

担当研究課題 重篤副作用に関連する複数の安全性バイオマーカーの同時診断系の検討

担当責任者 上田 哲也 プレシジョン・システム・サイエンス株式会社

診断システム開発本部 本部長

要旨 安全性バイオマーカーの同時診断系の開発として、弊社独自の遺伝子多型法である BIST (Beads in Single Tip) 法を用い、今年度は、抗てんかん薬であるフェノバルビタールによる薬疹の発症に関連する 2 か所の遺伝子多型 (rs2596560、rs2442736) について解析を行い、全自動機器による遺伝子解析の可能性を示した。

研究協力者

宮下 雪子

プレシジョン・システム・サイエンス株式会社

診断システム開発 1 部 マネージャー

研究課題である、重篤副作用に関連する複数の安全性バイオマーカーの同時診断系の確立を実現するため、将来的な自動化装置が実現可能な弊社独自の遺伝子多型法である BIST を利用したこれら SNPs の検出を試みた。

A. 目的

抗てんかん薬の一つであるフェノバルビタールは副作用として薬疹を発症することが知られており、時としてステイブン・ジョンソン症候群や中毒性表皮壊死症あるいは薬剤性過敏症症候群などの重篤な症状が現れることがある。このような重篤な副作用の発症を未然に防ぐためには、関連するバイオマーカーの探索とともに、そのバイオマーカーを同定・検出する測定系の開発が必要である。

近年、日本人において、*HLA-B*51:01* がフェノバルビタールによる薬疹の発症に関連することが報告された。我々の研究グループは、この *HLA-B*51:01* と 3 つの SNPs (rs6933050、rs2596560、rs2442736) が絶対連鎖不平衡にあると推定し、今年度は、これら 3 つの SNPs を安全性バイオマーカーの一候補とした。

B. 研究方法

ボランティア全血より抽出したヒトゲノム DNA 検体 5 種、および国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部 (国衛研・医安部) より提供いただいたヒトゲノム DNA 3 種 (「H26-001: *HLA-B*5101* が homo の検体」、「H26-002: *HLA-B*5101* が hetero の検体」、「H26-003: *HLA-B*5101* を持たずに、日本人の major な型をもつ検体」) について、BIST を使った遺伝子多型解析を実施し、解析結果を国衛研・医安部で実施されている解析手法 (TaqMan 法) およびシーケンス結果と比較することで、BIST での検出が可能であるかを検討した。

B. 1. ヒトゲノム DNA の調製、遺伝子型解析

ボランティア全血からのゲノム抽出には、弊

社の市販製品である核酸抽出装置「Magtration System 12GC-PLUS」を用いた。Magtration System での核酸抽出方法は、機器の取扱い説明書に従い実施し、抽出試薬は MagDEA DNA 200 (GC) (コード: E7001) を、プロトコルを実施するために必要となる機器専用 IC カードは MagDEA DNA 200 Whole Blood PLUS (コード: I7501) を用いた。架設した全血量は 200 μ l、溶出液量は 100 μ l と設定した。抽出された核酸は NanoDrop (Thermo SCIENTIFIC 製) を用い、収量および純度を測定し、PCR に使用する量を決めた。

抽出されたヒトゲノム DNA はシークエンス解析にて、遺伝子型を決定した。シークエンス解析方法は、SNP 近傍 200 bp 前後の特異 Primer を合成し、PCR Product の電気泳動により目的のものが増幅されているかを確認後、特異 Primer を使い実施した。

国衛研・医安部より提供いただいたヒトゲノム DNA 3 検体は、上記記載のシークエンス解析と、国衛研・医安部の方で実施いただいた TaqMan 法により、遺伝子型を決定した。

B. 2. BIST 作製

ヒトのゲノム配列と相同性が低く設計された 31-37 mer のオリゴヌクレオチド (TAG) を BIST のビーズに固相し、18 種類の遺伝子型が同時判定できる BIST を製造した。

B. 3. BIST 検出用 Primer の開発

SNP の rs 番号から、配列情報を NCBI のデータベースより入手した。入手した配列情報に従い、SNP の近傍約 20 塩基程度に、BIST 解析用 TAG 配列を付加した BIST 解析用 Primer を合成した。BIST 解析に使用することが可能かどうかは、これらの Primer を用いた PCR を実施し、

電気泳動法により増幅産物の鎖長解析を行うことで判断した。

B. 4. SNPs の BIST 検出

B. 4.1 Allele Specific PCR とラベル化反応

BIST での検出を行うために、DIG-dUTP (Roche 製、PCR DIG Labeling mix) の存在下で、Allele Specific PCR を Life Technologies 社のサーマルサイクラーVerti® 200 を用いて実施した。PCR Tube には、各 SNP の近傍を増幅するために B. 3 項の手法で選定した Primer を添加した。PCR 酵素としては、HGS Diamond Taq (Eurogentech 製) を用いた。PCR 条件は、PCR 試薬の添付文書および設計した Primer の T_m 値から決定した。

B. 4.2 BIST 解析

B. 4.1 の PCR 産物を、BIST と反応させ、遺伝子型を判定した。BIST との反応には、核酸抽出でも使用した Magtration System 12GC-PLUS を用いた。

反応容器にハイブリダイゼーションバッファー、洗浄&ブロッキングバッファー、抗体試薬、洗浄バッファーを 100 μ l ずつ入れ、ハイブリダイゼーションバッファーに 95°C で 5 分間の熱変性をした Allele specific primer extension product 5 μ l を添加した。専用スキャナー検出のための抗体試薬は、Roche 社の POD 標識抗ジゴキシゲニンポリクローナル抗体、Fab フラグメントを使用した。

反応後の BIST に 40 μ l の POD 発光基質 (Thermo Scientific 社、Super Signal West Femto Maximum Sensitivity Substrate) を吸引し、BIST 専用の測定機として開発した BISTnner でビーズからの発光強度を測定した。SNPs の判定は、測定結果をもとに実施した。

<倫理面への配慮>

ヒト遺伝子解析研究は、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(平成13年3月29日、文部科学省・厚生労働省・経済産業省、平成25年2月8日全面改正)を遵守し、所属研究機関および関係医療機関の倫理委員会の認可を受けた上で、被験者に対して文書による説明と合意の取得を行った後に実施した。

C. 結果

C.1. ヒトゲノム DNA 検体の遺伝子型判定

各手法の遺伝子解析の結果は、表1の通りであった。また、シーケンス解析のためのPCRは、図1に添付した通りであり、増幅鎖長が目的のサイズになっていることを確認した。

C.2. BIST 作製

作製したBIST ビーズに固定したTAG オリゴヌクレオチドと、ビオチン化ラベルを固定したTAG 配列に相補的な塩基配列を持つオリゴヌクレオチドを、Magtration System 12GC でハイブリダイゼーション反応させ、ビーズのシグナル有無を確認した。図2に示した通り、目的の位置に特異的なシグナルが検出でき、BISTに目的のTAGが固定されたビーズが封入できていることが確認された。

