩水(5 mL/kg/day)またはAPAP 150または750 mg/kg (5 mL/kg/day)を12週間連日経口投与することで検討した(Fig. 33)。

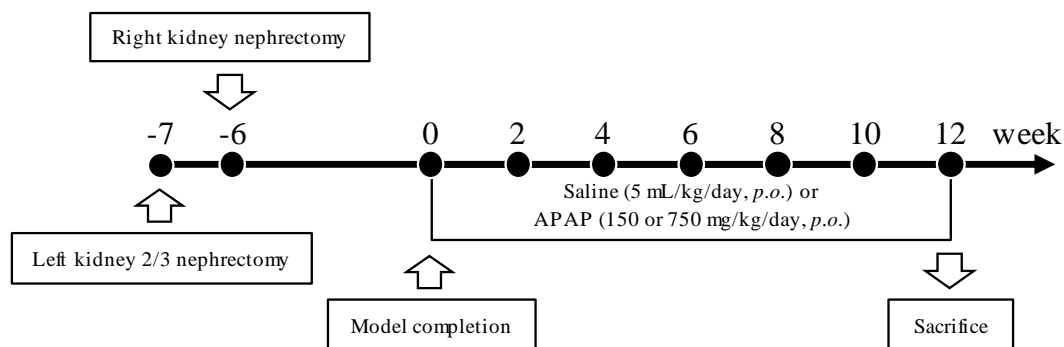


Fig. 33 Experimental scheme for evaluation of APAP on CKD rats.

Rats received 5/6 nephrectomy. At 6 weeks after final surgery, rats were randomly divided into 4 groups: (1) control rats, sham-operated; (2) 5/6Nx rats receiving saline (5 mL/kg/day); (3) 5/6Nx rats receiving APAP (150 mg/kg/day); (4) 5/6Nx rats receiving APAP (750 mg/kg/day). Saline or APAP was administered once daily for 12 weeks through a stomach tube after model completion.

まず初めにAPAP投与による腎機能パラメータを評価し、血球数算定を行った。APAP投与0週において、Control群と比較して、5/6Nx各群で有意なScr、BUN、尿中蛋白の上昇、尿毒症物質であるISの蓄積が認められた。また赤血球数(RBC)、ヘマトクリット(HCT)、ヘモグロビン(HGB)値の低下を認め、貧血傾向にあることが示された(Table 2)。12週目の各パラメータに関して5/6Nx + Vehicle投与群と5/6Nx + APAP投与群で有意な差は認めなかった(Table 2)。試験期間中に渡り、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST)、アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)値は正常であり、APAPの重篤な副作用である肝障害が誘発されていないことを確認した(Table 2)。

Table 2. Effect of APAP on general parameters in 5/6Nx rats at 0 and 12 weeks

	week	Control	5/6Nx + Vehicle	5/6Nx + APAP 150 mg/kg	5/6Nx + APAP 750 mg/kg
Scr (mg/dL)	0	0.50±0.07	1.24±0.34 [#]	1.23±0.21 [#]	1.26±0.42 [#]
	12	0.91±0.12	1.60±0.35 [#]	1.54±0.10 [#]	1.59±0.78 [#]
BUN (mg/dL)	0	14.65±1.40	28.84±5.29 [#]	29.47±3.47 [#]	28.05±3.44 [#]
	12	22.93±2.86	53.00±6.69 [#]	53.49±4.86 [#]	64.56±31.38 [#]
Urine protein (mg/day)	0	14.67±3.44	41.91±16.10 [#]	54.08±26.27 [#]	43.18±20.35 [#]
	12	13.75±4.06	74.56±22.61 [#]	92.91±32.97 [#]	84.50±15.70 [#]
IS (μM)	0	12.67±2.92	28.35±8.86 [#]	29.61±9.20 [#]	24.98±9.31 [#]
	12	6.98±2.51	29.33±7.91 [#]	29.93±14.42 [#]	30.74±4.53 [#]
AST (IU/L)	0	74.19±20.61	73.85±7.53	68.92±7.62	76.31±7.39
	12	56.82±11.15	61.14±5.56	62.00±7.35	54.43±6.14
ALT (IU/L)	0	22.12±3.17	18.35±1.77	20.12±4.46	19.76±6.99
	12	23.68±5.30	24.76±1.56	23.35±3.87	25.00±4.27
RBC (×10 ⁴ cell/mL)	0	725.63±5.45	616.50±47.90 [#]	625.80±44.25 [#]	662.40±23.90 [#]
	12	775.50±33.54	582.90±40.62 [#]	554.10±65.01 [#]	530.10±79.91 [#]
HGB (mg/dL)	0	14.18±0.23	12.54±0.62 [#]	12.75±0.83 [#]	13.32±0.56 [#]
	12	13.95±0.30	12.00±0.33 [#]	11.85±0.64 [#]	12.78±1.23 [#]
HCT (%)	0	40.99±0.47	35.43±2.45 [#]	35.94±2.65 [#]	37.62±0.94 [#]
	12	41.14±1.51	32.40±1.42 [#]	31.50±3.78 [#]	31.80±4.77 [#]

Values are expressed as the mean ± SD (control; n=4, other; n=5 at 0 and 12 week).

P < 0.05 compared with control group, ## P < 0.01 compared with control group.

Scr: serum creatinine, BUN: blood urea nitrogen, IS: indoxyl sulfate, AST: aspartate aminotransferase, ALT: alanine aminotransferase, RBC: red blood cell, HGB: hemoglobin, HCT: hematocrit

次に APAP 投与による腎組織形態学的変化を観察するために、hematoxylin-eosin (HE) 染色および PAS 染色を行った。5/6Nx+Vehicle 群では、糸球体肥大、尿細管拡張などの組織障害が確認された (Fig. 34A,B)。また azan-mallory 染色により線維化の評価を行ったところ、5/6Nx+Vehicle 群では間質の線維化が生じていた (Fig. 34C)。一方、APAP 投与によりこれらの組織障害および線維化が抑制されていた (Fig. 34C)。

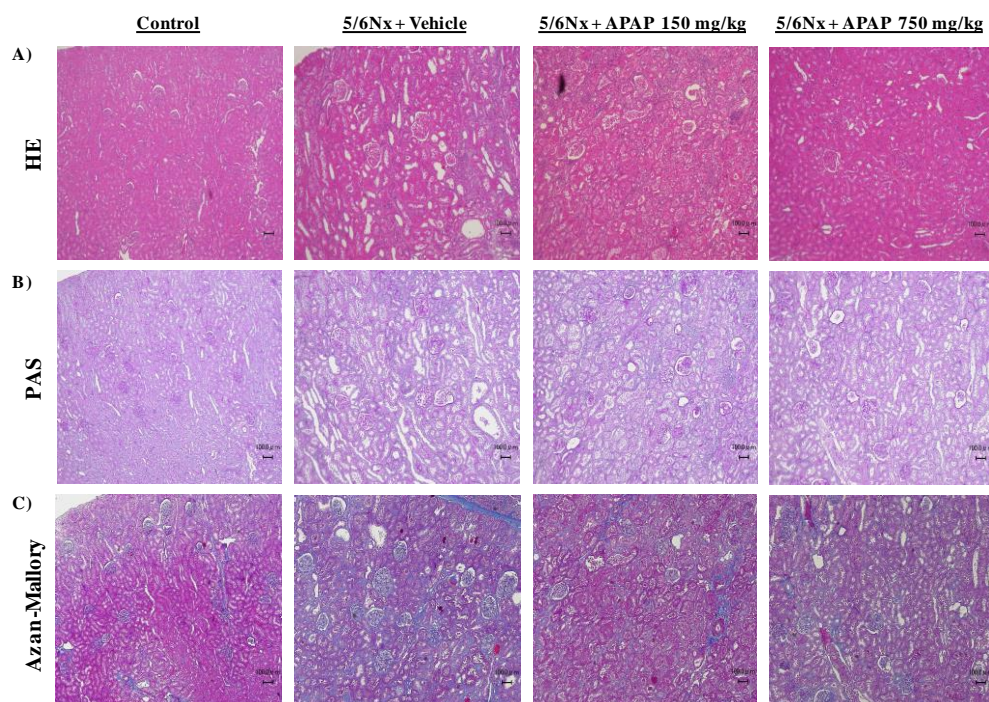


Fig. 34 Effect of APAP on histological features in 5/6 Nx rats.

Representative photomicrographs of A) HE, B) PAS, and C) azan-mallory-stained kidney sections were shown at 12 weeks after the model completion. Original magnifications $\times 100$. Scale bars represent 100 μm . Values are expressed as the means \pm SD (control; n=4, other; n=5).

また酸化ストレスに及ぼす APAP 投与の効果を評価したところ、核酸の酸化ストレス障害マーカーである 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine(8-OHdG)は 5/6Nx+Vehicle 群と比較し 5/6Nx+APAP 投与群において血漿中濃度は有意に低く、血中尿中比も同様の結果であった (Fig. 35A,B)。蛋白質の酸化ストレス障害マーカーである AOPP は各群間で有意な差はないものの、5/6Nx+APAP 750 mg/kg 投与群において抑制傾向にあった (Fig. 35C)。また腎組織中の酸化ストレス評価のために、 $\text{O}_2^{\cdot -}$ に反応し赤色発色するジヒドロエチジウム (DHE) 染色を行った。5/6Nx+Vehicle 投与群と比較し、5/6Nx+APAP 投与群はいずれも発色が抑えられていた (Fig. 35D)。さらに CKD ラットにおける血中または腎組織中の APAP およびその代謝物の濃度モニタリングを行った。APAP 投与 24 時間後に採血を行い、APAP およびその代謝物のトラフ濃度測定を行った。150 mg/kg、750 mg/kg 投与群いずれも経時的な代謝物濃度

の上昇が観察され、蓄積性が認められた (Table 3)。さらに 12 週間の薬物投与終了後に腎組織の摘出を行い、腎組織ホモジネート中の薬物濃度を測定したところ、高濃度の APAP 代謝物の蓄積が認められた (Table 3)。

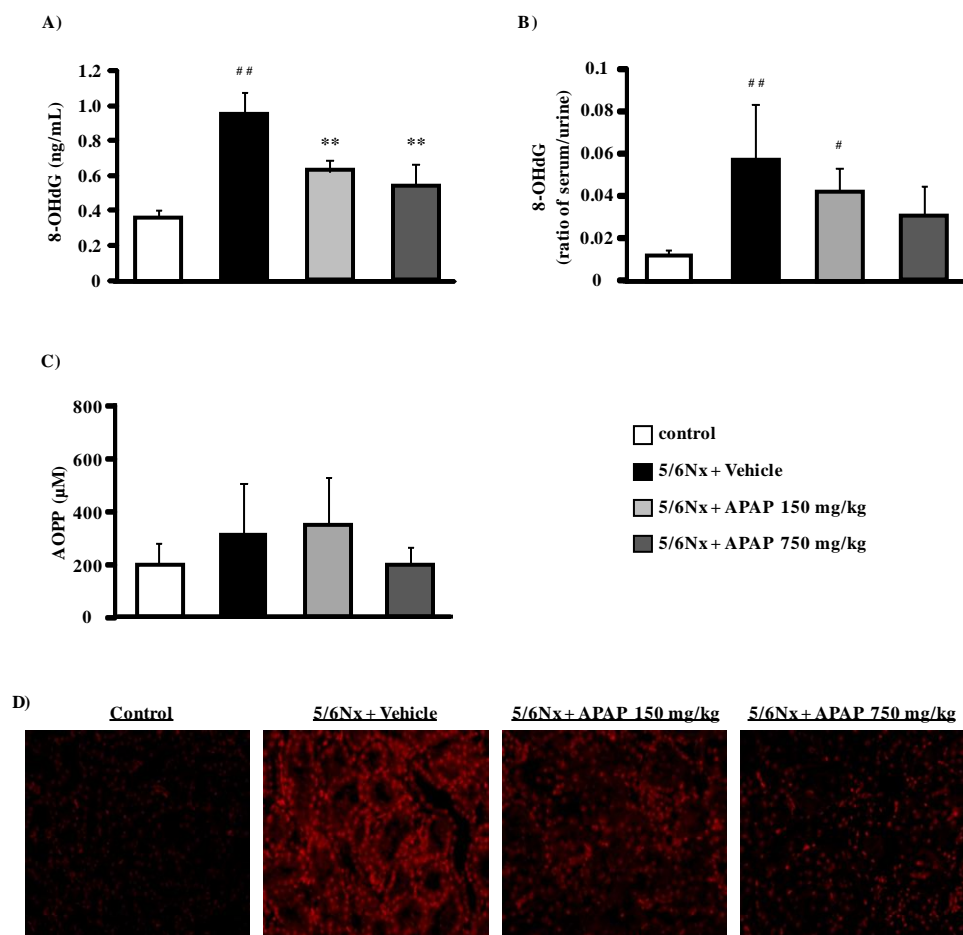


Fig. 35 Effect of APAP on oxidative stress markers in 5/6Nx rats.

The levels of A) plasma 8-OHdG, B) 8-OHdG (ratio of serum/urine), and C) plasma AOPP were measured. D) Representative photomicrographs of DHE-stained kidney sections were shown at 12 weeks after the model completion. Original magnification: $\times 200$. Values are expressed as the means \pm SD (control; n=4, other; n=5). #: P < 0.05 compared with control group, ##: P < 0.01 compared with control group, *: P < 0.05 compared with 5/6Nx + vehicle group, **: P < 0.01 compared with 5/6Nx + vehicle group.

Table 3. Concentration of APAP and its metabolite in plasma and kidney homogenates

		Plasma (μM)			Kidney (μM)
		4week	8week	12week	12week
Control and 5/6Nx + Vehicle	APAP	—	—	—	—
	AP-Glu	—	—	—	—
	APAP-Sul	—	—	—	—
5/6Nx + APAP 150 mg/kg	APAP	0.62±0.55	4.16±7.35	0.69±0.45	2.62±0.52
	AP-Glu	0.20±0.21	0.94±0.77	2.26±2.06	215.76±36.98
	APAP-Sul	0.43±0.27	0.87±0.11	1.06±0.98	65.88±9.76
5/6Nx + APAP 750 mg/kg	APAP	1.04±0.58	4.05±4.42	1.76±2.86	53.65±83.33
	AP-Glu	7.06±8.48	14.64±11.11	30.39±57.61	241.40±87.49
	APAP-Sul	1.92±1.97	7.09±6.36	32.33±63.45	802.72±1358.49

Values are expressed as the mean \pm SD (n = 5).

第5節 考察

本章では既存の鎮痛薬である APAP およびその代謝物が抗酸化作用を介した腎保護効果を有することを明らかにした。NTP と同様に APAP に関しても多くの疾患で抗酸化作用を介した臓器保護効果を示す可能性が示唆されており^{41,42}、腎臓に対しても横紋筋融解症誘発 AKI に対する腎保護効果が認められている⁴³。APAP は体内で速やかに代謝を受け、AP-glu または AP-sul となることで排泄されるが、腎不全時にはこれらの代謝物血中濃度の上昇が報告されている^{70,71}。これまでの我々の検討において、アデニン誘発腎不全モデルラットへ APAP を投与したところ、血中グルタチオン濃度の回復を伴う腎機能低下の抑制が認められるとともに、APAP が血中へ蓄積することなく2つの代謝物の血中濃度が上昇していることを報告している⁴⁵。このことは APAP だけではなく APAP 代謝物も抗酸化作用を示すことで腎保護的に作用することを示唆している。

そこでまず初めに、APAP の酸化ストレス抑制メカニズムを解明するために、ROS に対する APAP およびその代謝物の直接的なラジカル消去能への影響の評価を行った。DPPH ラジカル消去能測定法を用いて APAP、AP-glu、AP-sul のラジカルトラップ能を評価したところ、APAP は DPPH ラジカル消去能を有する一方で、AP-glu、AP-sul の DPPH ラジカル消去能は確認されなかったことから (Fig. 24)、不對電子捕捉による抗酸化能効果には APAP 特異的であることが示唆された。また、生体内に存在する ROS である $O_2^{\cdot-}$ や ONOO \cdot 、OH \cdot 、LOO \cdot に対する APAP およびその代謝物の影響を検討したところ、評価したすべての ROS に対して APAP およびその代謝物は消去能を有していたものの、その反応性は異なることが明らかになった (Fig. 25-30, Table 1)。今回の検討により、APAP は低濃度側においても OH \cdot 以外の ROS に対する消去能を有したが、AP-glu および AP-sul は高濃度側で全ての ROS に対する消去能を発揮することが明らかとなった。このことから腎不全時には、APAP 代謝物の血中濃度が上昇することにより、APAP の抗酸化作用に加え、特に細胞障害性の高い OH \cdot に対する AP-glu および AP-sul の抗酸化作用が働くことで、腎障害を抑制することが示唆された。一方で、APAP の OH \cdot に対する影響の検討においては、新たに出現するピークが観察された (Fig. 27)。APAP のラジカル産生機構として、N-acetyl-p-benzoquinone imine (NAPQI) の産生が知られている^{72,73}。これは APAP の水素原子が Cytochrome P450 (CYP450) によって引き抜かれる際に H_2O_2 が生成した後、APAP ラジカルによる酸素の還元により $O_2^{\cdot-}$ が産生される機構である。しかし、今回の系において CYP450 は存在していないため、この経路を介さない反応により APAP 由来のラジカルが産生された可能性がある。また APAP はフェノール性水酸基を有するため、各 ROS に対する反応性が高いことが予測され、実際に OH \cdot 以外の ROS に対する反応性は AP-glu、AP-sul と比較して高い結果が得られた。さらに AP-glu はヘミアセタール構造を有していることから、AP-sul よりも反応性が高い可能性が考えられる。この反応性の違いに

