

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：37604

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590165

研究課題名（和文） ネフローゼ症候群患者の腎尿細管内の微環境変化を推察するための非侵襲的診断法の開発

研究課題名（英文） Development of noninvasive diagnostic method to predict a microenvironment change in renal tubule of the nephrotic syndrome patient

研究代表者

高村 徳人 (Takamura Norito)

九州保健福祉大学・薬学部・教授

研究者番号：20369169

研究成果の概要(和文):ネフローゼ症候群を含む重症の腎障害患者の尿中の血清アルブミン(以下HSA)や α_1 -酸性糖蛋白質(以下AGP)の結合サイトの結合能および尿中物質の成分や量の違いを推測できる2種類の非侵襲的尿中診断法を確立した。本診断法より、患者個々で尿中に漏れ出したタンパク(HSAとAGP)と尿中物質の違いを評価できた。したがって、本診断法は尿により尿細管中の薬物の結合能や病態の差異を簡便に評価できることが示唆された。

研究成果の概要(英文): We established two kinds of noninvasive diagnostic methods in the urine which can predict binding capacities of binding sites of urinary human serum albumin (HSA) and α_1 -acid glycoprotein (AGP) and difference of ingredient and quantity of urinary substance in the severe renal failure patients including nephrotic syndrome. Then these diagnostic methods, differences of binding capacities of proteins (HSA and AGP) that was leaked from glomerulus and urinary substances were able to be evaluated in each patient. Consequently, the diagnostic methods indicate to judge protein binding capacities of the drug in renal tubule and a pathologic difference to be simple and easy from urine samples of patients.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	2,200,000	660,000	2,860,000

研究分野：医療薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：臨床薬学

1. 研究開始当初の背景

ネフローゼ症候群の患者は腎尿細管中に多量の血清タンパク質が漏れ出るため、薬理作用部位が尿細管中にある薬物で、特にタンパク結合性の高い利尿薬は利尿耐性が生じることが報告されている。また、作用部位が尿

細管中でなくてもタンパク結合性の高い薬物が腎尿細管中に糸球体濾過や分泌により放出された場合、その薬物の再吸収は著しく低下し、血中濃度は著しく低下する可能性が高い。したがって、採取した尿より尿細管中のタンパク結合性の高い薬物の動態を推察

するための非侵襲的尿中診断法の開発が必要である。特に、重症のネフローゼ症候群の患者に対し、採血を経時的に行い薬物の動態を把握することは、血圧低下によるショックや苦痛を伴うため困難である。したがって、本診断法が確立されれば、尿からHSAおよびAGPのサイト結合能を測定でき、タンパク結合性が高く尿細管中に薬理作用部位が存在する薬物や再吸収率の高い薬物の薬効を推察する診断に侵襲的負担を患者にかけることなく施行できる。(重症患者はベッドサイドにおいて蓄尿が行われているため、尿サンプルの採取は経時的に行える)。

我々は、既に、ネフローゼ症候群のプロセミドの利尿耐性克服のための研究を行ってきた。これは、尿細管中のHSAのサイトIにフロセミドが強く結合することで、フロセミドの腎尿細管表面に存在する薬理活性部位にフロセミドが結合できずに利尿耐性が生じるため、尿細管中でHSAのサイトIを結合阻害する薬物を併用することで、フロセミドのサイトIへの結合性を低下させ、利尿耐性を克服させる研究である。この研究ではHSAのサイトIの結合能によりフロセミドの薬効が変化することがわかった。ここで、作用部位が尿細管中でない薬物について注目すると、その薬物が尿細管中のHSAやAGPと結合することで再吸収が阻害される場合は、フロセミド同様、尿中のHSAやAGPの各結合サイトの結合能の違いを診断することの意義はさらに大きく広がる。

2. 研究の目的

ネフローゼ症候群の患者は腎尿細管中に多量の血清タンパク質が漏れ出るため、薬理作用部位が尿細管中にある薬物で、特にタンパク結合性の高い利尿薬は利尿耐性が生じることが報告されている。また、作用部位が尿細管中でなくてもタンパク結合性の高い薬物が腎尿細管中に糸球体濾過や分泌により放出された場合、その薬物の再吸収は著しく低下し、血中濃度は著しく低下する可能性が高い。この結合に大きく関与する血清蛋白にHSAやAGPが存在し、それぞれに薬物結合サイトが存在する。そこで、本研究では、経時的に採取した尿サンプルに一定量のHSAおよびAGPのサイトプローブを添加し、各々のサイト結合能を算出し、さらに結合サイトに影響する尿中生化学検査値を加味することで、尿細管中のHSAおよびAGPの各々のサイト結合能の変動とその変動要因の両方を推察するための非侵襲的尿中診断法の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1)各種サイトプローブを用いた簡便な非侵襲的尿中診断法の開発