C.3. BIST 解析用 Primer の PCR

設計したPrimerで各遺伝子型のヒトゲノムDNAをTemplateにPCRを行い、電気泳動にて増幅有無を確認した。結果、rs2442736は、付加したTAGによっては増幅が認められず、それ以外のSNPsはいずれのTAGでも増幅が認められた。将来的な実用化を考慮し、これまでに開発したカルバマゼピン誘因性重傷薬疹関連多型解析法で使用していないTAGを選択し、BIST解析用Primerを作製した。このPrimerでの増幅

した結果は、図3に示した通りであり、rs6933050 遺伝子型判定用Primerセットは、遺伝子型に関係なく非特異的に増幅していることが示された。また、rs2596560用も同様に、G検出用Primerの非特異増幅が認められたが、rs6933050 検出用よりは増幅量の違いがあり、BISTによる検出では識別できる可能性が示唆された。rs2442736 検出用のPrimerセットにおいては、遺伝子型に従った増幅が認められた。

C.4. BIST 遺伝子型判定

C.3項で特異的な増幅を確認したPrimerセットで、国衛研・医安部より提供いただいたヒトゲノムDNA3種と、社内で調整したヒトゲノムDNA3種をBISTで解析した。図4に示した通り、ベースラインの補正が必要であったが、遺伝子型と一致する結果が得られた。

D. 考察

示した各試験結果から、BISTでの安全性バイオマーカーの同時診断系の可能性を示すことができた。さらなる実用性を示すために、検体数の追加と、抗てんかん薬の薬疹に対する新たなバイオマーカーの探索について、研究を継続する。

E. 結論

重篤副作用に関連する複数の安全性バイオマーカーの同時診断系の検討として、BISTを使った診断の可能性を示すことができた。

F. 健康危機情報

G. 研究発表等

論文発表等
なし

学会発表等
なし

報道発表等
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

表 1) ゲノム検体の遺伝子型

	Rs6933050 (T/C)	Rs2596560 (A/G)	Rs2442736 (C/G)
H26-001	CC	AA	CC
H26-002	CC	AA	CC
H26-003	TC	AG	GG
M8	TT	AA	GG
M9	TC	AG	GG
M10	CC	AG	CG
M11	TC	AA	CG
M12	TC	AG	GG

(シーケンス解析結果)

	Rs6933050 (T/C)	Rs2596560 (A/G)	Rs2442736 (C/G)
H26-001	CC	-	CC
H26-002	CC	-	CC
H26-003	TC	-	GG

(TaqMan 解析結果)

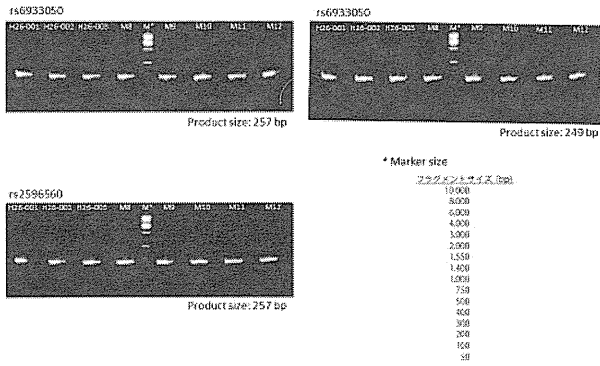


図 1) シーケンス解析のための PCR 結果

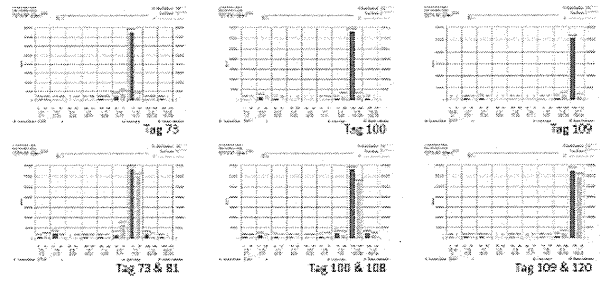
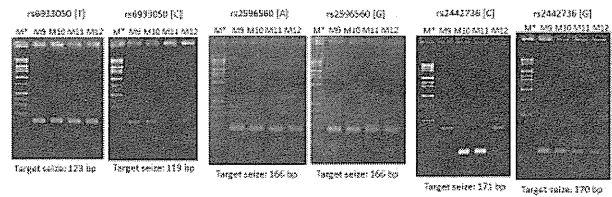


図 2) BIST 作製結果



	rs6933050	rs2596560	rs2442736
M9	TC	TC	AG
M10	CC	TC	AG
M11	TC	TC?	AA
M12	TC	TC?	AG

図 3) BIST 検出用 Primer による解析結果

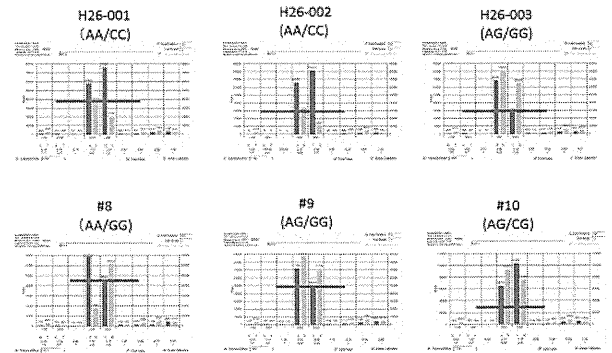


図 4) BIST 遺伝子型判定結果

担当研究課題 バイオマーカー値を用いた、ヒト生体における薬物動態の予測法確立

担当責任者 理化学研究所 杉山特別研究室 杉山雄一 特別招聘研究員

要旨 ヒト生体の薬物動態を決定する要因として、肝臓における薬物代謝酵素およびトランスporterが重要である。これらの機能を予測する方法として、特異的基質（プローブ）および特異的阻害剤を用いた方法を示してきたが、代謝酵素およびトランスporterの基質となるバイオマーカーを見出すことができれば、薬物を投与することなくヒト生体における薬物動態を予測することができる。本研究では、OATP および CYP2C8 に着目し、阻害剤投与条件下で変動するバイオマーカーを見出すために臨床試験を実施し、血漿サンプルを用いたメタボローム解析を実施した。将来的には、OATP および CYP2C8 が関与する複雑な薬物間相互作用の予測等にも応用することを考えている。

研究協力者

理化学研究所杉山特別研究室 吉門崇

理化学研究所杉山特別研究室 Kim, Soo-Jin

理化学研究所杉山特別研究室 石亀啓子

て、ゲムフィブロジルのグルクロン酸抱合体が肝臓において cytochrome P450 2C8 (CYP2C8) および organic anion transporting polypeptides (OATPs) の機能の両方を阻害し、セリバスタチン血中濃度を大きく上昇させたと考えられている。

A. 目的

ヒトにおける薬物動態・薬物間相互作用の予測は、医薬品の適正使用および創薬成功率の向上に必要である。薬物動態に影響を与える肝臓の薬物代謝酵素に関する研究が行われてきたが、近年、薬物トランスporterの寄与も大きく注目されている。トランスporterと代謝酵素の両方が関与する薬物間相互作用として、高脂血症治療薬セリバスタチンとゲムフィブロジルの併用による横紋筋融解症リスクの上昇が臨床において重大な問題となった。セリバスタチン上市後、僅かの期間に 52 名の患者が死亡し、その中の 10 名以上でゲムフィブロジルとの相互作用が指摘されている。この機序とし