については、APAP およびその代謝物が構造のどの部分でラジカルを捕捉しているのか、またそのラジカル捕捉能の強さを今後詳細に検討していく必要がある。

血管内皮細胞である HUVEC を用いて IS に対する APAP およびその代謝物における細胞内 ROS 産生抑制効果を評価したところ、APAP およびその代謝物の細胞内 ROS 抑制能が認められた (Fig. 32)。CKD による糸球体障害の進行には血行動態変化に伴う内皮障害が起こっており、またその過程には酸化ストレスが関与しているため、APAP の HUVEC における酸化ストレス抑制作用によって腎組織保護効果が期待できる。

そこで実際に APAP が腎保護効果を示すか検討するために、5/6Nx モデルに対する APAP のヒトでの常用量もしくは高用量の長期投与による腎機能および酸化ストレスへ及ぼす影響について評価を行った (Fig. 33)。本モデルでは腎機能悪化、糸球体肥大・尿管拡張などの腎組織障害、貧血傾向、尿毒症物質の蓄積を示したことから、腎障害時の病態をよく反映しており、12 週間の評価期間の中で、いずれのパラメータに関しても経時的な増悪を示す進行性の病態であった (Table 2)。APAP 投与群においてはこれらパラメータに対し更なる悪化を引き起こすことはなく (Table 2)、本モデルラットにおいても APAP の忍容性の高さが確認された。また血中および腎組織中の APAP およびその代謝物の濃度を測定したところ、投与期間が長くなり、APAP 投与量が多くなるほど APAP 代謝物が蓄積されていることが明らかとなり、我々のアデニンモデルでの報告および臨床での報告を支持する結果となった (Table 3)。今回、*In vitro* において APAP および APAP 代謝物が代表的な ROS に対して直接的スカベンジ能を有することを見出したが、各種 ROS の中でも $\text{OH}\cdot$ は酸化力が強く、生成後、核酸およびタンパク質などの過酸化を引き起こすことが知られており、APAP よりもその代謝物による $\text{OH}\cdot$ 消去能の方が強力であることが明らかとなった (Fig. 27-29)。そのため、本検討で観察された APAP 投与による血漿および腎組織中での抗酸化作用は蓄積した APAP 代謝物による $\text{OH}\cdot$ を中心とした ROS に対する消去能が寄与していることが示唆された (Fig. 35)。さらに APAP 投与による腎線維化抑制作用が観察されたが、これは抗酸化作用を介したものだと考えられた (Fig. 34)。

腎障害時には腎機能低下に伴う排泄機能低下とともに、薬物代謝が変化することが報告されている⁷⁴。加えて、APAP に関してはグルクロン酸抱合体の腸管循環による APAP 血中濃度上昇が起こる。今回、APAP の腎障害時体内動態の変化の一つとして、APAP 代謝物の排泄遅延、蓄積が認められたが、代謝経路の変化および腸管循環の影響については十分に検討できていないため、腎障害時 APAP 投与による体内動態変化のより詳細な検討を行う必要がある。IS の血中濃度を定量したところ、APAP 投与による IS の濃度変化は観察されなかったため、硫酸転移酵素 (SULT) の発現および活性の変化はないことが示唆された (data not shown)。また、*in vivo* において今回は 1 日 1 回の投与であったが、臨床で使用されているように、1 日数回に分割投与にすることで、一定濃度以上の APAP 代謝物濃度を保ち、より効果的に APAP 代謝物の抗酸化能による腎保護効果が得られる可能性も考えられる。

本検討では、APAP およびその代謝物の抗酸化作用には直接的なラジカル消去機構が関

連しており、腎不全時特異的に APAP 代謝物が蓄積することで抗酸化作用を介したより強力な腎保護作用を有することが示唆された。

第6節 小括

本章では、動態特性を活かした代謝活性型の CKD 患者特異的な治療薬として既存薬である APAP の抗酸化作用を介した腎保護効果を検証し新規治療戦略を提案した。以下に得られた知見を小括する。

- 1) APAP およびその代謝物の ROS に対する消去能評価を行ったところ、APAP だけではなく、代謝物である AP-glu および AP-sul にもラジカル消去能が認められた。しかしながら、その反応性は異なっており細胞障害性が強い $\text{OH}\cdot$ に関しては APAP よりも代謝物である AP-glu および AP-sul でより強力な直接的ラジカルスカベンジ能が観察された。また APAP およびその代謝物は細胞内の ROS に対しても抑制を示したことから、直接的な ROS 消去能を介した抗酸化作用により腎保護的に働くことが示唆された。
- 2) 5/6Nx モデルを用いて APAP の腎保護効果を評価したところ、抗酸化作用および抗線維化作用を介した腎保護効果が認められた。また APAP の代謝物である AP-glu および AP-sul の蓄積が 5/6Nx ラットで観察され、腎不全時特異的に蓄積した代謝物による抗酸化作用を介して腎保護的に働いたと考えられる。

以上の知見より、APAP は既存薬の鎮痛薬でありながら、腎不全特異的に蓄積した APAP 代謝物によるプレイオトロピック効果としての抗酸化作用および抗線維化作用を介した新規 CKD 治療薬となり得ることが示唆された。

第4章 *In vivo* 血液透析モデルラットの構築とヒト透析除去率の予測

第1節 序

HD患者はCKD-MBDをはじめ、感染症や心不全、がんなど様々な合併症を併発し、それに伴い服用薬剤数も増大する⁷⁵。またHD患者では尿毒症物質の蓄積や血漿アルブミンの減少、腎機能廃絶による浮腫などが起こるため、健常人と比較して薬物動態が大きく異なる⁷⁶。そのためHD患者における至適な薬物投与設計は包括的なCKD治療戦略には必要不可欠である。さらにHD患者では、薬物の排泄が透析によって代替されているため、透析による薬物除去率に応じて薬物投与設計を行う必要がある。しかしながら、医薬品インタビューフォーム等においても薬物の透析除去率を表記している医薬品は少なく、臨床において薬物透析性に関する報告は不十分である。また国によってHD施行時の血液流量や透析液流量、透析時間などが異なり、HD施行の条件が一定でないため、薬物透析除去率報告値に乖離があるなど解決すべき課題は多い。さらにバンコマイシン(VCM)などの薬物では透析終了後、薬物が組織から血漿へ再分布することで血中濃度が再上昇するHD特有のリバウンド現象が観察されるため、HD前後での血中濃度変化のみからでは正確な評価ができない。そのため薬物投与設計が適切に行えず、治療不良や副作用発現につながる懸念される^{31, 32}。

薬物透析除去率に関する研究・手法は臨床研究以外にも*in vitro*や*ex vivo*を中心としたモデルがある。しかしながら、これらのモデルでは分布容積などの生体側因子の影響を考慮できておらず⁵¹、正確な薬物透析性評価には至っていないのが現状である。一方で、動物を用いた*in vivo*モデルに関しては比較的簡便かつ短時間で検討ができ、生体側因子の影響も考慮できるという利点がある。しかしながら、多くのモデルが犬⁷⁷やヤギ⁷⁸などの大型動物で行われているため実用性に乏しく、薬物の透析除去率を評価した報告もほとんどなされていない。また、薬物の透析性に影響を及ぼすタンパク結合率や分布容積には種差が報告されており⁵²⁻⁵⁴、動物モデルを用いて得られた結果をヒトへ外挿する場合には種々の生体内因子を考慮する必要があるなどの問題点が挙げられる^{55, 56}。

このような背景のもと、第3章では小型動物であるラットを用いて100分の1スケールに小型化したダイアライザーを用い、*in vivo*HDモデルを構築し、さらに本モデルから得られた結果をもとにヒトでの透析除去率を予測する計算式の確立を行った。

第2節 HD ratの構築と生理学的パラメータおよび透析効率の評価

両腎摘出ラットに小型ダイアライザーを接続し、HDを施行することでHD ratを構築した (Fig. 36)。HD ratはTable 4の条件下でHDを施行した。まず初めに、構築したHD ratによる生理学的パラメータの推移および透析効率の評価を行った。

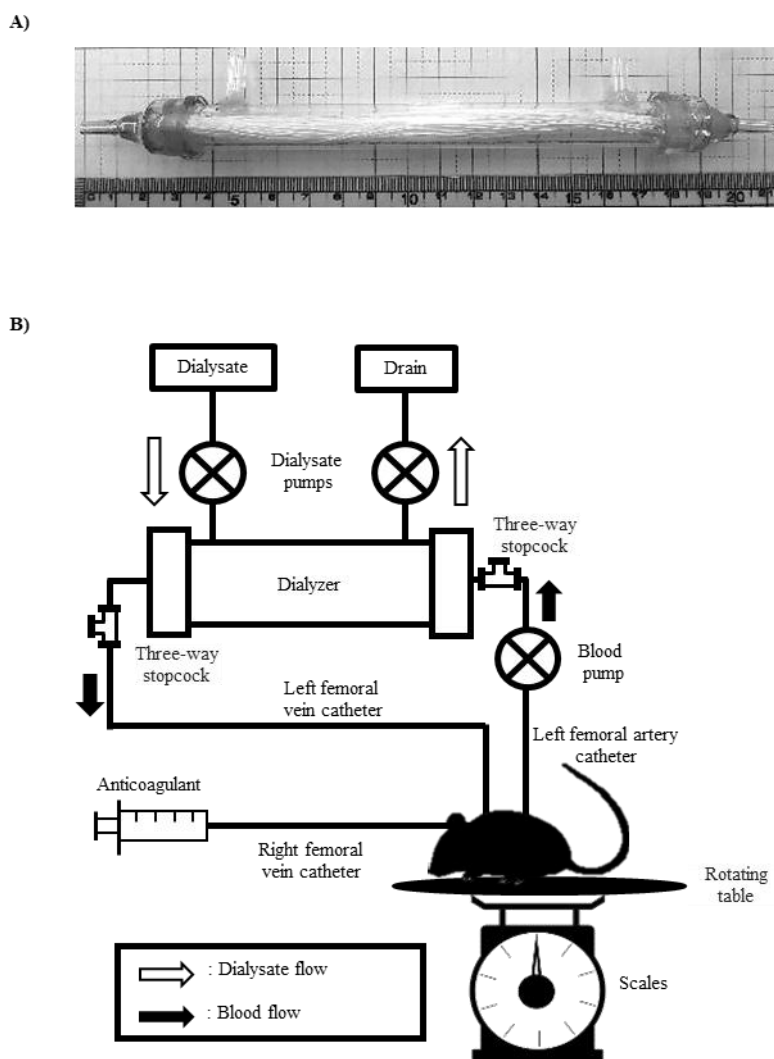


Fig. 36 Construction of hemodialysis system using rat.

A) Miniature dialyzer and B) schematic diagram of the HD protocol were shown. Miniature dialyzer contained PES membrane (113 cm²) and was gamma sterilized. The renal failure model rat was prepared by bilateral renal nephrectomy. Heparin (100 U/mL) was administered as an anticoagulant with 0.2 mL/h flow rate. Blood pump was AC-2120 PERISTA® BIO-MINIPUMP. Dialysate pump were AC-2120 PERISTA® BIO-MINIPUMP and Ceramic pump VSP-2050 (outflow side).

Table 4. Hemodialysis conditions of HD rat compared with clinical setting.

	HD rat	Clinical condition
Vascular access	Catheter	Arteriovenous fistula ^{a 79}
Flow rate		
Blood flow rate (mL/min)	1.0	180-239 ^{a 79}
Dialysate flow rate (mL/min)	5.0	500-549 ^{a 79}
Dialysis time (h)	2	3.0-5.4 ^{b 79}
Dialyzer		
Membrane type	PES	PS, CTA, PES ^{a 79}
Membrane area	113 cm ²	1.2-2.1 m ² ^{a 79}
Dialysate	Bicarbonate dialysate	Bicarbonate dialysate
Anesthesia	No	No

^a Vascular access, blood flow rate, dialysate flow rate, membrane type and membrane area at clinical condition was more than 10% of the total population in the paper.

^b Dialysis time at clinical condition was more than 5% of the total population in the paper.

PS: polysulfone, CTA: cellulose triacetate, PES: polyethersulfone.

HD rat における生理学的パラメータの推移を Fig. 37 に示す。なお HD を施行していないラット (non-HD rat) を比較対象とした。両モデルで両腎を摘出後、18 時間までに BUN および K⁺の上昇と、Na⁺、Cl⁻、HCT および HGB 低下が観察された (Fig. 37)。HD rat では HD 施行中に Na⁺や Cl⁻の上昇、BUN や K⁺の低下が観察され、電解質や腎機能パラメータが改善した (Fig. 37A - D)。一方で、HCT および HGB は継続的な低下が認められた (Fig. 37E,F)。また HD rat による透析効率を Table 5 に示す。HD rat における尿素および Cr の HD クリアランス (CL_{Urea}、CL_{Cr}) はそれぞれ 0.83 ± 0.07 mL/min、0.70 ± 0.08 mL/min、標準化透析量 (Kt/V) は 0.13 ± 0.06 となった (Table 5)。

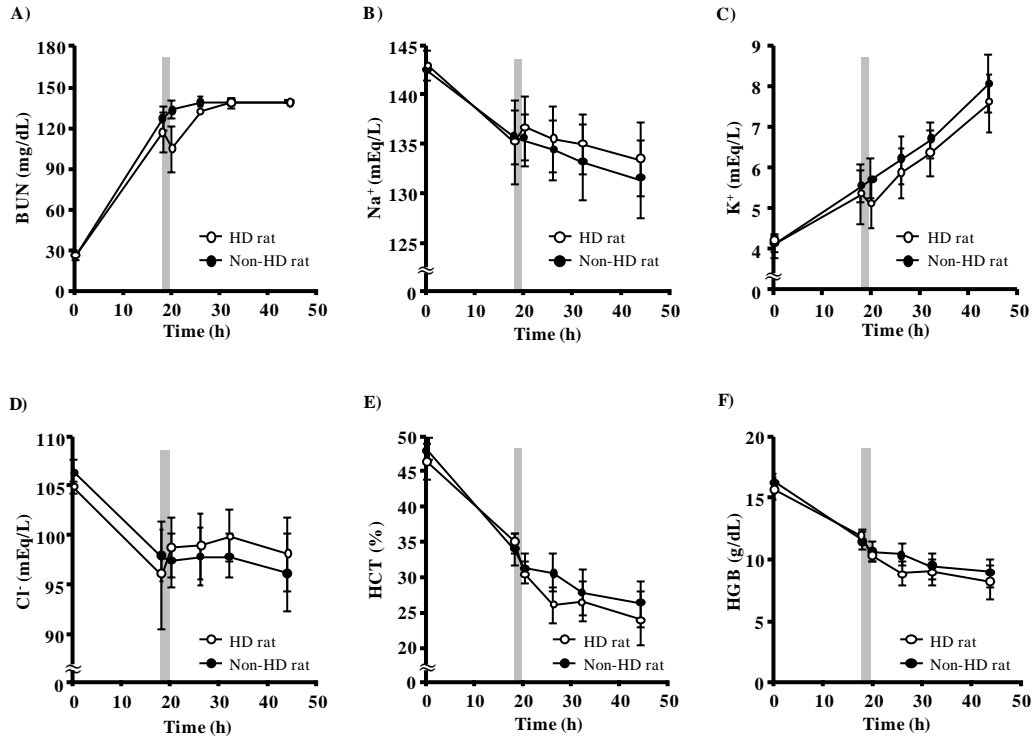


Fig. 37 Physiological parameters of each rat with or without HD.

The blood of each HD rat was corrected and A) blood urea nitrogen (BUN), B) sodium (Na^+), C) potassium (K^+), D) chloride (Cl^-), E) hematocrit (HCT), and F) hemoglobin (HGB) were measured. HD timing was represented by the gray area. The value of BUN reached a plateau at 140 mg/dL, which is the measurement limit of the i-STAT[®] 1 Analyzer. ○: HD rat (n=4-7), ●: non-HD rat (n=3-4). Values are expressed as the mean \pm SD.

Table 5. Dialysis efficiency by HD rat.

	CL_{Urea} (mL/min)	CL_{Cr} (mL/min)	Kt/V
<i>In vivo</i> model	0.83 ± 0.06	0.70 ± 0.08	0.13 ± 0.06
Clinical condition	$> 150^{\text{a } 80}$	$> 130^{\text{a } 80}$	$0.9 \sim 1.9^{\text{b } 79}$

^a CL_{Urea} and CL_{Cr} at clinical condition were the lower limit of the performance standard required for functional classification of dialyzer with a membrane area of 1.5m² based on clinical data.

^b Kt/V at clinical condition was more than 5% of the total population in the paper.

Values are expressed as the mean \pm SD.

CL_{Urea} and CL_{Cr} : the HD clearance of urea and creatinine, Kt/V: normalized dialysis dose.

