

【13】

氏 名	鷹 木 雄 飛 <small>たか ぎ ゆう ひ</small>
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	甲第844号
学位授与の日付	令和5年3月3日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項 (小児科学)
学位論文題目	Development of a young rat hyperkalemia model with decreased renal excretion of potassium (若齢ラットを用いた腎カリウム排泄低下を起因とする高カリウム血症モデルの作製)
論文審査委員	(主査) 教授 徳 田 信 子 (副査) 教授 山 口 重 樹 教授 頼 建 光

論 文 内 容 の 要 旨

【背 景】

高カリウム (K) 血症は、Kの過剰摂取や細胞内Kの細胞外への移動、Kの腎排泄の低下が原因とされる。小児ではK排泄低下を起因とする高K血症が起こることはまれではなく、その治療には利尿薬や吸着薬が用いられている。薬剤の安全性や作用の点からKの排泄部位に直接作用する、より有効で安全な治療薬が求められる。新奇候補薬を開発し、その効果を評価するためには小児に適用できる高K血症の動物モデルが必要である。

【目 的】

既報を参考に、アミロライドと塩化カリウム溶液 (KCl) を若齢ラットに腹腔内投与し、腎排泄低下を起因とする高K血症モデルを作製する。作製した動物モデルが適切であるか、高K血症の既存の治療薬であるフロセミドを陽性対照として動物へ投与し、高K血症に対する抑制効果を検証する。さらに治療薬候補としてアンジオテンシン II 2型受容体 (AT₂R) 刺激薬であるCompound 21 (C21) の高K血症に対する抑制効果の有無を検討する。

【対象と方法】

本研究は獨協医科大学動物実験委員会の承認を得て、指針に従って行った。体重100~120gの雄性Wistar-Imamichiラット83匹を対象とした。

実験1：腎性高カリウム血症モデルの作製

ラットにKCl (0、2、6 mEq/kg) を単独投与またはKClとアミロライド (3 mg/kg) を併用投

与した。いずれも腹腔内投与した。次に、KCl (0、2、3、4.5、6 mEq/kg) とアミロライド (3 mg/kg) の併用投与を行った。対照群には、生理食塩水を投与した。KClとアミロライドの投与後、代謝ケージに静置し、その間蓄尿し、6時間後に蓄尿サンプルを回収し、麻酔下で開腹にて下大静脈から採血を行った。

実験2-1：上記モデル動物へのフロセミド投与後の血清カリウム値に対する作用

KCl溶液 6 mEq/kgとアミロライド 3 mg/kgの投与1時間後に、フロセミドを単回 (30mg/kg)、または1、3、5時間後に反復 (1回投与量30mg/kg) 経口投与し、6時間後に尿回収と採血を行った。対照群には生理食塩水を経口投与した。

実験2-2：上記モデル動物への候補薬投与後の血清カリウム値に対する作用

高K血症モデルにC21を経口投与した。C21の用量は10、30mg/kgとし、対照群にはC21の溶解溶液であるジメチルスルホキシド、ポリエチレングリコール300、ツイン80、生理食塩水 (容量比2：8：1：9) を経口投与した。

血清K値と尿K排泄量のデータの等分散性について、F検定 (2群比較) またはH検定 (3群以上の比較) を実施した。実験1のKCl単独投与またはKClとアミロライドの併用投与、実験2-1の生理食塩水またはフロセミドの投与において、血清データについては2標本の *t* 検定を、尿データについては、Welch補正による2標本の *t* 検定を行った。実験1のKClとアミロライド併用の用量反応、実験2-2のC21の投与において、血清データについては、One-Way ANOVAを、尿データについては、Bonferroni補正によるKruskal-Wallis検定を行った。これらの統計解析には、IBM SPSSを使用した。両側検定で行い、有意水準は5%とした。

【結 果】

実験1

実験群の血清K値は対照群に比べ有意に上昇した (2 mEq/kg : 5.2 vs 4.5 mEq/L, $P=0.039$, 6 mEq/kg : 6.8 vs 4.1 mEq/L, $P=0.005$)。また、血清K値はKClの用量に依存して有意に上昇した。実験群では対照群に比べ尿K排泄量は抑制傾向だった。

実験2-1

単回投与、反復投与ともに有意に血清K値の低下を認めた (単回投与 : 5.9 vs 6.8 mEq/L, $P=0.017$, $n=7$; 反復投与 : 5.6 vs 6.3 mEq/L, $P=0.021$, $n=7$)。尿K排泄量は、反復投与により増加が認められたが (1.9 vs 1.4 mEq/mg Cr, $P=0.03$, $n=7$)、単回投与では有意差は認められなかった (1.9 vs 2.0 mEq/mg Cr, $P=0.2$, $n=7$)。

実験2-2

血清K値、尿K排泄量および尿量は、いずれの用量でも対照群と比較して変化しなかった。

【考 察】

アミロライドはK保持性利尿薬であり、遠位尿細管および皮質集合管の上皮性Naチャンネルを選択的に遮断し、Na-K交換を阻害することでKの排泄を減少させる。実験1でKClとアミロライドの併用投与群が、KCl単独投与群に比べ有意に血清K値が上昇したことから、高K血症モデルの作製にはア

ミロライドの併用が必要である。既報で用いたKClは2 mEq/kg（平均血清K値 6.73mEq/L）だったが、本研究では同程度の上昇を得るのに6 mEq/kgのKClを要した。これは、我々が用いたラットが既報よりも若齢であり、腎機能の差に起因すると思われる。C21が血清K値および尿K排泄量に効果がなかった理由として、低いAT₂R発現量、C21の低いバイオアベイラビリティや短い半減期、K排泄を起こすのに不十分なAT₂R刺激などの可能性が考えられた。