FDA が提供する副作用データベース (AERS) を用いた解析結果 (Floyd et al., Clin Pharmacol Ther, 91:896-904, 2012) によると、セリバスタチンとゲムフィブロジルとの相互作用に加えて、セリバスタチンとクロピドグレルの間でも重篤な副作用の誘発が示唆されている。既にセリバスタチンは市場から撤退しているが、クロピドグレルは広く用いられている医薬品（抗血小板薬）であり、多くの医薬品と併用され得ることから相互作用のリスクを予測する意義がある。クロピドグレルおよびクロピドグレル代謝物による相互作用メカニズムとして、CYP2C8 および OATPs の阻害が考えら

れている。また、糖尿病治療薬であるレパグリニドは、OATPs で肝臓に取り込まれた後に CYP2C8 で代謝され、セリバスタチンとほぼ同様の体内動態を示すが、セリバスタチンのように横紋筋融解症を生じることはないことから、トランスポーターと代謝酵素が関与する相互作用を検証する上で有用なモデル薬物として用いることができる。

本研究では、まず、レパグリニドを OATPs と CYP2C8 の dual 基質、クロピドグレルを OATPs と CYP2C8 の dual 阻害剤として投与し、得られる血漿サンプルをもとに薬物動態を解析する相互作用試験を実施した。また、ピタバスタチン (OATPs 基質) およびピオグリタゾン (CYP2C8 基質) もカセットドーズで同時に投与し、リファンピシン (単回投与で OATP 阻害剤) およびトリメトプリム (CYP2C8 阻害剤) との相互作用試験も併せて行うことで、OATPs と CYP2C8 の関与を分離評価しながらレパグリニドとクロピドグレルとの相互作用を定量的に解析することとした (補足図)。

さらに、OATPs および CYP2C8 はプローブ薬のみならず、内因性物質の輸送・代謝にも関与していると考えられることから、血漿中の内因性物質の濃度にも影響を与えると予想される。従って、OATPs や CYP2C8 の機能を反映する内因性物質 (バイオマーカー) を測定することで、薬物投与を行うことなく機能評価が可能となる。OATPs のバイオマーカー候補としてはビリルビン-グルクロン酸抱合体が考えられるが (van de Steeg et al., J Clin Invest, 122:519-528, 2012)、ヒトにおいて OATPs 機能を予測する上で使用可能かどうか検討する必要がある。一方、CYP2C8 については報告が無いが、CYP3A4 についてはバイオマーカーとして 6β -ヒドロキシコルチゾルが知られている (Bienvenu et al.,

Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol, 29:441-445, 1991)。本研究では、OATP 阻害剤および CYP2C8 阻害剤投与条件下で変動するバイオマーカーを明らかとするため、血漿サンプルを用いたメタボローム解析を実施することを目的とした。

B. 研究方法

本研究では、レパグリニド、ピタバスタチン、ピオグリタゾンの 3 剤をカセット単回投与 (試験 1)、3 剤カセット+クロピドグレル単回投与 (試験 2)、3 剤カセット+リファンピシン単回投与 (試験 3)、3 剤カセット+トリメトプリム (ST 合剤として) 単回投与 (試験 4) する臨床試験を行った。24 名の健康成人を対象とし、トランスポーターおよび代謝酵素 (CYP2C19、CYP2C8、SLCO1B1、CES1) の遺伝子解析用に 2 mL の採血を行い凍結保存した。続いて、健康診断をもとに投薬可能と判断された対象者に、以下の 2 つの試験を実施した (試験 1 は被験者 24 名で実施し、試験 2 から試験 4 までは、各 8 名ずつ)。

- ① 入院した日の翌朝、3 種類の試験薬 (レパグリニド 100 μ g、ピタバスタチンカルシウム 200 μ g、ピオグリタゾン 1 mg) を混合したものを、経口投与
- ② 4 日間以上の休薬期間を設けて上記 3 種類の試験薬 (経口) とクロピドグレル 75mg 4 錠 (試験 2)、またはリファンピシン 150mg 4 カプセル (試験 3)、または ST 合剤 (スルファメトキサゾール 1g、トリメトプリム 200mg) (試験 4) を単回投与

薬剤濃度測定のために血液を遠心分離して血漿サンプルとして凍結保存した。試験 1 から試験 4 で得られた血漿サンプルを用いて、カセットで投与した 3 剤の併用薬による体内動態の変化を比較検討するための定量系の構築を理

化学研究所で実施した。また、内因性物質の変動を解析するために、サンプルを測定機関である国立医薬品食品衛生研究所に送付した。

<倫理面への配慮>

ヒト遺伝子解析研究は、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（平成16年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号）を遵守し、所属研究機関および関係医療機関の倫理委員会の認可を受けた上で、被験者に対して文書による説明と合意の取得を行った後に行った。さらに、本研究には、ヒトを対象とした臨床研究が含まれるが、「臨床研究に関する倫理指針（平成16年厚生労働省告示第459号）」及び細則を遵守し、所属研究機関および関係医療機関の倫理委員会の認可を受けた上で、被験者に対して文書による説明と合意の取得を行った後に実施している。

C. 結果 および D. 考察

九州大学より送付された血漿サンプルを用い、固相カラム抽出をした上で液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析法（LC-MS/MS）により薬剤および代謝物の定量系を構築した。得られた濃度推移データを用いて、レパグリニド（OATPs, CYP2C8）、ピタバスタチン（OATPs）およびピオグリタゾン（CYP2C8）の体内動態解析を進めている。同時に、コントロール条件下、OATP 阻害剤併用条件下および CYP2C8 阻害剤併用条件下の血漿サンプルをもとに、OATPs または CYP2C8 阻害により変動する内因性物質のメタボローム解析を開始した。内因性物質の変動とプローブ薬物の薬物動態を比較することにより、OATPs および CYP2C8 のバイオマーカーを見出すことができると考えられる。これらバイオマーカー値の変動に基づいて、相互作用時の

薬物の血中濃度-時間曲線下面積（AUC）を予測できる方法を提案したい。例えば OATPs のバイオマーカーと考えられるビリルビン-グルクロン酸抱合体の濃度について、コントロール時の濃度 A から相互作用時（DI）の濃度 B に変動したとすると、肝取り込み過程クリアランスが A/B となり、薬物の肝固有クリアランス（ $CL_{int,all}$ ）も $\frac{A}{B} \times CL_{int,all}$ となる。相互作用時の肝クリアランスは、

$$CL_{h,DI} = \frac{A}{B} \times f_b CL_{int,all}$$

（well-stirredモデルで $Q_h > f_b CL_{int,all}$ を仮定。

Q_h : 肝血流、 f_b : 非結合型分率）

相互作用時の薬物の AUC_{DI} とコントロール時の $AUC_{control}$ の比は、

$$\begin{aligned} \frac{AUC_{DI}}{AUC_{control}} &= \frac{CL_{tot,control}}{CL_{tot,DI}} = \frac{CL_{h,control} + CL_r}{CL_{h,DI} + CL_r} \\ &= \frac{f_b CL_{int,all} + CL_r}{\frac{A}{B} \times f_b CL_{int,all} + CL_r} \end{aligned}$$