第3節 HD rat における薬物の透析性の検討

HD rat を用いてアミカシン (AMK)、アプリンジン (AP)、VCM、ドリペネム (DRPM)、バルプロ酸 (VPA)、および APAP の血中濃度推移および透析除去率の評価を行った。non-HD rat を比較対象とした各薬物の血中濃度推移を Fig. 38 に示す。VCM 以外の薬物では経時的に血中濃度が減少したが、VCM では HD 施行後、血中濃度が再上昇するリバウンド現象が認められた (Fig. 38)。また各薬物における HD rat の透析除去率実測値およびその 4 時間換算値、臨床で報告されている透析除去率を Table 6 に示す。DRPM 以外の薬物では 4 時間換算した透析除去率が臨床報告値と近似した値を示した (Table 6)。DRPM に関しては臨床の透析除去率報告値よりも 4 時間換算した透析除去率が低い値を示した (HD rat vs 臨床報告値; $32.2 \pm 3.8\%$ vs $46.3\text{-}56.1\%$) (Table 6)。

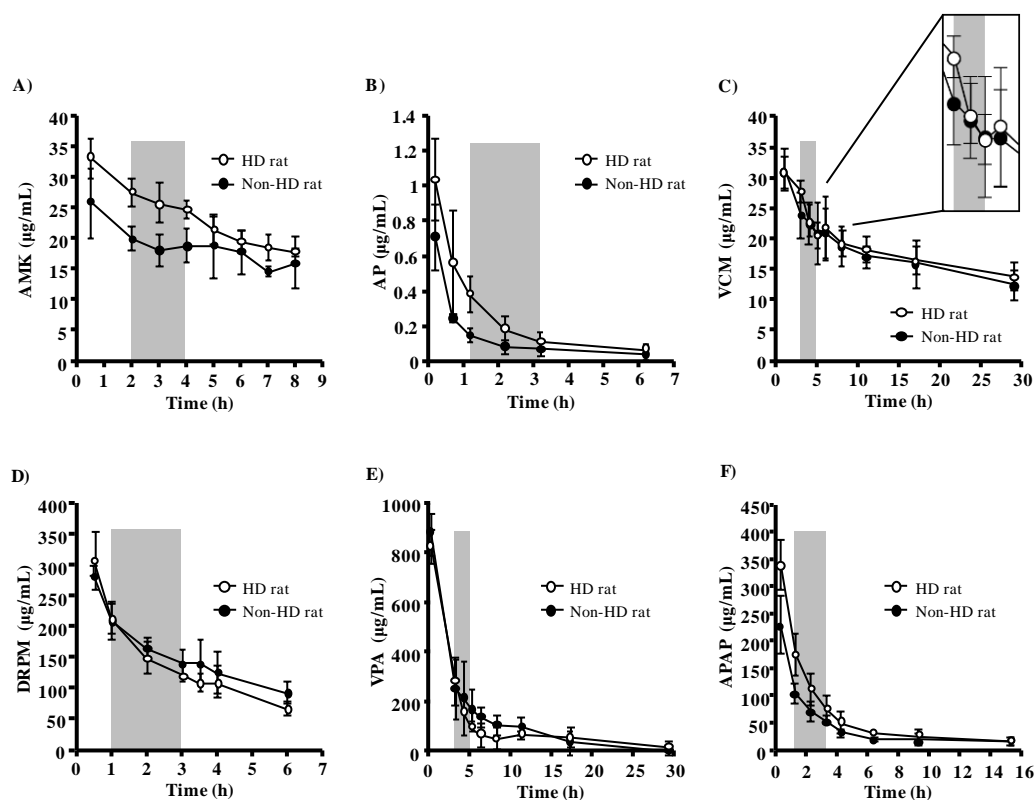


Fig. 38 Plasma concentration-time curve of drugs by HD.

The blood of each HD rat was corrected and concentration of drugs [A) amikacin (AMK), B) aprindine (AP), C) vancomycin (VCM), D) doripenem (DRPM), E) valproic acid (VPA), and F) acetaminophen (APAP)] was measured. HD timing was represented by the gray area. ○: HD rat (n=4-7), ●: non-HD rat (n=3-4). Values are expressed as the mean \pm SD.

Table 6. Comparison of drug removal of various drugs between human and *in vivo* model.

Hemodialysis time	Rat (%)		Human (%)
	2 h	4 h (estimated)	4 h
AMK	27.1 ± 2.7	54.2 ± 5.4	53 ⁸¹
AP	None ^a	0	None ^{a 56}
VCM	17.8 ± 3.1	35.6 ± 6.2	20.8-39.5 ⁸²⁻⁸⁴
DRPM	16.1 ± 1.9	32.2 ± 3.8	46.3-56.1 ^{b 85}
VPA	8.4 ± 3.7	16.8 ± 7.4	15.1-21.9 ^{86, 87}
APAP	6.1 ± 0.8	12.2 ± 1.6	10.8 ⁸⁸

Estimated removal rate of 4 h was calculated to double of 2 h data.

^a AP was not detected in dialysate.

^b Some data on removal rate of DRPM were obtained from SHIONOGI & Co., Ltd.

Values are expressed as the mean ± SD.

AMK: amikacin sulfate, AP: aprindine hydrochloride, VCM: vancomycin hydrochloride, DRPM: doripenem hydrate, VPA: sodium 2-propylvalerate (valproicacid sodium salt), APAP: acetaminophen.

第4節 ヒトおよびラット間でのタンパク結合率と分布容積の相違

各薬物のラットおよびヒトのタンパク結合率および分布容積を Table 7 に示す。DRPM のタンパク結合率はヒトよりもラットで高値を示した (ラット vs ヒト; $26.1 \pm 4.2\%$ vs $2.5 \pm 2.2\%$, $p < 0.01$) (Table 7)。また VCM、DRPM、VPA の分布容積はラットとヒトで近似した値を示した一方で、AMK や AP、APAP の分布容積はヒトとラットで異なる値を示した (ラット vs ヒト: AMK; $0.71 \pm 0.18\%$ vs $0.35-0.39\%$, AP; $54.5 \pm 15.3\%$ vs $4.1-10.5\%$, APAP; $24.4 \pm 7.4\%$ vs 4.59%) (Table 7)。

Table 7. Protein binding and distribution volume of various drugs between human and *in vivo* model.

	Protein binding (%)		Distribution volume (L/kg)	
	Rat	Human	Rat	Human
AMK	0.8 ± 6.2	0.5 ± 5.7	0.71 ± 0.18	$0.35-0.39$ ^{89, 90}
AP	93.3 ± 1.0	91.2 ± 1.2	54.51 ± 15.33	$4.1-10.5^a$ ⁹¹
VCM	35.0 ± 9.3	35.3 ± 6.9	0.85 ± 0.11	$0.51-0.94$ ^{82, 83}
DRPM	$26.1 \pm 4.2^{**}$	2.5 ± 2.2	0.37 ± 0.05	$0.30-0.40^b$ ^{85, 92}
VPA	24.4 ± 7.4	38.9 ± 5.0	0.46 ± 0.18	$0.1-0.4$ ^{56, 93}
APAP	25.7 ± 3.1	24.0 ± 1.7	2.21 ± 0.96	3.18^c ⁷⁰

^a Distribution volume were calculated by dividing distribution volume at steady state by the average of weight

^b Some distribution volume was calculated by dividing the average of distribution volume at steady state by the average of weight

^c Distribution volume were calculated by using half-life, the area under the curve, APAP dose and weight of HD patients. It was postulated that the bioavailability of APAP was 100%.

Values are expressed as the mean \pm SD.

AMK: amikacin sulfate, AP: aprindine hydrochloride, VCM: vancomycin hydrochloride, DRPM: doripenem hydrate, VPA: sodium 2-propylvalerate (valproic acid sodium salt), APAP: acetaminophen.

** $P < 0.01$ compared with Human.

第5節 HD rat を用いた HD 患者における薬物の透析除去率予測式の構築

測定した6つの薬物を用いて臨床報告値とHD ratの血液透析除去率の相関性を検討した (Fig. 39)。その結果、HD ratの透析除去率は臨床報告値との相関性を認めた ($r^2 = 0.788$; $p < 0.05$) (Fig. 39A)。またHD ratによる薬物の透析除去率をタンパク結合率で補正したところ、臨床報告値とより高い相関を示した ($r^2 = 0.916$; $p < 0.01$) (Fig. 39B)。しかしながら、分布容積で補正した薬物透析除去率 (Fig. 39C) やタンパク結合と分布容積の両方で補正した薬物透析除去率 (Fig. 39D) は臨床報告値と相関性を示さなかった (分布容積補正: $r^2 = 0.718$; $p = 0.07$, タンパク結合および分布容積補正: $r^2 = 0.726$; $p = 0.07$)。そのため、HD患者における透析除去率予測式をHD ratの透析除去率とタンパク結合率を用いて構築した。HD患者における透析除去率予測式を以下に示す。

ヒト透析除去率予測式 (%) = $2.1434 + 1.0651 \times \text{HD ratによる透析除去率} \times F$
 F : 非タンパク結合型分率比 (ヒト非タンパク結合率/ラット非タンパク結合率)

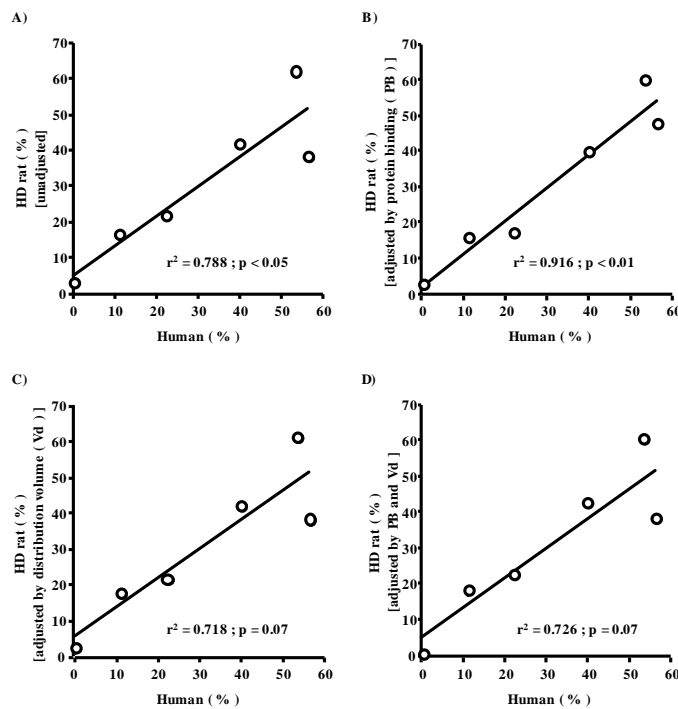


Fig. 39 Relationship between drug removal rates in human and HD rat adjusted by various drug characteristics.

Relationship between drug removal rates in human and A) unadjusted HD rat, B) HD rat adjusted for protein binding, C) HD rat adjusted for distribution volume, D) HD rat adjusted for protein binding and distribution volume. Correlativity between drug removal rates in human and HD rat adjusted by various drug characteristics was calculated by statistical software R.

第6節 考察

ラットを用いて薬物透析除去率評価系としての*in vivo*血液透析モデルの構築を行った。ラット^{94,97}やその他の動物^{77,78}も含めて*in vivo*血液透析モデルに関する報告は少なく、また、薬物の透析性評価に関して*in vivo*からヒトへの外挿法を検討したものは本検討が初めてである。

HD患者の薬物排泄は、HD導入時に残存しているわずかな腎機能も時間とともに徐々に失われていくため、最終的に無尿になるとダイアライザーのみで行われる。そこで、無尿のESKD患者の状態を再現するために、ラットは両腎を摘出し腎臓からの薬物排泄を完全に消失させた。その結果、両腎摘出後18時間までに腎機能の低下や電解質異常、貧血などが認められた。これはこれまでに両腎摘出による無尿モデルラットで報告されている結果と一致していた⁹⁸。またHDを施行することで尿毒症物質の除去や電解質異常の改善が認められた (Fig. 37)。尿素やCrのHDクリアランスは臨床の約1/200、Kt/Vは臨床の約1/10程度となった (Table 5)。この理由としてHDクリアランスには血液流量が大きく関与しており、本モデルの血液流量が臨床透析条件の約1/200である1 mL/minであるため、HDクリアランスも約1/200になったと思われる。また、Kt/Vに関しては、Daugirdasの式⁹⁹より臨床と比較して透析施行時間が短いことや体重あたりの徐水量が少ないことなどいくつか原因は挙げられるが、最も大きな要因としては本モデルにおけるHD施行前後でのBUN濃度比率 (BUN_{post}/BUN_{pre}) が大きかったためだと考えられる。臨床での報告と比較すると本モデルはHD開始時のBUN濃度が高値であり、1回のHD施行によるBUN減少率は小さかった (本モデルのHD開始前BUN濃度: 117 mg/dL, HD開始後BUN: 106 mg/dL)¹⁰⁰。その一方で任意の時間におけるダイアライザー前後のBUN減少率は臨床で報告されている値と同程度であった (HD開始1時間後におけるダイアライザー動脈側BUN: 111 mg/dL, ダイアライザー静脈側BUN: 18 mg/dL)¹⁰⁰。そのため、今回使用した小型ダイアライザーは臨床と同程度の性能を示した一方、HD開始時のBUNが高値であること、透析時間が短いこと、血液流量が少ないことによりBUNが除去しきれず、 BUN_{post}/BUN_{pre} が高くなり、最終的にKt/Vの低下へつながったと考えられる^{101,102}。これに加えて本モデルのBUN上昇スピードを考えると動物種や摂餌によるBUN生産速度の違いがKt/Vに影響を及ぼした可能性も考えられる。

薬物の透析性について、今回検討した6つの薬物のうち5つの薬物で臨床報告値を反映する透析除去率となった。VCMに関しては臨床で報告されている透析終了後のリバウンド現象^{103,104}がHDラットでも認められた。またDRPMに関してはラットのタンパク結合率がヒトよりも高いため、臨床報告値よりもHD ratで透析除去率が低くなったと考えられる (Table 6)。さらに今回のHD ratは無麻酔下でHDを施行しているが、これまでに報告されている多くのHDモデル動物に関して無麻酔下でのHDを施行しているものは少ない^{77,94,96}。実際に麻酔の有無は薬物の透析性に影響しており、無麻酔下モデルで評価したVCMの4時間換算透析除去率は以前当研究室で検討した麻酔下モデルと比較してより臨床報告値

(20.8-39.5%) に近似した値となった (無麻酔下vs麻酔下; $35.6\pm 6.2\%$ vs $47.9\pm 11.8\%$, $p = 0.053$) (data not shown)。以上のことからHD ratは薬物透析性に関して臨床の透析除去率報告値や種差によるタンパク結合率の影響を反映すること、臨床をより反映する無麻酔下モデルであることから薬物透析除去率評価系モデルとしての高い有用性が示唆された。

以前の研究よりタンパク結合率や分布容積の種差が報告されているため⁵²⁻⁵⁴、ヒトとラットのタンパク結合率および分布容積を算出した。その結果、今回検討した6つの薬物においても種差によるタンパク結合率および分布容積に差異が観察された (Table 7)。そのためHD ratをヒトへ外挿するためにはタンパク結合率などの生体内因子における種差の影響を考慮する必要性が示唆された。

そこで、臨床で報告されている透析除去率とタンパク結合率や分布容積などの生体内因子によって補正したHD ratによる透析除去率の相関性を評価した。その結果、HD ratの透析除去率実測値は臨床報告値と相関性を示した (Fig. 39A)。さらに相関性を向上させるため、薬物動態パラメータとしてタンパク結合率、分布容積およびその両者による補正を行なった。HD ratの透析除去率をタンパク結合率で補正したものは臨床報告値とより高い相関性を示した (Fig. 39B)。これはHD ratによるDRPMの透析性評価の結果を支持するものと考えられる。その一方で補正因子として分布容積を用いたHD ratの透析除去率は臨床報告値と相関性を示さなかった (Fig. 39C,D)。これまで分布容積よりもタンパク結合率のほうが薬物の透析性と相関性が高いことが報告されており^{55, 56, 105}、今回の結果はこれを支持する結果となった。一方、今回検討したAPやAPAPは分布容積が大きく、HDによって除去されにくい薬物が多かったため、分布容積が種差による影響を受けにくかったことが考えられる。しかしながら、今回HD ratおよびタンパク結合率を用いて構築したHD患者に対する薬物透析除去率予測式は種差による生体内因子の影響を考慮した非常に有用な予測式と考えられる。

今回の研究に関してはリミテーションがいくつかあげられる。まずHD ratの血流流量や膜面積には上限がある。ラット自体が小型動物であるため、血流流量や膜面積、体外血液循環量を増大させるとラットへの負担が大きくなる。そのため今回の透析条件よりも血液流量や膜面積を上げることは難しく、*in vitro*や*ex vivo*などによる透析除去率評価系を併用して血流速度や膜面積による薬物透析性への影響などを評価していく必要があるかもしれない。次に検討した薬物数が少ないことがあげられる。今回6つの薬物は透析性が大きいものから小さいものまで幅広く選択し、予測性の向上を図ってはいるものの、HD ratを用いてより多くの薬物透析性を評価する必要がある。そのため、タンパク結合率に種差が報告されているメロペネム⁵²や分布容積に種差が報告されているセファゾリン⁵⁴、その他様々なHD除去率の薬物をHD ratで検討し、より信頼性の高いヒト透析除去率予測式の構築をする必要がある。最後に、HD患者における薬物透析性や薬物動態に関するデータが限られていることである。今回使用した臨床データはこれまでに報告された論文を参考にしたが、臨床での薬物透析除去率に関する報告は少なく、血液流量や透析液流量、膜面積などの透