【結 論】

若齢ラットを用いて、KClとアミロライドの併用投与により、腎排泄低下を起因とする高K血症モデルを作製した。この若齢ラット高K血症モデルは、尿K排泄量の減少に起因する高K血症に対する新奇治療薬の効果を評価することができる。これは小児（学童期）に相当する若齢ラットを用いて、腎性高K血症モデルを作製したはじめての研究報告である。通常薬物の機序、投与量などを研究する際には、大人に相当する動物を用いて、あるいは成人を対象とした臨床試験において検討されることが多い。しかし、本研究で若齢ラット腎性高K血症モデルを確立したことで、小児（学童期）で試験することができない既存の治療薬、新奇候補薬の効果を検討することができる。これらの点において本研究は新奇性・独創性に優れていると考える。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

【論文概要】

小児において、脱水などによって腎排泄低下により高カリウム血症（以下、高K血症）が起こることは希ではない。高K血症は、カリウムの過剰摂取や細胞内K⁺の細胞外への移動、K⁺の腎排泄の低下が原因とされる。治療にはカルシウム製剤やインスリン、利尿薬や吸着薬が用いられている。しかし、小児を対象とした臨床試験を行うことは困難であるため、小児での薬物投与量は確立しておらず、大人の投与量から決められている。そこで、小児に適用できる腎性高K血症の動物モデルがあれば、既治療薬、新奇候補薬の小児での有効性、安全性を評価することができると考えられる。

申請論文の目的は、小児（10歳代）に相当する5週齢の雄性ラットを用いて、既知の成獣雄性ラットを用いた腎性高K血症モデルを参考に、KCl溶液とアミロライドの腹腔内投与により高K血症モデルを作製すること、既治療薬であるループ利尿薬（フロセミド）を陽性対照薬として投与し効果があることを確認すること、さらに、新奇候補薬であるアンジオテンシンII 2型受容体（AT₂R）選択的作動薬（Compound 21：C21）を投与し、高K血症に対して効果があるか否かを検討することである。

フロセミド（30mg/kg/回）は単回、反復（時間をあけて3回）で、ゾンデを用いて経口投与した。C21の投与量は10mg/kgと30mg/kgの2用量とし、ゾンデを用いて経口投与した。

その結果、KCl溶液6 mEq/kgとアミロイド3 mg/kgの腹腔内投与により、高K血症が認められた。すなわち、目的に沿った若齢モデルが作製できたことを確認した。フロセミドを投与したところ、対照群と比較して血清K値は低下し、尿中K値は増加した。C21の投与では、血清K値の低下および尿中K値の増加は認められなかった。

KCl溶液の投与量が本研究では既報（2 mEq/kg）に比べ多くなった理由として、若い週齢のため

腎機能が高かった可能性が考えられた。C21の投与により血清K値、尿中K値が変化しなかった理由として、AT₂R発現が低い、バイオアベイラビリティが低い、AT₂R刺激のみの作用不足などの可能性が考えられた。

以上の結果から、申請論文では、本研究で作製した若齢ラット腎性高K血症モデルは小児（10歳代）の腎性高K血症に対する既治療薬、新奇候補薬を評価するための適切なモデルになり得ると結論づけた。

【研究方法の妥当性】

申請論文では、動物実験委員会にて実験計画の承認を受けて、指針に従って行っている。本研究で作製された腎性高K血症モデルは、既知の成獣雄性ラットを用いた高K血症モデルを参考に作成されている。薬物の投与量、投与方法は、適切に設定している。実験群に対し適切な対照群を置き、比較している。血液の採取や血清K値測定は、溶血が起こらない方法で行っている。統計解析は、血清、尿データの分布から、それぞれパラメトリック、ノンパラメトリック検定を選択し適切に行っている。以上から、本研究方法は妥当なものである。

【研究結果の新奇性・独創性】

申請論文では、小児（10歳代）に相当する若齢ラットを用いて、腎性高K血症モデルを作製したはじめての報告である。通常薬物の機序、投与量などを研究する際には、成人に相当する動物を用いて、あるいは成人を対象とした臨床試験において検討される。しかし、本研究で若齢ラット腎性高K血症モデルを確立したことで、小児（10歳代）で試験することができない新奇候補薬の効果を検討するのに使用できる可能性がある。これらの点において本研究は新奇性・独創性に優れた研究と評価できる。

【結論の妥当性】

申請論文では、5週齢ラットを用いて高K血症モデルを作製し、血清K値が正常上限を超えるのに必要なKCl溶液の投与量を決定している。次に陽性対照薬のフロセミドの抗高K血症作用を確認している。新奇候補薬のC21を検討しているが、抗高K血症作用は認められていない。結論は結果に基づいて導かれたものであり、臨床、基礎的見地からも妥当なものである。

【当該分野における位置付け】

申請論文で作製した疾患モデルは、小児（10歳代）への投与を想定した、抗高K血症に対する薬物の効果、安全性の検討、ならびに作用機序や体内動態の検討のために有用である。無麻酔、無拘束で経口投与するため、ヒトにおける経口投与薬に外挿できる。小児（10歳代）への安全で、有効な薬物治療のエビデンスを積み上げるための研究と評価できる。

【申請者の研究能力】

申請者は、小児科学、薬理学、腎臓や尿細管の機能を学び実践した上で、作業仮説を立て、実験計画を立案した後、適切に本研究を遂行し、貴重な知見を得ている。その研究成果はDokkyo Medical Journalへの掲載が受理されており、申請者の研究能力は高いと評価できる。

【学位授与の可否】

本論文は独創的で質の高い研究内容を有しており、当該分野における貢献度も高い。よって、博士（医学）の学位授与に相応しいと判定した。

（主論文公表誌）

Dokkyo Medical Journal

（2023年公表予定）