（ CL_{tot} : 全身クリアランス、 CL_r : 腎クリアランス）

これにより、相互作用による AUC の上昇率を、バイオマーカーの測定値に基づき予測することができる。

臨床においては、セリバスタチンやレパグリニドのように OATPs および CYPs の dual 基質となる薬物が多く知られており、OATP および CYPs のバイオマーカーを測定することで複雑な薬物動態を定量的に予測することが可能になり、将来的には有効性や安全性の予測に基づいた適正な薬物の使用に繋がると考えられる。

E. 結論

本研究の進展により、体内動態関連遺伝子多型の影響を考慮した上で、クロピドグレル、リファンピシンおよびトリメトプリムの阻害効果に基づいた OATPs および CYP2C8 の寄与率評

価と、両分子が関与する複雑な相互作用の機序解明が期待される。将来的には、バイオマーカーを用いて OATPs および CYPs の機能を評価することで、これら分子機能の個人差による薬物動態の個人間変動の予測、肝障害等の病態時変動の予測、薬物間相互作用の予測が可能となり、創薬における成功率向上・効率化や臨床における適切な薬物治療に貢献することができると考えられる。

F. 健康危機情報

該当なし

G. 研究発表等

論文発表等（総説も含みます）

学会発表等

報道発表等

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

図:代謝酵素・トランスポーターのプローブ・選択的阻害剤を用いた薬物動態の解析

フェノタイピングに用いるプローブの条件

- ①ヒト臨床で使用可能な薬物であること、もしくは内因性物質(バイオマーカー)
- ②ヒトでサンプリング可能な血中・尿中濃度から分子機能の推定が可能であること
- ③各標的分子に選択的なリガンドとなること

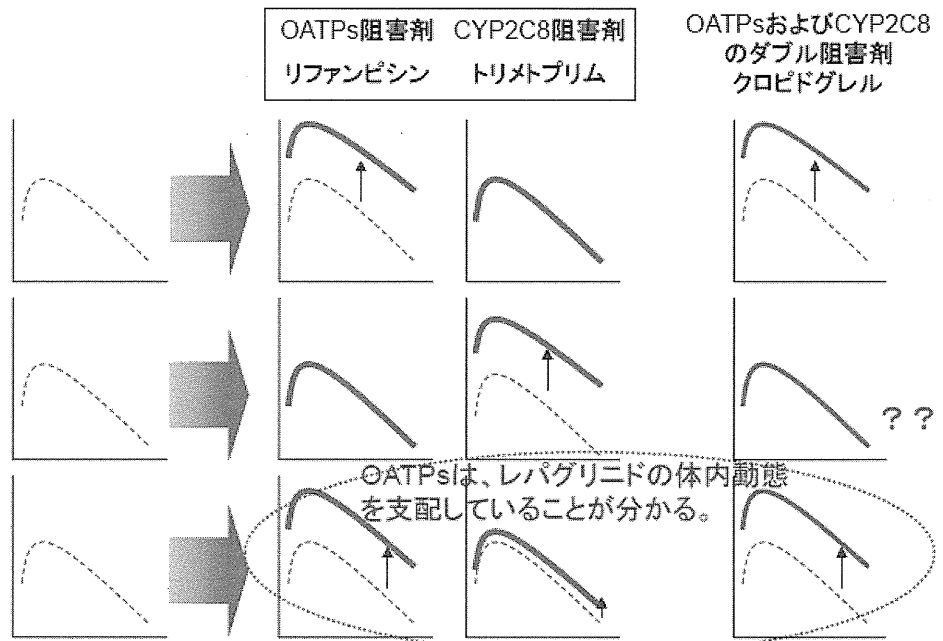
プローブの利用

カクテル投与

OATPsの
プローブ
(ピタバスタチン)

CYP2C8の
プローブ
(ピオグリタゾン)

レバグリニド



担当研究課題 薬物動態関連蛋白質のノックアウト動物等の作製とメタボローム測定

担当責任者 楠原洋之 東京大学大学院薬学系研究科 教授

研究要旨 医薬品開発ならびに市販後の薬物療法において、薬物動態ならびに有害事象に関連するトランスポーターの機能変動を検出するバイオマーカーとして、生体試料中に内在性に存在する化合物を同定することを目的とする。トランスポーター（Oatp1a/1b、Slc16a9、Atp8b1）のノックアウトマウスから生体試料を採取し、メタボローム解析を実施した。Oatp1a/1b、Slc16a9については解析中であり、Atp8b1 ノックアウトマウスでは、野生型マウスならびにヘテロ型マウスと比較して、一部の血漿中脂質に変動が認められたことから、Atp8b1 は phosphatidylserine のフリッパーゼであるが、生体内では脂質の体内動態にも関与するものと期待される。

研究協力者

東京大学大学院薬学系研究科 助教 林久允

A.研究目的

薬物トランスポーターは、医薬品の生体膜透過に関わることで、その組織分布や排泄経路など、体内動態特性の決定要因となる。そのため、そのためその機能変動は薬剤応答性の個体間変動につながる。薬物トランスポーターの機能変動を生じる要因として、併用薬や喫煙、飲酒や食事など外的要因のほか、遺伝子多型や疾患など内的要因に分類される（Huang SM, and Temple R, Clin Pharmacol Ther 84: 287-294, 2008）。①医薬品開発の早期に代謝酵素やトランスポーターなど体内動態関連因子との薬物間相互作用を検出し、Go or No go の判断に貢献する、②市販後、安全な薬物療法を実現することが期待されている。

現在、日米欧における規制当局が薬物間相互

作用に関するガイドライン/ガイダンスを発行しており、in vitro 試験に基づいた薬物間相互作用リスクの予測について閾値を超える場合には、当該代謝酵素・トランスポーターの体内動態に占める寄与率が高い薬物（プローブ薬物）を用いた臨床試験の実施が推奨されている。

一方で、代謝酵素に関しては、食品由来あるいは内因性化合物の中に基質となるものが知られている。Cortisol と 6 β -hydroxycortisol など、特定の代謝酵素により生じる化合物をモニターすることで薬物間相互作用リスクが評価できることも報告されている。こうした内在性の化合物を利用することで、プローブ化合物を投与することなく、トランスポーターの機能変動が評価できることから、Phase I 等薬物の用量依存性を検討する試験において、薬物間相互作用リスクを評価することができ、プローブ薬を用いた試験を省略することができるものと期待される（Clayton TA et al, Nature 440,