析条件を統一することができていない。またいくつかの薬物では分布容積に関する臨床データは健常者や子供のデータを用いた。

以上の知見より、構築した HD rat は臨床での透析を良好に再現したモデルとなった。また、タンパク結合率などの薬物の透析性に関連する因子による影響を反映することが明らかとなり、本モデルによる HD 除去率をもとにタンパク結合率を補助因子として用いることでヒトにおける透析除去率を予測できることが示唆された。今後、本モデルを用いて、より正確なヒト透析除去率予測構築を行うことで、抗がん剤のような臨床の現場で評価が困難な薬物の投与設計や新規医薬品開発での前臨床試験における薬物の透析性の基礎的データとして活用されることが期待される。

第7節 小括

本章では、包括的なCKD治療戦略として、CKDが進展しHD導入となった患者に対する薬物投与設計の最適化を企図し、100分の1スケールに小型化したダイアライザーを用いて *in vivo* HDモデルを構築するとともに、本モデルから得られた結果をもとにHD患者における薬物の透析除去率を予測する計算式の確立を行った。以下に得られた知見を小括する。

- 1) 両腎摘出ラットを作製し、術後18時間目における生理的パラメータを評価したところ、腎機能不全によるBUNの上昇や電解質異常、貧血等が観察され、HD患者の病態を反映するモデルとなった。それに加え、両腎摘出ラットは薬物の腎臓からの排泄が行われないため、無尿のESKD患者モデルとして有用であることが示唆された。
- 2) 両腎摘出ラットに対して100分の1スケールに小型化したダイアライザーを用いてラットにHDを施行するHD ratを構築したところ、BUNの除去や電解質の是正が確認された。また6つの薬物を用いてHD ratでの薬物透析性評価を行ったところ、ほとんどの薬物が臨床報告値と同様の透析除去率となった。さらにHD ratは無麻酔下でHDを施行しており、以前当研究室で検討した麻酔下でHDを施行したモデルと比較して、薬物透析除去率はより臨床報告値に近似したとなった。これらの結果より、HD ratはHD患者モデルおよび薬物透析除去率評価系として有用であることが示唆された。
- 3) ヒトとラットのタンパク結合率および分布容積を算出したところ、薬物によってはタンパク結合率および分布容積に種差が認められた。そこでタンパク結合率に種差があるDRPM（ヒト<ラット）に関して、透析除去率をHD ratによって評価したところ臨床報告値よりも低くなった。そのため、HD ratは薬物透析性に関連する生体内因子による影響を反映するとともに、HD ratをヒトへと外挿し、HD患者における薬物透析性を予測するためにはタンパク結合率や分布容積などの生体内因子における種差の影響を考慮する必要性が示唆された。
- 4) 今回検討した6つの薬物の結果から、臨床で報告されている透析除去率とタンパク結合率や分布容積によって補正したHD ratによる透析除去率の相関性を評価した。その結果、HD ratの透析除去率実測値は臨床報告値と相関性を示すとともに、HD ratの透析除去率をタンパク結合率で補正したものは臨床報告値とより高い相関性を示した。そのため、今回構築したHD ratおよびタンパク結合率を用いたHD患者における薬物透析除去率予測式は種差による生体内因子の影響を考慮した非常に有用な予測式だと考えられる。

以上の知見より、構築した HD rat は臨床での透析を再現したモデルであるとともに、薬物の透析性に関連する因子による影響を反映することが明らかとなった。本モデルによる除去率をもとにタンパク結合率を補助因子として用いることでヒトにおける透析除去率を予測できることが示唆された。今後、本モデルが抗がん剤のような臨床の現場で評価・検討が難しい薬物の投与設計や新規医薬品開発の際、前臨床試験における薬物の透析性の基礎的データとして活用されることが期待される。

第5章 総括

CKD は腎障害を示す所見や腎機能低下が慢性的に続く状態であり、病態が進展すると ESKD へと移行し、人工透析や腎移植などの RRT が生存のためには必要不可欠となる大変予後の悪い疾患である。実際に本邦の CKD 患者数は成人の約 8 分の 1 にあたる 1,330 万人であるのに加え、ESKD 罹患率も世界第 2 位であることから CKD は健康を脅かす重大な国民病として位置づけられている。CKD 発症のリスク因子である高齢化や生活習慣病の蔓延に加えて、CKD の初期は自覚症状も現れない「サイレントディゼーズ」ともいえる疾患であるため、今後も更なる CKD 患者の増加が危惧される。さらに CKD はその進展とともに合併症や死亡リスクが上昇することから、早期からの薬学的介入が重要となっているが、画期的な CKD 治療薬はいまだになく、その開発は急を要する。また ESKD から HD 導入となると、薬物の排泄が HD によって代替されるため、透析による薬物の除去量（率）に応じた投与設計が必要となる。しかしながら、透析による薬物の除去率の研究報告は少ないことや薬物血中濃度変化のみでは正確な評価が困難であるといったことから、適切な投与設計が行えずに、治療不良や副作用発現につながるものが懸念される。このように CKD はその初期から HD に至るまで絶えず変動する疾患であり、治療に関しても介入時期により種々様々な問題点を抱えているため、包括的な CKD 治療戦略が必要となっている。そこで私は育薬による新規 CKD 治療薬の探索をするとともに、HD 患者に対する薬物投与設計の最適化を試みた。具体的には CKD の中でも特に対応策が切望されている 2 つのポイント、1) プレイオトロピック効果としての抗酸化作用に着目した NTP および APAP による新規 CKD 治療薬としての有効性、並びに 2) *In vivo* 血液透析モデルラットを用いた HD 患者における薬物透析除去率予測に関する検討を行った。以下に得られた知見を総括する。

1. NTP の抗酸化作用に着目した新規 CKD 治療薬としての有用性評価

NTP の抗酸化作用を評価するために、代表的な ROS である $O_2^{\cdot-}$ や $ONOO^{\cdot}$ 、 OH^{\cdot} に対する NTP の消去能を評価した。その結果、程度の差はあるものの NTP は各種 ROS に対して直接的なラジカル消去能を有した。また HK-2 細胞を用いて NTP の細胞内 ROS 産生抑制能を評価したところ、各種刺激剤によって誘発された ROS に対する NTP の細胞内での抑制効果が観察された。さらに、HK-2 細胞を用いて低酸素状態における HIF-1 α のタンパク発現を評価したところ、低酸素状態で増大した HIF-1 α 発現は NTP によって抑制され、NTP は HIF-1 α を介した腎線維化を抑制することが示唆された。そこで次に 5/6Nx モデルを用いた NTP の CKD に対する腎保護効果を検討したところ、抗酸化作用に加え、腎線維化抑制作用を有する可能性が明らかとなった。さらに線維化モデルである UUO モデルを用いて NTP の腎保護効果を検討した結果、NTP の投与によって腎組織中マロンジアルデヒドの抑制や酸化ストレス部位の減少が観察され、直接的な ROS 消去能および NOX4 抑制を介した抗酸化作用が示唆された。また UUO モデルで認められた腎組織中ヒドロキシプロリン量や線維化面

積の増大は NTP によって抑制され、抗酸化作用や HIF-1 α 抑制を介した NTP の腎線維化抑制効果が認められた。さらに初期の腎線維化モデルである高 P 食マウスにおける NTP の腎保護効果を評価したところ、Sirius red 染色による線維化面積の減少が NTP 投与によって観察されるとともに、血漿 P 濃度や Scr の減少も認められ、NTP の腎保護効果が示唆された。

2. APAP の抗酸化作用に着目した新規 CKD 治療薬としての有用性評価

APAP およびその代謝物に対する抗酸化作用を検討するために各種 ROS に対するスカベンジ能力を評価したところ、APAP およびその代謝物はラジカル消去能を有していたものの、その反応性は異なることが示唆された。そこで、HUVEC を用いて APAP およびその代謝物の IS に対する細胞内 ROS 産生抑制効果を評価したところ、すべての APAP およびその代謝物において細胞内 ROS 抑制能が認められた。そのため 5/6Nx モデルを用い APAP の長期投与による腎機能および酸化ストレスについて評価を行った。その結果、APAP 投与によって腎機能の更なる悪化を引き起こすことはなく、CKD における APAP の忍容性の高さが確認された。また試験期間中に血中および腎組織中での APAP 代謝物の蓄積が観察されたのに加え、APAP 投与による 8-OHdG の有意な抑制効果や AOPP 抑制傾向、酸化ストレス部位の減少、また線維化面積の減少も認められたことから、腎不全特異的に蓄積する APAP 代謝物による酸化ストレスおよび腎線維化抑制作用を介した腎保護効果が示唆された。

3. In vivo 血液透析モデルラットの構築とヒト透析除去率の予測

小型ダイアライザーを用いて構築した *in vivo* HD システムである HD rat の有用性を評価した。その結果、両腎摘出モデルは腎機能の低下や電解質異常、貧血などが認められた。一方、HD rat は尿毒症物質の除去や電解質異常の改善が認められた。そのため、HD rat を用いて 6 つの薬物における血中濃度推移および透析除去率の評価を行ったところ、DRPM 以外の薬物では 4 時間換算した透析除去率が臨床報告値と近似した値を示した。興味深いことに、DRPM に関しては臨床の透析除去率報告値よりも 4 時間換算した透析除去率が低い値を示した。そこで薬物透析性と関連する生体内因子であるタンパク結合率および分布容積をラットおよびヒトでそれぞれ評価したところ、種差が認められた。さらに 6 つの薬物を用いて臨床報告値と HD rat の血液透析除去率の相関性を検討したところ、HD rat の透析除去率は臨床報告値との相関性を認めた。加えて、HD rat による薬物の透析除去率をタンパク結合率で補正したところ、臨床報告値とより高い相関を示したため、最終的に HD 患者における透析除去率予測式を HD rat の透析除去率とタンパク結合率を用いて構築した。

本研究において、CKD に対する包括的治療戦略を展開し、NTP と APAP の CKD 治療における薬物特性はそれぞれ異なるものの、育薬の観点からプレイオトロピック効果としての抗酸化作用に着目することで NTP および APAP が新規 CKD 治療薬となり得ることを明らかにした。加えて、*in vivo* HD モデルを用いてヒトにおける薬物透析除去率予測式を確立

することで、HD 患者に対する薬物透析性を予測し、薬物投与設計を最適化することが可能となった。本研究は病期によって多彩な変化および問題点を伴う CKD に対して育薬による新規治療薬の探索および薬物投与設計の最適化に基づいた薬学的介入を行うことで包括的 CKD 治療戦略を提供するための重要な知見である。

実験の部

実験試料

Neurotropin は日本臓器株式会社 (Osaka, Japan) より恵与されたものを使用した。Xanthine $\geq 99.5\%$ (HPLC) , purified by recrystallization、Xanthine Oxidase from bovine milk、Uric acid $\geq 99\%$, crystalline、DHR 123、トリプシン-EDTA、Indoxyl sulfate potassium salt、Ammonium molybdate、APAP、p-Acetamidophenyl β -D-glucuronide sodium salt、Paracetamol sulfate potassium salt、DHE、5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) は Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA) より購入した。アスコルビン酸、よう化カリウム、ルミノール、N,N-Dimethylformamide、クロラミン T、7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)、トリクロロ酢酸 (TCA)、過塩素酸、Histo VT one は Nacalai Tesque, Inc. (Kyoto, Japan) より購入した。N-アセチルシステイン、過酸化水素、DTPA (diethylene triamine-penta acetic acid)、モリブデン酸アンモニウム、SIN-1、2,2'-azobis(2-amidinopropane)dihydrochloride (AAPH)、ウラニン (フルオレセインナトリウム)、MES、5-sulfosalicylic acid dihydrate (SSA)、Cilastatin Sodium Salt (CS) は Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan) より購入した。Angiotensin II、Cell Counting Kit-8、D-MEM/Ham's F-12、10%中性緩衝ホルマリン液は FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation より購入した。O.C.T コンパウンドは Sakura Finete k 社、DMPO は LABOTEC Co., Ltd. (Tokyo, Japan) より購入した。Fetal Bovine Serum は Capricorn Scientific (Ebsdorfergrund, Germany) より購入した。5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (CM-H₂DCFDA) は Invitrogen (Eugene, OR, USA) より購入した。DPBS、Penicillin Streptomycin は Gibco (Uxbridge, UK) より購入した。p-cresyl sulfate は既報に従い合成した¹⁰⁶。ATCC ヒト細胞株 HK-2 は Summit Pharmaceuticals International Corporation (Tokyo, Japan) より購入した。HUVEC は Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd. (Osaka, Japan) より購入した。6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox) は Merck Millipore (Darmstadt, Germany) より購入した。HE 染色、PAS 染色試薬、Azan-Mallory 染色、Masson's trichrome 染色試薬およびマリノールは Muto Pure Chemicals Co., Ltd.より購入した。Amikacin Sulfate (AMK ; AMIKACIN Sulfate Injection 100mg "Nichiiko") は Nichi-Iko Pharmaceutical Co., Ltd. (Toyama, Japan)、Aprindine Hydrochloride (AP ; Aspenon[®] for iv inj. 100) は Bayer Yakuhin, Ltd. (Osaka, Japan)、Vancomycin Hydrochloride (VCM ; Vancomycin Hydrochloride For Intravenous Drip Infusion 0.5g) および Doripenem Hydrate (DRPM ; FINIBAX[®]) は SHIONOGI & Co., Ltd. (Osaka, Japan) から購入した。DPPH、Sodium 2-Propylvalerate (VPA) は Tokyo Chemical Industry Co., Ltd. (Tokyo, Japan) から購入した。Bicarbonate buffer (Sublood-BSG) と physiological saline は Fuso Pharmaceutical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)、Heparin Sodium (ノボ・ヘパリン注 5 千単位/5 mL) は MOCHIDA PHARMACEUTICAL Co., Ltd. (Tokyo, Japan) から購入した。アイ・スタット カートリッジ EC8+は Abbot Japan Co., Ltd. (Chiba, Japan) より購入した。また小型化した Polyethersulfone 膜 (PES 膜) ダイアライザーはニプロ総合研究所人工臓器開発センタ

ー (Shiga, Japan) から恵与されたものを使用した。ダイアライザーは Fig. 36A に示す。その他、試薬、溶媒類はすべて市販特級品を使用し、溶媒としての水はイオン交換水またはミリQ水を使用した。

統計解析

実験データは平均値±標準偏差 (SD) で示した。有意差検定は、単群間では対応のある student の t 検定、2 群間では対応の無い student の t 検定、3 群以上においては分散分析 (ANOVA) を用い、Turkey 法により多重比較検定を行った。生存率の有意差は Kaplan-Meier survival curve と log-rank test を用いて検定した。危険値が 0.05 以下であるとき、統計学的に有意であると評価した。また 50%阻害濃度 (IC₅₀) は Image J により得られた 4 係数ロジスティック近似式を用いて算出した。また、AMK、AP、VCM、DRPM、VPA、APAP の 6 つの薬物による *in vivo* 血液透析モデルの除去率実測値およびその補正值とヒト透析除去率間の相関係数、さらにヒト透析除去率予測式を統計ソフト R で算出した。

第2章に関する実験

1. $O_2^{\cdot-}$ に対する消去能評価

$O_2^{\cdot-}$ に対する消去能を電子スピン共鳴 (Electron spin resonance; ESR) 法および化学発光法を用いて評価した。

ESR 法ではスピントラップ剤である DMPO を用いて評価した。X 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、XO 0.02 U/mL、DTPA 100 μM 、DMPO 900 mM および NTP (0.1, 1, 10 NU/mL) をミリ Q 水中で混合し、フラットセル内に採取した。試料は全てミリ Q 水およびリン酸緩衝生理食塩水 (PBS; pH 7.4) を用いて調製した。混合後 1 分より、JES-FA100 型電子スピン共鳴装置 (日本電子社) を用いて ESR スペクトルを測定した。測定条件は以下の通りである。

《ESR 法測定条件》

Power	: 4 mW
Center field	: 335 mT
Sweep width	: 5 mT
Modulate width	: 0.07 mT
Sweep time	: 2 min
Amplitude	: 300
Time constant	: 0.1 sec

化学発光法における評価では X 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、XO 0.004 U/mL、DTPA 250 μM 、ルミノール 500 μM および NTP (0.1, 1, 10 NU/mL) を PBS (pH 7.4) 溶液中で混合し、Infinite® 200 PRO (TECAN) を用いて化学発光を連続測定した。X 添加後 30 秒から 4 分までの化学発光生成速度により評価した。

2. 尿酸の定量による XOx 活性評価

X 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、XO 0.004 U/mL、DTPA 250 μM および NTP (0.1, 1, 10 NU/mL) を PBS (pH 7.4) 溶液中で混合し、紫外可視近赤外分光光度計 (V-550, JASCO Corporation, Tokyo, Japan) を用いて 290 nm における吸光度を測定した。尿酸生成量は調製した既知の濃度の尿酸より算出し、X 添加後 4 分における尿酸生成量を評価した。