- ① 最適なサイトプローブの検索・選定 (現有設備のHPLCなどを用いて定量できる薬物の中から選択予定)。実験方法: 様々なデータベースや文献等より情報を収集した。
- ② 2人の健常人尿の一定量にHSAおよびAGPを一定量添加し疑似ネフローゼ症候群タンパク尿を調製し、疑似のネフローゼ症候群尿中における種々のサイトプローブの結合性と定量法の検討。実験方法: 限外ろ過法により行う。限外濾過器はウルトラセント-10 (東ソー社製) を使用し、調製した疑似ネフローゼ症候群尿1.5 mlを限外濾過器に充填し、25°C、3000rpmで5分間遠心分離した後、それらのろ液を一定量採取し(ろ液中に種々の遊離サイトプローブが存在する)、多項目生化学自動分析装置やHPLCなどで測定を行った。簡便で迅速な定量法についても検討した。
- ③ 尿中に存在する蛋白結合を有する内因性物質(主に尿毒症物質)のHSAやAGP結合部位の同定。実験方法: ①で見出したサイトプローブと内因性物質を種々の濃度で共存させて、それぞれの遊離濃度(実測値)を限外濾過法により求め、その実測値を基にHSAやAGPとの結合部位を解析した。
- ④ 尿中の尿素窒素(BUN)、尿中のクレアチニンおよびHSAなどの尿中生化学検査。実験方法: 生化学検査装置等の測定限界を考慮し尿中成分の測定法を検討した。

(2)疑似ネフローゼ症候群タンパク尿に対する本尿中診断法の精度の検討

- ① 疑似ネフローゼ症候群タンパク尿に対するHSAおよびAGPへの各結合サイトの結合能の変動の検討。実験方法: 数名の健常人尿の一定量にHSAおよびAGPを一定量添加し個人ごとの疑似ネフローゼ症候群タンパク尿を調製し、それに各結合サイトプローブを添加し限外濾過法にて遊離濃度を測定することにより結合能を算出した。それらの尿中BUNや尿中クレアチニンなどを多項目生化学自動分析装置にて、さらに、タンパク結合を有する尿毒症物質をHPLCにて測定し、結合サイトへの影響を調べた。
- ② ①より得られたデータを多角度から分析・評価し、非侵襲的尿中診断法の構築を試みた。実験方法: 各結合サイトプローブの遊離形濃度の大小のデータと尿中のHSA、AGP、BUN、クレアチニンおよび尿毒症物質濃度の大小のデータ

を多角度に比較し、相関等を見出す。

(3) 非侵襲的尿中診断法の検証

- ① ネフローゼ症候群を含む腎障害患者に対する非侵襲的尿中診断法の妥当性の検証。実験方法：経時的に腎障害患者尿を採取し、そのサンプルより一定量採取し、それに各結合サイトプローブを添加し限外濾過法にて遊離濃度を測定し結合能を算出した。それらの尿中BUNやクレアチニンなどを多項目生化学自動分析装置にて測定し、結合サイトへの影響を調べた。その結果より、非侵襲的尿中診断法の妥当性を検証した。
- ② 低濃度サイトプローブの微量同時定量法の検討。実験方法：限外濾過法により行った。限外濾過器はウルトラセント-10（東ソー社製）を使用し、微量のHSAやAGPを含んだ溶液に低濃度の数種のサイトプローブを同時に添加した試料を限外濾過器に充填し、25℃、3000rpmで5分間遠心分離した後、それらのろ液を一定量採取し（ろ液中に種々の遊離サイトプローブが複数存在する）、HPLCで測定を行った。簡便で迅速な微量同時定量法をHPLCで検討した。

4. 研究成果

- (1) 様々なデータベースや文献等より情報を収集および予備実験を行い、最適なサイトプローブとしてHSAのサイトIはワルファリンとピレタニドを、サイトIIはイブプロフェンを、AGPのサイトプローブはベラパミルを選定し、蛍光での測定法を確立できた。
- (2) 健常人尿にHSAを一定量添加することで作製した疑似ネフローゼ症候群タンパク尿中のサイトプローブにはワルファリン（蛍光）とイブプロフェン（蛍光）を用いた結果、それぞれのサイトプローブ遊離濃度を尿中物質の妨害を受けず定量できた。そこで、2人の尿を用い個々の疑似ネフローゼ症候群HSA尿を作製し本定量法を施行し、HSAサイトIとIIの結合能を比較した結果、それぞれのサイト結合能に大きな差を生じることが判明した。
- (3) 尿中に存在する蛋白結合を有する内因性物質（インドール酢酸：IA、インドキシル硫酸：IS、馬尿酸：HA、3-カルボキシ-4-メチル-5-プロピル-2-フランプロパン酸：CMPF）のHSAへの結合部位を本定量法で同定した結果、CMPFはワルファリンの遊離濃度を著しく増加させたが、イブプロフェンの遊離濃度は変化しなかったことよりサイトIであることが判明した。