1073, 2006)。

In vitro 試験で、内在性基質を見つけたとしても、①in vivo における寄与率を反映しているのか、②血漿・尿中に内在性に化合物が存在することから、トランスポーター機能が低下した際の検出力は、当該化合物の合成速度とトランスポーター機能阻害の持続時間に依存する。近年の分析技術の高感度化に伴い、生体試料中の代謝物を一斉分析されることが可能となった(メタボロミクス)。本方法に、トランスポーター機能のパーターベーションを与えることで、トランスポーターの機能変動と関連した化合物を同定することを本研究の目的とした。

本年度は、スタチンなどアニオン性薬物の体内動態に深く関わる有機アニオントランスポーターである *Oatp1a* (*Oatp1a1*~*Oatp1a6*)ならびに *1b2* を欠損した *Oatp1a/1b* クラスターノックアウトマウス (*Oatp1a/1bKO*)、有機カチオントランスポーターである *Mct9/Slc16a9*、*phosphatidylserine* (PS)のフリッパーゼであり、進行性家族性肝内胆汁うっ滞症1型(PFIC1)の原因遺伝子である *ATP8B1* 遺伝子のマウスホモログである *Atp8b1* に、PFIC1で見出された変異(G308V)を導入した遺伝子改変マウス(以後、便宜的に *Atp8b1 deficient* マウスと呼ぶ)を対象とし、メタボローム解析により内在性代謝物を探索した。

B.研究方法

Oatp1a/1bKO は、Taconic より購入した。馴化の後、生体試料(血漿)に採取し、脂質ならびにそのほかの低分子化合物を対象としたメタボローム解析を実施した。

ゲノム編集技術である *Crispr/Cas-9* システムにより、*Slc16a9* 遺伝子に変異を導入した。本マウスを、C57BL6 野生型マウスと交配し、ホ

モで変異有するマウスを得た。野生型マウスならびに *Slc16a9KO* から血漿ならびに尿を回収し、低分子化合物を対象としたメタボローム解析を実施した。

Atp8b1 deficient マウス(ホモ型、ヘテロ型)ならびに野生型マウスから、血漿を採取し、脂質に関するメタボローム解析を実施した。

<倫理面への配慮>

遺伝子組み替え動物の利用に関しては、東京大学大学院薬学系研究科の承認を得て実施している。

C. 研究結果

C.1. *Oatp1a/1bKO* のメタボローム解析

Oatp1a/1bKO マウスならびに野生型マウスの血漿検体に関して、メタボローム解析を実施中である。

C.2. *Slc16a9KO* のメタボローム解析

Slc16a9KO を交配により得た。*Slc16a9KO* ならびに野生型マウスの血漿ならびに尿検体に関して、メタボローム解析を実施中である。

C.3. *Atp8b1 deficient* マウスの解析

Atp8b1 deficient マウスの脂質メタボローム解析の結果、ヘテロ型ならびに野生型マウスと比較して、ホモ変異型で複数の脂質が変動していた。

D.考察

Oatp1a/1bKO では、すでにビリルビンおよびそのグルクロン酸抱合体、胆汁酸の血漿中への蓄積が報告されているが、網羅的な解析は実施されていない。胆汁酸の硫酸抱合体は既知基質との類似していることや、フラボノイドの抱合代謝物も血漿中に存在している。*Oatp* と基質選択性が類似している *MRP2* の遺伝子多型

(ヒト) や欠損 (ラット) と、これら抱合体の血漿中濃度との関連が認められる事から、グルクロン酸抱合体や硫酸抱合体等の抱合代謝物が候補として考えられる。また、prostaglandin 類などは、*in vitro* 試験によりで基質として見出されていることから、脂質成分の中からこうした化合物が発見されるものと考えられる。

Slc16a9 はゲノムワイド関連解析により、カルニチンとの関連が示唆されている。カチオン性薬物を基質とすることから、これらに類似した構造を有する化合物が見出されるものと考えられる。

Atp8b1 に関して、複数の脂質の変動が認められた。Atp8b1 自信は、PS のフリッパーゼであるため、これら脂質の変動は、Atp8b1 の直性の輸送機能の変動ではなく、機能欠損により副次的に生じたものと考えられる。Atp8b1 のこれら脂質分子の体内動態における役割を解明するためにも、さらにメカニズム解析を必要とする。そうした機能的な裏付けがなされることで、PFIC1 診断ならびに薬物による ATP8B1 阻害により生じる肝障害のためのバイオマーカーとして、妥当性を実証できるものと考えている。

E. 結論

Oatp1a/1bKO ならびに Slc16a9KO のメタボローム解析を実施した。Atp8b1 deficient マウスの解析により、複数の脂質成分が変動しており、Atp8b1 がこれらの生体内調節に関与していることが示唆された。

F. 健康危機情報

G. 研究発表等

論文発表等
なし

学会発表等

- 1) 楠原洋之：薬物トランスポーターの種差と遺伝子多型による医薬品体内動態の個人間変動. 第 54 回日本先天異常学会学術集会 (2014. 7, 東京).
- 2) 楠原洋之：メタボロームによる薬物動態バイオマーカーの探索と薬物間相互作用の定量的解析への適用. 第 5 回杉山特別研究室理研公開シンポジウム (2015. 2, 東京).

報道発表等
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

厚生労働科学研究委託費（創薬基盤推進研究事業）
委託業務成果報告書（業務項目）

担当研究課題 網羅的水溶性代謝物測定

担当責任者 河原崎 正貴 マルハニチロ株式会社中央研究所 副主管研究員

高血圧発症腎疾患モデル動物の作製と包括的代謝物測定の検討

研究要旨 発症機序の異なる高血圧発症ラットに食塩を負荷し、腎疾患モデルラットを作製した。尿の包括的代謝物解析として、¹H-NMR メタボリック・プロファイリング(MP)を検討した。その結果、NMR-MP は腎疾患にかかわる生化学検査値および病理学的所見を反映し、病態の特徴を把握できる可能性が示唆された。

研究協力者

内尾こずえ 独立行政法人医薬基盤研究所
難病・疾患モデル動物部門 研究員
根本 直 (独)産業技術総合研究所
バイオメディカル部門 主任研究員
深水 昭吉 筑波大学 生命領域学際研究
センター 教授
福岡 秀興 早稲田大学総合研究機構 教授

A. 研究目的

2012年度 厚生労働科学研究費補助金 創薬基盤推進研究事業 政策創薬マッチング研究事業「慢性腎臓病(CKD)の将来動向」にまとめられているように、国内における慢性腎臓病の患者数は予備軍も含めて1,300万人と推定されている。糖尿病性腎症や腎硬化症をはじめとする腎疾患は、食生活の欧米化に伴うメタボリックシンドロームの増加と相まって発生率が急速に増加している疾患である。さらに、慢性腎不全へ進行すると、現在の治療法は透析と臓器移植以外はなく、健康長寿社会の実現の障壁と

なっていることから、初期の病態時での治療を可能にする医薬品の創出が急務である。現在用いられている治療薬としては、腎保護作用のある降圧薬(カルシウム拮抗薬、ARB、ACE阻害薬)、あるいはナトリウム排泄を主眼とした利尿薬等の組み合わせが処方されているが、根本的な治療薬の開発には至っていない。また、臨床研究・現場からは、現在の腎生検に代わる低侵襲あるいは非侵襲の検査により、診断を可能とし、日常診療や臨床試験のアウトカムに応用されるバイオマーカーが必要であるとされている。