3. 蛍光分析法による ONOO $^{\cdot-}$ に対する消去能評価

SIN-1 (1 μM) と NTP (0.1, 1, 10 NU/mL) を PBS (pH 7.4) 溶液中で混合し、37°C で 10 分間インキュベートした後、DHR 123 (5 μM) を添加した。測定は Infinite® 200 PRO (TECAN) を用いて行い、励起波長: 485 nm、蛍光波長: 535 nm で蛍光強度を連続測定した。DHR123 添加後 1 分毎に 10 分間継続して測定した蛍光強度により評価した。

4. ESR 法による OH・に対する消去能評価

OH・に対する消去能は、スピントラップ剤 DMPO を用いた ESR 法により評価した。H₂O₂ 8.82 mM、DTPA 100 μM、DMPO 90 mM および NTP (0.1, 1, 10 NU/mL) をミリ Q 水中で混合し、フラットセル内に採取した。試料は全てミリ Q 水および PBS (pH 7.4) を用いて調製した。フラットセル内採取後すぐに UV ランプ (SUV-16, AS ONE Corporation, Osaka, Japan) を用いて UV (100 V, 60 Hz, 254 nm) を 10 秒間照射し、照射開始後 30 秒より、JES- FA100 型電子スピン共鳴装置 (日本電子社) を用いて ESR スペクトルを測定した。測定条件は以下の通りである。

《ESR 法測定条件》

Power	: 4 mW
Center field	: 335 mT
Sweep width	: 5 mT
Modulate width	: 0.07 mT
Sweep time	: 2 min
Amplitude	: 300
Time constant	: 0.1 sec

5. H₂O₂ 分解能評価¹⁰⁷

2.4 M 塩化カリウム溶液と 0.5 M Tris buffer (pH 7.5) を 1 : 2 の割合で混合し、反応原液とした。この反応原液と 100 μM H₂O₂ と NTP (0.1, 1, 5 NU/mL) を 2 : 1 : 1 の割合で混合し、反応液とした。また 25 mg/mL フタル酸カリウム、2.5 mg/mL 水酸化ナトリウム、82.5 mg/mL ヨウ化カリウム、0.25 mg/mL モリブデン酸アンモニウムを混合し、停止液とした。反応液を 37°C で 30 分間インキュベートした後、反応液と停止液が 1 : 1 の割合となるように停止液を加えた。添加後 30 秒後に Infinite® 200 PRO (TECAN) を用いて 350 nm で吸光度を測定した。

6. HK-2 細胞の培養

ヒト近位尿細管上皮細胞 HK-2 細胞の培養は 10% FBS、Penicillin Streptomycin (100 U/mL penicillin, 100 μg/mL streptomycin) を含む D-MEM/Ham's F-12 培地にて 37 °C、5% CO₂ の条件下で行った。継代は Trypsin-EDTA (0.25% trypsin, 0.2 g/L EDTA・4Na) 溶液により細胞をはがし、上記条件にて培養した。

7. 細胞内 ROS の測定

HK-2 細胞における細胞内 ROS の測定は、蛍光試薬である CM-H₂DCFDA を用いて行っ

た。通常、CM-H₂DCFDA は細胞内で発生する ROS により DCF となり蛍光を発する。HK-2 細胞を 96 well plate に 1.0×10^4 cell/well で播種し、CO₂ インキュベーターで 24 時間培養した。その後、上清を除去し、DPBS で洗浄後、CM-H₂DCFDA (最終濃度 5 μ M) を添加し、37 °C、5% CO₂ の条件下で 30 分間インキュベートし、細胞内に取り込ませた。上清を除去し、細胞外の CM-H₂DCFDA を取り除いた後に、NTP (0.1, 1 NU/mL) および刺激剤である H₂O₂ を添加し、37 °C、5% CO₂ 条件下で 3 時間インキュベートした。もしくは、HK-2 細胞を 96 well plate に 1.0×10^4 cell/well で播種および CO₂ インキュベーターで 24 時間培養後、NTP (0.001, 0.01, 0.1, 1 NU/mL) の 9 時間前処理を行った。上清の除去および DPBS での洗浄後、CM-H₂DCFDA (最終濃度 5 μ M) を添加し、37 °C、5% CO₂ の条件下で 30 分間インキュベートした。上清を除去した後に各種刺激剤 (IS、PCS、AII、H₂O₂) を添加し、37 °C、5% CO₂ 条件下で 3 時間インキュベートした。その後、励起波長: 485 nm、蛍光波長: 535 nm で蛍光を測定し MFI (mean fluorescence intensity) により評価した。測定には Infinite® 200 PRO (TECAN) を用いた。

8.細胞生存率の評価

HK-2 細胞における細胞生存率は、Cell counting kit-8®を用いて行った。HK-2 細胞を 96 well plate に 1.0×10^4 cell/well で播種し、CO₂ インキュベーターで 24 時間培養した。上清の除去および DPBS での洗浄後、NTP (0.1, 1 NU/mL) および H₂O₂ を添加し、37 °C、5% CO₂ の条件下で 24 時間インキュベートした。その後、Cell counting kit-8®を添加し 2 時間呈色反応させ、450 nm で吸光度を測定し生存率を評価した。測定には Infinite® 200 PRO (TECAN) を用いた。

9.HIF-1a の western blotting

HK-2 細胞中の HIF-1a タンパク発現を western blot 法を用いて評価した (HK-2 細胞の培養は、第 2 章に関する実験 6 参照)。低酸素状態下における NTP の HIF-1a タンパク発現を評価するため、HK-2 細胞を 6 well plate に 1.0×10^5 cell/well で播種し、CO₂ インキュベーターで 24 時間培養後、アネロバック®・ケンキ (スギヤマゲン) を用いて 24 時間低酸素状態 (O₂ \leq 0.1%) にした後、NTP 0.1 NU/mL を 3 時間前処理した。前処理後の HK-2 細胞に RIPA buffer (150 mM NaCl, 1%ノニデット P-40, 1%プロテアーゼ阻害剤カクテル, 10 mM Tris/HCl (pH7.4)) を加え、スクレーパーを用いてエッペンチューブに回収し、常温で 10 分間静置した後、遠心 (4°C、12000 rpm、15 min) して上清を回収した。上清とサンプルバッファー (0.17 mM Tris/HCl (pH6.8), 5.5 % sodium dodecyl sulfate, 13.3% sucrose, bromophenol blue 適量, dithiothreitol 0.25 mM) を混合した後、100 °C で 3 分間ボイルしたものを泳動サンプルとして使用した。タンパク 20 μ g が含まれるように 8%のポリアクリドアミドゲルにアプライし、8 mA/枚 (定電流) で SDS-PAGE を行った。泳動後、ゲルを親水化処理済みの PVDF 膜に転写し (100 V (定電圧) , 2 h)、5%スキムミルク in 0.1% Tween 20 in TBS (TBS-T) でブ

ロッキング(4°C, overnight)後、TBS-T 洗浄(RT, 5 min×3)に続き、一次抗体反応(4°C, overnight)を行った。TBS-T 洗浄(RT, 10 min×3)後、HRP 標識抗体を用いて二次抗体反応(RT, 1 h)を行った。再度 TBS-T で洗浄(RT, 10 min×3)後、発光試薬(SurperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific))と反応させ、LAS 4000 mini (GE Healthcare 社)で画像を取得した。バンド強度の定量は ImageJ ソフトウェアを使用した。また western blotting で使用した抗体および希釈濃度を以下に示す。

Antibody	Dilution ratio	Working solution
Rabbit anti-HIF-1a (Gene Tex 社, GTX127309)	1:5000	1%スキムミルク in TBS-T
Mouse anti-β-actin (Sigma Aldrich 社, A5411)	1:5000	1%スキムミルク in TBS-T
Mouse anti-rabbit IgG HRP (Santa Cruz 社, sc-2357)	1:10000	1%スキムミルク in TBS-T
Mouse IgG kappa binding protein HRP (Santa Cruz 社, sc-516102)	1:10000	1%スキムミルク in TBS-T

10. CKD モデルラットの作成および薬物投与スケジュール

実験には7週齢のSD系雄性ラット(KYUDO Co, Ltd., Saga, Japan)を用いた。麻酔管理条件下にて、左腎の上下3分の1を切除し、7日後に右腎全摘出を行った後、6週間経過したものを5/6Nxラットとした。モデル完成後にラットは2群に割り付けられた(5/6Nx + Vehicle群、5/6Nx + NTP群)。Nx + Vehicle群は生理食塩水、5/6Nx + NTP群はNTP 1 NU/kgを5 mL/kgで術後6週目から4週間連日経口投与を行った。薬物投与開始から4週間の生存期間を観察するとともに、4週間目における薬物投与終了後の血液および腎臓を採取し、各種評価を行った。

11. 生化学的パラメータの定量

NTP投与開始後0、2、4週目における採血後、遠心分離(3000 rpm, 4°C, 10 min)により得られた血漿を測定サンプルとして使用した。また各評価日による24時間蓄尿により得た尿を遠心分離(3000 rpm, 4°C, 10 min)し、夾雑物を除いたものを尿サンプルとして使用した。腎機能マーカーであるBUNおよびScrは富士ドライケム 7000Z装置と測定用スライド(富士ドライケムスライド BUN-PIIIおよびCRE-PIII)を用いて測定した。尿中クレアチニン(U_{Cr})は測定キット(富士フィルム和光純薬)を用いて評価し、 CL_{Cr} はScrおよび U_{Cr} 、蓄尿時間、尿量により算出した。尿蛋白はbradford法によって尿中のタンパク濃度を測定

し、 U_{Cr} で補正をかけることで算出した。

12.酸化ストレスマーカーの測定

血漿 AOPP 濃度の測定は、Witko-Sarsat らの方法により行った¹⁰⁸。血漿 10 μ L を PBS にて 20 倍希釈し、1.16 M ヨウ化カリウム 10 μ L、酢酸 20 μ L を混和し、340 nm における吸光度を Tecan SPECTRA Fluor Plus (Tecan 社) により測定した。0-100 μ M のクロラミン T 溶液 200 μ L に 1.16 M ヨウ化カリウム 10 μ L、酢酸 20 μ L を混和し、340 nm における吸光度を測定し、AOPP 濃度を算出した。

血漿チオール含量は、DTNB 法を用いて測定を行った¹⁰⁹。あらかじめ 100 mM KPB (pH 7.0) と 1 mM DTPA を混合した buffer A、buffer A 10 mL に DTNB 2.0 mg を混合した buffer B を調製しておいた。遠心分離 (3000 rpm, 4°C, 10 min) した血漿サンプル 20 μ L に buffer A 100 μ L 添加した well を blank well、血漿サンプル 20 μ L に buffer B 100 μ L 添加した well を sample well とし、添加後 15 分の 405 nm における吸光度を測定後、sample well と blank well における吸光度の差をとることによりチオール含量を算出した。

13.パラフィン切片の作製

薬物投与開始 4 週間後において、ラットの脱血および生理食塩水による心灌流を行った後に腎臓を摘出し、10%中性緩衝ホルマリン液によって腎臓を固定化した (4°C, 24 h)。固定化後、100%エタノールで 4°C保存した。次にパラフィン浸透機 (MILESTONE 社) 内で 100%エタノール、JFC solution およびパラフィンにそれぞれ 18 分、19 分、42 分に浸漬した後、パラフィンによる包埋を行った。その後、ロータリーミクロトーム (RM2155, Leica 社) を用いてパラフィンブロックを 2.0 μ m の厚みで薄切し、スライドガラスへと付着させることでパラフィン切片を作製した。

14.Masson's trichrome 染色

薬物投与開始 4 週間後における腎臓のパラフィン切片を作製した (手順は、第 2 章に関する実験 13 参照)。キシレン並びに 70、80、90 および 100% エタノールを用いてパラフィン切片中のパラフィンを除去した。その後、流水水洗 (5 min)、風乾、第一媒染剤 (15 min)、水洗 (3 min)、鉄ヘマトキシリン液 (5 min)、オレンジ G 液 (1 min)、1%酢酸 (10 sec \times 2)、ポンソー・酸フクシン・アゾフロキシ混合液 (8 min)、1%酢酸 (10 sec \times 2)、2.5%リタングステン (15 min)、1%酢酸 (10 sec \times 2)、アニリンブルー (4 min)、1%酢酸 (5 sec) およびイソプロパノールという順に試薬への浸漬もしくは洗浄を行った。最後にエタノールによる脱水およびキシレンによる透徹操作を行い、マリノールで封入した。光学顕微鏡 (BZ-X700) を用いて画像を取得した。画像の線維化面積の定量には ImageJ Fiji ソフトウェアを使用した。

15.UUO モデルラットの作成および薬物投与スケジュール

実験には7週齢のSD系雄性ラット（Japan SLC, Inc., Saga, Japan）を用いた。ラットは3群に割り付けられ（Control群, UUO + Vehicle群, UUO + NTP群）、UUO + Vehicle群およびUUO + NTP群は麻酔管理条件下においてラットの側腹を切開して左腎を露出させ、左腎尿管を結紮することでUUOモデルを作成した。Control群およびUUO + Vehicle群は生理食塩水、UUO + NTP群はNTP 1 NU/kgを5 mL/kgで片側尿管結紮の1週間前から片側尿管結紮2週間後までの21日間連日経口投与した。片側尿管結紮2週間後に血液および腎臓を採取し、各種評価を行った。

16.血漿中生化学的パラメータの定量

片側尿管結紮14日後に採血を行い、遠心分離（4000 rpm, 4°C, 10 min）により得られた血漿を測定サンプルとして使用した。腎機能マーカーであるBUNおよびScrは第2章に関する実験11に準じて測定した。

17.PAS 染色

片側尿管結紮処置14日後にラットから腎臓を摘出し、腎パラフィン切片を作製した（手順は、第2章に関する実験13参照）。キシレン並びに70、80、90および100%エタノールを用いてパラフィン切片中のパラフィンを除去した。その後、流水水洗（30 sec）、1%過ヨウ素酸水（10 min）、流水水洗（10 min）、コールドシッフ試薬（15 min）、亜硫酸水（3 min×3）、流水水洗（10 min）、マイヤー・ヘマトキシリン（1 min）および流水水洗（5 min）による操作を順番に行った。最後にエタノールによる脱水およびキシレンによる透徹操作を行い、マリノールで封入した。光学顕微鏡（BZ-8000、Keyence社）を用いて画像を取得した。

18.Azan-Mallory 染色

UUO処置後14日目における腎臓のパラフィン切片を作製した（手順は、第2章に関する実験13参照）。キシレン並びに70、80、90および100%エタノールを用いてパラフィン切片中のパラフィンを除去した。その後、媒染液（10 min）、流水水洗（5 min）およびアゾカルミンG（60°C, 30 min）、アゾカルミンG（RT, 20 min）の順に浸漬した。水洗後、5%リタンダステン酸液エタノール（70 min）、アニリン青・オレンジG液（35 min）の順で行い、流水水洗後、エタノールによる脱水およびキシレンによる透徹操作を行い、マリノールで封入した。光学顕微鏡（BZ-X700, Keyence社）を用いて画像を取得した。

19.腎組織中ヒドロキシプロリンの定量

UUO処置後14日目にラットから腎臓を摘出し、腎重量を測定後、腎臓サンプルにmiliQ 1 mLと50 w/v% TCA 125 μLを添加し、ホモジナイズ処理を行った。氷上に20分間静置した後に、10000 rpm、5 min、4°Cで遠心し、上清を除去後、10 N HClを500 μL加え、エッペ

ンのふたを開けたまま 110°C、16 時間でインキュベートした。乾燥したペレットを miliQ 1 mL で懸濁後、サンプル溶液 200 µL を別のエッペンにとり、クロラミン T 溶液 500 µL (クロラミン T 0.7 g, 酢酸 Na 2.05 g, イソプロ 5 mL を 50 mL にイオン交換水でメスアップ) を添加した。常温で 20 min 静置後、Ehnoh's 試薬 500 µL (IMD-MBA (4- (Dimethylamino) benzaldehyde)) 1.492 g, イソプロ 7 mL, 過塩素酸 3 mL) を添加した。65°C、15 min でインキュベート後、100 µL を 96 well プレートに添加し、540 nm の吸光度で測定した。

20.酸化ストレスマーカーの測定

腎組織中マロンジアルデヒド含量は TBARS Assay Kit (Funakoshi Co., Ltd., Kumamoto, Japan) を用いて測定した。腎組織中チオール含量は、DTNB 法により測定を行い (手順は、第 2 章に関する実験 13 参照)、サンプルは腎組織を 0.5% SSA 溶液でホモジネートしたものを用いた。腎組織中 SOD 活性は SOD Assay Kit - WST (Dojindo Co., Ltd., Kumamoto, Japan) を用い、添付のプロトコールに従って測定した。