一方、IA、ISは低濃度においてイブプロフェンの遊離濃度を著しく増加させたが、ワルファリンの遊離濃度は変化しなかったことよりサイトIIであることが判明した。

- (4) 尿中におけるHSA濃度の影響を明らかにするために、2人の健常人尿に濃度の異なるHSA（100～500 μ M）を加えてネフローゼ疑似尿（AおよびB）を調製し、それぞれの疑似尿にサイトプローブ（サイトI：ワルファリン、サイトII：イブプロフェン）を一定量添加して試料を調製し、サイトIおよびIIの結合能を評価した。その結果、疑似尿AとBにおけるHSAサイトIおよびIIの結合能は、程度の差があるもののHSA濃度の増加と共に増強した。したがって、尿中に漏出するHSA濃度の差異は尿細管に存在する薬物のHSA結合能の強弱に反映される可能性が高い。
- (5) 2人の健常人尿から調製したネフローゼ疑似尿におけるHSAのサイトIとIIの結合能に及ぼす尿中成分の影響を検討したところ、尿中成分で各結合サイトの結合能に関する臨床検査値はクレアチニンと尿素窒素であり、特に、クレアチニンは尿素窒素より各結合サイトへの影響を正確に反映していた。さらに、蛋白結合を有する尿中の尿毒症物質（インドール酢酸：IA、インドキシル硫酸：IS、馬尿酸：HA、3-カルボキシ-4-メチル-5-プロピル-2-フランプロパン酸：CMPF）を測定したところ、ISやHAの濃度は高く、個人差も著しく大きかった。一方、IAやCMPF濃度は低く、個人差も小さかった。二者間のサイトIIの結合能への影響の違いは尿毒症物質であるISやHAの濃度の違いに依存することが判明した。
- (6) ネフローゼ症候群患者に対する非侵襲的尿中診断法の妥当性の検証については、それぞれのネフローゼ症候群患者尿を一定量採取し、それに各結合サイトプローブを添加して結合能を算出した。それらの尿中HSAや尿中クレアチニンおよび尿中尿素窒素の濃度との関係は、主に尿中HSA量に大きく依存することが分かった。その結果より、非侵襲的尿中診断法におけるサイトプローブの結合能の変動はHSA濃度の変動に大きく依存し、尿中クレアチニンおよび尿中尿素窒素にはあまり依存しないものと考えられた。ただし、尿毒症物質はサイトプローブの結合能に影響を与える可能性が高い。
- (7) (6)の診断法を補強するために、第二の診断法についても検討した。この診断法は、微量のHSAやAGPを一定量含んだ溶液に低濃度の数種のサイトプローブを一定量加えたものに、それぞれの患者の尿を一定

量添加し、それぞれのサイトプローブの結合能の変化を比較すると、患者間でHSAやAGPの結合サイトの結合に差が見られた。本診断法は蛋白結合に影響する尿中物質の大小を推察できることが示唆された。

以上の結果より、尿より尿細管中の薬物の結合能や病態の差異を簡便に評価できる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

- ① 緒方賢次、高村徳人、徳永仁、瀬戸口奈央、松岡俊和、川井恵一、ネフローゼ誘発ラットを用いた腎尿細管における薬物のタンパク結合能の評価、平成23年度九州保健福祉大学教育研究業績集、査読無、2012、13-14

[学会発表] (計3件)

- ① 緒方賢次、高村徳人、徳永仁、瀬戸口奈央、尾崎峯生、大崎卓、松岡俊和、西尾豊隆、川井恵一、非侵襲的尿中診断法を用いた尿中アルブミンとフロセミドの結合能の評価、日本薬学会第132年会、2012年3月31日(札幌)
- ② 高村徳人、緒方賢次、徳永仁、瀬戸口奈央、磯田祥、比嘉仁、松岡俊和、近藤照義、西尾豊隆、川井恵一、ネフローゼにおける非侵襲的尿中診断法とそれに基づく効果的なフロセミドの投与設計、第73回九州山口薬学大会、2011年11月12日(沖縄・宜野湾)
- ③ 緒方賢次、高村徳人、徳永仁、瀬戸口奈央、磯田祥、比嘉仁、二宮健、草場郡之、松岡俊和、西尾豊隆、川井恵一、ネフローゼにおける腎尿細管中アルブミンの薬物結合能におよぼす尿毒症物質の影響、第21回日本医療薬学会年会、2011年10月2日(神戸)

[図書] (計1件)

- ① 高村徳人、他、南山堂、入院外来薬物治療プラクティス、2013、462-477

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称：尿検査方法及び尿検査用キット

発明者：川井恵一、高村徳人、緒方賢次、徳永仁

権利者：金沢大学

種類：特願

番号：2011-195187

出願年月日：2011年9月7日

国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等

http://www.phoenix.ac.jp/faculty/p_sciences/ps_teacher/

http://www.phoenix.ac.jp/iryo_gp/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高村 徳人 (Takamura Norito)
九州保健福祉大学・薬学部・教授
研究者番号：20369169

(2) 研究分担者

徳永 仁 (Tokunaga Jin)
九州保健福祉大学・薬学部・准教授
研究者番号：60369171
緒方 賢次 (Ogata Kenji)
九州保健福祉大学・薬学部・講師
研究者番号：90509580

(3) 研究協力者

瀬戸口 奈央 (Setoguchi Nao)
九州保健福祉大学・薬学部・助手
研究者番号：50551305