本研究では、腎疾患の医薬品開発の迅速化・効率化を目指す上で有用と考えられる、有効性(病態の改善)を評価しうる水溶性代謝物バイオマーカーの探索、またその方法論の開発が目的である。

今回は、腎疾患モデルとして、高血圧を背景とした、発症作用機序の異なる自然発症高血圧ラット(SHR)と食塩感受性高血圧ラット(Dahl-Iwai salt sensitive rat)を対象に、食

塩負荷した際の生化学的、病理的变化および、包括的代謝物解析の基礎的検討を行った。

B. 研究方法

B.1 食塩負荷高血圧ラットの作製

(1) 使用動物と飼育

検討①

自然発症高血圧ラット (Spontaneous Hypertensive Rat) (SHR/Izm) (n=10) とその対照動物として Wistar Kyoto Rat (WKY/Izm) (n=10) (ともに雄性、入荷時 8 週令) を日本エスエルシーより購入し、1 週間馴化後本試験に供した。馴化期間は、食塩濃度 0.3% AIN-93G を自由摂取させ、本試験においては 8.0 %食塩含有 AIN-93G を 8 週間自由摂取させた。飲料水は、給水瓶により自由摂取させた。

検討②

食塩感受性高血圧症モデルラット (Dahl-Iwai S) (DIS/Eis) (n=10) とその対照動物として食塩抵抗性ラット (Dahl-Iwai R) (DIR/Eis) (n=10) (ともに雄性、入荷時 4 週令) を日本エスエルシーより購入し、1 週間馴化後本試験に供した。

馴化期間は、食塩濃度 0.3% AIN-93G を自由摂取させ、4.0 %食塩含有 AIN-93G を 8 週間自由摂取させた。飲料水は、給水瓶により自由摂取させた。

検討①、②ともに室温：19～25° C、相対湿度：30～70%、換気回数：1 時間に 10～20 回、照明：1 日 12 時間 (7 時～19 時) 点灯の環境下で飼育した。

(2) 観察および試料採取

全個体について 1 日に 1 回、体外表、栄養状態、姿勢、行動及び排泄物の異常などの一般

状態を観察した。また、全個体について、週 1 回以上体重、摂餌量及び飲水量を測定した。

血圧については、全個体について、高食塩飼料の給餌開始前に 1 回、給餌開始後は第 2、4、6 及び 8 週にテイルカフ法で血圧を測定した。測定には無加温型非観血式血圧計 (MK-2000、室町機械) を用いた。試験当日、ラットをホルダーに入れて固定し、尾にカフパルスセンサーを取り付けて血圧を測定した。1 回目の測定値はホルダー及び手技への馴化として捨て値とし、2 回目以降の 5 回の測定値から、上下を除いた 3 回分の測定値の平均をその個体の測定値とした。採尿を行う週は、血圧測定は採尿の前日に行った。

採尿は、高食塩飼料の給餌開始前に 1 回、給餌開始後は第 4 及び 8 週に行った。すなわち、動物を代謝ケージに入れて約 16 時間飼育し、尿を回収した。その間、餌は与えず、水は自由に摂取させた。採取した尿は室温、500 × g で 5 分間遠心分離して上清を分離して、分注を行い、液体窒素で凍結した。凍結サンプルは分析まで、-70° C 以下で冷凍保存した。

採血は、高食塩飼料を 8 週間摂取させた後、ラットをペントバルビタールナトリウム (ソムノペンチル、共立製薬、約 50 mg/kg、腹腔内投与) で麻酔し、開腹して腹大静脈から全採血した。剖検時に麻酔下で採取した血液は EDTA・2K 入りチューブに約 5 mL 分取し、2,000 × g で 10 分間遠心分離して血漿を分離した。血液の残りは全量を凝固促進剤・分離剤フリーのチューブに移し、30 分間室温に静置後、室温にて、2,000 × g で 10 分間遠心分離し、血清を分離した。得られた血漿および血清は、クライオチューブに分取し、液体窒素で速やかに凍結した。

また、凍結サンプルは分析まで、 -70°C 以下で冷凍保存した。

剖検は、上記の第8週の採血に続きラットを安楽殺し、速やかに肝臓、腎臓及び心臓を採取した。臓器の重量を測定後、各1片を採取しカセットに入れ、リン酸緩衝ホルマリン液で固定した。各臓器の残りは適宜分取し、クライオチューブに入れ、速やかに液体窒素で凍結した。

B.2 試料分析

B.2.1 生化学的分析

高塩分給餌開始前、給餌開始後第4及び8週時に得られた尿について、尿中クレアチニン(U-CRE) (測定法: 酵素法) およびアルブミン(U-ALB) (測定法: 免疫比濁法) を測定した。

剖検時に得られた血清は、総タンパク質(TP) (測定法: ビウレット法)、血中アルブミン(ALB) (測定法: BCG法)、血中尿素窒素(BUN) (測定法: UV法)、血中クレアチニン(CRE) (測定法: 酵素法)、ナトリウムイオン(Na) (測定法: イオン選択電極法)、塩化物イオン(Cl) (測定法: イオン選択電極法)、カリウムイオン(K) (測定法: イオン選択電極法)、カルシウムイオン(Ca) (測定法: OCPC法)、無機リン酸(IP) (測定法: 酵素法)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST) (測定法: JSCC標準化対応法)、アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT) (測定法: JSCC標準化対応法)、乳酸脱水素酵素(LDH)、(測定法: JSCC標準化対応法)、アミラーゼ(AMY) (測定法: JSCC標準化対応法)、総コレステロール(T-CHO) (測定法: 酵素法)、中性脂質(TG) (測定法: 酵素法)、HDL-コレステロール(HDL-C) (測定法: 直接法)、総ビリルビン(T-BIL) (測定法: 酵素法)、血糖値(GLU) (測定法: 酵素法) を測定した。

B.2.2 病理組織学的検査

ホルマリン固定済み肝臓および腎臓を常法により切り出し、パラフィン包埋、薄切を行った。肝切片は、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色、腎切片はPeriodic acid-Schiff(PAS)染色およびシリウスレッド(SR)染色に供し、光学顕微鏡にて検鏡した。作製した、各染色標本において、第三者機関である病理専門家により所見の強さに基づいた5段階評価(-:異常なし、±:軽微、+:軽度、++:中等度、+++ :高度)のグレイティング評価を行った。

B.2.3 尿包括的代謝物分析

分析は、高塩分給餌開始前、及び摂取8週後に得られた尿を対象とし、 $^1\text{H-NMR}$ メタボリック・プロファイリングによる包括的代謝物解析を行った。