21.Nitro-Tyr の蛍光免疫染色

UUO 処置 14 日後にラットから腎臓を摘出し、腎パラフィン切片を作製した (手順は、第 2 章に関する実験 12 参照)。キシレン並びに 70、80、90 および 100% エタノールを用いてパラフィン切片中のパラフィンを除去した。水洗 (5 min) 後、抗原賦活化液 (HistoVT ONE) に浸漬した (95°C, 30 min)。50 mM Tris/HCl (pH 7.5) (TB) による洗浄 (5 min×3) 後、3% H₂O₂ in メタノール溶液で RT、30 分間インキュベートした。TB による洗浄 (5 min×3) 後、4% ブロックエースにより 15 分間のブロッキングを行い、続いて、湿潤箱内で一次抗体反応 (4°C, overnight) を行った。TB による洗浄 (5 min×3) 後、ヒストファイン シンプルステイン MAX-PO (G) (414351、ニチレイバイオサイエンス) を適量滴下し、RT、30 分間インキュベートした。その後、TB による洗浄 (遮光, 5 min×3) を行い、DAB solution (0.02% DAB、0.05% H₂O₂、0.05% アジ化ナトリウム in 50 mM Tris/HCl (pH 7.5)) による反応を行った。水洗後、ヘマトキシリンに 1 分間浸漬し、再び水洗を行った。最後に、エタノールによる脱水およびキシレンによる透徹操作を行い、マリノールで封入した。光学顕微鏡 (BZ-X700) を用いて画像を取得した。また、免疫染色で使用した抗体および希釈濃度を以下に示す。

Antibody	Dilution ratio	Working solution
Rabbit anti-Nitro-Tyr (Millipore 社, AB5411)	1:50	0.5% BSA in PBS

22.電気泳動と western blotting

片側尿管結紮 14 日目にラットから腎臓を摘出し、腎ホモジネートを測定サンプルとして各種腎組織中タンパク発現を western blotting を用いて検討した (手順は、第 2 章に関する

実験 9 参照)。また、western blotting で使用した抗体および希釈濃度を以下に示す。

Antibody	Dilution ratio	Working solution
Rabbit anti-HIF-1a (Gene Tex 社, GTX127309)	1:5000	1%スキムミルク in TBS-T
Rabbit anti-TGF- β (CST Japan 社, 3711)	1:1000	1%スキムミルク in TBS-T
Rabbit anti-COL1A1 (CST Japan 社, 84336)	1:1000	1%スキムミルク in TBS-T
Rabbit anti-Nox4 (Santa Cruz 社, sc-30141)	1:1000	1%スキムミルク in TBS-T
Rabbit anti-GAPDH (CST Japan 社, 2118)	1:5000	1%スキムミルク in TBS-T
Mouse anti-rabbit IgG HRP (Santa Cruz 社, sc-2357)	1:10000	1%スキムミルク in TBS-T
Mouse IgG kappa binding protein HRP (Santa Cruz 社, sc-516202)	1:10000	1%スキムミルク in TBS-T

23.高リン食モデルラットの作成および薬物投与スケジュール

実験には 12 週齢の C57/BL6J 雄性マウス (Japan SLC, Inc., Saga, Japan) を用いた。マウスは 3 群に割り付けられ (Control 群, 高 P 食 + Vehicle 群, 高 P 食 + NTP 群)、Control 群は 0.35%P 含有餌 (TD10662 変型 P0.35%, オリエンタル酵母工業株式会社)、高 P 食 + Vehicle 群および高 P 食 + NTP 群は 2%P 含有餌 (TD10662 変型 P2.0%, オリエンタル酵母工業株式会社) を試験期間中に摂餌させた。また Control 群および高 P 食 + Vehicle 群は生理食塩水、高 P 食 + NTP 群は NTP 1 NU/kg を 10 mL/kg で 12 週間連日経口投与した。試験終了前日からの当日までの 1 日摂餌量の計量を行い、その後血液および腎臓を採取し、各種評価を行った。

24.血漿中生化学的パラメータの定量

薬物投与開始から 12 週間後に採血を行い、遠心分離 (4000 rpm, 4 °C, 10 min) により得られた血漿を測定サンプルとして使用した。腎機能マーカーである Scr は第 2 章に関する実験 11 に準じて測定した。生理学的パラメータである P および Ca は富士ドライケム 7000Z 装置と測定用スライド (富士ドライケムスライド Ca-PIIIおよび IP-PIII)を用いて測定した。

25. Sirius red 染色

薬物投与 12 週間後における腎臓のパラフィン切片を作製した（手順は、第 2 章に関する実験 13 参照）。キシレン並びに 70、80、90 および 100%エタノールを用いてパラフィン切片中のパラフィンを除去した。その後、ワイゲルト鉄ヘマトキシリン液（8 min）および流水水洗（10 min）を行った。次に、飽和ピクリン酸溶液 500 mL に Direct Red 80（43665、Sigma aldrich）0.5 g を溶解した反応液中で 1 時間インキュベートした。その後、0.1%酢酸で 2 度洗浄し、余分な水分を取り除いた。最後に、エタノールによる脱水およびキシレンによる透徹操作を行い、マリノールで封入した。光学顕微鏡（BZ-X700）を用いて画像を取得した。画像の線維化面積の定量には ImageJ Fiji ソフトウェアを使用した。

第3章に関する実験

26.DPPH ラジカルに対する消去能評価

通常ラジカルは不安定な物質であり、短時間で別の物質へと変換されるため、評価試験で使用することが困難となる。しかし DPPH は人工的に作られた安定なラジカルであり、操作も簡便であるため、試験的に不対電子スカベンジ能を確認するために用いられている。DPPH (0.33mM) に APAP、AP-glu、AP-sul (10 μ M-1 mM) のいずれかを MES buffer (pH; 7.4) 溶液中で混和し、60 分後に分光光度計にて 540 nm で吸光度を測定した。

27.化学発光試薬による $O_2^{\cdot-}$ に対する消去能評価

APAP、AP-glu、AP-sul (1 nM - 1 mM) の $O_2^{\cdot-}$ に対する消去能について化学発光法を用いて評価した。手順は、第2章に関する実験1を参照した。

28.蛍光分析法による ONOO $^-$ に対する消去能評価

APAP、AP-glu、AP-sul の ONOO $^-$ に対する消去能を蛍光分析法により評価した (手順は、第2章に関する実験3参照)。SIN-1 (100 μ M) と APAP、AP-glu、AP-sul (1 nM-1 mM) を PBS (pH 7.4) 溶液中で混合し、37°Cで 10 分間インキュベートした。インキュベート後、DHR 123 (50 μ M) を添加し、Infinite[®] 200 PRO (TECAN) を用いて蛍光強度を連続測定した。添加後 30 秒から 10 分までの蛍光強度により評価した。

29.ESR 法による OH $^{\cdot}$ に対する消去能評価

OH $^{\cdot}$ に対する消去能を ESR 法により評価した (手順は、第2章に関する実験4参照)。DTPA (100 μ M)、DMPO (9 mM) および APAP、AP-glu、AP-sul (10 μ M-1 mM) のいずれかを PBS (pH 7.4) 溶液中で混合し、フラットセル内に採取した。混合後 2 分より、JES-X320 型電子スピン共鳴装置 (日本電子社) を用いて ESR スペクトルを測定した。測定条件は次の通りである。

《ESR 法測定条件》

Power	: 40 mW
Center field	: 334.9 mT
Sweep width	: 5 mT
Modulate width	: 0.25 mT
Sweep time	: 2 min
Amplification	: 600
Time constant	: 0.3 sec

30.H₂O₂分解能評価

APAP、AP-glu、AP-sul の H₂O₂ 分解能を評価した（手順は、第 2 章に関する実験 5 参照）。反応原液と 20 mM H₂O₂ と試料（APAP、AP-glu、AP-sul（10 μM-1 mM））を 2 : 1 : 1 の割合で混合し、反応液とした。またフタル酸カリウム 714.29mg、水酸化ナトリウム 2500mg、ヨウ化カリウム 916.67mg、モリブデン酸アンモニウム 50mg を各々 10mL に溶解し、フタル酸カリウム 7mL、水酸化ナトリウム 200μL、ヨウ化カリウム 1.8mL、モリブデン酸アンモニウム 1mL を混合し、停止液とした。反応液を 3°C で 30 分間インキュベートした後、停止液を 500μL 加えた。添加後 30 秒後に分光光度計にて 350nm で吸光度を測定した。

31.ORAC 法による LOO[•] に対する消去能評価

ORAC 法は、蛍光プローブ（フルオレセイン）を用い、ROS により分解されるフルオレセインの蛍光強度を経時的に測定し、その変化を指標として抗酸化力を測定する方法である。この反応系に抗酸化物質が共存するとフルオレセインの蛍光強度の減少速度が遅延するため、標準物質である Trolox 存在下の Fluorescein の減少速度の遅延度合いと比較して、標準物質に換算した試料の抗酸化力を算出できる。

APAP、APglu、APsul（1 nM-1 mM）又は Trolox に Fluorescein を添加し、37°C で 30 分間インキュベートした後、ラジカル開始剤として AAPH を用いて活性酸素を発生させ、Infinite® 200 PRO（TECAN）を用いて蛍光強度を連続測定した。AAPH 添加後 30 秒から 1 時間までの蛍光強度の曲線化面積から算出した ORAC 値により評価した。

32.HUVEC 細胞の培養

HUVEC の培養は、10% Fetal calf serum（FCS）、L-glutamine（10 mM）を含む MCDB 131 にて 37°C、5% CO₂ 条件下で行った。継代は Trypsin-EDTA（0.25% trypsin、1 mM EDTA・4Na）溶液により細胞をはがし、上記条件にて培養した。

33.細胞内 ROS の測定

HUVEC 細胞における細胞内活性酸素種の測定は蛍光試薬である CM-H₂DCFDA を用いて行った（手順は、第 2 章に関する実験 7 参照）。HUVEC 細胞を 96 well plate に 1.0×10⁴ cell/mL で播種し、CO₂ インキュベーターで 24 時間培養した。その後、上清を除去し、DPBS で洗浄後、CM-H₂DCFDA（最終濃度 5 μM）を添加し、37°C、5% CO₂ 条件下で 30 分間インキュベートし、細胞内に取り込ませた。上清を除去し、細胞外の CM-H₂DCFDA を取り除いた後、APAP または AP-glu、AP-sul および IS（500 μM）を添加し、37°C、5% CO₂ 条件下で 30 分間インキュベートした。IS 添加後より、蛍光を測定し MFI により評価した。

34. CKD モデルラットの作成および薬物投与スケジュール

5 週齢の SD 系雄性ラット (KYUDO Co, Ltd., Saga, Japan) を用いて 5/6Nx モデルラットを作製した (手順は、第 2 章に関する実験 10 参照)。ラットは術後 6 週目に 4 群に割り付けられた (Control 群、5/6Nx + Vehicle 群、5/6Nx + APAP 150 mg/kg 群、5/6Nx + APAP 750 mg/kg 群)。Control 群および Nx + Vehicle 群は生理食塩水、5/6Nx + APAP 群は APAP 150 mg/kg 又は 750 mg/kg を 5 mL/kg で術後 6 週目から 12 週間連日経口投与を行った。投与開始後 2 週間毎に血圧測定、採血、24 時間蓄尿を行った。12 週間の薬物投与終了後、腎組織の摘出を行った。

32. 血漿中生化学的パラメータの定量

CKD モデル完成の 0 週目から試験終了の 12 週目まで 2 週間ごとに採血を行い、遠心分離 (4 °C, 4000 rpm, 10 min) して得られた血漿の Scr、BUN、AST、ALT をクレアチニン測定キット (LaboAssayTM Creatinine)、BUN 測定キット (尿素窒素 B-テストワコー)、AST・ALT 測定キット (トランスアミナーゼ CII-テストワコー) を用いて測定した。24 時間蓄尿後、Bradford 法により尿中蛋白量を測定した。全血 70 µL に EDTA-2Na 35µL を添加、混合したサンプルを Sysmex 社の多項目自動血球計数装置 KX-21NV にて測定した。

35. IS の測定

血漿中 IS 量の定量は HPLC 法を用いた。血漿サンプルはアセトニトリルと 1:9 の割合で混合し、遠心分離を行った (4 °C, 4000 rpm, 10 min)。上清を回収し、超純水と等量混合し、HPLC 測定サンプルとした。血漿サンプルは 20 µL アプライした。以下に HPLC 装置の詳細を記載する。

《HPLC 測定条件》

HPLC システム (Agilent 1100 series intelligent pump and a fluorescence spectrometer)

HPLC 条件

- カラム : LiChro-sorb RP-18 colum (Cica Merk 社)
- 移動相 : 0.2 M 酢酸緩衝液 (pH 4.0) : アセトニトリル (v/v) = 3 : 1
- 測定波長 : excitation/emission = 280/375 nm
- 流速 : 1.0 mL/min
- カラム温度 : 25°C

36. 酸化ストレスマーカーの測定

血漿 AOPP 濃度の測定は、Witko-Sarsat らの方法により行った (手順は、第 2 章に関する実験 12 参照)。血漿 8-OHdG、尿中 8-OHdG は New 8-OHdG Check、高感度 8-OHdG Check (Japan institute for the Control of Aging, NIKKEN SEIL Co., Ltd., Shizuoka, Japan) を用

いて測定した。

37.HE 染色

薬物投与 12 週間後における腎臓のパラフィン切片を作製した（手順は、第 2 章に関する実験 13 参照）。キシレン並びに 70、80、90 および 100%エタノールを用いてパラフィン切片中のパラフィンを除去した。その後、ヘマトキシリン液（90 sec）、温水（40 °C、60 sec）およびエオジン液（5 sec）の順に浸漬した。水洗後、エタノールによる脱水およびキシレンによる透徹操作を行い、マリノールで封入した。光学顕微鏡（BZ-X700, Keyence 社）を用いて画像を取得した。

38.PAS 染色

薬物投与 12 週間後における腎臓のパラフィン切片を作製した（手順は、第 2 章に関する実験 13 参照）。手順は、第 2 章に関する実験 17 を参照した。

39.Azan-Mallory 染色

薬物投与 12 週間後における腎臓のパラフィン切片を作製した（手順は、第 2 章に関する実験 12 参照）。手順は、第 2 章に関する実験 18 を参照した。

40.凍結切片の作製

薬物投与開始 4 週間後において、ラットの脱血および生理食塩水による心灌流を行った後に腎臓を摘出し、プラスチック包埋皿（Sakura Finetek 社）に腎臓を入れた後、O.C.T.コンパウンドで包埋することで凍結ブロックを作製した。その後、クリオスタット（CM3000II, Leica 社）により、凍結ブロックを 10 μm の厚みで薄切し、スライドガラスへと付着させることで凍結切片を作製した。

41.DHE 染色

薬物投与 12 週間後における腎臓の凍結切片を作製した（手順は、第 2 章に関する実験 38 参照）。DHE 溶液（5 μM , PBS）で 37°C、30 分間反応させた。その後 PBS で 1 回洗浄し（1 分間）、染色後は 90%グリセロール in PBS で封入し、蛍光顕微鏡（BZ-8000）を用いて画像を取得した。

42.APAP および代謝物濃度測定

APAP 投与 24 時間後に採取した血液を遠心分離した（4°C, 3,000 rpm, 10 min）。血漿 10 μL に過塩素酸（7%）、内標準物質（2-acetamidphenol）をそれぞれ 20 μL ずつ加え、17,000 g、5 min で遠心分離後、上清 10 μL を HPLC にて測定した。

《HPLC 測定条件》

HPLC システム (Agilent 1100 series intelligent pump and a fluorescence spectrometer)

HPLC 条件

ポンプ : LC-10AS (SIMADZU)

検出器 : SPD-10A (SIMADZU)

カラム : COSMOSIL 5C18-MS-II (ナカライテスク株式会社)

移動相 : acetonitrile (4%) -0.05 mM sodium sulfate buffer (96%)

測定波長 : ultraviolet absorbance (254 nm)

流速 : 1.5 mL/min

カラム温度 : 30°C

第4章に関する実験

43. ラットを用いた HD モデルの構築

実験には体重 600-750 g の Wistar 系雄性ラット (KYUDO Co, Ltd., Saga, Japan) を用いた。Fig. 36B に血液透析回路、Table 4 に血液透析条件を示す。麻酔下にてラットの側腹を切開して右腎を露出させ、腎動静脈および尿管を結紮し、腎臓を摘出した。右腎摘出後、同様にして左腎も摘出した。その後、大腿部を切開して、ヘパリン化生理食塩液 (100 IU/mL) を充填したポリエチレンチューブカテーテル (PE No.50, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) を左大腿動・静脈および右大腿静脈に留置した。カテーテルのもう一端は、背部の皮下を通して頸部より体外へ露出させた。

両腎摘出後 18 時間目より無麻酔下で留置カテーテルを血液透析回路に接続し、2 時間の血液透析を施行した。左大腿動静脈に挿入した各カテーテルは HD 中に採血ができるように血液側回路の三方活栓に接続した。右大腿動静脈に挿入したカテーテルは HD 中のヘパリン投与経路として使用した。血液側回路および透析液側回路の各回路はポンプによる流速調節を可能にし、血液流量 1 mL/min および透析液流量 5 mL/min になるように調節を行った。透析液として重炭酸緩衝液であるサブラッド®注血液ろ過用補充液 BSG (Sublood-BSG) を 37°C に加温し、透析開始前に透析回路内を還流させた。血液回路内にもサブラッド®注血液ろ過用補充液 BSG を還流させた後、透析開始前に回路内をヘパリン化生理食塩液 (100 IU/mL) で充填した。

44. 生理学的パラメータ評価

ラットの両腎摘出後、0、18、20、26、32、44 時間目に採血を行った。採血直後に、アイ・スタット 1 アナライザーを用いて、生理学的パラメータ [BUN, 電解質 (Na, K, Cl), HCT, HGB] を測定した。

