

【28】

氏 名	やま だ てつ べい 山 田 哲 平
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	甲第793号
学位授与の日付	令和3年3月3日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項 (麻酔・疼痛学)
学位論文題目	Effect of In-vivo administration of nafamostat on the onset of renal hyperkalemia and association of urine kallikrein in rats (ラットにおけるナファモスタットの生体内投与による腎性高カリウム血症発症への影響と尿カリクレインの関連)
論文審査委員	(主査) 教授 石 光 俊 彦 (副査) 教授 小 野 一 之 教授 松 島 久 雄

論 文 内 容 の 要 旨

【背 景】

ナファモスタットはセリンプロテアーゼ阻害薬であり、臨床では急性膵炎、播種性血管内凝固症候群に対する治療薬として用いられている。標的とするプロテアーゼには活性化凝固因子（トロンビン、XIIa、Xa、VIIa）、プラスミン、補体、カリクレインなどがある。主な副作用として高カリウム血症が知られており、そのメカニズムは皮質集合管を用いた実験で、アミロライド感受性Na⁺チャネル阻害による腎性カリウム排泄低下と考えられている。セリンプロテアーゼであるカリクレインには2種類あり、それぞれ血漿と組織に存在する。腎臓組織に存在するカリクレインは遠位尿細管部の接合尿細管で産生、尿中分泌され、主に2つの作用がある。一つは基質キニノゲンからキニンを放出し、キニン受容体を介して、腎血流とナトリウム利尿を増加する作用、もう一つはアミロライド感受性Na⁺チャネルに直接作用し、そのサブユニット構造を分解、活性化し、ナトリウム再吸収を増加する作用である。そこで、申請者は、「ナファモスタットは、アミロライド感受性Na⁺チャネル阻害により尿カリウム排泄低下を介して高カリウム血症を誘発し、それは腎臓のカリクレイン活性阻害による。」という研究仮説を立てた。

【目 的】

ラットにおいて、ナファモスタットの投与はアミロライド感受性Na⁺チャネル阻害を介して腎性高カリウム血症を発症し、その機序として尿中カリクレイン活性阻害が関連するかを調べる。

【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行われた（許可番号：1120）。9～11週齢のWistar-Imamichi雄性ラットを用いた。実験は、セボフルラン麻酔下に頸静脈、大腿静脈、膀胱にカニューレーションし、各々から採血、薬物投与、採尿を経時的に行った。採血、採尿は、薬物投与30分前から投与後90分間、15分毎に合計8回行った。実験1では、ナファモスタット（1.2mg/kg/h、c.i.、臨床最大用量相当）単独群（n=4）と5%ブドウ糖群（n=4）、実験2では、低用量アミロライド（3.33 μ g/kg、i.v. 12 μ g/kg/h、c.i.、既報で血清カリウム上昇作用を示さない最小用量）+ナファモスタット用量漸増（0.13、0.4、1.2mg/kg/h、c.i. 臨床最小用量以下から最大用量相当）併用群（各n=13、n=12、n=5）と低用量アミロライド単独群（n=13）を、各々比較した。評価項目は、血清 Δ カリウム濃度（薬物投与直前値との差、mEq/L）、尿カリウム排泄量（mEq/mg尿クレアチニン）、尿カリクレイン活性量（ μ mol/mg尿クレアチニン）、各項目の投与終了3時点の平均値（最大効果の現れる時点）とした。血清、尿カリウム濃度はイオン電極法を、尿クレアチニン濃度はJaffe法を、尿カリクレイン活性は合成蛍光基質による酵素反応法を用いて測定した。統計解析では、データは平均値 \pm 標準誤差（SE）で表し、実験1、2ともにrepeated measure two-way ANOVAを行い、実験2では多重比較検定（Dunnnett test、片側検定）を行った。投与終了3時点の平均値の比較は、実験1、2で各々unpaired-*t* testとrepeated measure one-way ANOVAを用いた。実験2でナファモスタット0.13、0.4mg/kg/h群の投与45分後尿の検体量不足が1つずつあったため、各々n=12、n=11を解析対象とした。有意水準は<0.05とし、IBM SPSS Statistics, version 26を使用した。

【結 果】

実験1では、血清 Δ カリウム濃度（以下、 Δ K）は、ナファモスタット投与群で対照群に比べ上昇傾向が示された（repeated measure two-way ANOVA、 $P=0.081$ ）。投与終了3時点の平均値の比較においても同様の結果が示された（unpaired-*t* test、 $P=0.052$ 、片側）。尿中カリウム排泄量（以下、K排泄）は、ナファモスタット投与群で対照群に比べ低下傾向が示された（ $P=0.635$ ）。投与終了3時点の平均値の比較においても同様の結果が示された（ $P=0.467$ ）。

実験2では、 Δ Kは、アミロライドとナファモスタット併用群で、アミロライド単独群に比べて軽度上昇し、経時変化全体では有意でなかった（repeated measure two-way ANOVA、 $P=0.163$ ）が、併用群と単独群との比較では、ナファモスタット0.4 mg/kg/h併用群で有意な上昇が示された（ $P=0.036$ ）。投与終了3時点の平均値の比較においても同様の結果であった（repeated measure one-way ANOVA、 $P=0.038$ ）。K排泄は、併用群で単独群に比べ軽度低下し、全体では有意でなかった（ $P=0.091$ ）が、併用群と単独群との比較では、1.2 mg/kg/h併用群で有意な低下が示された（ $P=0.025$ ）。投与終了3時点の平均値の比較においては、0.13 mg/kg/h、または1.2 mg/kg/h併用群で単独群に比べ有意な低下が示された（各 $P=0.034$ 、0.0003）。尿カリクレイン活性は、薬物投与45分以降で、併用群でアミロライド単独群に比べて軽度低下が示されたが、全体では有意でなかった（ $P=0.181$ ）。併用群と単独群との比較でも有意差は示されなかった（1.2 mg/kg/h併用群で $P=0.074$ ）が、投与終了3時点の平均値の比較において、1.2 mg/kg/h併用群で単独群に比べ有意な低下が示された（ $P=0.046$ ）。

【考 察】

実験1では、ナファモスタットの投与により、 ΔK とK排泄に対してそれぞれ上昇、低下傾向が示された。データのばらつきがやや大きいことは考慮すべきであるが、ナファモスタットの臨床用量での投与範囲において、単独使用では明らかな腎性高カリウム血症を発症しないことが考えられた。実験2では、ナファモスタットはアミロライドの併用投与によって、 ΔK 上昇、K排泄低下が顕在化され、また尿カリクレイン活性低下が示された。各々の用量反応関係は一部明らかでなかったが、この理由として全身麻酔による呼吸状態の変動が血清カリウム濃度、尿量に影響したことが考えられた。これらの結果は、ナファモスタットがアミロライド感受性Na⁺チャネル阻害を介して腎性高カリウム血症を発症し、この機序にカリクレイン活性低下が関与することを示唆している。また、ナファモスタットの薬剤添付文書に記載されている「カリウム保持性利尿剤等を併用する場合には、高カリウム血症の発現に注意すること。」や、腎機能低下患者でナファモスタットによる高カリウム血症の発現が多いことを説明するものである。

【結 論】

ラットにおいて、ナファモスタットの投与はアミロライド感受性Na⁺チャネルを介して腎性高カリウム血症を発症し、その機序として尿中カリクレイン活性阻害が関連することが示唆された。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

【論文概要】

セリンプロテアーゼ阻害薬であるナファモスタットは、トロンビン、活性化凝固因子（XIIa、Xa、VIIa）、カリクレイン、プラスミン、補体などを標的としている。急性膵炎、播種性血管内凝固症候群、出血性または出血傾向のある患者の体外循環時（血液透析、血漿交換）の血液凝固予防などに広く使用されている。ナファモスタットの主要かつ重篤な副作用に高K血症が知られているが、その発症機序は解明されていない。これまでの研究で、組織（腎）カリクレイン阻害が発症機序の一つとして考えられている。

申請論文の目的は、ラットにおいてナファモスタットの投与はアミロライド感受性Na⁺チャネル阻害を介して腎性高K血症を発症し、尿中カリクレイン活性阻害が関連するかを明らかにすることである。

研究は、セボフルラン麻酔下のラットに、薬物を静脈内投与し、経時的に採血、採尿を行った。血清および尿K値はイオン電極法を、尿クレアチニン値はJaffe法を、尿カリクレイン活性は合成蛍光基質による酵素反応法を用いて測定した。

ナファモスタット単独投与では、血清K値が上昇、尿K排泄量の低下傾向が認められた。ナファモスタットとアミロライドの併用投与では、これらの傾向が増強され（統計学的有意差を認めた）と共に有意な尿カリクレイン活性の低下も確認された。以上の結果から、申請論文では、ナファモスタットはアミロライド感受性Na⁺チャネル阻害により、尿K排泄量の低下による腎性高K血症を引き起こし、その機序には尿カリクレイン活性阻害が関連していると結論づけた。

【研究方法の妥当性】

申請論文では、全身麻酔下でラットに対して薬物投与を行い、経時的に採血および採尿を行っている。薬物の投与量、投与方法は、臨床での用量、用法を根拠としている。採血量は循環血液量の15%未満と生物学的な許容範囲に設定されている。血清K値、尿K値、尿クレアチニン値、および尿カリクレイン活性量は、それぞれ確立された標準的方法で測定している。また、ナファモスタットの影響を調べるために、適切な対照（5%グルコースのみ投与）を設定し、適切な統計解析を用いている。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】

ナファモスタットが高K血症を引き起こすことは、臨床上数多く報告されてきたが、そのことを検証した研究報告はない。また、生体に全身投与したときに、腎カリクレインを阻害するかについて検証されていない。申請論文では、ラットにナファモスタットを投与し、高K血症を発症することを再現した。その機序として尿K排泄低下と尿中カリクレイン活性阻害が示唆された。これらの点において、申請論文は、ナファモスタットの生体内投与による腎性高カリウム血症発症への影響と尿カリクレインの関連を実験的に示した報告であり、最初の新奇性・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、まずナファモスタット単独投与、続いてアミロライド併用投与による検討を行い、ナファモスタットによる血清K値が上昇、尿K排泄量の低下と腎カリクレイン活性低下の関連性について評価している。これらの結果から導き出された結論は、論理的に矛盾するものではない。また、腎臓内科学、救急医学、薬理学、麻酔科学など関連領域における臨床的知見を踏まえても妥当なものである。

【当該分野における位置付け】

ナファモスタットの薬剤添付文書には、腎からのK排泄抑制やK保持性利尿剤を併用する場合に高K血症が発症しやすいことが記載されている。申請論文は、その根拠を説明するものとなる。加えて、申請論文は、ナファモスタットを投与時の高K血症発症のリスクを提唱し、投与中の定期的な血清K値の測定を推奨することを示唆している。患者への安全な医療の提供や機序解明による創薬研究への応用に役立つ研究と評価できる。

【申請者の研究能力】

申請者は、薬理学の理論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 Journal of Medical Sciences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】

申請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く、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 Journal of Medical Sciences

(48 : 33-42, 2021)