サンプル調製

凍結保存尿サンプルを $0\sim 4^{\circ}\text{C}$ で融解し、 $2,000\times\text{g}$ 、 4°C で10分間遠心分離した。得られた上清($200\mu\text{L}$)に 0.2M リン酸緩衝液(リン酸二水素ナトリウム(和光純薬製)およびリン酸水素二ナトリウム(和光純薬製)で $\text{pH}7.4$ に調整し、 10% (v/v)重水(99.9% D+, Merck製)、内部標準として 3mM 3-トリメチルシリル[$2,2,3,3\text{-}^2\text{H}_4$]プロピオン酸ナトリウム(TSP)(最終濃度: 1mM)を含む($400\mu\text{L}$)を加えて混和し、 $2,000\times\text{g}$ 、 4°C で10分間遠心分離した。得られた上清($550\mu\text{L}$)をNMRチューブ(NMR Test Tube HG-Type($\phi 4.951\sim 4.965\text{mm}\times 7\text{inch}$))、和光純薬製)に移し、測定に用いた。

NMR測定

核磁気共鳴装置(NMR)は、JNM-ECA(500MHz 、日本電子株式会社)(現:株式会社 JEOL RESONANCE)を用いた。測定条件は、次のとおり

である。測定温度:298 K、観測中心:4.67 ppm、測定範囲: 15 ppm, データポイント: 32,768, 積算回数: 128、遅延時間: 5 秒/スキャン, パルスフリップ角: 45°。また、軽水信号は、事前飽和法 (pre-saturation) により、消去した。

メタボリック・プロファイリング

測定した各 ¹H-NMR スペクトルは、ALICE 2 for Metabolome (Ver. 2.1, 日本電子株式会社) を用いて、スペクトル処理を行った。すなわち、FID をフーリエ変換後、絶対値微分処理により位相補正、ベースライン補正なしに一括処理した。得られた各 NMR スペクトルに対し、化学シフト 0.5-9.5 ppm の領域を 0.04 ppm 幅で分割して積分 (bucket 積分あるいは binning) を行い、225 の変数に変換した。軽水近傍の 4.5-5.2 ppm を除外し、最終的に 207 変数とした。尿は、サンプルによって濃度が異なるため、積分値の総和を 100 として、各積分値を百分率に変換した。検討①、検討② 其々に対して、主成分分析 (PCA) および判別分析 (O-PLS-DA) を行った。主成分分析あるいは判別分析には上記ソフト以外に、SIMCA-P (ver. 12) (Umetrics) を用いた。

B.2.4 統計解析

試験データを集計し、項目毎に統計解析を行った。原則として、高血圧モデル群と対照群における群間比較は、対応のない student-t 検定を採用した。また、有意水準は両側検定で 5% 未満とした。

<倫理面への配慮>

実験動物の飼育管理、動物実験の計画および実施は、「動物の愛護及び管理に関する法律」(昭和 48 年 10 月 1 日法律第 105 号、最終改正

平成 24 年 9 月 5 日法律第 79 号)、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」

(平成 18 年 4 月 28 日環境省告示第 88 号、最終改正平成 25 年 8 月 30 日環境省告示第 84 号)、

「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」(日本学術会議、平成 18 年 6 月 1 日) に準

拠し、マルハニチロ株式会社動物実験委員会の承認を得て実施した。なお、本飼育管理は株式

会社ボゾリサーチセンターつくば研究所動物実験委員会の承認を得て、飼育管理施設で定め

ている実験動物の管理及び福祉に関する指針 (動物実験委員会規則、株式会社ボゾリサーチ

センター) に従って実施した。

C. 研究結果

C.1 体重・摂餌量・血圧の推移

検討①では、飼育期間を通して SHR/Izm 群の摂餌量が WKY/Izm 群の摂餌量よりも有意に低く、それと連動して、体重推移も有意に SHR/Izm 群が WKY/Izm 群と比較して低値であった。一方、検討②では、DIS/Eis 群と対照の DIR/Eis 群において、摂餌量に有意な差は認められなかった。試験終了前 2 週間において、DIS/Eis 群は DIR/Eis 群と比較して低値であったが、試験期間の体重推移は同様であった。(図 1)

収縮期血圧は、検討①の SHR/Izm 群は、継時的に著しい血圧上昇傾向を示したのに対し、検討②の DIS/Eis 群は、一定の高値を保ったまま推移した。(図 2)

C.2 生化学検査

摂取 8 週後、蓄尿により採尿が可能であった個体は、SHR/Izm 群 10 個体、WKY/Izm 群 9 個体、DIS/Eis 群 8 個体、DIR/Eis 7 個体であった。尿中アルブミンは、高血圧モデルラットである SHR/Izm 群 (143.5 ± 87.4 mg/dL), DIS/Eis

群(484.9±248.3 mg/dL)で著しい排出が認められ、SHR/Izm 群よりも DIS/Eis 群のほうが全体的に高値であった。また、尿中アルブミンを尿中クレアチニンで除して比較すると、検討①、②ともに高血圧モデル群(SHR/Izm: 2.64±0.29 μg/mg CRE, DIS/Eis: 2.54±1.32 μg/mg CRE)は各対照群(WKY/Izm: 0.30±0.10 μg/mg CRE, DIR/Eis: 1.32±0.58 μg/mg CRE)と比較して有意に高値であり、腎糸球体機能の低下が認められた。

また、血液生化学検査で特徴的な相違がみられたのは、腎機能を反映した血中尿素窒素(BUN)であり、高血圧モデル群(SHR/Izm: 37.2±20.2 mg/dL, DIS/Eis: 23.0±0.32 mg/dL)は、対照群(WKY/Izm: 20.2±4.1 mg/dL, DIR/Eis: 18.3±3.1 mg/dL)と比較して有意に高値であった。しかし、血中クレアチニンについては、検討①(SHR/Izm >WKY/Izm)と検討②(DIS/Eis <DIR/Eis)では結果が異なった。また、腎機能が低下すると、損失したタンパク質を肝臓が補完しようとするため、肝臓がアルブミンの合成を開始するが、同時に LDL のようなコレステロール運搬タンパクも合成してしまうため、腎臓疾患の罹患患者では、高頻度に高脂血症の状態をみることがあるといわれているが、検討①、②においてもそのような変化は認められなかった。

C.3 臓器重量・病理組織学所見

臓器重量

剖検時採取した腎臓、肝臓、そして心臓を剖検時体重あたりに換算して、比較をした。検討①及び②ともに、高血圧動物群は対照群と比較して、有意に高値を示した。また、検討②の DIS/Eis における心肥大は目視でも明らかであった。

病理所見:肝臓

検討①

SHR/Izm 群では、10 例中 9 例に小葉周辺性の脂肪沈着がみられ、その殆どが軽微(±)の所見だったのに対し、WKY/Izm 群では全例に軽度(+)または中等度(++)の同所見がみられた。

検討②

DIS/Eis 群では、全例に軽微または軽度の小葉周辺性の脂肪沈着がみられた。一方、DIR/Eis 群では、10 例中 9 例に小葉周辺性の脂肪沈着がみられ、その殆どが軽微の所見であったことより、DIS/Eis 群と比較して、同所見の僅かな軽減化傾向がみられた。その他の所見では、DIS/Eis 群の 1 例のみに軽度の被膜炎がみられた。なお、グリッソン鞘周囲の細胞浸潤および小肉芽腫が散見されたが、これらの所見の明らかな群間差は認められなかった。