45. 透析効率評価

HD1 時間目においてダイアライザー前後より採血を行い、透析効率の指標として CL_{Urea} および CL_{Cr} 、 Kt/V をそれぞれ算出した。 CL_{Urea} および CL_{Cr} に際して、BUN はアイ・スタット 1 アナライザー、クレアチニンは LabAssay™ Creatinine (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) を用いて濃度を測定した。また透析による濃縮および希釈の影響をなくすために、ダイアライザー後濃度を HCT によって補正した。HD クリアランスの算出には以下の式を用いた。

$$\text{HD Clearance (ml/min)} = \frac{C_a - C_v}{C_a} \times Ht_a / Ht_v \times Q_B$$

C_a : ダイアライザー動脈側濃度、 C_v : ダイアライザー静脈側濃度、 Q_B : 血流量、 Ht_a : ダイアライザー動脈側 HCT 値、 Ht_v : ダイアライザー静脈側 HCT 値

また Kt/V に関しては Daugirdas の式⁹⁹に基づいて以下の式で算出した。

$$Kt/V = -\ln\left(\frac{BUN_{post}}{BUN_{pre}} - 0.008 \times Td\right) + \left(4 - 3.5 \times \frac{BUN_{post}}{BUN_{pre}}\right) \times \Delta BW/BW$$

BUN_{pre}: HD 前 BUN 濃度、BUN_{post}: HD 後 BUN 濃度、Td: 透析時間、ΔBW:除水量、BW:HD 後体重

46.薬物血中濃度推移および HD 除去率評価

AMKおよびAP、VCM、DRPM、VPA、APAPの血中濃度推移および透析除去率の評価を行った。薬物は、投与用の右大腿静脈カテーテルより、マイクロシリンジポンプIC3100 (Kd Scientific Inc., Holliston, MA, USA) を用いて持続静注 (c.i.) した。各薬剤の投与量および投与速度はAMK 7 mg/kg/30 min、AP 7 mg/kg/10 min、VCM 10 mg/kg/h、DRPM 60 mg/kg/30 min、VPA 10mg/kg/15min、APAP飽和溶液 10 mL/kg/15 minとした。DRPMに関してはDRPM分解酵素であるジヒドロペプチダーゼ-I (DHP-I) の活性がヒトよりもラットで高いため⁵²、DHP-I阻害薬であるCSを併用した。

各薬物の血中濃度推移を評価するために、薬物持続静注後、経時的な採血を行った。HD中の透析廃液は全量回収し、透析液中の薬物濃度を測定することで透析回収液中に除去された薬物量を算出した。また今回2時間のHD施行であったため、推算薬物4時間透析除去率はHDラットの実測透析除去率値を2倍したものをを用いた。各薬物の透析除去率は以下の式にて算出した。

$$\text{透析除去率} = \frac{\text{透析液中薬物濃度 (mg/mL)} \times \text{透析液回収液量 (mL)}}{\text{総薬物投与量 (mg)}} \times 100$$

ヒトにおける各種薬物の透析除去率に関しては以前報告された論文を参考にした。透析除去率評価における薬物の濃度測定について、AMKは試薬キット TDX™ アミカシン「アボット」を用い、蛍光偏光免疫測定法により TDX®自動分析装置で測定した。

APおよびVCM、DRPM、VPA、APAPはHPLC法により測定した。

APの測定にはポンプとして LC-10AS (株式会社島津 GLC)、UV検出器として SPD-10A (株式会社島津 GLC) を使用し、VCM、DRPM、VPA、APAPの測定にはHPLC装置として Alliance®2695 (Waters Corporation, Milford, MA, USA)、UV検出器として 2489UV/Vis 検出器 (Waters Corporation, Milford, MA, USA) を使用した。

AP、DRPM、APAPの各測定は以前報告されている方法¹¹⁰⁻¹¹²に基づいて測定した。VPAは第17改正日本薬局方のバルプロ酸ナトリウムにおける定量法を基に測定した¹¹³。VCMは、試料血清 40 μL に内標準物質として 1H-Benzotriazole を 10 μL、Methanol を 40 μL 加えて攪拌し、18000 g、5 min、4°Cで遠心分離して得た上清 40 μL を用いて HPLC 法により測定した。測定条件としてカラムには COSMOSIL 5C18-MS-II Packed Column (5 μm,

Φ4.6×250 mm, Nacalai Tesque Inc., Kyoto, Japan) を用い、移動相として Acetonitrile-20 mM sodium phosphate buffer (12:88) を、1 mL/min の流速で送液し、カラム温度を 25°C に保った。検出波長は 210 nm とし、試料注入量は 25 μL とした。

47. ヒトとラットのタンパク結合率および分布容積算出

HD 患者の血清および両腎摘出後 18 時間経過したラットの血清を使用した。限外濾過は VCM で Vivaspin® 500 (NIPPON Genetics Co., Ltd., Tokyo, Japan)、それ以外の薬物は Amicon Ultra-0.5 (Merck Millipore Massachusetts, USA) を用いた。薬物を血清に添加後、試料リザーバーに入れ、遠心濾過を行った。遠心後に得られた限外濾液中および添加血清中の薬物濃度を測定し、タンパク結合率を算出した。遠心条件に関しては各薬物で限外ろ過液量がアプライ量の 20%未満になるように設定した。

タンパク結合率は以下の式にて算出した。

$$\text{タンパク結合率 (\%)} = \frac{C_T - C_F}{C_T} \times 100$$

C_T : 限外ろ過前血清薬物濃度、 C_F : 限外ろ過液中血清薬物濃度

またノンコンパートメントモデルは薬物動態解析に用いられ、Microsoft Excel のモーメント解析プログラムを用いてラットの分布容積を算出した。ヒトの分布容積に関しては以前報告された論文を参考にした。

参考文献

1. THE HIDDEN EPIDEMIC: WORLDWIDE, OVER 850 MILLION PEOPLE SUFFER FROM KIDNEY DISEASES. 2018.
2. Foundation, NK: K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Am J Kidney Dis*, 39: S1-266, 2002.
3. Evidence-based Clinical Practice Guideline for CKD 2018., 2018.
4. Matsushita, K, van der Velde, M, Astor, BC, Woodward, M, Levey, AS, de Jong, PE, Coresh, J, Gansevoort, RT, Consortium, CKDP: Association of estimated glomerular filtration rate and albuminuria with all-cause and cardiovascular mortality in general population cohorts: a collaborative meta-analysis. *Lancet*, 375: 2073-2081, 2010.
5. Wu, J, Jia, J, Li, Z, Pan, H, Wang, A, Guo, X, Wu, S, Zhao, X: Association of estimated glomerular filtration rate and proteinuria with all-cause mortality in community-based population in China: A Result from Kailuan Study. *Sci Rep*, 8: 2157, 2018.
6. Kovesdy, CP, Trivedi, BK, Anderson, JE: Association of kidney function with mortality in patients with chronic kidney disease not yet on dialysis: a historical prospective cohort study. *Adv Chronic Kidney Dis*, 13: 183-188, 2006.
7. Astor, BC, Levey, AS, Stevens, LA, Van Lente, F, Selvin, E, Coresh, J: Method of glomerular filtration rate estimation affects prediction of mortality risk. *J Am Soc Nephrol*, 20: 2214-2222, 2009.
8. Yamagata, K, Ishida, K, Sairenchi, T, Takahashi, H, Ohba, S, Shiigai, T, Narita, M, Koyama, A: Risk factors for chronic kidney disease in a community-based population: a 10-year follow-up study. *Kidney Int*, 71: 159-166, 2007.
9. Poljsak, B, Šuput, D, Milisav, I: Achieving the balance between ROS and antioxidants: when to use the synthetic antioxidants. *Oxid Med Cell Longev*, 2013: 956792, 2013.
10. Schieber, M, Chandel, NS: ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr Biol*, 24: R453-462, 2014.
11. Sawyer, DE, Mercer, BG, Wiklendt, AM, Aitken, RJ: Quantitative analysis of gene-specific DNA damage in human spermatozoa. *Mutat Res*, 529: 21-34, 2003.
12. Aitken, RJ: Reactive oxygen species as mediators of sperm capacitation and pathological damage. *Mol Reprod Dev*, 84: 1039-1052, 2017.
13. Halliwell, B: Oxidants and human disease: some new concepts. *FASEB J*, 1: 358-364, 1987.
14. Nunomura, A, Castellani, RJ, Zhu, X, Moreira, PI, Perry, G, Smith, MA: Involvement of oxidative stress in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol*, 65: 631-641, 2006.
15. Nunomura, A, Hofer, T, Moreira, PI, Castellani, RJ, Smith, MA, Perry, G: RNA oxidation in Alzheimer disease and related neurodegenerative disorders. *Acta Neuropathol*, 118: 151-166,

2009.

16. Tanaka, H, Fujita, N, Sugimoto, R, Urawa, N, Horiike, S, Kobayashi, Y, Iwasa, M, Ma, N, Kawanishi, S, Watanabe, S, Kaito, M, Takei, Y: Hepatic oxidative DNA damage is associated with increased risk for hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C. *Br J Cancer*, 98: 580-586, 2008.
17. Oberg, BP, McMenamin, E, Lucas, FL, McMonagle, E, Morrow, J, Ikizler, TA, Himmelfarb, J: Increased prevalence of oxidant stress and inflammation in patients with moderate to severe chronic kidney disease. *Kidney Int*, 65: 1009-1016, 2004.
18. Lee, DM, Jackson, KW, Knowlton, N, Wages, J, Alaupovic, P, Samuelsson, O, Saeed, A, Centola, M, Attman, PO: Oxidative stress and inflammation in renal patients and healthy subjects. *PLoS One*, 6: e22360, 2011.
19. Small, DM, Coombes, JS, Bennett, N, Johnson, DW, Gobe, GC: Oxidative stress, anti-oxidant therapies and chronic kidney disease. *Nephrology (Carlton)*, 17: 311-321, 2012.
20. Xu, G, Luo, K, Liu, H, Huang, T, Fang, X, Tu, W: The progress of inflammation and oxidative stress in patients with chronic kidney disease. *Ren Fail*, 37: 45-49, 2015.
21. Jha, V, Garcia-Garcia, G, Iseki, K, Li, Z, Naicker, S, Plattner, B, Saran, R, Wang, AY, Yang, CW: Chronic kidney disease: global dimension and perspectives. *Lancet*, 382: 260-272, 2013.
22. Masakane, I, Nakai, S, Ogata, S, Kimata, N, Hanafusa, N, Hamano, T, Wakai, K, Wada, A, Nitta, K: An Overview of Regular Dialysis Treatment in Japan (As of 31 December 2013). *Ther Apher Dial*, 19: 540-574, 2015.
23. Lysaght, MJ: Maintenance dialysis population dynamics: current trends and long-term implications. *J Am Soc Nephrol*, 13 Suppl 1: S37-40, 2002.
24. Tentori, F, Blayney, MJ, Albert, JM, Gillespie, BW, Kerr, PG, Bommer, J, Young, EW, Akizawa, T, Akiba, T, Pisoni, RL, Robinson, BM, Port, FK: Mortality risk for dialysis patients with different levels of serum calcium, phosphorus, and PTH: the Dialysis Outcomes and Practice Patterns Study (DOPPS). *Am J Kidney Dis*, 52: 519-530, 2008.
25. Floege, J, Kim, J, Ireland, E, Chazot, C, Drueke, T, de Francisco, A, Kronenberg, F, Marcelli, D, Passlick-Deetjen, J, Schernthaner, G, Fouqueray, B, Wheeler, DC, Investigators, A: Serum iPTH, calcium and phosphate, and the risk of mortality in a European haemodialysis population. *Nephrol Dial Transplant*, 26: 1948-1955, 2011.
26. Kalantar-Zadeh, K, Kuwae, N, Regidor, DL, Kovesdy, CP, Kilpatrick, RD, Shinaberger, CS, McAllister, CJ, Budoff, MJ, Salusky, IB, Kopple, JD: Survival predictability of time-varying indicators of bone disease in maintenance hemodialysis patients. *Kidney Int*, 70: 771-780, 2006.
27. Fujii, H, Joki, N: Mineral metabolism and cardiovascular disease in CKD. *Clin Exp Nephrol*, 21: 53-63, 2017.
28. Miura, S, Yoshihisa, A, Takiguchi, M, Shimizu, T, Nakamura, Y, Yamauchi, H, Iwaya, S,

- Owada, T, Miyata, M, Abe, S, Sato, T, Suzuki, S, Oikawa, M, Yamaki, T, Sugimoto, K, Kunii, H, Nakazato, K, Suzuki, H, Saitoh, S, Takeishi, Y: Association of Hypocalcemia With Mortality in Hospitalized Patients With Heart Failure and Chronic Kidney Disease. *J Card Fail*, 21: 621-627, 2015.
29. Zoja, C, Benigni, A, Remuzzi, G: The Nrf2 pathway in the progression of renal disease. *Nephrol Dial Transplant*, 29 Suppl 1: i19-i24, 2014.
30. de Zeeuw, D, Akizawa, T, Audhya, P, Bakris, GL, Chin, M, Christ-Schmidt, H, Goldsberry, A, Houser, M, Krauth, M, Lambers Heerspink, HJ, McMurray, JJ, Meyer, CJ, Parving, HH, Remuzzi, G, Toto, RD, Vaziri, ND, Wanner, C, Wittes, J, Wrolstad, D, Chertow, GM, Investigators, BT: Bardoxolone methyl in type 2 diabetes and stage 4 chronic kidney disease. *N Engl J Med*, 369: 2492-2503, 2013.
31. Dager, WE: What are the important drug use errors in dialysis patients? Pharmacokinetic and pharmacodynamic principles. *Semin Dial*, 23: 466-469, 2010.
32. Olyaei, AJ, Steffl, JL: A quantitative approach to drug dosing in chronic kidney disease. *Blood Purif*, 31: 138-145, 2011.
33. Kurella, M, Bennett, WM, Chertow, GM: Analgesia in patients with ESRD: a review of available evidence. *Am J Kidney Dis*, 42: 217-228, 2003.
34. Zhang, X, Donnan, PT, Bell, S, Guthrie, B: Non-steroidal anti-inflammatory drug induced acute kidney injury in the community dwelling general population and people with chronic kidney disease: systematic review and meta-analysis. *BMC Nephrol*, 18: 256, 2017.
35. D'Angio, RG: Nonsteroidal antiinflammatory drug-induced renal dysfunction related to inhibition of renal prostaglandins. *Drug Intell Clin Pharm*, 21: 954-960, 1987.
36. Zambraski, EJ: The effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on renal function: experimental studies in animals. *Semin Nephrol*, 15: 205-213, 1995.
37. Vega, J, Goecke, H, Méndez, GP, Guarda, FJ: Nephrotic syndrome and acute tubular necrosis due to meloxicam use. *Ren Fail*, 34: 1344-1347, 2012.
38. Krause, I, Cleper, R, Eisenstein, B, Davidovits, M: Acute renal failure, associated with non-steroidal anti-inflammatory drugs in healthy children. *Pediatr Nephrol*, 20: 1295-1298, 2005.
39. Clinical Practice Guidebook for Diagnosis and Treatment of Chronic Kidney Disease 2012. 2012.
40. Mallet, C, Daulhac, L, Bonnefont, J, Ledent, C, Etienne, M, Chapuy, E, Libert, F, Eschalier, A: Endocannabinoid and serotonergic systems are needed for acetaminophen-induced analgesia. *Pain*, 139: 190-200, 2008.
41. Tripathy, D, Grammas, P: Acetaminophen inhibits neuronal inflammation and protects neurons from oxidative stress. *J Neuroinflammation*, 6: 10, 2009.
42. Tripathy, D, Grammas, P: Acetaminophen protects brain endothelial cells against oxidative

- stress. *Microvasc Res*, 77: 289-296, 2009.
43. Boutaud, O, Moore, KP, Reeder, BJ, Harry, D, Howie, AJ, Wang, S, Carney, CK, Masterson, TS, Amin, T, Wright, DW, Wilson, MT, Oates, JA, Roberts, LJ: Acetaminophen inhibits hemoprotein-catalyzed lipid peroxidation and attenuates rhabdomyolysis-induced renal failure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107: 2699-2704, 2010.
44. Schildknecht, S, Daiber, A, Ghisla, S, Cohen, RA, Bachschmid, MM: Acetaminophen inhibits prostanoid synthesis by scavenging the PGHS-activator peroxynitrite. *FASEB J*, 22: 215-224, 2008.
45. Kadowaki, D, Sumikawa, S, Arimizu, K, Taguchi, K, Kitamura, K, Ishitsuka, Y, Narita, Y, Irie, T, Chuang, VT, Maruyama, T, Otagiri, M, Hirata, S: Effect of acetaminophen on the progression of renal damage in adenine induced renal failure model rats. *Life Sci*, 91: 1304-1308, 2012.
46. Hoshino, Y, Nakamura, T, Sato, A, Mishima, M, Yodoi, J, Nakamura, H: Neurotrophin demonstrates cytoprotective effects in lung cells through the induction of thioredoxin-1. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 37: 438-446, 2007.
47. Fang, WL, Zhao, DQ, Wang, F, Li, M, Fan, SN, Liao, W, Zheng, YQ, Liao, SW, Xiao, SH, Luan, P, Liu, J: Neurotrophin® alleviates hippocampal neuron damage through a HIF-1 α /MAPK pathway. *CNS Neurosci Ther*, 23: 428-437, 2017.
48. Ienaga, K, Mikami, H, Yokozawa, T: First indications demonstrating the preventive effects of NZ-419, a novel intrinsic antioxidant, on the initiation and/or progression of chronic renal failure in rats. *Biol Pharm Bull*, 32: 1204-1208, 2009.
49. Ienaga, K, Yokozawa, T: Treatment with NZ-419 (5-Hydroxy-1-methylimidazole-2,4-dione), a novel intrinsic antioxidant, against the progression of chronic kidney disease at stages 3 and 4 in rats. *Biol Pharm Bull*, 33: 809-815, 2010.
50. Ienaga, K, Park, CH, Yokozawa, T: Protective effect of an intrinsic antioxidant, HMH (5-hydroxy-1-methylhydantoin; NZ-419), against cellular damage of kidney tubules. *Exp Toxicol Pathol*, 65: 559-566, 2013.
51. Hudson, JQ, Comstock, TJ, Feldman, GM: Evaluation of an in vitro dialysis system to predict drug removal. *Nephrol Dial Transplant*, 19: 400-405, 2004.
52. Hori, T, Nakano, M, Kimura, Y, Murakami, K: Pharmacokinetics and tissue penetration of a new carbapenem, doripenem, intravenously administered to laboratory animals. *In Vivo*, 20: 91-96, 2006.
53. Berry, LM, Li, C, Zhao, Z: Species differences in distribution and prediction of human V(ss) from preclinical data. *Drug Metab Dispos*, 39: 2103-2116, 2011.
54. Sawada, Y, Hanano, M, Sugiyama, Y, Iga, T: Prediction of the disposition of beta-lactam antibiotics in humans from pharmacokinetic parameters in animals. *J Pharmacokinetic Biopharm*,

- 12: 241-261, 1984.
55. Keller, F, Wilms, H, Schultze, G, Offerman, G, Molzahn, M: Effect of plasma protein binding, volume of distribution and molecular weight on the fraction of drugs eliminated by hemodialysis. *Clin Nephrol*, 19: 201-205, 1983.
56. Hirata, S, Izumi, S, Furukubo, T, Ota, M, Fujita, M, Yamakawa, T: Factors influencing the removal rate of drugs by hemodialysis. *Nihon Toseki Igakkai Zasshi*, 37: 1893-1900, 2004.
57. Hornig, B, Landmesser, U, Kohler, C, Ahlersmann, D, Spiekermann, S, Christoph, A, Tatge, H, Drexler, H: Comparative effect of ace inhibition and angiotensin II type 1 receptor antagonism on bioavailability of nitric oxide in patients with coronary artery disease: role of superoxide dismutase. *Circulation*, 103: 799-805, 2001.
58. Klimova, T, Chandel, NS: Mitochondrial complex III regulates hypoxic activation of HIF. *Cell Death Differ*, 15: 660-666, 2008.
59. Wang, Z, Tang, L, Zhu, Q, Yi, F, Zhang, F, Li, PL, Li, N: Hypoxia-inducible factor-1 α contributes to the profibrotic action of angiotensin II in renal medullary interstitial cells. *Kidney Int*, 79: 300-310, 2011.
60. Li, X, Kimura, H, Hirota, K, Kasuno, K, Torii, K, Okada, T, Kurooka, H, Yokota, Y, Yoshida, H: Synergistic effect of hypoxia and TNF-alpha on production of PAI-1 in human proximal renal tubular cells. *Kidney Int*, 68: 569-583, 2005.
61. Norman, JT, Clark, IM, Garcia, PL: Hypoxia promotes fibrogenesis in human renal fibroblasts. *Kidney Int*, 58: 2351-2366, 2000.
62. Higgins, DF, Biju, MP, Akai, Y, Wutz, A, Johnson, RS, Haase, VH: Hypoxic induction of Ctgf is directly mediated by Hif-1. *Am J Physiol Renal Physiol*, 287: F1223-1232, 2004.
63. Higgins, DF, Kimura, K, Bernhardt, WM, Shrimanker, N, Akai, Y, Hohenstein, B, Saito, Y, Johnson, RS, Kretzler, M, Cohen, CD, Eckardt, KU, Iwano, M, Haase, VH: Hypoxia promotes fibrogenesis in vivo via HIF-1 stimulation of epithelial-to-mesenchymal transition. *J Clin Invest*, 117: 3810-3820, 2007.
64. Wang, Z, Zhu, Q, Li, PL, Dhaduk, R, Zhang, F, Gehr, TW, Li, N: Silencing of hypoxia-inducible factor-1 α gene attenuates chronic ischemic renal injury in two-kidney, one-clip rats. *Am J Physiol Renal Physiol*, 306: F1236-1242, 2014.
65. Nangaku, M: Chronic hypoxia and tubulointerstitial injury: a final common pathway to end-stage renal failure. *J Am Soc Nephrol*, 17: 17-25, 2006.
66. Lv, W, Booz, GW, Fan, F, Wang, Y, Roman, RJ: Oxidative Stress and Renal Fibrosis: Recent Insights for the Development of Novel Therapeutic Strategies. *Front Physiol*, 9: 105, 2018.
67. Bondi, CD, Manickam, N, Lee, DY, Block, K, Gorin, Y, Abboud, HE, Barnes, JL: NAD(P)H oxidase mediates TGF-beta1-induced activation of kidney myofibroblasts. *J Am Soc Nephrol*, 21: 93-102, 2010.

68. Sedeek, M, Nasrallah, R, Touyz, RM, Hébert, RL: NADPH oxidases, reactive oxygen species, and the kidney: friend and foe. *J Am Soc Nephrol*, 24: 1512-1518, 2013.
69. Cho, S, Yu, SL, Kang, J, Jeong, BY, Lee, HY, Park, CG, Yu, YB, Jin, DC, Hwang, WM, Yun, SR, Song, HS, Park, MH, Yoon, SH: NADPH oxidase 4 mediates TGF- β 1/Smad signaling pathway induced acute kidney injury in hypoxia. *PLoS One*, 14: e0219483, 2019.
70. Prescott, LF, Speirs, GC, Critchley, JA, Temple, RM, Winney, RJ: Paracetamol disposition and metabolite kinetics in patients with chronic renal failure. *Eur J Clin Pharmacol*, 36: 291-297, 1989.
71. Martin, U, Temple, RM, Winney, RJ, Prescott, LF: The disposition of paracetamol and the accumulation of its glucuronide and sulphate conjugates during multiple dosing in patients with chronic renal failure. *Eur J Clin Pharmacol*, 41: 43-46, 1991.
72. Rosen, GM, Singletary, WV, Rauckman, EJ, Killenberg, PG: Acetaminophen hepatotoxicity. An alternative mechanism. *Biochem Pharmacol*, 32: 2053-2059, 1983.
73. Nelson, SD, Dahlin, DC, Rauckman, EJ, Rosen, GM: Peroxidase-mediated formation of reactive metabolites of acetaminophen. *Mol Pharmacol*, 20: 195-199, 1981.
74. Reyes, M, Benet, LZ: Effects of uremic toxins on transport and metabolism of different biopharmaceutics drug disposition classification system xenobiotics. *J Pharm Sci*, 100: 3831-3842, 2011.
75. Schmidt, IM, Hübner, S, Nadal, J, Titze, S, Schmid, M, Bärthlein, B, Schlieper, G, Dienemann, T, Schultheiss, UT, Meiselbach, H, Köttgen, A, Flöge, J, Busch, M, Kreutz, R, Kielstein, JT, Eckardt, KU: Patterns of medication use and the burden of polypharmacy in patients with chronic kidney disease: the German Chronic Kidney Disease study. *Clin Kidney J*, 12: 663-672, 2019.
76. Roberts, DM, Sevastos, J, Carland, JE, Stocker, SL, Lea-Henry, TN: Clinical Pharmacokinetics in Kidney Disease: Application to Rational Design of Dosing Regimens. *Clin J Am Soc Nephrol*, 13: 1254-1263, 2018.
77. Nayman, J: Effect of renal failure on wound healing in dogs. Response to hemodialysis following uremia induced by uranium nitrate. *Ann Surg*, 164: 227-235, 1966.
78. Quarles, JM, Belding, RC, Beaman, TC, Gerhardt, P: Hemodialysis culture of *Serratia marcescens* in a goat-artificial kidney-fermentor system. *Infect Immun*, 9: 550-558, 1974.
79. Nakai, S, Suzuki, K, Masakane, I, Wada, A, Itami, N, Ogata, S, Kimata, N, Shigematsu, T, Shinoda, T, Youji, T, Taniguchi, M, Tsuchida, K, Nakamoto, H, Nishi, S, Nishi, H, Hashimoto, S, Hasegawa, T, Hanafusa, N, Hamano, T, Fujii, N, Marubayashi, S, Morita, O, Yamagata, K, Wakai, K, Watanabe, Y, Iseki, K, Tsubakihara, Y: Overview of regular dialysis treatment in Japan (as of 31 December 2008). *Ther Apher Dial*, 14: 505-540, 2010.
80. Sato, T, Saito, A, Naito, H, Suzuki, S, Akisawa, T, Shinoda, T, Mineshima, M, Kin, S, Akiba,

T: Function and adaptation of various hemocatharsis method - performance evaluation method and functional classification of hemocatharsis equipment. *Journal of Japanese Society for Dialysis Therapy*, 29: 1231-1245, 1996.

81. Madhavan, T, Yaremchuk, K, Levin, N, Pohlod, D, Burch, K, Fisher, E, Cox, F, Quinn, EL: Effect of renal failure and dialysis on the serum concentration of the aminoglycoside amikacin. *Antimicrob Agents Chemother*, 10: 464-466, 1976.

82. Ariano, RE, Fine, A, Sitar, DS, Rexrode, S, Zelenitsky, SA: Adequacy of a vancomycin dosing regimen in patients receiving high-flux hemodialysis. *Am J Kidney Dis*, 46: 681-687, 2005.

83. DeSoi, CA, Sahm, DF, Umans, JG: Vancomycin elimination during high-flux hemodialysis: kinetic model and comparison of four membranes. *Am J Kidney Dis*, 20: 354-360, 1992.

84. Mason, NA, Neudeck, BL, Welage, LS, Patel, JA, Swartz, RD: Comparison of 3 vancomycin dosage regimens during hemodialysis with cellulose triacetate dialyzers: post-dialysis versus intradialytic administration. *Clin Nephrol*, 60: 96-104, 2003.

85. Tanoue, K, Nishi, K, Kadowaki, D, Hirata, S: Removal of doripenem during hemodialysis and the optimum dosing regimen for patients undergoing hemodialysis. *Ther Apher Dial*, 15: 327-333, 2011.

86. Lam, YW, Banerji, S, Hatfield, C, Talbert, RL: Principles of drug administration in renal insufficiency. *Clin Pharmacokinet*, 32: 30-57, 1997.

87. Marbury, TC, Lee, SC, Bruni, J, Wilder, JB: Hemodialysis of Valproic Acid in Uremic Patients. *Dialysis & Transplantation*. 1980 pp 961-964.

88. Marbury, TC, Wang, LH, Lee, CS: Hemodialysis of acetaminophen in uremic patients. *Int J Artif Organs*, 3: 263-266, 1980.

89. Lam, SW, Bauer, SR: Amikacin pharmacokinetics during continuous veno-venous hemodialysis. *Infect Dis Ther*, 2: 217-226, 2013.

90. Kihara, M, Ikeda, Y, Takagi, N, Fujita, H, Shibata, K, Masumori, S, Shiratori, K, Umemura, S, Shionoiri, H, Ishii, M: Pharmacokinetics of single-dose intravenous amikacin in critically ill patients undergoing slow hemodialysis. *Intensive Care Med*, 21: 348-351, 1995.

91. Kobari, T, Itoh, T, Hirakawa, T, Namekawa, H, Suzuki, T, Satoh, T, Iida, N, Ohtsu, F, Hayakawa, H: Dose-dependent pharmacokinetics of aprindine in healthy volunteers. *Eur J Clin Pharmacol*, 26: 129-131, 1984.

92. Cirillo, I, Vaccaro, N, Balis, D, Redman, R, Matzke, GR: Influence of continuous venovenous hemofiltration and continuous venovenous hemodiafiltration on the disposition of doripenem. *Antimicrob Agents Chemother*, 55: 1187-1193, 2011.

93. Zaccara, G, Messori, A, Moroni, F: Clinical pharmacokinetics of valproic acid--1988. *Clin Pharmacokinet*, 15: 367-389, 1988.

94. Röckel, A, Brand, A, Stanjek, A, Hevendehl, G, Heidland, A, Hoeltzenbein, J, Pedersen, FS: Haemodialysis in rats. *Res Exp Med (Berl)*, 172: 187-191, 1978.
95. Kränzlin, B, Gretz, N, Kirschfink, M, Mujais, SK: Dialysis in rats with acute renal failure: evaluation of three different dialyzer membranes. *Artif Organs*, 20: 1162-1168, 1996.
96. Kang, JH, Super, M, Yung, CW, Cooper, RM, Domansky, K, Graveline, AR, Mammoto, T, Berthet, JB, Tobin, H, Cartwright, MJ, Watters, AL, Rottman, M, Waterhouse, A, Mammoto, A, Gamini, N, Rodas, MJ, Kole, A, Jiang, A, Valentin, TM, Diaz, A, Takahashi, K, Ingber, DE: An extracorporeal blood-cleansing device for sepsis therapy. *Nat Med*, 20: 1211-1216, 2014.
97. Silver, SM, DeSimone, JA, Smith, DA, Sterns, RH: Dialysis disequilibrium syndrome (DDS) in the rat: role of the "reverse urea effect". *Kidney Int*, 42: 161-166, 1992.
98. COATS, DA, WELLBY, ML: Acute anuria in rats; extracellular electrolyte studies following bilateral nephrectomy. *Aust J Exp Biol Med Sci*, 30: 21-31, 1952.
99. Daugirdas, JT: Second generation logarithmic estimates of single-pool variable volume Kt/V: an analysis of error. *J Am Soc Nephrol*, 4: 1205-1213, 1993.
100. Sombolos, K, Natse, T, Zoumbaridis, N, Mavromatidis, K, Karagianni, A, Scandalos, J, Fiteli, C: Urea concentration gradients during conventional hemodialysis. *Am J Kidney Dis*, 27: 673-679, 1996.
101. Borzou, SR, Gholyaf, M, Zandiha, M, Amini, R, Goodarzi, MT, Torkaman, B: The effect of increasing blood flow rate on dialysis adequacy in hemodialysis patients. *Saudi J Kidney Dis Transpl*, 20: 639-642, 2009.
102. Daugirdas, JT: Hemodialysis Treatment Time: As Important as it Seems? *Semin Dial*, 30: 93-98, 2017.
103. Böhler, J, Reetze-Bonorden, P, Keller, E, Kramer, A, Schollmeyer, PJ: Rebound of plasma vancomycin levels after haemodialysis with highly permeable membranes. *Eur J Clin Pharmacol*, 42: 635-639, 1992.
104. Pollard, TA, Lampasona, V, Akkerman, S, Tom, K, Hooks, MA, Mullins, RE, Maroni, BJ: Vancomycin redistribution: dosing recommendations following high-flux hemodialysis. *Kidney Int*, 45: 232-237, 1994.
105. Sumio, H: Factors influencing the removal rate of drugs by hemodialysis. In: SATOSHI, I. (Ed.) *Journal of Japanese Society for Dialysis Therapy*. Japanese Association of Dialysis Physicians, 2004 pp 1893-1900.
106. Neuberg, JFA: Simplified Method for the Preparation of Aromatic Sulfuric Acid Esters. *Journal of the American Chemical Society*, 63: 3529-3530, 1941.
107. Lee, CS, Han, ES, Jang, YY, Han, JH, Ha, HW, Kim, DE: Protective effect of harmalol and harmaline on MPTP neurotoxicity in the mouse and dopamine-induced damage of brain mitochondria and PC12 cells. *J Neurochem*, 75: 521-531, 2000.

108. Witko-Sarsat, V, Friedlander, M, Capeillère-Blandin, C, Nguyen-Khoa, T, Nguyen, AT, Zingraff, J, Jungers, P, Descamps-Latscha, B: Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int*, 49: 1304-1313, 1996.
109. Ishima, Y, Hiroyama, S, Kragh-Hansen, U, Maruyama, T, Sawa, T, Akaike, T, Kai, T, Otagiri, M: One-step preparation of S-nitrosated human serum albumin with high biological activities. *Nitric Oxide*, 23: 121-127, 2010.
110. Tsuchishita, Y, Fukumoto, K, Kusumoto, M, Ueno, K: Relationship between serum aprindine concentration and neurologic side effects in Japanese. *Biol Pharm Bull*, 32: 637-639, 2009.
111. Tanaka, R, Sato, Y, Goto, K, Yasuda, N, Ohchi, Y, Suzuki, Y, Ueno, T, Ito, K, Kaneko, T, Kurogi, S, Nonoshita, K, Itoh, H: Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Analysis for Doripenem Regimens in Intensive Care Unit Patient. *Biol Pharm Bull*, 40: 1226-1231, 2017.
112. Brunner, LJ, Bai, S: Simple and rapid assay for acetaminophen and conjugated metabolites in low-volume serum samples. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 732: 323-329, 1999.
113. The Japanese Pharmacopoeia Seventeenth Edition (English Version). In: WELFARE, T. M. O. H. L. A. (Ed.), 2016 pp 1594-1595.