病理所見:腎臓

検討①

SHR/Izm 群では、1 例(個体番号 No. 1009)のみに中等度の硝子円柱、尿細管の再生性変化、拡張および血管炎、軽度の類線維索性壊死等の強い変化がみられた。(図 3) さらに、この動物では、比較的多くの糸球体硬化がみられ、ボウマン嚢への癒着も認められた。一方、その他の 9 例の動物については、8 例に硝子円柱および尿細管の再生性変化、6 例に尿細管の基底膜肥厚および間質の細胞浸潤等の所見がみられたが、その殆どが軽微または軽度の所見であった。また、SR 染色により 8 例の皮質および皮髄境界部に線維化がみられ、特に 3 例には高度(+++)または中等度の所見がみられた。対照群である WKY/Izm 群では、SHR/Izm 群と比較して、硝子円柱の僅かな軽減化傾向がみられたが、中等度の No. 1009 を除いた 9 例の動物とほぼ同様の結

果がみられ、明らかな群間差は認められなかった。SR染色の結果 WKY/Izm群の9例に軽微または軽度の線維化がみられたが、前述のSHR/Izm群にみられたような強い線維化は認められなかった。

検討②

DIS/Eis群では、SHR/Izm群のNo.1009のような強い変化は認められなかったが、10例中9例に軽微または軽度の硝子円柱、7例に軽微の尿細管の基底膜肥厚、6例に軽微の尿細管の再生性変化がみられた。(図4) DIS/Eis群の8例に軽微または軽度の線維化がみられたが、前述のSHR/Izm群にみられたような強い線維化は認められなかった。対照群であるDIR/Eis群では、6例に軽微の硝子円柱がみられただけであり、その他の顕著な所見は認められなかった。また、SR染色においても線維化は殆ど認められず、1例のみに軽微の線維化がみられた。

C.4 尿包括的代謝物分析

摂取8週後、蓄尿にて採取できた個体はC.2で示したとおりであり、すべての尿サンプルについて、¹H-NMRを測定し、多変量解析手法の一つである主成分分析(PCA)および2群間の際を識別する判別分析(O-PLS-DA)を行った。

PCAを行う変数処理として、各変数の平均を揃えるセンター処理(Ctr)あるいは、変数相違の検出力を高めるために提案されているパレート処理(Par)がある。これは、各変数を標準偏差の平方根で除したものである。変数処理について検討したところ、センター処理よりも、パレート処理したものの方がSHR/Izm群とWKY/Izm群の特徴抽出が明確になった。また、生化学的あるいは病理的にも腎障害が著しく進んだ1個体(SHR/Izm群No.1009)については、

統計空間上でも、外れに位置していた。(図5 PCA)(スペクトルは図6)O-PLS-DAは強力な識別装置であるので、オーバーフィッティングに注意せねばならないが、そのようなこともなく($R2X=0.706$, $R2Y=0.992$, $Q=0.96$)、2群をよく識別した。(図5 O-PLS-DA)

検討②においても、検討①と同様にPCAおよびO-PLS-DAを行った。(図7)その結果、O-PLS-DA($R2X=0.902$, $R2Y=0.998$, $Q=0.871$)においては、検討①と同様に2群を判別しているが、病理学的病変の度合いによって、群間内でのばらつきが見えている。

D. 考察

本検討においては、発現機序の異なる高血圧ラットに高食塩を負荷し、腎障害モデルを作製した。自然高血圧発症ラット(SHR)は比較的臓器が障害を受けにくいことが知られており、高塩分である8%食塩含有飼料を与えている実験例が多い。一方、食塩感受性ラットDISは、脳・心臓・腎臓・血管障害を合併することでもよく知られ、高血圧性臓器障害モデルとして研究に用いられている。しかし、8%食塩含有飼料を投与すると、8週間で、ほぼ全例が死亡するという報告もあるため、今回は4%食塩含有飼料を投与することとした。上記モデル動物を用いて、生化学的あるいは病理学的な変化については検討報告はあるが、尿中の代謝物を包括的にプロファイリングした報告はない。

検討①と検討②を比較すると、ともに高血圧モデル群において尿中アルブミンの排出と血中尿素窒素の上昇が認められたが、特に、DIS/Eis群においては、尿中アルブミンの排泄が著しかった。また、病理学的所見においては、検討①よりも検討②において、疾患群と対照群を比較して、腎障害の程度を明確に見ることが

でき、DIS/Eis の臓器障害の受けやすさを反映したものと考えられた。逆に、検討①で差が見えなかったことから、8%の食塩を含む飼料を与え続けるとWKY/Izmでも軽度の腎障害を生じるということが見いだされた。DIS/Eis 群で顕著に確認された硝子円柱は、主として遠位尿細管あるいは集合管で形成される、Tamm-Horsfall ムコタンパク質とアルブミンが凝固沈殿したものを基質とし、細胞あるいはその変性成分が封入された円柱状物質である。腎系球体が破壊されるとその修復を望むことはできないが、ナトリウム、グルコース等の低分子再吸収あるいは pH 調節を行っている尿細管の機能が保護できると、透析導入までの期間を遅延することが期待される。

NMR を用いた包括的代謝物解析、すなわちメタボリック・プロファイリングでは、非侵襲である尿サンプルを用いて、前処理も遠心分離程度で、すぐに測定できることが利点である。とくに、SHR/Izm 群の一例で認められたような著しい病変が統計散布図上にあぶりだされることは有用である。また、その一例を特徴づける因子の化学シフトが 1.92 ppm, 3.24, 3.44 ppm であることから、酢酸あるいはタウリンと推定される物質がアルブミンとともに排出されていることが推定される。(図 6) すなわち、尿細管がダメージを受けた際にどのような種類の低分子物質が流出するのかを把握できれば、腎疾患の医薬品開発の迅速化・効率化を目指す上で有用と考えられ、有効性(病態の改善)を評価しうるマーカーにフィードバックできるものと考えている。現在、血清についても NMR-MP での検討を行っており、尿代謝物との関連について検討を進めている。

E. 結論

発症機序の異なる高血圧ラットに食塩を負荷することで、腎障害ラットモデルを作製した。その結果、Dahl 食塩感受性ラットに 4%食塩含有飼料を 8 週間摂取させることで、尿細管に著しい硝子円柱が生じることを認め、対照群である DIR/Eis 群との病理的差異が明確であり、今後の評価系として有用であることが判明した。また、尿の ¹H-NMR スペクトルの包括的なプロファイリング解析より、病態の特徴を把握することができた。また、非侵襲かつ前処理を必要としないため、腎疾患評価の一手法として、NMR-メタボリック・プロファイリングが有用であることが期待された。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表等

論文発表等

特になし

学会発表等

- 1) 河原崎正貴, 鎌田彰, 矢口文, 江成宏之, 根本直: LDL-コレステロールが高めの成人男性に対する魚食の脂質代謝改善効果の検証, 日本農芸化学会 2015 年度大会 (2015. 3)

報道発表等

特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし