

博 士 論 文

尿酸代謝の種差最小化を指向した動物モデルによる
新規尿酸排泄促進薬 **Dotinurad** の薬理学的研究

Pharmacological profiling of a novel uricosuric agent **Doniturad**
in animal models with urate metabolism close to human one

2019 年 12 月

谷口 哲也

目次

緒言	1
第一章 尿酸代謝の種差最小化を指向したラットモデルによる尿酸排泄促進薬の評価	4
序論	4
第一節 Pyrazinamide処置ラットを用いた尿酸排泄促進薬の評価	6
序	6
材料・方法	6
実験動物	6
被験物質	7
試薬	7
動物実験モデル、被験物質投与、試料採取	7
血漿及び尿中の尿酸及びクレアチニンの測定	9
尿中PZAの測定	9
腎刷子縁膜小胞を用いた尿酸の取り込みの測定	9
統計解析	11
結果	11
1. 正常ラット及びPyrazinamide処置ラットを用いたProbenecidの評価	11
2. 正常ラット及びPyrazinamide処置ラットを用いたDotinuradの評価	12
3. Pyrazinamide処置ラットを用いた尿酸排泄促進薬の持続性の評価	15
4. ラット腎刷子縁膜小胞を用いた尿酸排泄促進薬の評価	18
考察	20
第二節 Oxonate処置ラットを用いた尿酸排泄促進薬の評価	22
序	22
材料・方法	22
実験動物	22
被験物質	22

試薬	23
動物実験モデル、被験物質投与、試料採取	23
血漿及び尿中の尿酸及びクレアチニンの測定	23
Uricase活性の測定	24
統計解析	24
結果	24
1. Uricase活性に対する尿酸排泄促進薬の影響	24
2. Oxonate処置ラットを用いた尿酸排泄促進薬の評価	24
考察	26
第三節 Topiroxostat処置ラットを用いた尿酸排泄促進薬の評価	27
序	27
材料・方法	27
実験動物	27
被験物質	27
試薬	28
動物実験モデル、被験物質投与、試料採取	28
血漿及び尿中の尿酸及びクレアチニンの測定	29
Xanthine oxidase活性の測定	29
統計解析	30
結果	30
1. Xanthine oxidase活性に対する尿酸排泄促進薬の影響	30
2. Topiroxostat処置ラットを用いた尿酸排泄促進薬の評価	30
3. Topiroxostat処置ラットに対するイノシン負荷の影響	32
考察	33
第四節 まとめ	35
第二章 新規尿酸排泄促進薬Dotinuradの薬理学的研究	36

序論.....	36
第一節 尿酸再吸収／分泌トランスポーターの尿酸輸送に対する尿酸排泄促進薬の 影響	37
序.....	37
材料・方法.....	38
被験物質	38
試薬	39
URAT1、OAT1及びOAT3発現細胞を用いた ¹⁴ C尿酸取り込みの測定	40
ABCG2発現細胞由来膜小胞を用いた ¹⁴ C尿酸取り込みの測定	40
統計解析	41
結果.....	41
1. 尿酸再吸収トランスポーター (URAT1) の尿酸取り込みに対する尿酸排 泄促進薬の影響.....	41
2. 尿酸分泌トランスポーター (ABCG2, OAT1及びOAT3) の尿酸取り込み に対する尿酸排泄促進薬の影響.....	43
考察.....	45
第二節 フサオマキザルを用いた尿酸排泄促進薬の評価	47
序.....	47
材料・方法.....	47
実験動物	47
被験物質	48
試薬	48
動物実験モデル、被験物質投与、試料採取	48
血漿及び尿中の尿酸及びクレアチニンの測定	49
血漿中被験物質濃度の測定	49
統計解析	49

結果.....	49
1. フサオマキザルを用いた尿酸排泄促進薬の評価.....	49
2. フサオマキザルにおける尿酸排泄促進薬の血漿中濃度推移.....	52
考察.....	53
第三節 ラットを用いたABCG2又はOAT1基質の血漿中濃度推移に対する尿酸排泄 促進薬の影響.....	55
序.....	55
材料・方法.....	55
実験動物.....	55
被験物質.....	56
試薬.....	56
動物実験モデル、被験物質投与、試料採取.....	56
血漿中Sulfasalazine濃度の測定.....	58
血漿中Adefovir濃度の測定.....	58
統計解析.....	58
結果.....	59
1. ラットを用いたABCG2基質（Sulfasalazine）の血漿中濃度推移に対する 尿酸排泄促進薬の影響.....	59
2. ラットを用いたOAT1基質（Adefovir）の血漿中濃度推移に対する尿酸排 泄促進薬の影響.....	61
考察.....	63
第四節 まとめ.....	66
総括.....	68
謝辞.....	70
引用文献.....	71

略号及び用語の定義一覧

AMP	adenosine 5'-monophosphate
ATP	adenosine 5'-triphosphate
AUC _{0-t}	area under the curve from 0 to t hours、0からt時間までの血漿中濃度時間曲線下面積
AUC _{0-inf}	area under the curve from 0 to infinity、0から無限大時間までの血漿中濃度時間曲線下面積
BBMV	brush-border membrane vesicle、刷子縁膜小胞
BCRP (ABCG2)	breast cancer resistance protein (ATP-binding cassette sub-family G member 2)
C ₀	initial plasma concentration after intravenous injection、静脈内投与直後の血漿中濃度
C _t	plasma concentration at t hours、被験物質投与t時間後における血漿中濃度
CPM	count per minute、1分あたりの放射線計測回数
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	dimethyl sulfoxide
EGTA	ethylene glycol tetraacetic acid
FE _{UA}	fractional excretion of urate、尿中尿酸排泄率
GLUT9 (SLC2A9)	glucose transporter type 9 (solute carrier family 2 member 9)
HBSS	Hank's balanced salt solution
HCl	hydrochloric acid
HEK293	human embryonic kidney cells 293
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HPLC	high-performance liquid chromatography、高速液体クロマトグラフィー

IC ₅₀	half maximum inhibitory concentration、50%阻害濃度
IL-1	interleukin-1、インターロイキン-1
K _i	inhibitor constant、阻害定数
K _m	Michaelis constant、ミカエリス定数
LC-MS/MS	liquid chromatography-tandem mass spectrometry、液体クロマトグラフィータンデム質量分析装置
MC	methylcellulose又はmetolose
MDCKII	Madin-Darby canine kidney strain II
MgCl ₂	magnesium chloride
MRP4 (ABCC4)	multidrug resistance-associated protein 4 (ATP-binding cassette sub-family C member 4)
NaCl	sodium chloride
NaOH	sodium hydroxide
NLRP3	Nod-like receptor family pyrin domain-containing 3
NPT4 (SLC17A3)	sodium-phosphate transporter 4 (solute carrier family 17 member 3)
OAT1 (SLC22A6)	organic anion transporter 1 (solute carrier family 22 member 6)
OAT3 (SLC22A8)	organic anion transporter 3 (solute carrier family 22 member 8)
P _{CRE}	plasma concentration of creatinine、血漿中クレアチニン値
P _{UA}	plasma concentration of urate、血漿中尿酸値
PZA	Pyrazinecarboxylic acid
[S]	concentration of substrate、基質濃度
SD	standard deviation、標準偏差
SGLT2	sodium glucose cotransporter 2
SNP	single nucleotide polymorphism、一塩基多型
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethane
URAT1 (SLC22A12)	urate transporter 1 (solute carrier family 22 member 12)

U _{CRE}	urinary concentration of creatinine、尿中クレアチニン値
UPLC	ultra-performance liquid chromatography、超高速高分離液体クロマトグラフィー
U _{UA}	urinary concentration of urate、尿中尿酸値

緒言

痛風は急性の関節炎を伴う疾患であり、関節に沈着した尿酸塩結晶が剥がれ落ちることで炎症が惹起される。遺伝要因（Lesch-Nyhan 症候群、家族性若年性高尿酸血症性腎症など）及び環境要因（食事や飲料）が痛風の発症に関与することが知られている（Kuo CF, 2015）。本邦における痛風の罹患者は 100 万人を超えており（厚生労働省, 2016 年）、世界的にも痛風の発生率は増加している（Roddy E, 2012）。痛風の炎症過程には自然免疫が関与しており、近年、その詳細なメカニズムが明らかとなった。すなわち、関節に遊走された好中球が尿酸塩結晶を貪食し、Nod-like receptor family pyrin domain-containing 3 (NLRP3) インフラマソームを活性化し、インターロイキン 1 β (IL-1 β) を産生することで痛風関節炎が発症する（Martinon F, 2006）。また、痛風の特効薬として古くから使用されているコルヒチンが、好中球における α -tubulin の重合を阻害し、NLRP3 インフラマソームの形成を抑制することが明らかとなった（Misawa T, 2015）。また、IL-1 関連の生物学的製剤である Anakinra (IL-1 受容体拮抗蛋白質)、Rilonacept (IL-1 受容体デコイ蛋白質) 及び Canakinumab (抗 IL-1 β 抗体) がいずれも痛風関節炎を抑制したことから（Jassen CA, 2019; Schumacher HR Jr, 2012; Schlesinger N, 2011）、痛風関節炎の発症メカニズムは NLRP3 インフラマソームの形成とそれに続く IL-1 β の産生であることが裏付けられた。痛風の原因疾患として高尿酸血症が知られているが、尿酸の溶解度（37°C の 140 mmol/l Na⁺水溶液で 6.8 mg/dl）を超える状態が続くことで関節に尿酸塩結晶が沈着するためである（Loeb JN, 1972）。また、高尿酸血症は慢性腎障害やメタボリックシンドロームの独立した危険因子であることが複数報告されており（Iseki K., 2004; Obermayr RP, 2008; Yu TY, 2016）、2018 年に発行された高尿酸血症・痛風の治療ガイドライン（第 3 版）では腎機能の改善を目的として尿酸降下薬の使用が条件付きで推奨されている（日本痛風・核酸代謝学会ガイドライン改定委員会、2018 年）。これらのことから、高尿酸血症の治療は痛風の予防だけではなく、生活習慣病の予防という観点からも重要と考えられる。

高尿酸血症治療薬は尿酸生成抑制薬と尿酸排泄促進薬の 2 つに分類され、尿酸生成過剰型の患者には前者、尿酸排泄低下型の患者には後者を使用することが推奨されてきた（日本痛風・核酸代謝学会ガイドライン改定委員会、2018 年）。尿酸生成抑制薬は xanthine oxidase を阻害し、ヒポキサン

チンからキサンチン、キサンチンから尿酸の生成を抑制することで血中尿酸値を低下させる。Allopurinol は古くから使用されている尿酸生成抑制薬であるが、副作用として重篤な皮膚症状が発現する点や腎機能障害患者で用量調節が必要な点に留意が必要である。近年、Febuxostat や Topiroxostat といった新規尿酸生成抑制薬が誕生し (Terkeltaub R, 2006; Matsumoto K, 2011)、中等度までの腎機能障害患者に用量調節不要な薬剤として使用されている (Kimura K, 2018; Hosoya T, 2014)。一方、尿酸排泄促進薬は尿中への尿酸排泄を促進することで血中尿酸値を低下させる。最も古い尿酸排泄促進薬である Probenecid は非常に高用量かつ 1 日 3 回投与であること、有機アニオントランスポーター (organic anion transporters; OATs) 阻害による薬物相互作用のリスクがあることから、臨床ではほとんど使用されていない。Benzbromarone は本邦で最も多く処方される尿酸排泄促進薬であるが、まれに発現する劇症肝炎のためにほとんどの EU 諸国では市場から撤退しており、米では上市されていない。近年、欧米で Lesinurad が尿酸生成抑制薬との併用という条件付きで承認されたが、血中尿酸値低下作用は他剤と比べて弱く、さらに高用量で腎機能障害が認められている。図 1 に本邦における高尿酸血症患者の病型分類の割合を示した。高尿酸血症患者の 85% は尿酸排泄低下型の素因を持っていることから (中村, 2003 年)、尿酸排泄促進薬の処方が大半を占めることが妥当と考えられるが、上記のように既存の尿酸排泄促進薬には問題点が多く、実際はほとんど処方されていない。以上のことから、薬効及び安全性に優れた新規尿酸排泄促進薬の開発が求められている。

尿酸排泄促進薬の作用メカニズムに関わる重要な発見が 2002 年に報告され、腎臓の近位尿細管腔側に発現するトランスポーターである URAT1 が尿酸の再吸収を担っていること、Benzbromarone が URAT1 を強く阻害することが明らかとなった (Enomoto A, 2002)。また、URAT1 の一塩基多型 (single nucleotide polymorphism: SNP) で機能が欠損している個人では無症候性の尿中尿酸排泄の増加がみられ、血中尿酸値が 1 mg/dl 未満と著しい低尿酸血症になることが報告されている (Ichida K, 2008)。これらのことから、URAT1 の機能低下により尿酸の再吸収が抑制され、尿酸排泄が促進した結果として血中尿酸値が低下すると考えられ、URAT1 が尿酸排泄促進薬の標的分子であることが裏付けられた。近年、同様な考え方で開発された薬剤が上市されている。糖尿病治療薬の sodium glucose cotransporter 2 (SGLT2) 阻害剤は、近位尿細管の管腔側に発現して糖を

再吸収するトランスポーターである SGLT2 を阻害することで、尿中に糖を排泄して血糖値を低下させる薬剤である。SGLT2 の SNP で機能が低下している個人では無症候性の尿糖の増加がみられており (Santer R, 2003)、SGLT2 を阻害して糖の再吸収を抑制し、尿糖が増加した結果として血糖値が低下するという、創薬の方向性が示されていた。

既存の尿酸排泄促進薬と比べて薬効が強く、Benzbromarone で報告されていた劇症肝炎のリスクを避けた新規尿酸排泄促進薬の創生を目指して創薬を開始した。肝障害のリスク回避のため、肝障害リスク構造を避けて合成展開し、肝臓ミトコンドリア毒性のスクリーニングを実施した。一方、薬理効果のスクリーニングは汎用性の観点からげっ歯類を用いることが多いが、ヒトとの種差が大きいため適切なモデルが報告されておらず、最適な実験モデルの選択が必要であった。そこで、第一章では尿酸代謝の種差最小化を指向して検討した複数のラットモデルについて論述し、第二章ではラットモデルの評価で有望な尿酸排泄促進薬と考えられた Dotinurad について、既存の尿酸排泄促進薬と比較して得られた薬理学的特長について論述した。

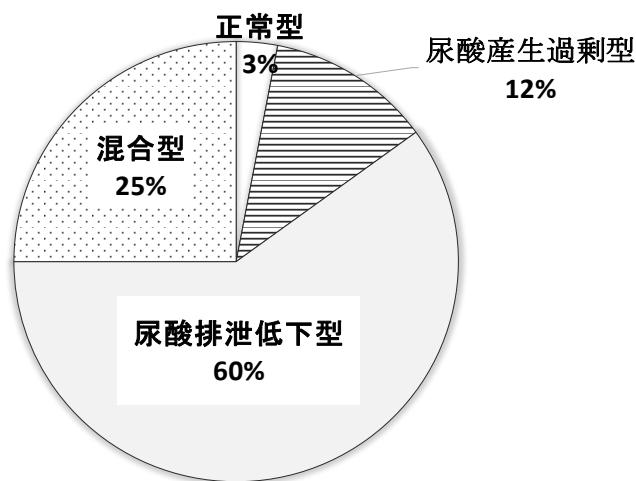


図 1 高尿酸血症患者の病型分類

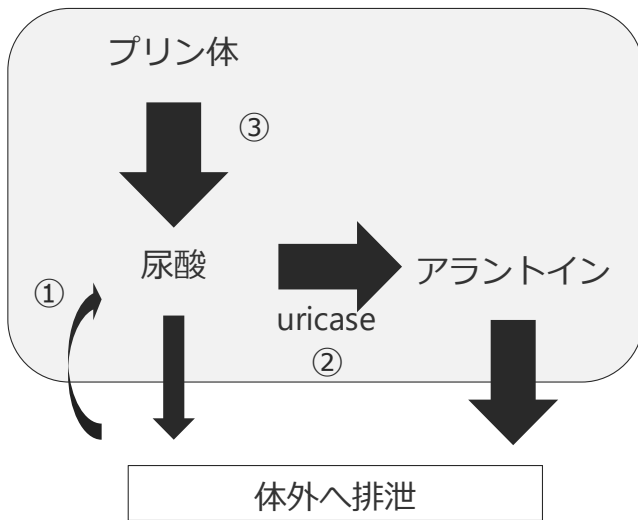
本邦における高尿酸血症患者における病型分類と構成比率を示す (中村, 2003 年)。混合型は尿酸産生過剰型と尿酸排泄低下型を併せ持つ高尿酸血症患者を示し、正常型は尿酸産生過剰型と尿酸排泄低下型のいずれでもない高尿酸血症患者を示す。

第一章 尿酸代謝の種差最小化を指向したラットモデルによる尿酸排泄促進薬の評価

序論

薬効のスクリーニングは汎用性の観点からげっ歯類を用いることが多いが、げっ歯類とヒトの間で尿酸代謝の種差が大きいため（図 2）、尿酸排泄促進薬の効果を適切に評価できるげっ歯類モデルはほとんど報告されていない。1 つ目の要因は、尿中尿酸排泄率（FE_{UA}）がヒトでは 10% 未満（再吸収優位）に対して（宇治、1994 年）、げっ歯類は 30–50% であり（Dan T, 1989）、げっ歯類では尿酸再吸収の寄与が小さいことに起因する。2 つ目の要因は、尿酸をアラントインに代謝する酵素である uricase がヒトでは欠損していることに起因する（Friedman TB, 1985）。3 つ目の要因は、げっ歯類のプリン代謝回転速度がヒトに比べて速く、ラットの体重当たりの尿中プリン体代謝産物量はヒトに比べて 36.6 倍であることに起因する（Shimo T, 2009）。これらの結果、血中尿酸値はヒトでは 4–6 mg/dl であるのに対し、げっ歯類では 0.3–0.6 mg/dl 未満であり（Sato S, 1991）、げっ歯類ではわずかな血中尿酸値の変化を捉えにくい状態になっていると考えられる。そこで、これらの種差の要因を改善した 3 種のラットモデルを検討し、尿酸排泄促進薬の効果を適切に評価でき、かつ臨床効果の予見性の高いモデルを選択した。第一節では Pyrazinamide を処置して尿酸再吸収の寄与をあげること、第二節では Oxonate を処置して uricase を阻害すること、第三節では Topiroxostat を処置してプリン代謝回転を抑制することで、尿酸排泄促進薬の効果を評価できるか否かを検討した。

<げっ歯類>



<ヒト>

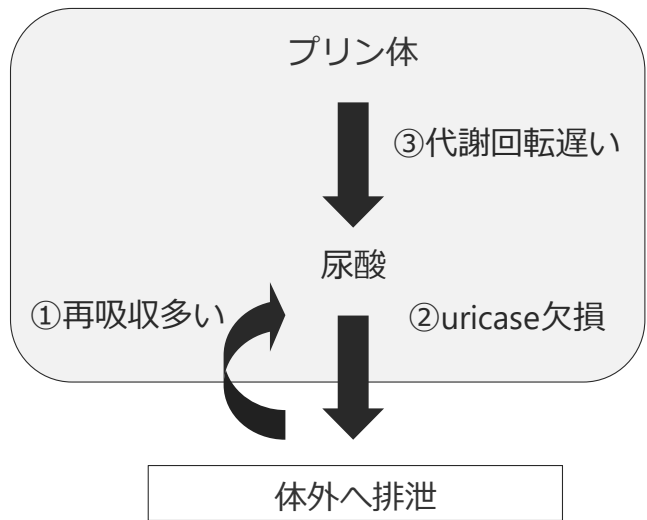


図2 げっ歯類とヒトの尿酸代謝の種差

げっ歯類とヒトの尿酸代謝の種差の要因を模式図で示した。①ヒトはげっ歯類に比べて尿中尿酸排泄率が低く、尿酸再吸収の寄与が大きい。②ヒトは uricase を欠損しているため、プリン体は尿酸として体外に排泄される。③ヒトはげっ歯類に比べてプリン代謝回転が遅いため、尿酸の生成量は少ない。

第一節 Pyrazinamide 処置ラットを用いた尿酸排泄促進薬の評価

序

尿中尿酸排泄率 (FE_{UA}) はヒトでは 10% 未満 (再吸収優位) に対して (宇治, 1994 年)、げっ歯類は 30–50% である (Dan T, 1989)。この一因として、ヒトとラットにおける URAT1 の遺伝子相同性が 74% と低く、ラット URAT1 はヒト URAT1 と比べて尿酸との親和性が 7 倍低いことがあげられる (Tan PK, 2017)。げっ歯類で尿酸再吸収の寄与が小さいことが、尿酸排泄促進薬の評価を難しくしていると考えた。

Pyrazinamide は抗結核薬として Isoniazide や Rifampicin と併用される薬剤であるが、副作用として 43–100% の患者で高尿酸血症が起こることが報告されている (Gerdan V, 2013)。この要因として Pyrazinamide の代謝物である Pyrazinecarboxylic acid (PZA) が尿酸再吸収トランスポーターである URAT1 の交換基質となり尿酸再吸収を促進すること、尿酸分泌トランスポーターである organic anion transporter 1 (OAT1) の輸送を阻害することが *in vitro* で報告されている (Iwanaga T, 2007; Ichida K, 2003)。そこで、ラットに Pyrazinamide を処置して尿酸再吸収を促進したモデルとなるか否かを検討した。さらに、本モデルを用いて既存の尿酸排泄促進薬である Probenecid 及び尿酸排泄促進薬の候補化合物である Dotinurad の評価を試みた。

材料・方法

実験動物

日本エスエルシー (Shizuoka, Japan) から雄性 Slc:Wistar/ST ラットの 6 週齢を入手し、7–9 週齢で試験に供した。動物はブラケットケージで飼育し、飼料は日本クレア (Tokyo, Japan) の CE-2 を使用し、水は自由摂取させた。飼育室の室温及び湿度はそれぞれ $22 \pm 4^\circ\text{C}$ 及び $60 \pm 20\%$ 、明暗サイクルは 12 時間に設定した。

動物実験は富士薬品第二研究所の動物実験委員会で承認されており (2009 年 3 月 23 日、2017 年 2 月 3 日)、「第二研究所における実験動物を用いた実験の実施に関する規定」に従って実施した。

被験物質

Dotinurad は富士薬品 (Saitama, Japan) で合成されたものを使用した。Probenecid は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) から入手した。構造式を図 3 に示した。

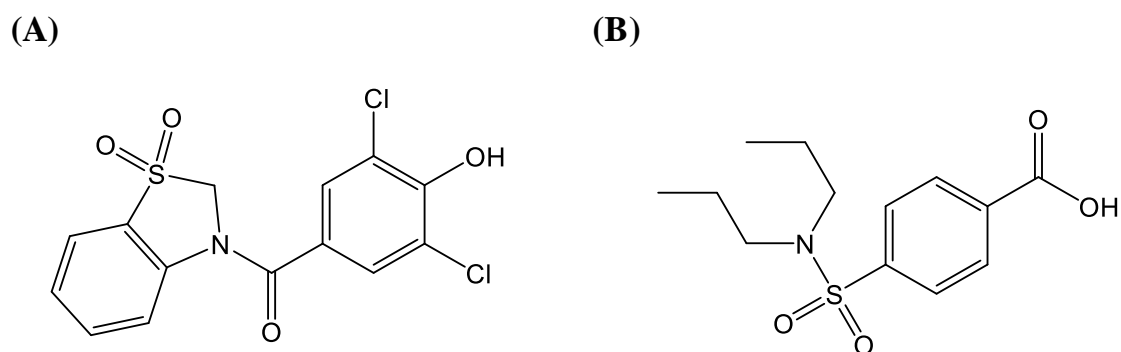


図3 Dotinurad (A) 及びProbenecid (B) の構造式

試薬

Pyrazinamide、尿酸及び 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) は Sigma-Aldrich から入手した。Methanol (HPLC grade)、disodium hydrogen phosphate 12-hydrate、phosphoric acid、acetic acid、D-mannitol、tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris)、sodium sulfate anhydrate 及び hydrochloric acid はキシダ化学 (Osaka, Japan) から入手した。Albumin standard (2 mg/ml BSA) 及び Coomassie plus protein assay reagent は Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA) から入手した。Pyrazinecarboxylic acid (PZA)、10×DPBS (-)、methylcellulose 400cp 及び potassium gluconate は和光純薬工業 (Osaka, Japan) から入手した。ノボ・ヘパリン注は持田製薬 (Tokyo, Japan) から入手した。Acetonitrile (HPLC grade) は関東化学 (Tokyo, Japan) から入手した。Ethylene glycol tetraacetic acid disodium salt (EGTA · 2Na)、及び dimethyl sulfoxide (DMSO) は同仁化学 (Kumamoto, Japan) から入手した。Protease inhibitor cocktail set III は Calbiochem (San Diego, CA) から入手した。

動物実験モデル、被験物質投与、試料採取

動物実験の試験デザインを図 4 に示した。正常ラット又は Pyrazinamide 処置ラットにおける尿酸排泄促進薬の評価(図 4A 又は 4B)では、ラットを約 16 時間絶食させた後、0.5% (w/v) methylcellulose

血漿及び尿中の尿酸及びクレアチニンの測定

尿酸及びクレアチニンは LSI メディエンス (Tokyo, Japan) のイアトロ LQ UAII (uricase 法) 及び和光純薬工業の L-タイプワコー-CRE-M (creatininase 法) を用いて測定した。すなわち、日立ハイテクノロジーズ (Tokyo, Japan) の紫外可視吸光度計 U-3000 で、主波長 600 nm/副波長 700 nm の吸光度を測定した。検量線より血漿中尿酸値 (P_{UA})、尿中尿酸値 (U_{UA})、血漿中クレアチニン値 (P_{CRE}) 及び尿中クレアチニン値 (U_{UA}) を算出した。さらに、尿中尿酸/クレアチニン (U_{UA}/U_{CRE}) 及び尿中尿酸排泄率 (FE_{UA} 、次式) を算出し、尿酸排泄促進作用の指標とした。 $FE_{UA} (\%) = (U_{UA}/P_{UA}) / (U_{CRE}/P_{CRE}) \times 100$ 。

尿中 PZA の測定

尿中 PZA は methanol で除蛋白した試料を Waters (Milford, MA) の Alliance high-performance liquid chromatography (Alliance HPLC) で測定した。カラムは Mightysil RP-18 Aqua GP 250-4.6mm (5 μ m)、移動相は 0.5% (v/v) acetic acid を用い、流速 1 ml/min、カラム温度 40 $^{\circ}$ C、波長 268 nm で測定した。検量線から尿中 PZA 濃度 (U_{PZA}) を算出し、尿中 PZA/クレアチニン (U_{PZA}/U_{CRE}) を算出した。

腎刷子縁膜小胞を用いた尿酸の取り込みの測定

腎刷子縁膜小胞 (brush-border membrane vesicle, BBMV) は Biber らの方法に従って調製した (Biber J, 1981)。すなわち、ラットを約 16 時間絶食させた後、放血致死させて腎皮質を採取した。19 倍量の 300 mmol/l D-mannitol 及び 5 mmol/l EGTA を含む 12 mmol/l Tris-HCl buffer (pH7.4) 並びに 1/20 量の Protease inhibitor cocktail set III を加え、ホモジナイザーで破碎した。破碎液に magnesium chloride を最終濃度 12 mmol/l となるように添加し、氷上で 15 分間インキュベートした。4 $^{\circ}$ C、2000 \times g で 15 分間遠心分離し、上清をさらに 4 $^{\circ}$ C、23000 \times g で 30 分間遠心分離した。沈査に 12 mmol/l magnesium chloride、300 mmol/l D-Mannitol 及び 5 mmol/l EGTA を含む 12 mmol/l Tris-HCl buffer (pH7.4) を加え、ホモジナイザーで破碎し、氷上で 15 分間インキュベートした。4 $^{\circ}$ C、2000 \times g で 15 分間遠心分離し、上清をさらに 4 $^{\circ}$ C、23000 \times g で 30 分間遠心分離した。沈査に Assay buffer

(100 mmol/l potassium gluconate、100 mmol/l D-mannitol、20 mmol/l HEPES-Tris pH7.4) を加え、ホモジナイザーで破碎後、4°C、23000 ×g で 30 分間遠心分離した。沈査に Assay buffer を加え、ホモジナイザーで破碎した。破碎液を 2 つに分け、片方に PZA を最終濃度 5 mmol/l となるように添加した。PZA 非添加及び添加の破碎液を 25°C で 1 時間インキュベート後、4°C、23000 ×g で 30 分間遠心分離した。PZA 非添加の沈査に Assay buffer を、PZA 添加の沈査に 5 mmol/l PZA を含む Assay buffer を適量加えて懸濁し、それぞれ蛋白質濃度を測定した。蛋白質濃度の測定は Coomassie plus protein assay reagent 3 ml に試料を 100 µl 加えて 10 分間インキュベートし、島津製作所 (Kyoto, Japan) の紫外可視分光光度計 UV-2200 で 595 nm の吸光度を測定した。Albumin standard を用いて作製した検量線より試料中の蛋白質濃度を算出した。PZA 非添加の懸濁液に Assay buffer を加えて 3 mg/ml としたものを BBMV (-PZA)、PZA 添加の懸濁液に 5 mmol/l PZA を含む Assay buffer を加えて 3 mg/ml としたものを BBMV (+PZA) とした。

尿酸取り込みは Roch-Ramel らの方法に従って評価した (Roch-Ramel, 1997)。すなわち、100, 300, 1000 µmol/l の尿酸を含む Assay buffer に BBMV (-PZA) 又は BBMV (+PZA) を最終濃度 0.5 mg/ml となるように加え、25°C で 20 秒間インキュベートした。インキュベート後、氷冷した 1 mmol/l Probenecid、300 mmol/l D-mannitol、60 mmol/l sodium sulfate を含む 5 mmol/l Tris-sulfate buffer (pH7.4) を加えて反応を停止させた。BBMV をニトロセルロースフィルターで回収し、acetonitrile を 300 µl 加えてフィルターを溶解させた。さらに、水を等量加えて 4°C、18,000 ×g で遠心分離した。上清を遠心エバポレーターで乾固し、等量の 1×DPBS(-) phosphate buffer で再溶解した。4°C、18,000 ×g で遠心分離した上清を Alliance HPLC で測定し、検量線より尿酸濃度を算出した。カラムは Mightysil RP-18 Aqua GP 250-4.6mm (5µm)、移動相は 74 mmol/l phosphate buffer (pH2.2) を用い、流速 1 ml/min、カラム温度 30°C、波長 284 nm で測定した。さらに、蛋白質量 (mg) あたりの尿酸取り込み量を算出した。

被験物質による阻害の評価は、300 µmol/l の尿酸を含む Assay buffer に DMSO で溶解した被験物質 (DMSO の最終濃度 0.5%) 及び BBMV (+PZA) を最終濃度 0.5 mg/ml となるように加え、25°C で 20 秒間インキュベートした。以降の操作は上記の通りに実施した。媒体である DMSO を添加した時の尿酸取り込みを 100% とし、被験物質による阻害率を算出した。

統計解析

試験より得られたデータの集計は Microsoft (Redmond, WA) の Microsoft Excel を用いた。統計解析は SAS institute (Cary, NC) の JMP を用い、試験 1 における無処置群と被験物質群との差を Student's *t*-test ($P < 0.05$ 又は 0.01)、その他の Control 群と被験物質群との差を Dunnett's test ($P < 0.05$ 又は 0.01) で評価した。

結果

1. 正常ラット及び Pyrazinamide 処置ラットを用いた Probenecid の評価

Pyrazinamide 処置により尿酸の再吸収が増加するか否かを検討した。次に、正常ラット及び Pyrazinamide 処置ラットを用いて、既存薬である Probenecid の尿酸排泄促進作用を比較した。

正常ラット及び Pyrazinamide 処置ラットに媒体である 0.5%MC 又は Probenecid (30 及び 100 mg/kg) を経口投与して尿酸排泄促進作用を評価した (表 1)。Pyrazinamide 処置ラットの尿中尿酸排泄率 (FE_{UA}) は 23.0% であり、正常ラット (27.7%) と比べて低下傾向を示した。また、Pyrazinamide 処置ラットの血漿中尿酸値 (P_{UA}) は 0.663 mg/dl であり、正常ラット (0.483 mg/dl) と比べて増加した。

正常ラットでは Probenecid (100 mg/kg) の影響はみられなかった。一方、Pyrazinamide 処置ラットでは Probenecid (100 mg/kg) は尿酸排泄促進作用を示し、 U_{UA}/U_{CRE} は 75% 増加 ($P < 0.01$) し、 FE_{UA} は 41% の増加傾向がみられた。また、血漿中尿酸値は Probenecid (100 mg/kg) により増加傾向であった。

表 1 正常ラット及び Pyrazinamide 処置ラットを用いた Probenecid の尿酸排泄促進作用

Group	Pyrazinamide (mg/kg)	Probenecid (mg/kg)	P _{UA} (mg/dl)	U _{UA} /U _{CRE}	FE _{UA} (%)
1	-	-	0.483 ± 0.092	0.98 ± 0.11	27.7 ± 3.6
2	-	100	0.525 ± 0.096	1.05 ± 0.11	30.6 ± 8.8
3	400	-	0.663 ± 0.077	1.29 ± 0.09	23.0 ± 4.1
4	400	30	0.695 ± 0.025	1.37 ± 0.21	24.1 ± 4.9
5	400	100	0.715 ± 0.062	2.26 ± 0.50**	32.5 ± 5.1

P_{UA} ; 血漿中尿酸値、U_{UA} ; 尿中尿酸値、U_{CRE} ; 尿中クレアチニン値、FE_{UA} ; 尿中尿酸排泄率

Group 1 及び 2 の試験デザインは図 4A に従い実施し、Group 3、4 及び 5 の試験デザインは図 4B に従い実施した。統計解析は無処置群 (Group 1) と被験物質投与群 (Group 2) について Student's *t*-test を、Pyrazinamide 処置の Control 群 (group 3) と被験物質群 (Group 4 及び 5) について Dunnett's test (**: p<0.01) を実施した。データは平均±SD (n=4) で示した。

2. 正常ラット及び Pyrazinamide 処置ラットを用いた Dotinurad の評価

Probenecid を用いた検討より、Pyrazinamide 処置ラットは尿酸排泄促進作用を評価する有用なモデルと考えられた。そこで、Pyrazinamide 処置ラットを用いて尿酸排泄促進薬の候補化合物である Dotinurad の尿酸排泄促進作用を評価し、正常ラットにおける作用と比較した。

正常ラット及び Pyrazinamide 処置ラットを用いて、Dotinurad (3、10 及び 30 mg/kg) を経口投与して尿酸排泄促進作用を比較した。正常ラットでは Dotinurad による FE_{UA} の増加傾向は認められたものの有意な変化ではなかった (表 2)。

Pyrazinamide 処置ラットでは Dotinurad は用量依存的な尿酸排泄促進作用を示し、U_{UA}/U_{CRE} はそれぞれ 26.2%、55.6% (P<0.01) 及び 67.0% (P<0.01) 増加し、FE_{UA} はそれぞれ 50.5%、70.9% (P<0.05) 及び 77.6% (P<0.05) 増加した (図 5B 及び C)。一方、血漿中尿酸値低下作用は認められなかった (図 5A)。

表 2 正常ラットを用いた Dotinurad の尿酸排泄促進作用

Dotinurad (mg/kg)	P _{UA} (mg/dl)	U _{UA} /U _{CRE}	FE _{UA} (%)
-	0.506 ± 0.134	0.72 ± 0.10	23.9 ± 4.6
3	0.415 ± 0.089	0.79 ± 0.06	28.9 ± 5.0
10	0.319 ± 0.041	0.66 ± 0.05	31.3 ± 4.6
30	0.399 ± 0.065	0.80 ± 0.06	33.5 ± 8.8

P_{UA} ; 血漿中尿酸値、U_{UA} ; 尿中尿酸値、U_{CRE} ; 尿中クレアチニン値、FE_{UA} ; 尿中尿酸排泄率

試験デザインは図 3A に従い実施した。統計解析は 0.5%MC を投与した Control 群と被験物質群について Dunnett's test を実施した。データは平均±SD (n=4) で示した。

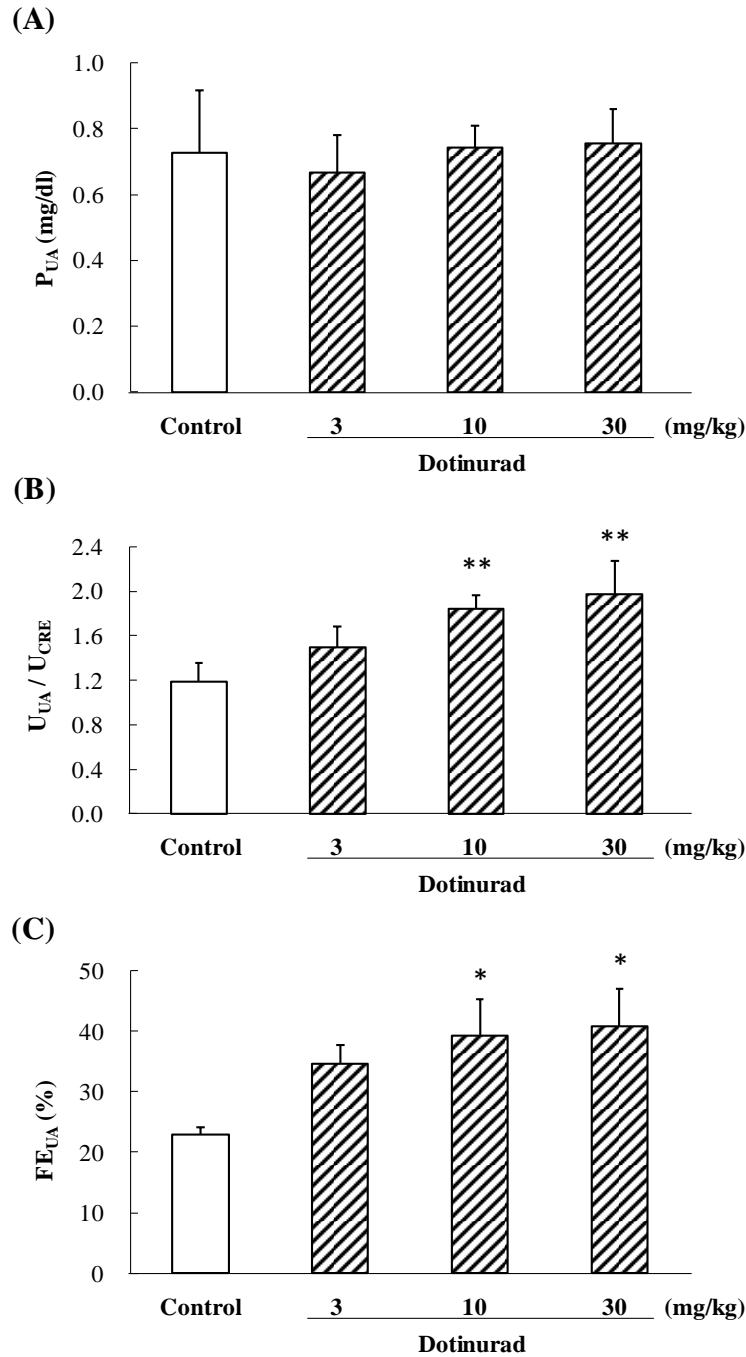


図5 Pyrazinamide 処置ラットを用いた Dotinurad 投与による血漿中尿酸値 (A)、尿中尿酸/クレアチニン (B) 及び尿中尿酸排泄率 (C) の変化

P_{UA} ; 血漿中尿酸値、 U_{UA} ; 尿中尿酸値、 U_{CRE} ; 尿中クレアチニン値、 FE_{UA} ; 尿中尿酸排泄率

試験デザインは図4Bに従い実施した。統計解析は0.5%MCを投与したControl群とDotinurad群との間でDunnett's test

(*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$) を実施した。データは平均±SD (n=3-4) で示した。

3. Pyrazinamide 処置ラットを用いた尿酸排泄促進薬の持続性の評価

既存の尿酸排泄促進薬である Probenecid は 1 日 2-4 回投与が必要である。服薬コンプライアンスの向上を図るためにも、新たな薬剤には 1 日 1-2 回投与を可能とする持続性が求められる。そこで、Probenecid 及び Dotinurad の持続性を評価するために、Pyrazinamide 処置ラットを用いて 0-1、1-2、2-4、4-6 及び 6-8 時間の U_{UA}/U_{CRE} を評価した。また、Pyrazinamide 処置により尿酸再吸収が促進する要因を検討するために、 U_{PZA}/U_{CRE} を評価して尿酸との関係を調べた。

Pyrazinamide 処置ラットに Probenecid (100 mg/kg) 又は Dotinurad (10 mg/kg) を経口投与して尿酸排泄促進作用の持続性を評価した (図 6)。Probenecid 及び Dotinurad はいずれも U_{UA}/U_{CRE} を増加させ、1-2 時間で最大の効果を示し、それぞれ 92.9% ($P<0.05$) 及び 70.1% ($P<0.01$) であった。さらに、Dotinurad は 6-8 時間においても 53.3% の増加 ($P<0.01$) がみられ、Probenecid と比べて持続的な効果であった。

さらに、同じ尿試料を用いて U_{PZA}/U_{CRE} を評価した (図 7)。Probenecid (100 mg/kg) 及び Dotinurad (10 mg/kg) により U_{PZA}/U_{CRE} の低下がみられた。さらに、Dotinurad は 6-8 時間においても 43.4% の低下 ($P<0.01$) がみられ、Probenecid と比べて持続的な効果であった。尿酸排泄促進薬による尿中 PZA の減少は尿中尿酸の増加と逆の方向に動いていることから、URAT1 を介して PZA が尿酸と交換輸送していると考えられた。

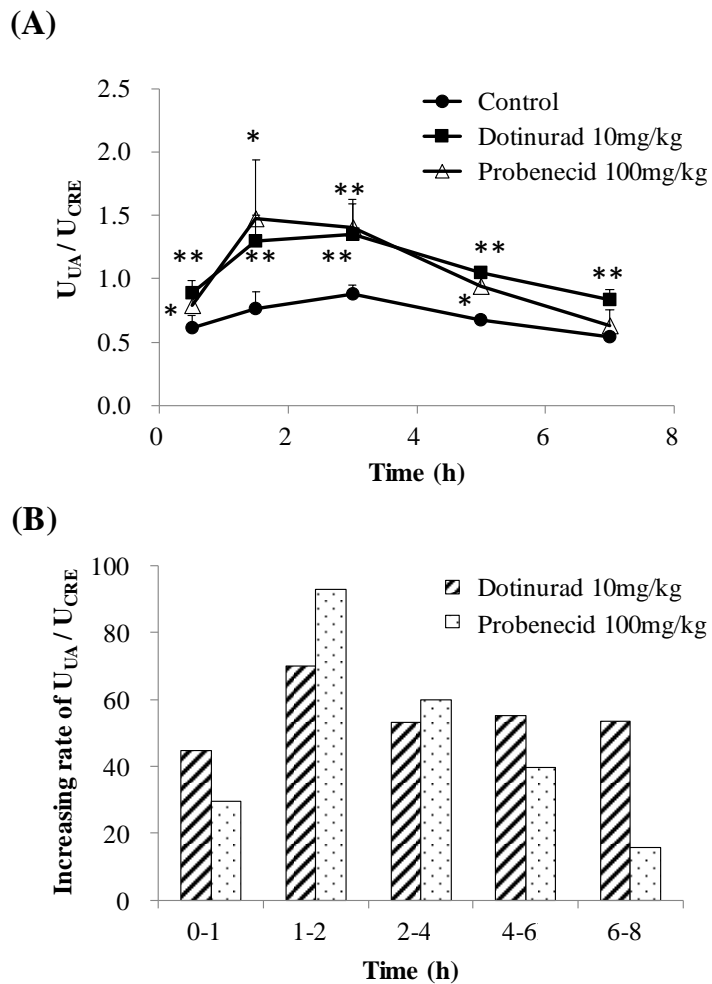


図6 Pyrazinamide 処置ラットにおける Probenecid 及び Dotinurad 投与による尿中尿酸／クレアチニンの推移 (A) 及び増加率 (B) の変化

U_{UA} ; 尿中尿酸値、U_{CRE} ; 尿中クレアチニン値

試験デザインは図 4C に従い実施した。A : 0-1、1-2、2-4、4-6、6-8 時間において採尿した尿中の U_{UA}/U_{CRE} を採尿の中間時点 (それぞれ 0.5、1.5、3、5、7 時間) の値として経時推移を示した。B : 被験物質群における Control 群からの U_{UA}/U_{CRE} 増加率を示した。統計解析は 0.5%MC を投与した Control 群と被験物質群との間で各時点の U_{UA}/U_{CRE} について Dunnett's test (*: p<0.05, **: p<0.01) を実施した。データは平均±SD (n=4) で示した。

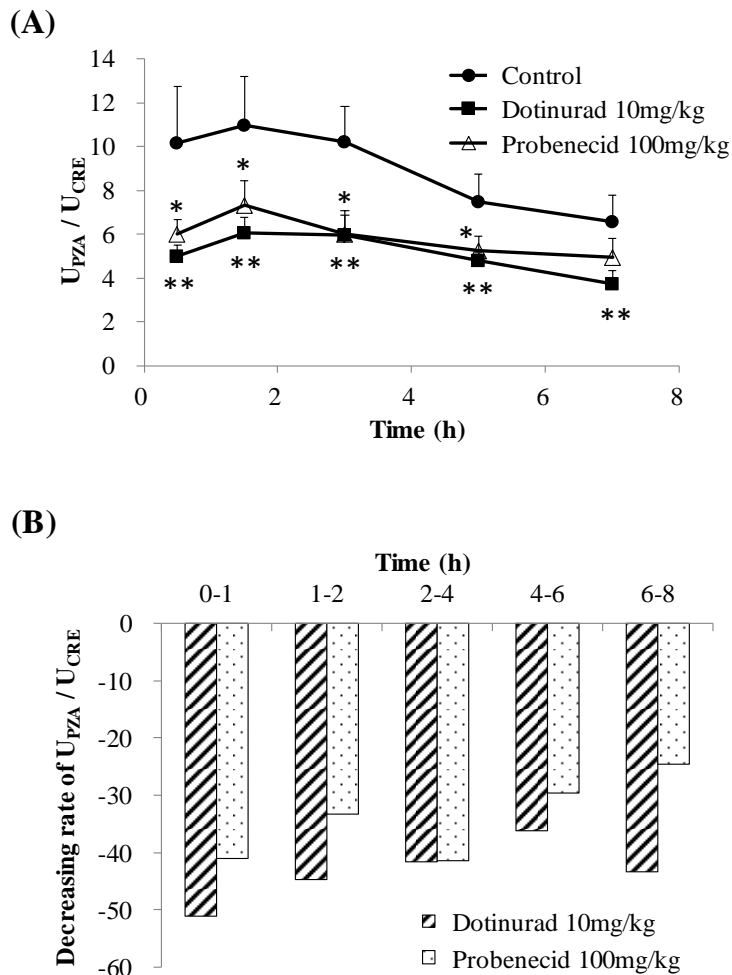


図7 Pyrazinamide 処置ラットにおける Probenecid 及び Dotinurad 投与による尿中 PZA/クレアチニンの推移 (A) 及び減少率 (B) の変化

UPZA ; 尿中 Pyrazinecarboxylic acid 濃度、UCRE ; 尿中クレアチニン値

試験デザインは図 4C に従い実施した。A : 0-1、1-2、2-4、4-6、6-8 時間において採尿した尿中の UPZA/UCRE を採尿の中間時点 (それぞれ 0.5、1.5、3、5、7 時間) の値として経時推移を示した。B : 被験物質群における Control 群からの UPZA/UCRE 減少率を示した。統計解析は 0.5%MC を投与した Control 群と被験物質群との間で各時点の UPZA/UCRE について Dunnett's test (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$) を実施した。データは平均 \pm SD (n=4) で示した。

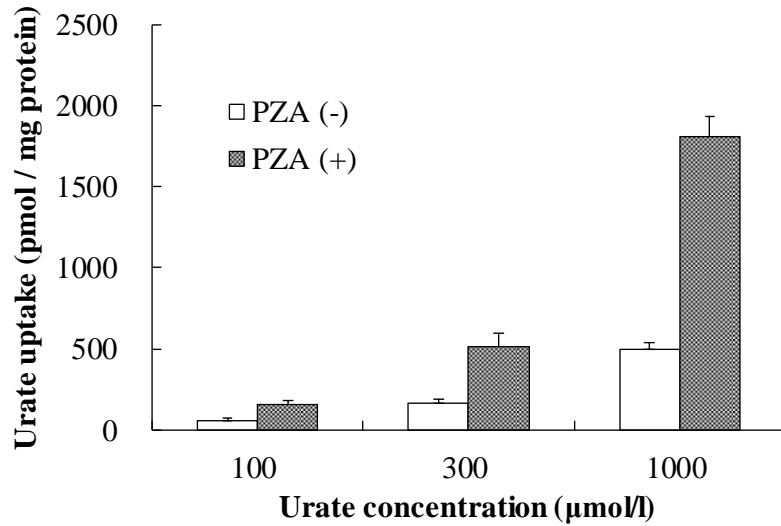
4. ラット腎刷子縁膜小胞を用いた尿酸排泄促進薬の評価

Pyrazinamide 処置ラットを用いた尿酸排泄促進薬の持続性の評価で、尿中尿酸の増加と尿中 PZA の減少がみられた。この反対の動きは URAT1 を介した尿酸と PZA の交換輸送によるものであると考えられた。URAT1 は腎臓の近位尿細管管腔側（刷子縁膜側）に発現しているため、ラット腎皮質から刷子縁膜小胞（BBMV）を調製し、尿酸の取り込みを評価した。BBMV による尿酸の取り込みは再吸収を評価していることになる。BBMV (-PZA) 及び BBMV (+PZA) を用いて、尿酸取り込みに対する PZA の影響を調べた。さらに、BBMV (+PZA) を用いて尿酸取り込みに対する Probenecid 及び Dotinurad の影響を評価し、Pyrazinamide 処置ラットにおける効力比の要因について考察した。

BBMV の尿酸取り込みはいずれの尿酸濃度においても PZA 添加により増加（2.7–3.6 倍）しており、尿酸と PZA が交換輸送することが示された（図 8A）。

BBMV (+PZA) を用いた検討で、Probenecid 及び Dotinurad は濃度依存的な尿酸取り込み阻害を示し、IC₅₀ 値はそれぞれ 1431 及び 3.6 µmol/l であった（図 8B）。Dotinurad は Probenecid よりも 398 倍強く尿酸取り込みを阻害していることが示された。

(A)



(B)

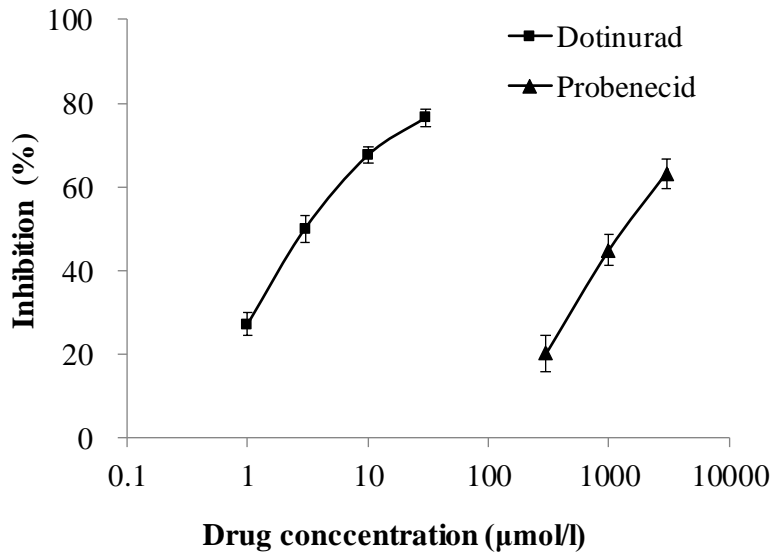


図8 ラット腎刷子縁膜小胞の尿酸取り込みに対する PZA 添加の影響 (A) 並びに Probenecid 及び Dotinurad の濃度阻害曲線 (B)

PZA ; Pyrazinecarboxylic acid、BBMV ; 刷子縁膜小胞

(A) BBMV (-PZA) 及び BBMV (+PZA) を用いて、尿酸取り込みを比較した。Assay buffer 中の尿酸濃度は 100、300 及び 1000 μmol/l の 3 点で評価した。(B) BBMV (+PZA) を用いて、尿酸取り込みに対する被験物質の阻害を評価した。Assay buffer 中の尿酸濃度は 300 μmol/l で評価した。BBMV をフィルターで回収し、アセトニトリルを添加して尿酸を抽出した。抽出液中の尿酸濃度を Alliance HPLC で測定した。データは平均±SD (n=3) で示した。

考察

Pyrazinamide 処置ラットは正常ラットと比べて FE_{UA} が低下しており、尿酸再吸収が促進したモデルであることが示唆された。正常ラットでは Probenecid (100 mg/kg) による尿酸排泄促進作用はみられなかったが、Pyrazinamide 処置ラットでは Probenecid (100 mg/kg) で有意な尿酸排泄促進作用が認められたことから、尿酸再吸収を促進したことで尿酸排泄促進薬の効果がより低用量で発現すると考えられた。なお、Pyrazinamide 処置ラットで正常ラットに対して血漿中尿酸値の増加がみられた。一方、Probenecid による血漿中尿酸値の低下はみられなかった (表 1)。この要因としては PZA が尿酸分泌トランスポーターである OAT1 の基質となり、高濃度では他の基質の輸送を阻害することが *in vitro* で報告されていることから (Ichida K, 2003)、Pyrazinamide 処置ラットでみられた血漿中尿酸値の増加は OAT1 阻害による尿酸分泌の抑制により引き起こされている可能性が考えられた (図 9)。

Pyrazinamide 処置ラットで Dotinurad は 10 mg/kg から有意な尿酸排泄促進作用が認められており、Probenecid に比べて 1/10 の用量で効果を示す強力な薬剤であることが示された。さらに、Dotinurad の結果から、Pyrazinamide 処置ラットは正常ラットに比し 1/10 の用量で効果を示す高感度なモデルであることが明らかとなった。一方、本モデルでは Probenecid 及び Dotinurad による血漿中尿酸値の低下は認められなかった。尿酸排泄促進薬による血漿中尿酸値の低下を捉えにくい要因として、uricase により尿酸がすぐに代謝されるために血漿中尿酸値が低値であること、又はプリン代謝回転が速いために尿酸がすぐに補充されることが考えられ、それぞれ第二節及び第三節で検討することとした。

Pyrazinamide 処置ラットにおいて Probenecid (100 mg/kg) 及び Dotinurad (10 mg/kg) の持続的な尿酸排泄促進作用を評価した (図 6)。Dotinurad は 6–8 時間まで尿酸排泄促進作用を示したことから、Probenecid に比べて持続性に優れた薬剤であることが示された。また、 U_{UA}/U_{CRE} の増加は U_{PZA}/U_{CRE} の低下と逆の方向に動いていることから (図 7)、尿酸と PZA が交換輸送しており、尿酸排泄促進薬はこの交換輸送を阻害していると考えられた。

ラットの腎皮質から調製した BBMV を用いた検討から、PZA を交換基質とした尿酸の取り込み (再吸収) が尿酸排泄促進薬の作用点であることが示された (図 8)。Iwanaga らの報告によると

URAT1 を過剰発現させたアフリカツメガエル卵母細胞で PZA が尿酸の交換基質として働くことから (Iwanaga T, 2007)、Pyrazinamide 処置ラットにおける尿酸排泄促進薬の作用点は URAT1 と考えられた。BBMV (+PZA) の尿酸取り込みに対する Dotinurad の IC₅₀ は 3.6 μmol/l であり、Probenecid に比べて 398 倍低濃度であることが、Pyrazinamide 処置ラットにおける Dotinurad の強力な薬効を裏付けていると考えられた。

以上より、Pyrazinamide 処置ラットは PZA を交換基質として尿酸再吸収を促進する点で、よりヒトに近づいたモデルであることが示された。本モデルは正常ラットに比べて 1/10 用量で尿酸排泄促進薬の尿酸排泄促進作用を評価できる点で有用であると考えられたが、血中尿酸値低下作用はみられておらず、さらなる改良が必要と考えられた。

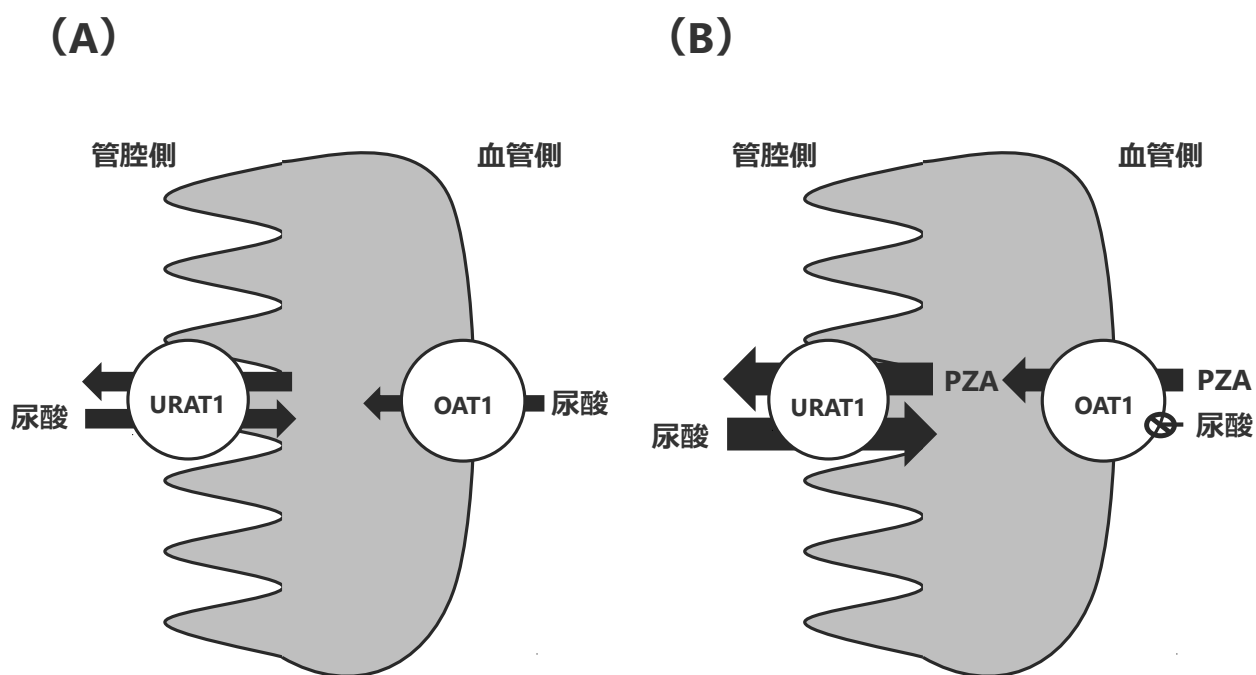


図9 正常ラット (A) 及びPyrazinamide 処置ラット (B) における尿酸及びPZAの近位尿細管細胞における動態

PZA : Pyrazinecarboxylic acid

A : 正常ラットでは URAT1 の交換基質が少なく、尿酸の再吸収が少ない。また、尿酸は OAT1 の基質となり、近位尿細管細胞内に取り込まれる。B : Pyrazinamide 処置ラットでは近位尿細管細胞内に URAT1 の交換基質である PZA が豊富に存在するため、尿酸の再吸収が多い。また、PZA は OAT1 の基質となり細胞内に取り込まれるため、OAT1 により細胞内に取り込まれる尿酸は減少する。矢印の太さは輸送量の大きさを示した。

第二節 Oxonate 処置ラットを用いた尿酸排泄促進薬の評価

序

ヒトにおけるプリン代謝の最終産物は尿酸であるが、げっ歯類を含めたその他の哺乳類は uricase を発現しているため、尿酸はアラントインに代謝されて排泄される (Friedman TB, 1985)。げっ歯類では uricase の働きで血中尿酸値が低値であることが、尿酸排泄促進薬の評価を難しくしていると考えた。

Oxonate は uricase を阻害することが知られている試薬であり、げっ歯類において血漿中尿酸値を 3 mg/dl 程度まで増加させることができる。Oxonate 処置ラットは uricase が欠損しているヒトに近いモデルとして尿酸生成抑制薬のスクリーニング系として汎用されている。しかし、尿酸排泄促進薬の評価に使用されている報告はほとんどみられない。そこで、oxonate を処置して血中尿酸値を増加させたラットを用いて既存の尿酸排泄促進薬である Probenecid 及び尿酸排泄促進薬の候補化合物である Dotinurad 及び F12859 の評価を試みた。

材料・方法

実験動物

日本エスエルシーから雄性 Slc:Wistar/ST ラットの 6 週齢を入手し、7 週齢で試験に供した。動物はブラケットケージで飼育し、飼料は日本クレアの CE-2 を使用し、水は自由摂取させた。飼育室の室温及び湿度はそれぞれ $22 \pm 4^{\circ}\text{C}$ 及び $60 \pm 20\%$ 、明暗サイクルは 12 時間に設定した。

動物実験は富士薬品第二研究所の動物実験委員会で承認されており (2014 年 11 月 10 日)、動物の使用は「第二研究所における実験動物を用いた実験の実施に関する規定」に従って実施した。

被験物質

Dotinurad 及び F12859 (フェノール誘導体、構造非開示) は富士薬品で合成されたものを使用した。Probenecid は Sigma-Aldrich から入手した。

試薬

Potassium oxonate 及び尿酸は Sigma-Aldrich から入手した。Disodium hydrogen phosphate 12-hydrate、phosphoric、perchloric acid 及び Tris はキシダ化学から入手した。Methylcellulose 400 及び uricase (from yeast) は和光純薬工業から入手した。生理食塩液は大塚製薬工場 (Tokushima, Japan) から入手した。ノボ・ヘパリン注は持田製薬から入手した。

動物実験モデル、被験物質投与、試料採取

動物実験の試験デザインを図 10 に示した。ラットを約 16 時間絶食させた後、0.5% (w/v) MC-生理食塩液で懸濁した potassium oxonate 250 mg/kg を皮下投与し、その 1 時間後に 0.5%MC 又は 0.5%MC で懸濁した被験物質を経口投与した。Potassium oxonate の投与用量は文献報告を参考に設定した (Yonetani Y, 1980)。被験物質投与 1 時間後から 1 時間、ステンレス尿受けで採尿した。採尿後に眼窩静脈叢から約 500 μ l 採血し、ヘパリン入りのチューブに加えて氷上で保管した。血液は 4°C、700 \times g で 10 分間遠心分離して血漿とした。

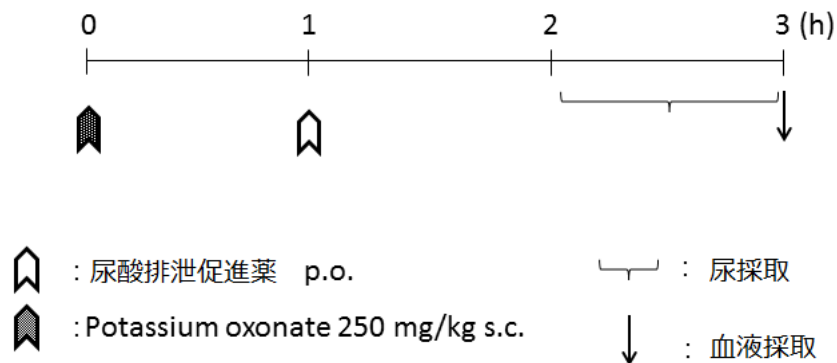


図 10 動物試験デザイン II

第二節で用いた動物試験デザインを示した。Oxonate 処置ラットを用いた尿酸排泄促進薬の評価。

血漿及び尿中の尿酸及びクレアチニンの測定

尿酸は 0.3 mol/l perchloric acid で除蛋白した後、0.2 mol/l disodium hydrogenphosphate 水溶液を等量加えた試料を Alliance HPLC で測定した。検量線より血漿中尿酸値 (P_{UA}) 及び尿中尿酸値 (U_{UA}) を算出した。カラムは Mightysil RP-18 Aqua GP 250-4.6mm (5 μ m)、移動相は 74 mmol/l phosphate

buffer (pH2.2) を用い、流速 1 ml/min、カラム温度 30°C、波長 284 nm で測定した。

クレアチニンは第一節と同様に測定した。さらに、尿中尿酸排泄率 (FE_{UA}) を次式により算出し、尿酸排泄促進作用の指標とした。FE_{UA} (%) = (U_{UA}/P_{UA}) / (U_{CRE}/P_{CRE}) × 100。

Uricase 活性の測定

25 μmol/l の尿酸を含む 50 mmol/l tris-HCl buffer (pH8.0) を 25°C で 5 分間プレインキュベートし、uricase を最終濃度 16.7 mU/ml となるように添加した。紫外可視吸光度計 U-3000 で 25°C、292 nm の吸光度を測定し、2 分間の吸光度変化から uricase 活性を求めた。DMSO で溶解した被験物質を最終濃度 1% となるように添加し、媒体添加時の活性を 100% として被験物質の阻害率を算出した。試験は n=3 で実施した。

統計解析

試験より得られたデータの集計は Microsoft Excel を用いた。統計解析は SAS institute (Cary, NC) の JMP を用い、Oxonate 処置の Control 群と被験物質群との差を Dunnett's test (P<0.05 又は 0.01) で評価した。

結果

1. Uricase 活性に対する尿酸排泄促進薬の影響

Uricase 活性を強く阻害する薬剤は血漿中尿酸値増加作用を示すため、Probenecid、Dotinurad 及び F12859 について uricase 活性を阻害するか否かを検討し、血漿中尿酸値に変化を及ぼす可能性を調べた。

Uricase 活性に対する Probenecid、Dotinurad 及び F12859 の 100 μmol/l における阻害はそれぞれ 3.8%、5.0% 及び 6.4% であり、いずれの被験物質も阻害は認められなかった。

2. Oxonate 処置ラットを用いた尿酸排泄促進薬の評価

Oxonate 処置による血漿中尿酸値の増加を確認した。次に、Oxonate 処置ラットを用いて

Probenecid、Dotinurad 及び F12859 の尿酸排泄促進作用を評価した。

Oxonate 処置により血漿中尿酸値は 0.82 mg/dl から 3.04 mg/dl に増加した (図 11A)。また、FE_{UA} は 32.5% から 62.1% に増加した (図 11B)。本モデルで Dotinurad (30、100 mg/kg) 及び F12859 (30、100 mg/kg) の影響はみられなかった。Probenecid (600 mg/kg) では血漿中尿酸値の増加が認められた。

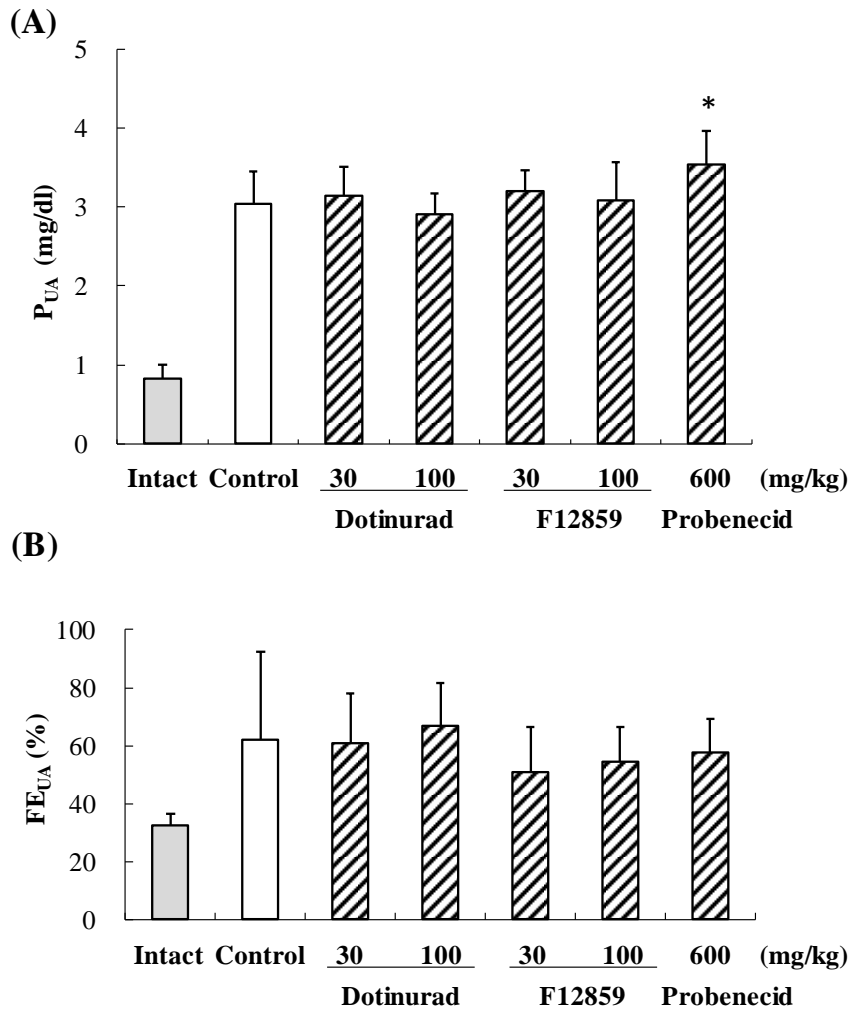


図 11 Oxonate 処置ラットを用いた尿酸排泄促進薬投与による血漿中尿酸値 (A) 及び尿中尿酸排泄率 (B) の変化

P_{UA} ; 血漿中尿酸値、FE_{UA} ; 尿中尿酸排泄率

試験デザインは図 10 に従い実施した。統計解析は Oxonate 処置の Control 群と被験物質投与群について Dunnett's test

(*: p<0.05) を実施した。データは平均±SD (n=5-6) で示した。

考察

Oxonate 処置で uricase が阻害され、想定通り血漿中尿酸値の増加がみられたものの、各種尿酸排泄促進薬の血漿中尿酸値低下作用はみられなかった。反対に、Probenecid による血漿中尿酸値の増加が認められた。我々の検討と同様に、Oxonate を処置したラットに Probenecid を投与した時、血漿中尿酸値が増加したと報告されている (Yonetani Y, 1980)。これは、Probenecid の非特異的な OATs (特に OAT1/3) 阻害により、尿酸の近位尿細管細胞内への取り込みが抑制された結果であると推察された。Oxonate 処置自体で尿酸排泄促進作用の指標である FE_{UA} を 32.5% から 62.1% に増加させたため、尿酸排泄促進薬の効果がマスクされていると考えられた。この理由として 2 つの仮説が立てられる。1 つ目は、oxonate が uricase 阻害作用以外に尿酸排泄促進作用を持つ可能性である。Oxonate は尿酸と構造類似性がある有機アニオンであることから、トランスポーターを介した尿酸輸送に影響を与える可能性が考えられる。2 つ目は、oxonate 処置により uricase が阻害され、血漿中尿酸値が増加したことで FE_{UA} に変化をもたらした可能性である。前者については *in vitro* の各種尿酸トランスポーターの尿酸輸送に対する oxonate の阻害を評価することにより、後者については uricase ノックアウトマウスを評価することにより検討が可能であるが、現在のところ報告されていない。いずれにしても、oxonate 処置ラットは尿酸排泄促進薬の効果をマスクしてしまうため、スクリーニング系としては不適であると考えられた。ただし、前者の仮説の場合、oxonate と異なる、uricase のみを阻害する新たな試薬が見い出されれば、適切なモデルを作製できる余地がある。

第三節 Topiroxostat 処置ラットを用いた尿酸排泄促進薬の評価

序

げっ歯類のプリン代謝回転速度はヒトに比べて速く、ラットの体重当たりの尿中プリン体代謝産物量はヒトに比べて 36.6 倍である (Shimo T, 2009)。その一因として、ラットの肝臓重量当たりの xanthine oxidase 活性がヒトに比べて 5 倍高いことがあげられる (Parks DA, 1986)。げっ歯類では尿酸の生成が速く、随時補給されていることから、尿酸排泄促進薬の血漿中尿酸値低下作用がマスクされていると考えた。

Topiroxostat は新規尿酸生成抑制薬として 2013 年に日本で上市された薬剤である。Topiroxostat は xanthine oxidase 活性を強力に阻害し、その阻害定数 (Ki) は 5.1 nmol/l である (トピロリック®錠インタビューフォーム、2013 年)。ラットに Topiroxostat を処置し、xanthine oxidase を阻害した結果、プリン代謝回転速度を抑制させたモデルを作製し、既存の尿酸排泄促進薬である Probenecid 及び尿酸排泄促進薬の候補化合物である Dotinurad 及び F12859 の評価を試みた。

材料・方法

実験動物

日本エスエルシーから雄性 Slc:Wistar/ST ラットの 6 週齢を入手し、7-9 週齢で試験に供した。動物はブラケットケージで飼育し、飼料は日本クレアの CE-2 を使用し、水は自由摂取させた。飼育室の室温及び湿度はそれぞれ $22 \pm 4^{\circ}\text{C}$ 及び $60 \pm 20\%$ 、明暗サイクルは 12 時間に設定した。

動物実験は富士薬品第二研究所の動物実験委員会で承認されており (2013 年 5 月 21 日、2013 年 6 月 26 日)、動物の使用は「第二研究所における実験動物を用いた実験の実施に関する規定」に従って実施した。

被験物質

Dotinurad 及び F12859 は富士薬品で合成されたものを使用した。Probenecid は Sigma-Aldrich から入手した。

試薬

Topiroxostat は福寿製薬 (Toyama, Japan) から入手した。イノシン、尿酸及びキサンチンは Sigma-Aldrich から入手した。Disodium hydrogen phosphate 12-hydrate、phosphoric、perchloric acid、及び EDTA・2Na はキンダ化学から入手した。Methylcellulose 400 及び sodium pyrophosphate は和光純薬工業から入手した。Xanthine oxidase (from bovine milk) はオリエンタル酵母 (Tokyo, Japan) から入手した。ノボ・ヘパリン注は持田製薬から入手した。

動物実験モデル、被験物質投与、試料採取

動物実験の試験デザインを図 12 に示した。Topiroxostat 処置ラットを用いた尿酸排泄促進薬の評価 (図 12A) では、ラットを約 16 時間絶食させた後、0.5%MC 又は 0.5%MC で懸濁した Topiroxostat 0.1 mg/kg を経口投与し、その 1 時間後に 0.5%MC 又は 0.5%MC で懸濁した被験物質を経口投与した。Topiroxostat の投与用量は予備検討を実施し、有意な血漿中尿酸値低下作用が得られる用量として設定した。被験物質投与 1 時間後から 1 時間、ステンレス尿受けで採尿した。採尿後に眼窩静脈叢から約 500 μ l 採血し、ヘパリン入りのチューブに加えて氷上で保管した。血液は 4°C、700 \times g で 10 分間遠心分離して血漿とした。Topiroxostat 処置ラットに対するイノシン負荷の影響 (図 12B) では、ラットを約 16 時間絶食させた後、0.5%MC で懸濁した Topiroxostat 0.1 mg/kg を経口投与し、その 30 分後に 0.5%MC 又は 0.5%MC で懸濁したイノシン 1000 mg/kg を経口投与し、さらに 30 分後に 0.5%MC 又は 0.5%MC で懸濁した被験物質を経口投与した。イノシンの投与用量は予備検討を実施し、血漿中尿酸値が正常ラットと同等まで増加する用量として設定した。被験物質投与 1 時間後から 1 時間、ステンレス尿受けで採尿した。採尿後に眼窩静脈叢から約 500 μ l 採血し、ヘパリン入りのチューブに加えて氷上で保管した。血液は 4°C、700 \times g で 10 分間遠心分離して血漿とした。

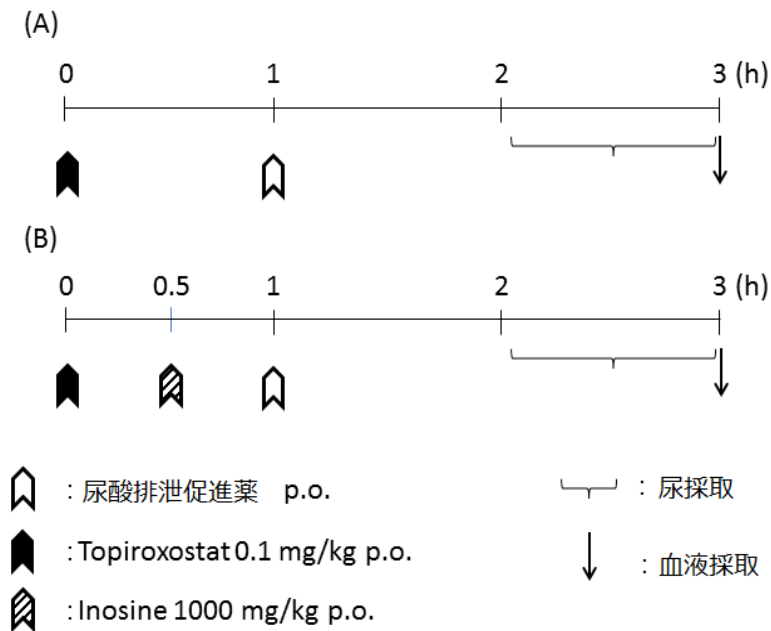


図 12 動物試験デザイン III

第三節で用いた動物試験デザインを示した。A：Topiroxostat 処置ラットを用いた尿酸排泄促進薬の評価、
B：Topiroxostat 処置ラットに対するイノシン負荷の影響。

血漿及び尿中の尿酸及びクレアチニンの測定

尿酸及びクレアチニンは第二節と同様に測定した。さらに、尿中尿酸排泄率（FE_{UA}）を次式により算出し、尿酸排泄促進作用の指標とした。FE_{UA} (%) = (U_{UA}/P_{UA}) / (U_{CRE}/P_{CRE}) × 100。

Xanthine oxidase 活性の測定

100 μmol/l キサンチン及び0.2 mmol/l EDTA を含む 100 mmol/l pyrophosphate buffer (pH8.5) を 25°C で 5 分間プレインキュベートし、xanthine oxidase を最終濃度 3.2 mU/ml となるように添加した。紫外可視吸光度計 U-3000 で 25°C、295 nm の吸光度を測定し、1 分間の吸光度変化から xanthine oxidase の活性を求めた。DMSO で溶解した被験物質を最終濃度 1% となるように添加し、媒体添加時の活性を 100% として被験物質の阻害率を算出した。試験は n=3 で実施した。

統計解析

試験より得られたデータの集計は Microsoft Excel を用いた。統計解析は SAS institute (Cary, NC) の JMP を用い、Topiroxostat 処置の Control 群と被験物質群との差を Dunnett's test ($P < 0.05$ 又は 0.01) で評価した。

結果

1. Xanthine oxidase 活性に対する尿酸排泄促進薬の影響

既存の尿酸排泄促進薬である Benzbromarone が尿酸生成酵素である xanthine oxidase 活性を弱いながらも阻害する ($K_i = 8.5 \mu\text{mol/l}$) ことが報告されている (Sinclair DS, 1975)。Xanthine oxidase 活性を強く阻害する薬剤は血漿中尿酸値低下作用を示すため、Probenecid、Dotinurad 及び F12859 について xanthine oxidase 活性を阻害するか否かを検討し、血漿中尿酸値に変化を及ぼす可能性を調べた。

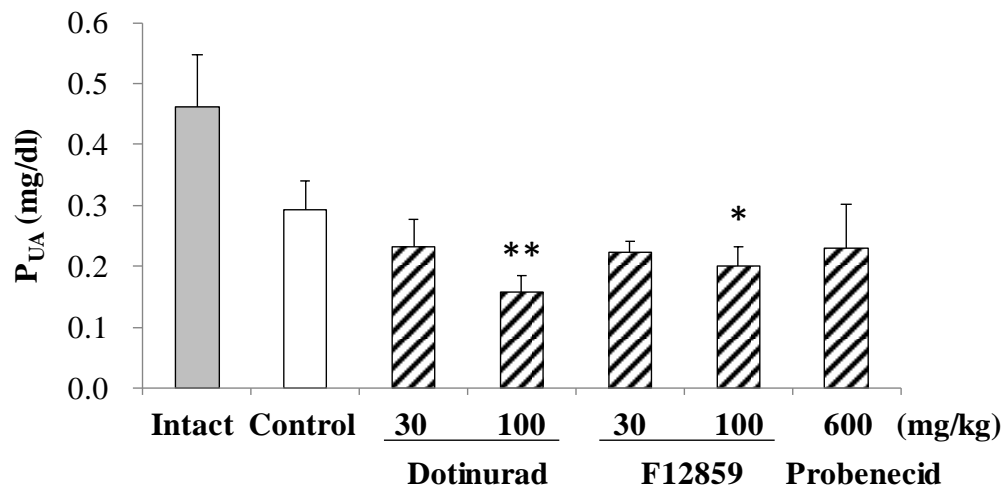
Xanthine oxidase 活性に対する Probenecid、Dotinurad 及び F12859 の $100 \mu\text{mol/l}$ における阻害はそれぞれ -0.4% 、 11.0% 及び 6.0% であり、いずれの被験物質も阻害は認められなかった。

2. Topiroxostat 処置ラットを用いた尿酸排泄促進薬の評価

Topiroxostat 処置による血漿中尿酸値の低下を確認した。次に、Topiroxostat 処置ラットを用いて Probenecid、Dotinurad 及び F12859 の尿酸排泄促進作用を評価した。

Topiroxostat 処置により、xanthine oxidase が阻害され、血漿中尿酸値は 0.462 mg/dl から 0.294 mg/dl に低下した。本モデルで Dotinurad ($30, 100 \text{ mg/kg}$) 及び F12859 ($30, 100 \text{ mg/kg}$) は用量依存的に血漿中尿酸値を低下させ (図 13)、Dotinurad (100 mg/kg) 及び F12859 (100 mg/kg) は Control に比べて 0.136 mg/dl ($P < 0.01$) 及び 0.093 mg/dl ($P < 0.05$) 低値であった (表 3)。一方、Probenecid (600 mg/kg) は Control に比べて 0.064 mg/dl 低値であったが、有意な変化ではなかった。また、被験物質による FE_{UA} の増加がみられており、Probenecid (600 mg/kg) 及び Dotinurad (100 mg/kg) で Control に比べて 52.7% ($P < 0.01$) 及び 49.6% ($P < 0.01$) 増加した。一方、F12859 (100 mg/kg) で Control に比べて 27.5% 増加したが、有意な変化ではなかった。

(A)



(B)

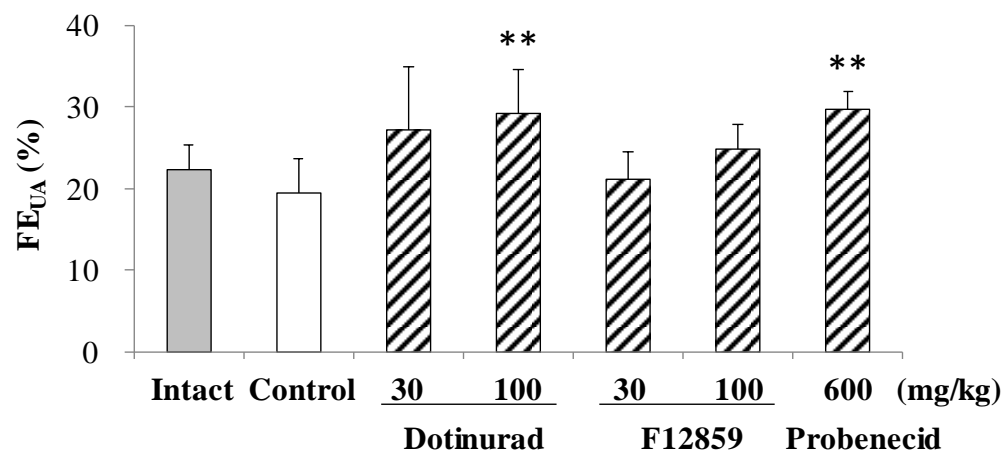


図 13 Topiroxostat 処置ラットを用いた尿酸排泄促進薬投与による血漿中尿酸値 (A) 及び尿中尿酸排泄率 (B) の変化

P_{UA} ; 血漿中尿酸値、FE_{UA} ; 尿中尿酸排泄率

試験デザインは図 12A に従い実施した。統計解析は Topiroxostat 処置の Control 群と被験物質群について Dunnett's test

(*: p<0.05, **: p<0.01) を実施した。データは平均±SD (n=5-6) で示した。

表 3 Topiroxostat 処置ラットを用いた Probenecid、Dotinurad 及び F12859 の尿酸排泄促進作用

Test article	Dose (mg/kg)	Topiroxostat (mg/kg)	P _{UA} (mg/dl)	Decrement from	
				Topiroxostat-treated control (mg/dl)	FE _{UA} (%)
0.5%MC	-	-	0.462 ± 0.086	-	22.4 ± 3.0
	-	0.1	0.294 ± 0.047	-	19.5 ± 4.1
Dotinurad	30	0.1	0.231 ± 0.047	0.063	27.1 ± 7.8
	100	0.1	0.158 ± 0.027**	0.136	29.1 ± 5.4**
F12859	30	0.1	0.223 ± 0.017	0.071	21.1 ± 3.4
	100	0.1	0.201 ± 0.032*	0.093	24.8 ± 3.1
Probenecid	600	0.1	0.230 ± 0.071	0.064	29.7 ± 2.1**

P_{UA} ; 血漿中尿酸値、FE_{UA} ; 尿中尿酸排泄率

試験デザインは図 12A に従い実施した。統計解析は Topiroxostat 処置の Control 群と被験物質投与群について Dunnett's test (*, **: p<0.05, 0.01) を実施した。データは平均±SD (n=5-6) で示した。

3. Topiroxostat 処置ラットに対するイノシン負荷の影響

イノシンはプリン体の中間代謝物であり、ヒポキサンチンに代謝される。さらに、xanthine oxidase によりヒポキサンチンからキサンチン、キサンチンから尿酸に代謝される。イノシンを投与し、尿酸生成を亢進することで、Topiroxostat 処置ラットにおける尿酸排泄促進薬の作用が消失するか否かを検討した。

Topiroxostat 処置ラットの血漿中尿酸値は 0.245 mg/dl であり、イノシン負荷により 0.452 mg/dl まで増加し (表 4)、正常ラットとほぼ同程度の値と考えられた。本モデルで Probenecid (600 mg/kg) 及び Dotinurad (100 mg/kg) の作用は消失した。

表 4 Topiroxostat 処置ラットにイノシンを負荷した時の Probenecid 及び Dotinurad の尿酸排泄促進作用

Test article	Dose (mg/kg)	Topiroxostat (mg/kg)	Inosine (mg/kg)	P _{UA} (mg/dl)	Decrement from	
					inosine-treated control (mg/dl)	FE _{UA} (%)
0.5%MC	-	0.1	-	0.245 ± 0.019	-	21.4 ± 7.3
	-	0.1	1,000	0.452 ± 0.086	-	23.5 ± 8.5
Dotinurad	100	0.1	1,000	0.384 ± 0.083	0.068	33.9 ± 4.5
Probenecid	600	0.1	1,000	0.439 ± 0.076	0.013	32.6 ± 9.1

P_{UA} ; 血漿中尿酸値、FE_{UA} ; 尿中尿酸排泄率

試験デザインは図 12B に従い実施した。統計解析は Topiroxostat 処置の Control 群と被験物質投与群について Dunnett's test を実施した。データは平均±SD (n=5-6) で示した。

考察

Topiroxostat 処置により xanthine oxidase を阻害して血漿中尿酸値を低下させたことから、プリン代謝回転を抑制したラットモデルであると考えられた。本モデルで尿酸排泄促進薬の効果を評価したところ、Dotinurad による尿酸排泄促進作用を伴う血漿中尿酸値低下作用がみられた。さらに、Topiroxostat 処置モデルでみられた Dotinurad の血漿中尿酸値低下作用がイノシン負荷により消失したことから、血中尿酸値低下作用を評価するためには尿酸生成速度を抑える必要があることが裏付けられた。

一方、Probenecid は尿酸排泄促進作用を示したが、血漿中尿酸値低下作用はみられなかった。Probenecid は尿酸排泄促進薬の分子標的である URAT1 だけでなく、OATs を非特異的に阻害することが知られている (Miner JN, 2016; Takeda M, 2001)。特に OAT1/3 は腎臓の近位尿細管において尿酸の分泌を担っており、その阻害により血漿中尿酸値が増加すると考えられる。実際、OAT3 のノックアウトマウスは尿中への尿酸排泄が低下しているものの血漿中尿酸値には変化がないが、OAT3 ノックアウトマウスに Probenecid を投与すると OAT1 阻害に基づくと考えられる、血漿中尿

酸値の増加が認められている (Wu W, 2017)。

以上より、Topiroxostat 処置ラットはプリン代謝回転速度を抑制したという点でよりヒトに近いモデルであることが示された。本モデルでは Dotinurad による尿酸排泄促進作用を伴う血漿中尿酸値低下作用が認められることから、尿酸排泄促進薬の血漿中尿酸値低下作用を評価できる有用なモデルであることが示された。

第四節 まとめ

本章ではヒトとげっ歯類の尿酸代謝の種差に着目し、これらの種差を改善するラットモデルの作製を試みた。3種のモデル（Pyrazinamide 処置ラット、oxonate 処置ラット、Topiroxostat 処置ラット）の評価から、尿酸代謝の種差の中でもラットにおいて尿酸再吸収の寄与が低いこと及びプリン代謝回転が速いことが、尿酸排泄促進薬の評価を難しくしている要因と考えられた。Dotinurad は Pyrazinamide 処置ラットで Probenecid に比べて 1/10 の用量で尿酸排泄促進作用を示し、6-8 時間までの持続的な作用を示した。さらに、Dotinurad は Topiroxostat 処置ラットで尿酸排泄促進作用を伴う血漿中尿酸値低下作用を示したことから、有望な尿酸排泄促進薬であると考えられた。

なお、尿酸排泄促進薬のスクリーニングに適した動物（げっ歯類以外）が存在する可能性について、文献報告を基に検討した。FE_{UA}はヒトでは 10%未満であるのに対して、雑種犬では 51%であり（Stapleton FB, 1981）、イヌはげっ歯類と同等と考えられた。Uricase の活性はヒトでは欠損しているのに対して、類人猿を除く哺乳類は保有している（Friedman TB, 1985）。同論文ではアナウサギの肝臓蛋白質あたりの uricase 活性及び xanthine oxidase 活性はそれぞれマウスの 1.75 倍及び 0.84 倍であると報告されていることから、ウサギはげっ歯類と同等と考えられた。プリン代謝回転速度はヒトとカニクイザルの体重当たりの尿中プリン体代謝産物量はほぼ同じである（Shimo T, 2009）。一方、ビーグル犬の体重当たりの尿中プリン体代謝産物量はカニクイザルに比べて 6.3 倍であるため（Shimo T, 2011）、イヌはヒトに比べてプリン代謝回転が速いと考えられた。血中尿酸値はヒトでは 4-6 mg/dl であるのに対し、類人猿を除く哺乳類（サル、イヌ、ラット及びマウス）では 0.1-0.6 mg/dl と低値である（Sato S, 1991）。これらの報告から、げっ歯類以外の動物においてもヒトとの種差は依然として大きいと考えられた。以上より、汎用性も鑑みて、尿酸排泄促進薬のスクリーニングにはげっ歯類を用いた検討が最適と考えられた。

第二章 新規尿酸排泄促進薬 Dotinurad の薬理学的研究

序論

第一章のラットモデルを用いた検討で有望な尿酸排泄促進薬と考えられた Dotinurad について、薬剤としての資質を評価するために非臨床試験が開始された。すなわち、薬物動態試験としてラット及びサルを用いた吸収・分布・代謝・排泄の検討、安全性試験として遺伝毒性やげっ歯類及びサルを用いた反復投与毒性の検討である。Dotinurad の生物学的利用率 (F) はラット及びサルでそれぞれ 86.8% 及び 91.0% であり、良好な吸収性を示した。さらに、分布容積が小さく、かつ全身クリアランスが小さいことから、結果として血中薬物濃度の半減期 ($T_{1/2}$) はラット及びサルでそれぞれ 11.4 h 及び 9.0 h であり、持続性が認められた。以上より、Dotinurad は良好な薬物動態プロファイルであると評価された。また、安全性の面でも大きな問題はみられず、特に既存の尿酸排泄促進薬である Benzbromarone で報告されていた肝臓への影響については、ラット肝臓ミトコンドリアの機能試験、ヒト肝細胞共有結合試験、ラット及びサルの反復経口投与毒性試験等の結果から、Dotinurad の肝障害発現リスクは低いと評価された。これらより、Dotinurad は薬剤としての資質があると評価された。

そこで、Dotinurad の薬理学的特長を明らかにするために、さらなる評価を実施した。すなわち、第一節では尿酸排泄促進薬の標的分子である尿酸再吸収トランスポーター URAT1 による ^{14}C 尿酸輸送に対する阻害を評価し、さらに尿酸分泌トランスポーター ABCG2、OAT1 及び OAT3 による ^{14}C 尿酸輸送に対する阻害を評価した。第二節ではフサオマキザルを用いて Dotinurad 及び Benzbromarone の尿酸排泄促進作用及び血漿中尿酸値低下作用を評価した。第三節では尿酸排泄促進薬が *in vivo* においても尿酸分泌トランスポーターに影響するか否かを評価するために、ラットを用いて ABCG2 又は OAT1 の典型的基質の血漿中濃度推移に対する尿酸排泄促進薬の影響を評価した。

第一節 尿酸再吸収／分泌トランスポーターの尿酸輸送に対する尿酸排泄促進薬の影響

序

腎臓の近位尿細管において複数のトランスポーターが尿酸輸送に関与することが報告されている。管腔側の URAT1 及び血管側の GLUT9 (SLC2A9) は尿酸再吸収に関与するトランスポーターであり、SNP で機能が欠損している個人では血中尿酸値が 1 mg/dl 未満になることから (Ichida K, 2008; Dinour D, 2010)、これらは尿酸再吸収に重要な役割を担うトランスポーターとして位置付けられている。この他に尿酸分泌に関与するトランスポーターがあり、管腔側には NPT4 (SLC17A3), MRP4 (ABCC4) 及び ABCG2、血管側には OAT1 及び OAT3 が発現している (Ishikawa T, 2013)。

これら尿酸分泌トランスポーターの阻害により血中尿酸値が増加する可能性が示されている。例えば、OAT3 ノックアウトマウスに非特異的な OAT 阻害を示す Probenecid を投与した際、OAT1 阻害が原因と考えられる血中尿酸値の増加がみられている (Wu W, 2017)。さらに、oxonate を処置したラットに Probenecid を投与した時、血漿中尿酸値が増加したと報告されている (Yonetani Y, 1980)。また、痛風患者において ABCG2 機能低下の割合が多いことが報告されている (Matsuo H, 2009)。ABCG2 ノックアウトマウスでは血中尿酸値が増加し、小腸における尿酸排泄が低下していることから、小腸に発現する ABCG2 が尿酸排泄を担うと考えられている (Ichida K, 2012)。さらに、尿酸生成抑制薬である Febuxostat 及び尿酸排泄促進薬である Benzbromarone が *in vitro* で ABCG2 による尿酸輸送を強力に阻害し、臨床上也 ABCG2 を阻害する可能性があることが報告されている (Miyata H, 2016)。

以上を踏まえ、図 14 に腎臓及び小腸における尿酸排泄と関連するトランスポーターを示した。健常人における尿酸の排泄は腎臓 (尿) が約 500 mg/day であり、残りのほとんどの排泄を担う小腸 (便) が約 200 mg/day である (Sorensen LB, 1975)。ABCG2, OAT1 及び OAT3 に対する阻害が弱い、URAT1 選択的な阻害剤は効率的に尿酸の排泄を促進すると考えられる。そこで、Dotinurad 並びに既存の尿酸排泄促進薬である Benzbromarone、Lesinurad 及び Probenecid について URAT1、ABCG2、OAT1 及び OAT3 による ¹⁴C 尿酸輸送の阻害を評価し、さらに URAT1 に対する選択性を評価した。

<腎臓>

<小腸>

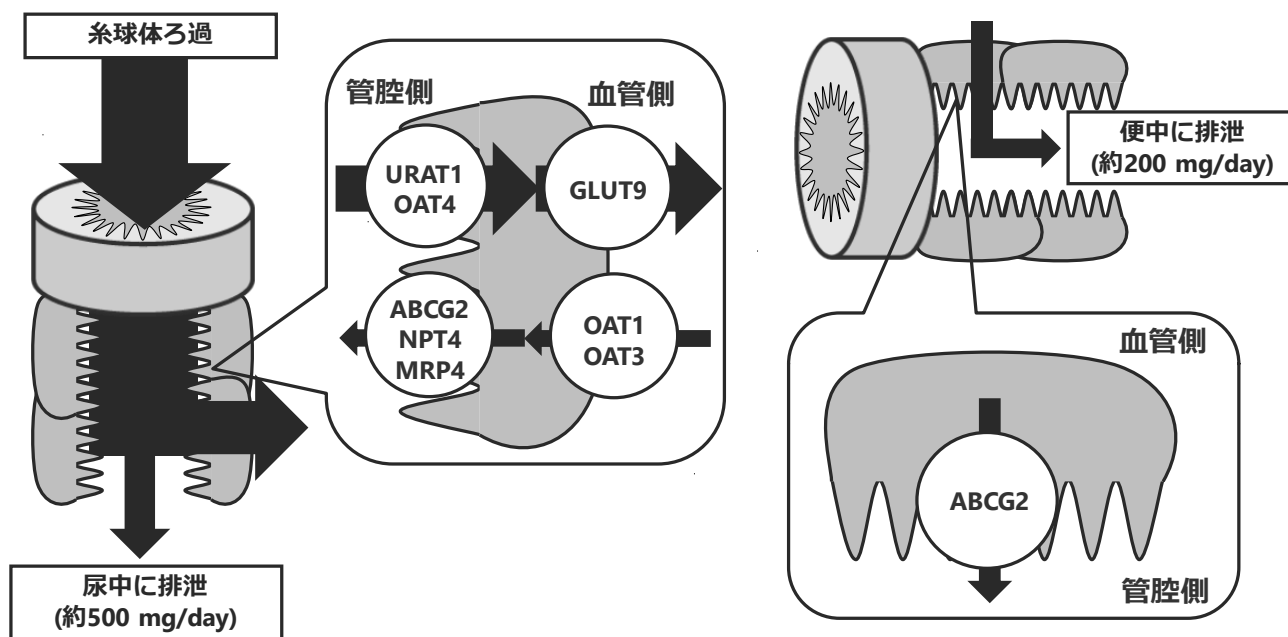


図 14 腎臓及び小腸における尿酸排泄とトランスポーター

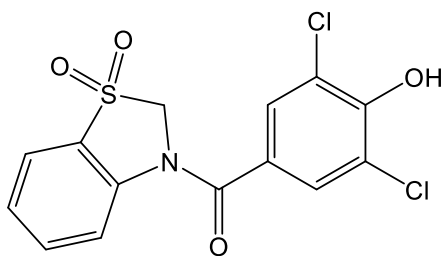
腎臓において尿酸は 100%糸球体ろ過され、近位尿細管における再吸収と分泌を受け、尿中に排泄される。小腸において尿酸は ABCG2 により分泌され、便中に排泄される。尿中に排泄される約 500 mg/day と便中に排泄される約 200 mg/day の尿酸は健常人での値。矢印は尿酸の動きを示した。

材料・方法

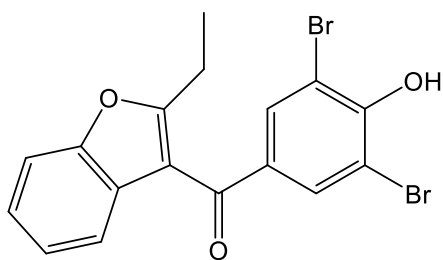
被験物質

Dotinurad は富士薬品で合成されたものを使用した。Benzbromarone 及び Probenecid は Sigma-Aldrich から入手した。Lesinurad は Sequoia Research Products (Berkshire, UK) から入手した。尿酸排泄促進薬の構造式を図 15 に示した。

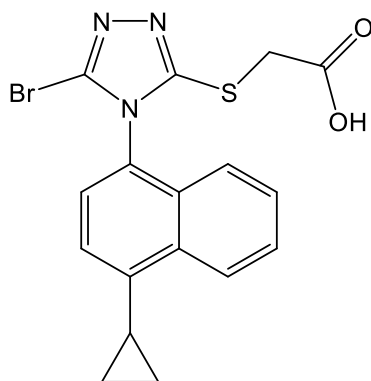
(A)



(B)



(C)



(D)

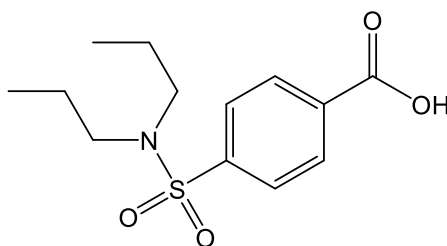


図 15 尿酸排泄促進薬の構造式

A : Dotinurad, B : Benzbromarone, C : Lesinurad, D : Probenecid

試薬

Dulbecco's modified Eagle's medium with 4.5 g/l glucose (DMEM) は Gibco®を Thermo Fischer Scientific (Waltham, MA) から入手した。Sodium gluconate、potassium phosphate dibasic trihydrate、HEPES、calcium D-gluconate、potassium gluconate、DMSO、adenosine 5'-monophosphate (AMP) sodium salt、adenosine 5'-triphosphate (ATP) sodium salt hydrate、sucrose、hydrochloric acid (HCl)、sodium hydroxide (NaOH)、magnesium chloride hexahydrate ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$)、sodium chloride (NaCl)、Tris は Sigma-Aldrich から入手した。Glucose monohydrate は Fluka®を Honeywell (Charlotte, NC) から入手した。 ^{14}C 尿酸は Moravek (Brea, CA) から入手した。

Hank's balanced salt solution (HBSS) は sodium gluconate、potassium phosphate dibasic trihydrate、HEPES、calcium D-gluconate、potassium gluconate 及び glucose monohydrate を水に溶解し、NaOH で pH7.4 に調整したものを使用した。

URAT1、OAT1 及び OAT3 発現細胞を用いた ¹⁴C 尿酸取り込みの測定

Solvo Biotechnology (Szeged, Hungary) のヒト URAT1 安定発現 MDCKII 細胞並びにヒト OAT1 又は OAT3 安定発現 HEK293 細胞を使用し、¹⁴C 尿酸取り込み阻害を評価した。すなわち、DMEM に懸濁した細胞を 96 well plate に 1×10^5 cells/well 蒔き込み、37°C、5% CO₂ で 24 時間インキュベートした。培地を吸引し、HBSS で 2 回洗浄した。20 µmol/l の ¹⁴C 尿酸及び DMSO に溶解した被験物質(最終濃度 1%)を含む HBSS を 50 µl 添加し、10 分間 (URAT1 及び OAT1) 及び 5 分間 (OAT3) インキュベートした。氷冷した HBSS を添加し、さらに 0.1 mol/l の NaOH を添加し細胞を溶解した。細胞溶解液中の ¹⁴C 尿酸は PerkinElmer (Waltham, MA) の Optiphase supermix (URAT1) 又は Ultima Gold XR (OAT1/3) を添加し、PerkinElmer の MicroBeta² liquid scintillation counter で CPM (1 分あたりの放射線計測回数) を測定した。以下の計算式から、Relative transport of urate を求めた。Relative transport of urate (% of control) = (A - B) / (C - D) × 100、A : 発現細胞における被験物質存在下の CPM、B : 非発現細胞における被験物質存在下の CPM、C : 発現細胞における 1%DMSO 添加時の CPM、D : 非発現細胞における 1%DMSO 添加時の CPM。

ABCG2 発現細胞由来膜小胞を用いた ¹⁴C 尿酸取り込みの測定

Solvo Biotechnology のヒト ABCG2 安定発現 HEK293 細胞由来膜小胞を使用し、¹⁴C 尿酸取り込み阻害を評価した。すなわち、30 µmol/l の ¹⁴C 尿酸を含む Transport buffer (250 mmol/l sucrose, 10 mmol/l MgCl₂, 10 mmol/l Tris-HCl, pH7.4) で膜小胞を懸濁し、96 well plate に 50 µl 添加した。DMSO で溶解した被験物質を最終濃度 1%となるように添加し、37°C で 15 分間インキュベートした。12 mmol/l MgCl₂-ATP 又は AMP を含む Transport buffer を 25 µl 添加し、3 分間インキュベートした。氷冷した Washing buffer (250 mmol/l sucrose, 100 mmol/l NaCl, 10 mmol/l Tris-HCl, pH7.4) を加えて反応を停止し、ガラスファイバーのフィルターで回収した。フィルターを氷冷した Washing buffer で 5 回洗浄し、風乾した。膜小胞中の ¹⁴C 尿酸は Ultima Gold XR を添加し、MicroBeta² liquid scintillation counter で CPM を測定した。以下の計算式から、Relative transport of urate を求めた。Relative transport of urate (% of control) = (A - B) / (C - D) × 100、A : 被験物質及び ATP 存在下の CPM、

B : 被験物質及び AMP 存在下の CPM、C : 1% DMSO 及び ATP 存在下の CPM、D : 1% DMSO 及び AMP 存在下の CPM。

統計解析

試験より得られたデータの集計は Microsoft Excel を用いた。濃度阻害曲線は GraphPad Software (San Diego, CA) の GraphPad Prism 7.03 software を用いて解析した。IC₅₀ 値及び 95%信頼性区間は各濃度における阻害率から 4 パラメータロジスティック回帰により算出した。また、各トランスポーターの IC₅₀ 値から URAT1 阻害比 (ABCG2, OAT1 又は OAT3 の IC₅₀ 値 / URAT1 の IC₅₀ 値) を算出した。

結果

1. 尿酸再吸収トランスポーター (URAT1) の尿酸取り込みに対する尿酸排泄促進薬の影響

尿酸排泄促進薬の標的分子であり、尿酸再吸収トランスポーターである URAT1 を過剰発現させた MDCKII 細胞を用いて、尿酸排泄促進薬による尿酸取り込みの阻害を評価した。

Dotinurad は濃度依存的に尿酸取り込みを阻害し、その IC₅₀ 値は 0.0372 µmol/l であった (図 16A)。一方、Benzbromarone、Lesinurad 及び Probenecid の IC₅₀ 値はそれぞれ 0.190、30.0 及び 165 µmol/l であり、Dotinurad に比べてそれぞれ 5.11、806 及び 4440 倍高値であった (図 16B, C, D)。

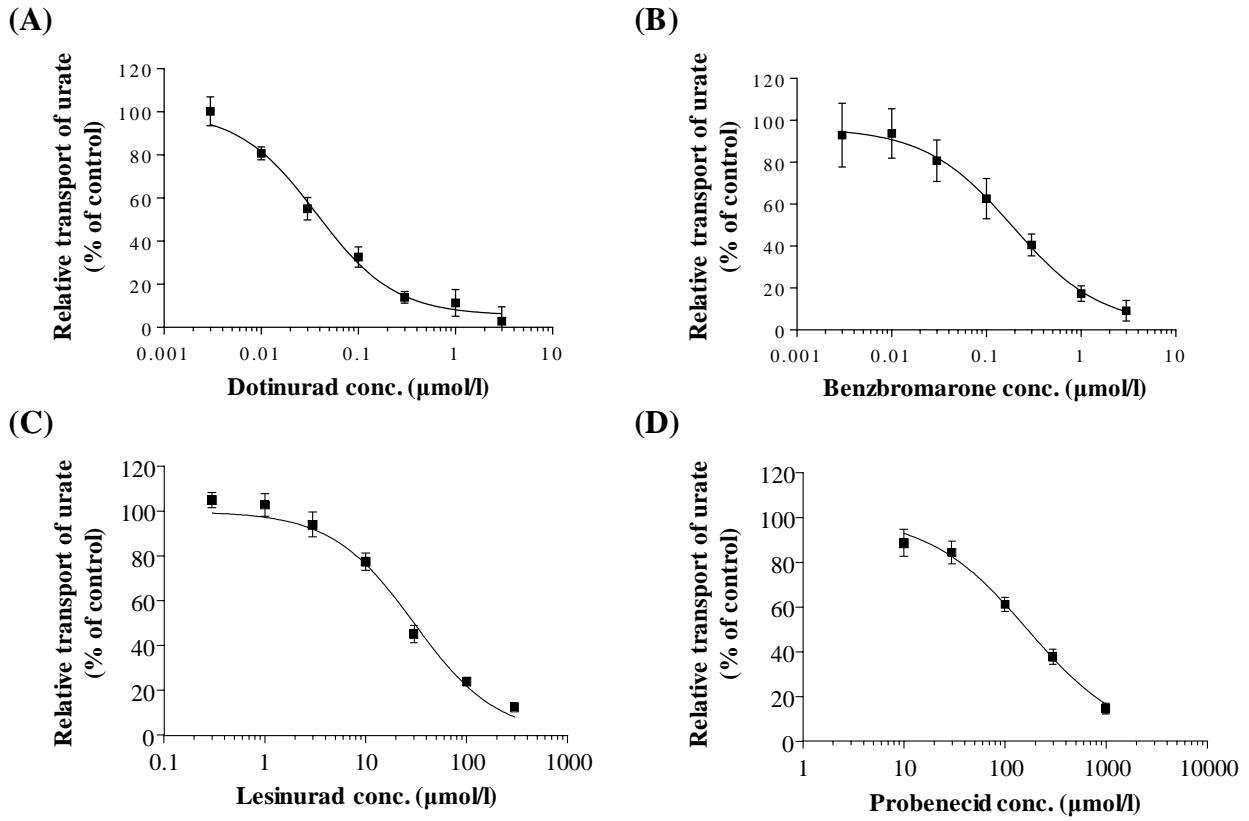


図 16 URAT1 発現細胞の ^{14}C 尿酸取り込みに対する尿酸排泄促進薬の濃度阻害曲線

A : Dotinurad, B : Benzbromarone, C : Lesinurad, D : Probenecid

URAT1 安定発現 MDCKII 細胞を用いて尿酸排泄促進薬の ^{14}C 尿酸取り込み阻害を評価した。濃度阻害曲線は GraphPad Prism 7.03 software を用いて解析した。データは平均±SD (n=3) で示した。

2. 尿酸分泌トランスポーター (ABCG2, OAT1 及び OAT3) の尿酸取り込みに対する尿酸排泄促進薬の影響

既存の尿酸排泄促進薬である Benzbromarone、Lesinurad 及び Probenecid は尿酸分泌トランスポーターを阻害することが知られている。すなわち、Benzbromarone は ABCG2 及び OAT1/3 を阻害すること (Miyata H, 2016; Ahn 2016)、Lesinurad は OAT1 及び OAT3 を阻害すること (Miner JN, 2016)、Probenecid は非特異的に OATs を阻害することが報告されている (ベネシッド®錠インタビューフォーム、2011 年)。そこで、尿酸排泄促進薬による ABCG2、OAT1 及び OAT3 による ¹⁴C 尿酸取り込みの阻害を評価した。

Dotinurad は各トランスポーターの尿酸取り込みを 0.3–300 µmol/l (ABCG2)、0.1–100 µmol/l (OAT1) 及び 0.03–30 µmol/l (OAT3) で濃度依存的に阻害し、IC₅₀ 値はそれぞれ 4.16、4.08 及び 1.32 µmol/l であった (表 5)。Benzbromarone は各トランスポーターの尿酸取り込みを濃度依存的に阻害し、IC₅₀ 値はそれぞれ 0.289、3.14 及び 0.967 µmol/l であった。Lesinurad は各トランスポーターの尿酸取り込みを濃度依存的に阻害し、IC₅₀ 値はそれぞれ 26.4、6.99 及び 1.07 µmol/l であった。Probenecid は各トランスポーターの尿酸取り込みを濃度依存的に阻害し、IC₅₀ 値はそれぞれ 433、10.9 及び 2.37 µmol/l であった。

表 5 URAT1、ABCG2、OAT1 及び OAT3 発現細胞を用いた尿酸取り込みに対する尿酸排泄促進薬の影響

Test article	IC ₅₀ (μmol/l)			
	(95% confidence interval)			
	URAT1	ABCG2	OAT1	OAT3
Dotinurad	0.0372 (0.0238–0.0581)	4.16 (1.13–15.29)	4.08 (2.19–7.59)	1.32 (1.12–1.56)
Benzbromarone	0.190 (0.121–0.299)	0.289 (0.154–0.543)	3.14 (1.00–9.82)	0.967 (0.772–1.211)
Lesinurad	30.0 (21.9–41.1)	26.4 (16.7–41.6)	6.99 (3.54–13.78)	1.07 (0.57–2.01)
Probenecid	165 (127–215)	433 (140–1343)	10.9 (9.5–12.7)	2.37 (0.93–6.01)

IC₅₀ ; 50%阻害濃度

URAT1 安定発現 MDCKII 細胞、OAT1 又は OAT3 安定発現 HEK293 細胞及び ABCG2 安定発現 HEK293 細胞由来膜小胞を用いて尿酸排泄促進薬の ¹⁴C 尿酸取り込み阻害を評価した。IC₅₀ は 4-パラメータロジスティック回帰を用いて算出した。データは平均及び 95% 信頼性区間 (n=2–3) で示した。

表 5 で得られた IC₅₀ を用いて URAT1 選択性を評価した。すなわち、ABCG2、OAT1 及び OAT3 の URAT1 阻害比 (URAT1 の IC₅₀ に対する ABCG2、OAT1 及び OAT3 の IC₅₀ の比) を算出した。Dotinurad の URAT1 阻害比はそれぞれ 112, 110 及び 35.5 倍であり、URAT1 選択性の高い薬剤であることが示された (表 6)。一方、Benzbromarone の URAT1 阻害比はそれぞれ 1.52、16.5 及び 5.09 倍であり、ABCG2 阻害が強いことが示された。Lesinurad の URAT1 阻害比はそれぞれ 0.880、0.233 及び 0.0357 倍であり、URAT1 を阻害する濃度よりも低濃度で ABCG2、OAT1 及び OAT3 を阻害することが示された。Probenecid の URAT1 阻害比はそれぞれ 2.62、0.0661 及び 0.0144 倍であり、OAT1

及び OAT3 阻害が強いことが示された。

表 6 尿酸排泄促進薬の URAT1 選択性

Test article	IC ₅₀ Ratio to URAT1			
	URAT1	ABCG2	OAT1	OAT3
Dotinurad	1	112	110	35.5
Benzbromarone	1	1.52	16.5	5.09
Lesinurad	1	0.880	0.233	0.0357
Probenecid	1	2.62	0.0661	0.0144

IC₅₀ ; 50%阻害濃度

表 5 から次式により算出した。IC₅₀ Ratio to URAT1 = IC₅₀ of URAT1, ABCG2, OAT1 or OAT3 / IC₅₀ of URAT1。

考察

Dotinurad、Benzbromarone、Lesinurad 及び Probenecid は URAT1 による ¹⁴C 尿酸の取り込みを阻害し、IC₅₀ はそれぞれ 0.0372、0.190、30.0 及び 165 μmol/l であることから、Dotinurad は他剤に比べて強力な URAT1 阻害剤であることが明らかとなった。さらに、Dotinurad は ABCG2、OAT1 及び OAT3 による ¹⁴C 尿酸取り込みをわずかに阻害し、その URAT1 阻害比はそれぞれ 112、110 及び 35.5 倍であった。一方、Benzbromarone、Lesinurad 及び Probenecid の URAT1 阻害比はそれぞれ 5.09–16.5 倍、0.0357–0.880 倍及び 0.0144–2.62 倍であることから、Dotinurad は他剤に比べて URAT1 選択的な薬剤であることが明らかとなった。

なお、Benzbromarone、Lesinurad 及び Probenecid の各トランスポーターに対する阻害が複数報告されている (Miner JN, 2016 ; Food and drug administration, 2015 ; Miyata H, 2016 ; Ichida K, 2003)。これらの文献と今回得られた IC₅₀ を比較したところ、Lesinurad 及び Probenecid の URAT1 阻害 (IC₅₀ はそれぞれ 3.53 及び 13.23 μmol/l) を除けばほぼ同等の値であった。なお、Miner らの試験では ABCG2 を発現している Caco-2 細胞を用いた検討で Lesinurad は 100 μmol/l でも阻害がないと報告

しているが、Food and drug administration の審査資料では ABCG2 を過剰発現させた細胞の膜小胞を用いた検討で Lesinurad は 100 $\mu\text{mol/l}$ で 62.7%の阻害が認められている。今回の試験では被験物質の阻害を同一条件（細胞、基質等）で評価しているため、得られた結果は被験物質間の阻害の強さを比較するために適していると考えられる。

なお、図 14 に示したように近位尿細管には URAT1、ABCG2、OAT1/3 以外にも複数の尿酸トランスポーターが存在する。尿酸再吸収トランスポーターとして管腔側に発現する OAT4 や血管側に発現する GLUT9（血管側）が挙げられる。URAT1 の SNP で機能が欠損している個人では血中尿酸値が 1 mg/dl 未満になることから（Ichida K, 2008）、URAT1 の阻害が十分に強い化合物では OAT4 や GLUT9 の阻害の強さは薬効に影響しないと考えられる。尿酸分泌トランスポーターとして管腔側に発現する NPT4 や MRP4 が挙げられる。*In vitro* で尿酸を輸送することがそれぞれ報告されているが（Jutabha P, 2011; Van Aubel RA, 2005）、ノックアウトマウス等の *in vivo* における尿酸動態を評価した報告がないため、生体における尿酸排泄に対する寄与は不明である。以上のことから、尿酸再吸収トランスポーターとしては尿酸排泄促進薬の標的分子である URAT1 のみを、尿酸分泌トランスポーターとしては ABCG2 及び OAT1/3 を優先して評価した。

第二節 フサオマキザルを用いた尿酸排泄促進薬の評価

序

第一章で述べた通り、類人猿を除く哺乳類とヒトの間には大きな種差が存在し、結果としてサル、イヌ、ラット及びマウスの血中尿酸値は 0.1–0.6 mg/dl と低値である (Sato S, 1991)。一方、サルの中でもフサオマキザルの血中尿酸値は 1.5–6 mg/dl と哺乳類の中でも高値であると報告されている (Fanelli GM, 1970)。また、オマキザル属のサルはヒトと同程度の FE_{UA} を示し、尿酸再吸収が優位であるため、げっ歯類よりもヒトに近い種と考えられている (Skeith MD, 1968)。実際、尿酸排泄促進薬の候補化合物であり、臨床試験も実施している AA-193 及び UR-1102 はフサオマキザルを用いて尿酸排泄促進作用及び血漿中尿酸値低下作用を評価している (Dan T, 1989; Ahn SO, 2016)。

これらの報告を踏まえ、フサオマキザルが薬効評価に最適な動物種であると考え、Dotinurad の尿酸排泄促進作用及び血漿中尿酸値低下作用を評価した。また、血漿中の被験物質濃度を測定して薬理効果との関連を調べた。Benzbromaron 群では Benzbromarone とその活性代謝物である 6-Hydroxybenzbromaron の血漿中濃度をそれぞれ測定した。さらに、URAT1 選択性の高さが薬効に及ぼす影響について考察した。

材料・方法

実験動物

新日本科学 (Kagoshima, Japan) で飼育されている 5–10 年齢の雄性のフサオマキザル (2.85–3.70 kg) を試験に供した。動物はステンレスのケージに個別飼育し、飼料は Purina Animal Nutrition (Gray Summit, MO) の New World Primate Diet 5040 を使用し、リンゴを 1 日 1 個与え、水は自由摂取させた。飼育室の室温及び湿度はそれぞれ $26 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 及び $55 \pm 20\%$ 、明暗サイクルは 12 時間に設定した。

動物実験は新日本科学安全性研究所の動物実験委員会で承認されており (承認番号 IACUC129-014)、本委員会の動物実験倫理指針に従って実施した。

被験物質

Dotinurad は富士薬品で合成されたものを使用した。Benzbromarone は和光純薬工業から入手した。

試薬

Metolose SM-1500 は信越化学工業 (Tokyo, Japan) から入手した。ノボ・ヘパリン注は味の素製薬 (Tokyo, Japan) から入手した。尿酸は Sigma-Aldrich から入手した。Methanol (HPLC grade)、ammonium acetate 及び acetic acid はキシダ化学から入手した。Acetonitrile (HPLC grade) は関東化学から入手した。

動物実験モデル、被験物質投与、試料採取

フサオマキザル 5 例を用い、対照群、Dotinurad 群及び Benzbromarone 群のクロスオーバー試験を実施した。動物実験の試験デザインを図 17 に示した。約 18 時間絶食したフサオマキザルに 0.5% (w/v) metolose 水溶液 (0.5%MC) 又は 0.5%MC で懸濁した Dotinurad (1, 5 及び 30 mg/kg) もしくは Benzbromarone (30 mg/kg) を経口投与した。投与前、投与 2、4、8 及び 24 時間後にヘパリンを含む注射針で伏在静脈から約 1 ml 採血し、投与 0-4、4-8 及び 8-24 時間の尿をステンレス尿受けで採取した。血液は 4°C、1710×g で 15 分間遠心分離し、血漿とした。

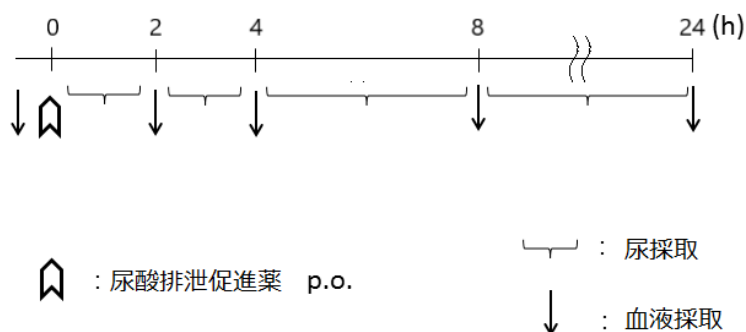


図 17 動物試験デザイン IV

第二節で用いた動物試験デザインを示した。フサオマキザルを用いた尿酸排泄促進薬の評価。

血漿及び尿中の尿酸及びクレアチニンの測定

尿酸及びクレアチニンは第一章第一節と同様に測定した。さらに、尿中尿酸排泄率 (FE_{UA}) を次式により算出し、尿酸排泄促進作用の指標とした。FE_{UA} (%) = (U_{UA}/P_{UA}) / (U_{CRE}/P_{CRE}) × 100。

血漿中被験物質濃度の測定

血漿を methanol で除蛋白し、遠心エバポレーターで乾固した。等量の移動相で再溶解して Alliance HPLC で測定した。Dotinurad の測定は、カラムは Mightysil RP-18 Aqua GP 250-4.6mm (5µm)、移動相は acetonitrile : 5 mmol/l ammonium acetate = 21 : 79 を用い、流速 1 ml/min、カラム温度 40°C、波長 325 nm で測定した。Benzbromarone 及びその代謝物である 6-Hydroxybenzbromarone の測定は、カラムは Mightysil RP-18 Aqua GP 250-4.6mm (5µm)、移動相は acetonitrile : 0.5% (v/v) acetic acid = 65 : 35 を用い、流速 1 ml/min、カラム温度 40°C、波長 300 nm で測定した。いずれも検量線より濃度を算出した。各時点の血漿中薬物濃度から台形法により、AUC₀₋₂₄ を求めた。0-8 時間の尿中尿酸排泄量は次式から求めた。尿中尿酸排泄量 = 0-2 時間の尿中尿酸値 × 尿量 + 2-4 時間の尿中尿酸値 × 尿量 + 4-8 時間の尿中尿酸値 × 尿量。

統計解析

試験より得られたデータの集計は Microsoft Excel を用いた。統計解析は SAS institute (Cary, NC) の JMP を用い、対照群と被験物質群との差は Dunnett's test (P<0.05 又は 0.01) で評価した。

結果

1. フサオマキザルを用いた尿酸排泄促進薬の評価

Dotinurad は用量依存的な血漿中尿酸値の低下を示し、5 及び 30 mg/kg の 4 及び 8 時間後においては対照群に比べ有意であった (図 18A)。8 時間後における血漿中尿酸値変化量は対照群に比べてそれぞれ 1.0 及び 1.8 mg/dl 低値であった。一方、Benzbromarone の 30 mg/kg では統計学的有意差はみられなかったが、血漿中尿酸値変化量は対照群に比べて低値で推移し、8 時間後では 0.5 mg/dl 低値であり、Dotinurad の 1 mg/kg とほぼ同等の効果であった。また、Dotinurad は用量依存的に FE_{UA}

を増加させ、0-4 時間では 30 mg/kg で 25.2%と対照群（8.9%）と比べて有意であり、その傾向は投与 8-24 時間まで持続した（図 18B）。一方、Benzbromarone の 30 mg/kg では統計学的有意差はみられなかったが、0-4 時間の FE_{UA} は 11.5%と対照群と比べて増加傾向であった。さらに、0-8 時間の尿中尿酸排泄量を評価したところ、Dotinurad は用量依存的な増加傾向を示し、対照群の 13.7 mg に対して 1、5 及び 30 mg/kg でそれぞれ 16.2、22.8 及び 25.3 mg であった（図 18C）。Benzbromaron の 30 mg/kg 投与群における尿中尿酸排泄量は 19.4 mg であり、Dotinurad の 1 mg/kg と 5 mg/kg の間であった。

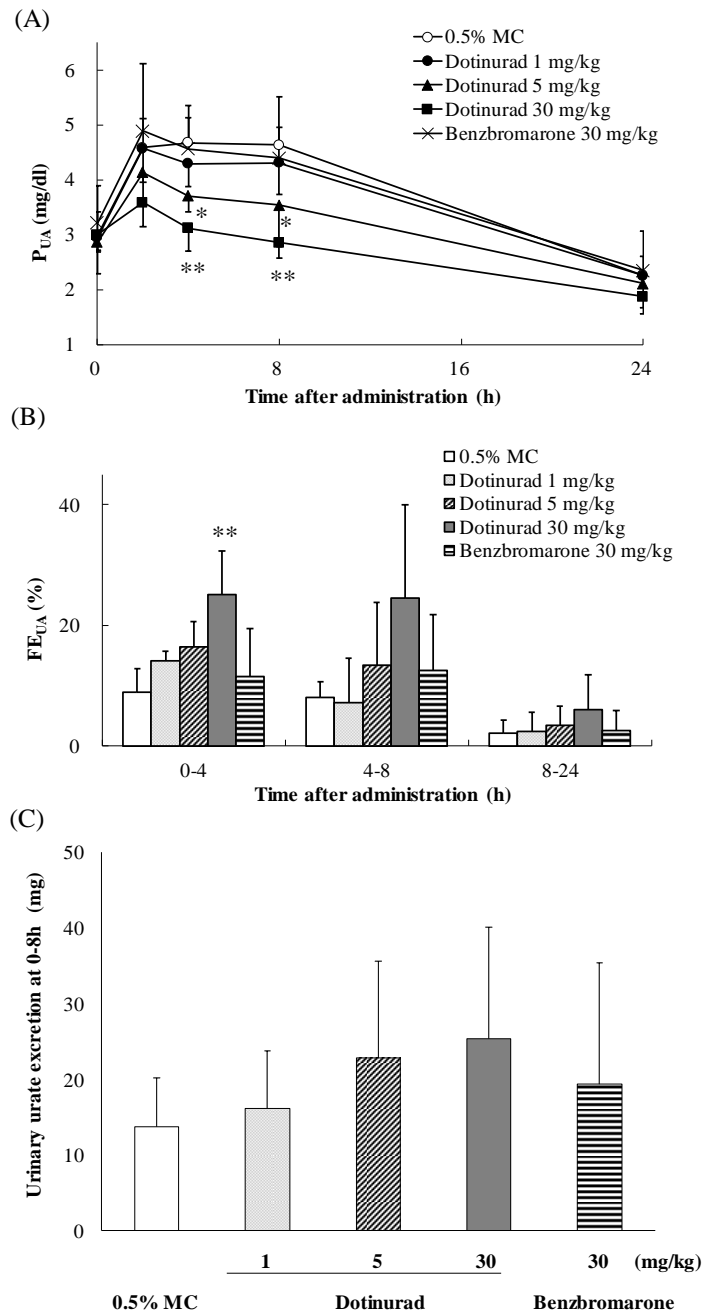


図 18 フサオマキザルを用いた尿酸排泄促進薬の血漿中尿酸値 (A)、尿中尿酸排泄率 (B) 及び尿中尿酸排泄量 (C) に対する効果

MC ; methylcellulose、P_{UA} ; 血漿中尿酸値、FE_{UA} ; 尿中尿酸排泄率

試験デザインは図 17 に従い実施した。血漿及び尿中の尿酸及びクレアチニン値は紫外可視吸光度計 U-3000 で吸光度を測定した。統計解析は 0.5%MC 群と被験物質群について Dunnett's test (*: p<0.05, **: p<0.01) を実施した。データは平均+又は-SD (n=4-5) で示した。

2. フサオマキザルにおける尿酸排泄促進薬の血漿中濃度推移

Dotinurad は用量依存的な血中薬物濃度の増加を示した (図 19A)。Dotinurad の 30 mg/kg における C_2 は 107 $\mu\text{g/ml}$ 、 AUC_{0-24} は 780 $\mu\text{g}\cdot\text{hr/ml}$ であり、持続的な血漿中薬物濃度推移を示した (表 7)。一方、Benzbromarone の 30 mg/kg における C_2 は 20.9 $\mu\text{g/ml}$ 、 AUC_{0-24} は 95.2 $\mu\text{g}\cdot\text{hr/ml}$ であり、6-Hydroxybenzbromarone の C_2 は 12.7 $\mu\text{g/ml}$ 、 AUC_{0-24} は 80.9 $\mu\text{g}\cdot\text{hr/ml}$ であった (図 19B)。

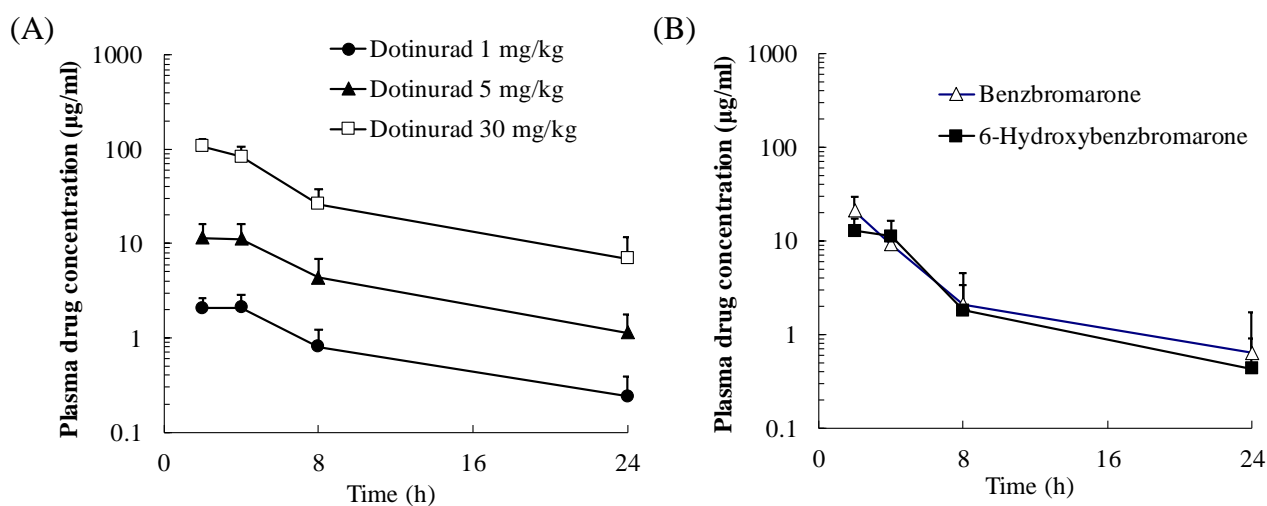


図 19 フサオマキザルを用いた被験物質の血漿中濃度推移

試験デザインは図 17 に従い実施した。血漿中の薬物濃度は Alliance HPLC で測定した。Benzbromarone 投与時は Benzbromarone 及びその代謝物である 6-Hydroxybenzbromarone を測定した。データは平均+SD (n=4-5) で示した。

表 7 フサオマキザルを用いた被験物質の薬物動態パラメーター

Administered article	Dose (mg/kg)	Measured article	C ₂ (µg/ml)	AUC ₀₋₂₄ (µg·h/ml)
Dotinurad	1	Dotinurad	2.06 ± 0.61	20.3 ± 8.6
	5		11.4 ± 4.8	109 ± 53
	30		107 ± 22	780 ± 265
Benzbromarone	30	Benzbromarone	20.9 ± 9.0	95.2 ± 28.1
		6-Hydroxybenzbromarone	12.7 ± 4.4	80.9 ± 33.9

C₂ ; 被験物質投与 2 時間後における血漿中濃度、AUC₀₋₂₄ ; 0 から 24 時間までの血漿中濃度時間曲線下面積
 血漿中薬物濃度は Alliance HPLC で測定した。Benzbromarone 投与時は Benzbromarone 及びその代謝物である
 6-Hydroxybenzbromarone を測定した。データは平均±SD (n=4-5) で示した。

考察

対照群の血漿中尿酸値は投与後 2-8 時間で高値を示し、投与後 24 時間では投与前に比べてやや
 低値であった。フサオマキザルにおいて血中尿酸値は日内変動又はストレスにより変動することが
 知られており、経口投与の操作により血中尿酸値は 8 時間まで上昇し、24 時間で投与前と同程度
 まで低下することが報告されている (Shinosaki T, 1992)。

Dotinurad の 1 mg/kg と Benzbromarone の 30 mg/kg における作用が同程度であったことから、
 Dotinurad と Benzbromarone の効力比は 30 倍と考えられた。この要因として血漿中薬物濃度の違い
 が想定される。Benzbromarone (30 mg/kg) は Dotinurad (1 mg/kg) に比べて C_{2h} で 10 倍、AUC₀₋₂₄
 で 4.7 倍高値であり、さらに活性代謝物である 6-Hydroxybenzbromarone は C_{2h} で 6.1 倍、AUC₀₋₂₄
 で 4.0 倍高値である。6-Hydroxybenzbromarone は URAT1 による尿酸取り込みを阻害し、その IC₅₀
 は 0.23 µmol/l と報告されていることから (Shin HJ, 2011)、薬効に寄与していると考えられる。こ
 れらのことから、Dotinurad と Benzbromarone の URAT1 に対する IC₅₀ の違い (5.1 倍) のみでは、
 Dotinurad の 1 mg/kg と Benzbromarone の 30 mg/kg で同等の血中尿酸値低下作用が発現することは

説明できないことから、URAT1 選択性の高さ（すなわち尿酸分泌トランスポーターを阻害しないこと）が薬効に寄与しているかを検討した。図 18C の尿中尿酸排泄量の結果から、Benzbromarone は尿中尿酸排泄を増加させており、その程度は Dotinurad の 1 mg/kg と 5 mg/kg の間である。本来ならば、Benzbromarone の血漿中尿酸値低下作用も同様に Dotinurad の 1 mg/kg と 5 mg/kg の間となるはずであるが、実際は Dotinurad の 1 mg/kg と同等であった。このことから、Dotinurad の URAT1 選択性の高さが薬効の強さの要因であると考え、第三節でさらなる検討を実施した。

第三節 ラットを用いた ABCG2 又は OAT1 基質の血漿中濃度推移に対する尿酸排泄促進薬の影響

序

フサオマキザルを用いた検討から URAT1 選択性が薬効に寄与している可能性が示唆されたが、尿酸排泄促進薬（血漿中尿酸値を低下させる薬剤）を用いて尿酸分泌トランスポーター阻害による血漿中尿酸値増加という相反する作用を正確に評価することは難しいと考えられた。そこで、各トランスポーターの典型的基質の血漿中濃度推移に対する尿酸排泄促進薬の影響を評価することで、尿酸の動きを模擬的に評価できると考えた。そこで、薬物相互作用ガイドラインから ABCG2 及び OAT1 の典型的基質を検索した（医薬品医療機器総合機構、2018 年）。Sulfasalazine は潰瘍性大腸炎治療薬であり、小腸の管腔側に発現する ABCG2 の基質となり排泄されることから（サラゾピリン[®]錠インタビューフォーム、2014 年）、経口吸収性が 2-13% と著しく低いことが知られている（Kolz U, 1985）。Adefovir は抗ウイルス薬であり、体内で代謝を受けずに、近位尿細管の血管側に発現する OAT1 の基質となり、90% が尿中から排泄される（Cundy KC, 1995）。Sulfasalazine 及び Adefovir が ABCG2 及び OAT1 阻害による影響を捉えやすい基質であると判断し、尿酸排泄促進薬との相互作用を評価した。なお、ABCG2 を最も強く阻害することが報告されている Febuxostat ($IC_{50} = 0.027 \mu\text{mol/l}$) と（Miyata T, 2016）、OAT を非特異的に阻害することが報告されている Probenecid（OAT 阻害によるペニシリンの血中濃度維持という適応を持つ）をそれぞれ陽性対照として設定した（ベネシッド[®]錠インタビューフォーム、2011 年）。

材料・方法

実験動物

日本エスエルシーから雄性 Slc:Sprague-Dawley ラットの 6 週齢を入手し、7 週齢で試験に供した。動物はブラケットケージで飼育し、飼料は日本クレアの CE-2 を使用し、水は自由摂取させた。飼育室の室温及び湿度はそれぞれ $22 \pm 4^{\circ}\text{C}$ 及び $60 \pm 20\%$ 、明暗サイクルは 12 時間に設定した。

動物実験は富士薬品第二研究所の動物実験委員会で承認されており（2017 年 2 月 3 日、2017 年 6 月 20 日）、動物の使用は「第二研究所における実験動物を用いた実験の実施に関する規定」に従

って実施した。

被験物質

Dotinurad は富士薬品で合成されたものを使用した。Benzbromarone は和光純薬工業から入手した。Probenecid 及び Febuxostat は Sigma-Aldrich から入手した。Lesinurad は Selleck Chemicals から入手した。

試薬

Sulfasalazine は Sigma-Aldrich から入手した。Adefovir は LKT Laboratories から入手した。Methylcellulose 400 及び Diclofenac sodium は和光純薬工業から入手した。生理食塩液は大塚製薬工場から入手した。Acetonitrile (HPLC grade) は関東化学から入手した。Tris、methanol (HPLC grade)、ammonium formate 及び sodium acetate anhydrate はキンダ化学から入手した。ノボ・ヘパリン注は持田製薬から入手した。Tenofovir hydrate、chloroacetaldehyde 及び tetrabutylammonium hydroxide は東京化成工業から入手した。

動物実験モデル、被験物質投与、試料採取

動物実験の試験デザインを図 20 に示した。ABCG2 基質の血漿中濃度推移に対する尿酸排泄促進薬の影響 (図 20A) では、約 16 時間絶食したラットに 0.5%MC 又は 0.5%MC で懸濁した Febuxostat (20 mg/kg)、Benzbromarone (50 mg/kg) 及び Dotinurad (1.3 mg/kg) を経口投与した。なお、被験物質の用量は臨床最大用量の 20 倍量で設定した。30 分後に 0.5%MC で懸濁した Sulfasalazine (20 mg/kg) を経口投与した。Sulfasalazine 投与から 0.25、0.5、1、2、4、8 及び 12 時間後に頸静脈より約 200 μ l ずつ採血した。生物学的利用率算出のために、Sulfasalazine の静脈内投与群を設定した。すなわち、約 16 時間絶食したラットに 0.5%MC を経口投与し、30 分後に生理食塩液で溶解した Sulfasalazine (5 mg/kg) を静脈内投与し、Sulfasalazine 投与から 0.083、0.25、0.5、1、2、4、8 及び 12 時間後に頸静脈より約 200 μ l ずつ採血した。採血はヘパリン処理した注射針を用いてインフルラン麻酔下で経静脈から採取し、氷上で保管した。血液は 4°C、700 \times g で 10 分間遠心分離し

血漿中 Sulfasalazine 濃度の測定

血漿中 Sulfasalazine 濃度の測定は Miyata らの方法を参考に実施した (Miyata T, 2016)。すなわち、血漿に methanol 及び Diclofenac (内標準物質) を溶解した acetonitrile を加えて除蛋白した試料を liquid chromatography- tandem mass spectro- metry (LC-MS/MS) で測定した。LC-MS/MS は Agilent Technologies (Santa Clara, CA) の Agilent 1100 Series HPLC Value System 及び AB SCIEX (Framingham, MA) の API3000 で構成されたものを用いた。カラムは Inertsustain C18 50-2.1mm (2 μ m)、移動相は 5 mmol/l ammonium formate : acetonitrile=90 : 10 から開始し、10 : 90 となるようにグラジエントをかけて測定した。流速 0.3 ml/min、カラム温度 40°C、Negative イオン検出モード、検出イオン m/z = 397.1→197.0 (Sulfasalazine) 及び m/z = 294.0→250.0 (Diclofenac) とした。検量線より血漿中 Sulfasalazine 濃度を定量した。生物学的利用率 (F) は以下の式から求めた。F (%) = (Sulfasalazine 経口投与時の AUC_{0-inf} / 20 mg/kg) / (Sulfasalazine 静脈内投与時の AUC_{0-inf} / 5 mg/kg) × 100。

血漿中 Adefovir 濃度の測定

血漿中 Adefovir 濃度の測定は Jullien らの方法を参考に実施した (Jullien V, 2003)。すなわち、血漿に Tenofovir (内標準物質) を溶解した methanol を加えて除蛋白した試料を遠心エバポレーターで乾固した。0.34% (v/v) chloroacetaldehyde を含む 50 mmol/l sodium acetate buffer (pH5.5) を加え、80°C で 50 分間インキュベートした。0.2 μ m のフィルターでろ過したものを ultra-performance liquid chromatography (UPLC) 注入試料とした。Waters の ACQUITY UPLC H-class を用いて、カラムは Inertsustain C18 50-2.1mm (2 μ m)、移動相は acetonitrile : 5 mmol/l tetrabutylammonium hydroxide を含む 50 mmol/l sodium acetate buffer (pH5.5) を 8:92 の割合で用い、流速 0.4 ml/min、カラム温度 40°C、励起波長 236 nm / 蛍光波長 420 nm で測定した。検量線より血漿中 Adefovir 濃度を定量した。

統計解析

試験より得られたデータの集計は Microsoft Excel を用いた。統計解析は SAS institute (Cary, NC) の JMP を用い、対照群と被験物質群との差は Dunnett's test (P<0.05 又は 0.01) で評価した。薬物

動態パラメーターの解析は Pharsight (Sunnyvale, CA) の Phoenix WinNonlin 6.4 software を用いた。

結果

1. ラットを用いた ABCG2 基質 (Sulfasalazine) の血漿中濃度推移に対する尿酸排泄促進薬の影響

図 21 に血漿中 Sulfasalazine 濃度推移を示し、表 8 に Sulfasalazine の薬物動態パラメーターを示した。0.5%MC 群における Sulfasalazine の薬物動態パラメーターは AUC_{0-inf} が 713 ng·h/ml、F が 2.0%であった。陽性対照である Febuxostat 群では顕著な血漿中 Sulfasalazine 濃度の増加がみられ、 AUC_{0-inf} は 5012 ng·h/ml、F は 14.1%に増加したことから、Sulfasalazine と相互作用することが確認された。Benzbromarone 群でも顕著な血漿中 Sulfasalazine 濃度の増加がみられ、 AUC_{0-inf} は 288 ng h/ml、F は 8.1%に増加したことから、Febuxostat と同様に ABCG2 阻害により Sulfasalazine と相互作用していると考えられた。一方、Dotinurad 群の AUC_{0-inf} は 885 ng·h/ml、F は 2.5%であり、0.5%MC 群と変わらないことから、ABCG2 を阻害しないと考えられた。

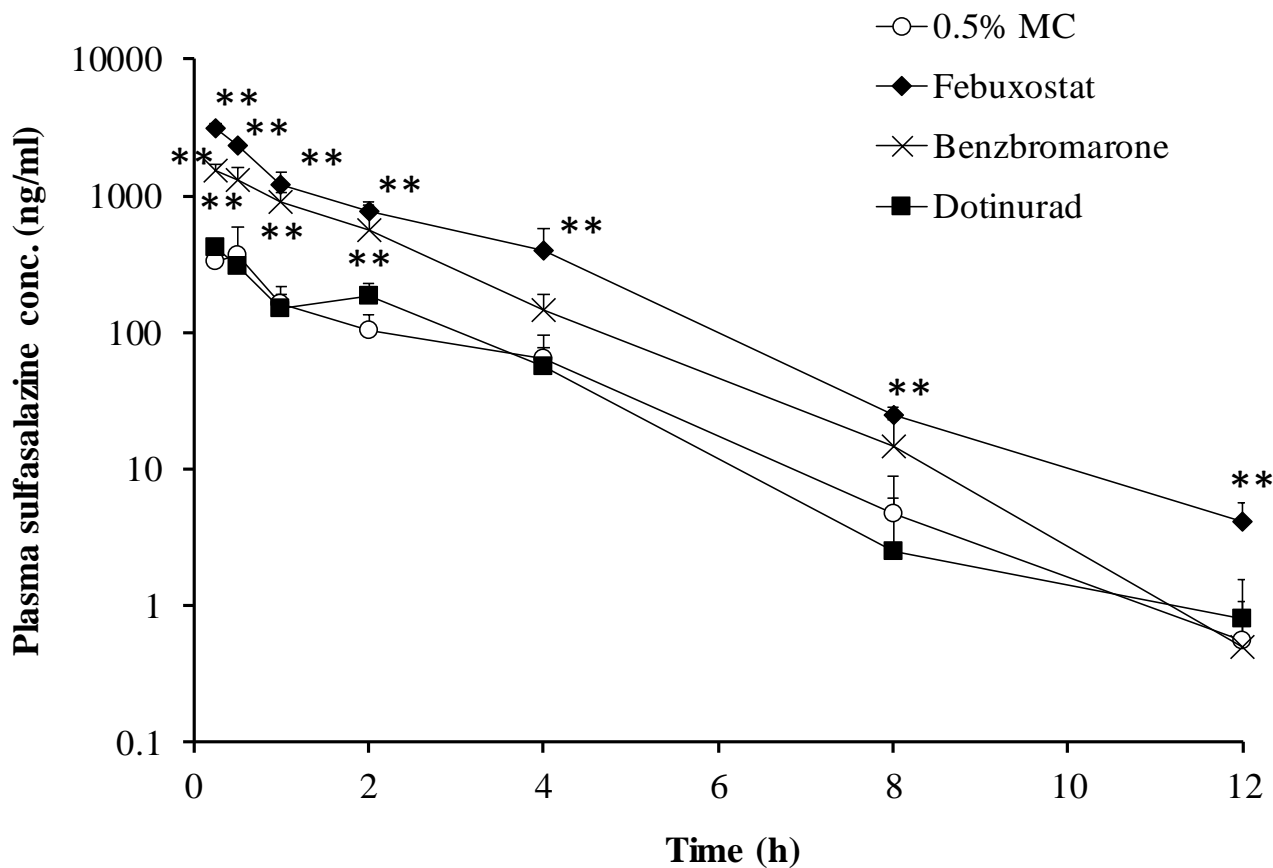


図 21 血漿中 Sulfasalazine 濃度推移に対する尿酸排泄促進薬の影響

MC ; methylcellulose

試験デザインは図 20A に示した。約 16 時間絶食したラットに 0.5%MC 又は 0.5%MC で懸濁した Probenecid (100 mg/kg)、Benzbromarone (50 mg/kg)、Lesinurad (67 mg/kg) 及び Dotinurad (1.3 mg/kg) を投与し、30 分後に 0.5%MC で懸濁した Sulfasalazine (20 mg/kg) を経口投与した。Sulfasalazine 投与から 0.25、0.5、1、2、4、8 及び 12 時間後に採血し、血漿中の Sulfasalazine 濃度を LC-MS/MS で測定した。

統計解析は 0.5%MC 群と被験物質群の各時点について Dunnett's test (*, **: p<0.05, 0.01) を実施した。データは平均 +SD (n=6) で示した。

表 8 尿酸排泄促進薬併用による Sulfasalazine の薬物動態パラメーター変化

Test article	Dose (mg/kg)	T _{1/2} (h)	AUC ₀₋₁₂ (ng·h/ml)	AUC _{0-inf} (ng·h/ml)	CL _T (l/h/kg)	F (%)
0.5%MC	-	1.5 ± 0.3	665 ± 94	713 ± 90	28.4 ± 3.8	2.0
Febuxostat	20	1.3 ± 0.1	5004** ± 851	5012** ± 848	4.07** ± 0.61	14.1
Benzbromarone	50	1.2 ± 0.5	2858** ± 750	2888** ± 729	7.29** ± 1.99	8.1
Dotinurad	1.3	1.9 ± 1.6	708 ± 166	885 ± 264	24.1 ± 7.8	2.5

MC ; methylcellulose、T_{1/2} ; 半減期、AUC₀₋₁₂ ; 0 から 12 時間までの血漿中濃度時間曲線下面積、AUC_{0-inf} ; 0 から無限大時間までの血漿中濃度時間曲線下面積、CL_T ; 全身クリアランス、F ; 生物学的利用率
薬物動態パラメーターは Phoenix WinNonlin 6.4 software を用いて解析した。統計解析は 0.5%MC 群と被験物質群について Dunnett's test (*: p<0.05, **: p<0.01) を実施した。データは平均±SD (n=3-4) で示した。

2. ラットを用いた OAT1 基質 (Adefovir) の血漿中濃度推移に対する尿酸排泄促進薬の影響

図 22 に血漿中 Adefovir 濃度推移を示し、表 9 に Adefovir の薬物動態パラメーターを示した。0.5%MC 群における Adefovir の薬物動態パラメーターは AUC_{0-inf} が 2.65 µg·h/ml、CL_T が 1.14 l/h/kg であった。Probenecid 群では AUC_{0-inf} が 5.88 µg·h/ml に増加し、CL_T が 0.56 l/h/kg に低下したことから、Adefovir と相互作用することが示された。Lesinurad 群でも AUC_{0-inf} が 4.81 µg·h/ml に増加し、CL_T が 0.67 l/h/kg に低下したことから、Probenecid と同様に OAT1 を阻害し Adefovir と相互作用したと考えられた。一方、Benzbromarone 群及び Dotinurad 群における血漿中薬物濃度推移は 0.5%MC 群と変わらないことから、いずれも OAT1 を阻害しないと考えられた。

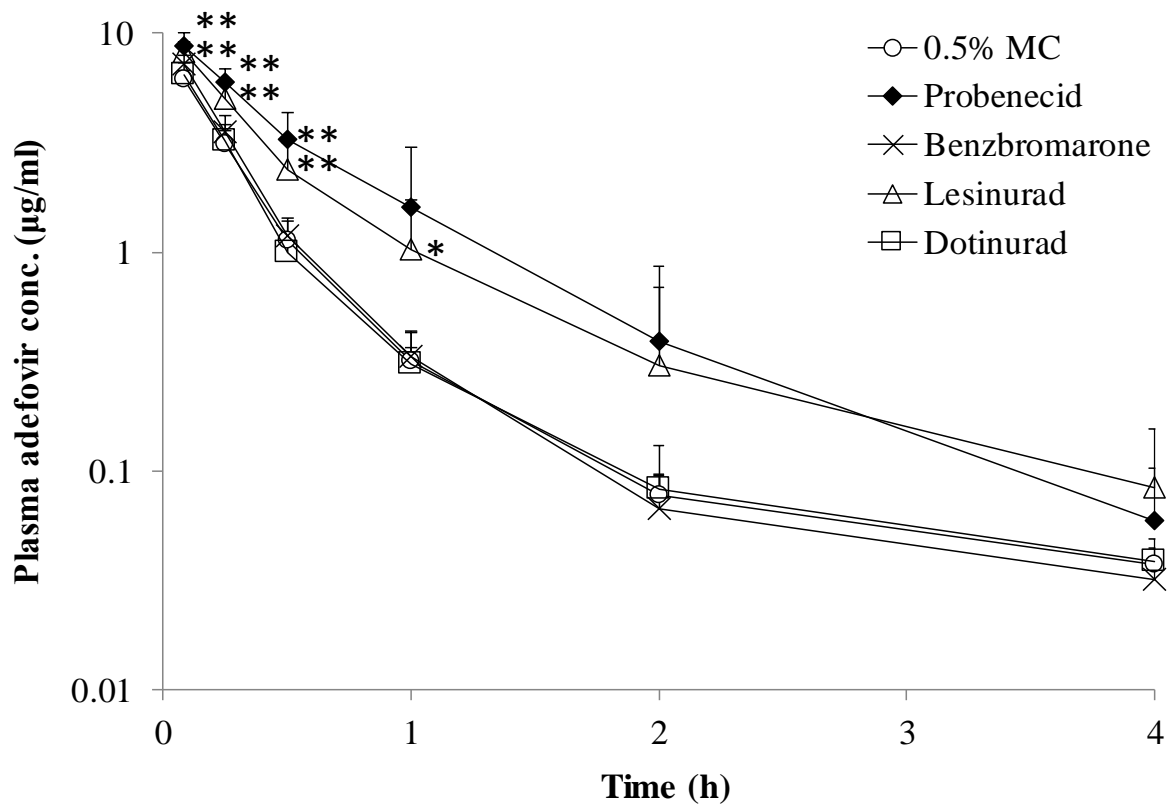


図 22 血漿中 Adefovir 濃度に対する尿酸排泄促進薬の影響

MC ; methylcellulose

試験デザインは図 20B に示した。約 16 時間絶食したラットに 0.5%MC 又は 0.5%MC で懸濁した Febuxostat (20 mg/kg)、Benzbromarone (50 mg/kg) 及び Dotinurad (1.3 mg/kg) を投与し、30 分後に 50 mmol/l tris-生理食塩液で溶解した Adefovir (3 mg/kg) を静脈内投与した。Adefovir 投与から 0.083、0.25、0.5、1、2 及び 4 時間後に採血し、血漿中の Adefovir 濃度を ACQUITY UPLC H-class で測定した。

統計解析は 0.5%MC 群と被験物質群の各時点について Dunnett's test (*, **: $p < 0.05, 0.01$) を実施した。データは平均 +SD (n=6) で示した。

表 9 尿酸排泄促進薬併用による Adefovir の薬物動態パラメーター変化

Test article	Dose (mg/kg)	C ₀ (ng/ml)	AUC ₀₋₄ (μg·h/ml)	AUC _{0-inf} (μg·h/ml)	CL _T (l/h/kg)
0.5%MC	-	8.70 ± 1.29	2.59 ± 0.26	2.65 ± 0.26	1.14 ± 0.10
Probenecid	20	10.6 ± 11.0	5.83** ± 2.34	5.88** ± 2.39	0.56** ± 0.16
Benzbromarone	50	10.3 ± 1.4	2.89 ± 0.37	2.94 ± 0.38	1.03 ± 0.13
Lesinurad	67	10.6 ± 2.0	4.71* ± 1.62	4.81* ± 1.72	0.67** ± 0.16
Dotinurad	1.3	9.20 ± 1.13	2.62 ± 0.49	2.68 ± 0.50	1.15 ± 0.18

0.5%MC ; 0.5% methylcellulose 水溶液、C₀ ; 静脈内投与直後の血漿中濃度、AUC₀₋₄ ; 0 から 4 時間までの血漿中濃度時間曲線下面積、AUC_{0-inf} ; 0 から無限大時間までの血漿中濃度時間曲線下面積、CL_T ; 全身クリアランス

薬物動態パラメーターは Phoenix WinNonlin 6.4 software を用いて解析した。統計解析は 0.5%MC 群と被験物質群について Dunnett's test (*, **: p<0.05, 0.01) を実施した。データは平均±SD (n=6) で示した。

考察

Benzbromarone はラットで ABCG2 の典型的基質である Sulfasalazine の血漿中濃度及び生物学的利用率を増加させることが明らかとなった。Sulfasalazine は小腸の管腔側に発現する ABCG2 の基質となり排泄されるために経口吸収性が悪いことから、Benzbromarone でみられた Sulfasalazine の生物学的利用率の増加は小腸の管腔側に発現する ABCG2 を阻害した結果と考えられた。なお、尿酸排泄の 1/3 を小腸が担っており (Sorensen LB, 1975)、小腸からの尿酸排泄を担っている分子が ABCG2 であることから (Ichida K, 2008))、Benzbromarone は小腸における尿酸排泄を抑制するこ

とが推察された。Probenecid 及び Lesinurad はラットで OAT1 の典型的基質である Adefovir の血漿中濃度を増加させた。Adefovir は体内で代謝を受けずに、近位尿細管の血管側に発現する OAT1 の基質となり、その尿中排泄率はげっ歯類で 80% であるため (Naesens L, 1996)、Probenecid 及び Lesinurad でみられた Adefovir の血漿中濃度の増加は近位尿細管の血管側に発現する OAT1 を阻害した結果と考えられた。なお、OAT1 は OAT3 と共に近位尿細管における尿酸の血管側から細胞内への輸送を担っていることから、Probenecid 及び Lesinurad は腎臓における尿酸排泄を抑制することが推察された。一方、Dotinurad はいずれの典型的基質とも相互作用しないことから、第一節で示した URAT1 選択性の高さを反映していると考えられた。

典型的基質は尿酸と完全に同じ動きをしているわけではないため、典型的基質との相互作用の結果が尿酸でも同様に起こるかを考える必要がある。典型的基質及び尿酸の輸送に対するある特定の薬剤の阻害が変わらない場合は、同じように相互作用を受けることが推測できる。例えば、ABCG2 阻害作用を持つ Rifampicin は ABCG2 を過剰発現させた Sf9 の膜小胞における尿酸の輸送を 50 $\mu\text{mol/l}$ で約 50% 阻害し (Hosomi A, 2012)、ヒト肝細胞における Sulfasalazine の輸送を 10 $\mu\text{mol/l}$ で 40% 阻害しているため (Kosa RE, 2018)、両基質に対する阻害に大きな違いはないと考えられた。また、OAT1 による Adefovir の輸送を Probenecid が阻害し、その K_i は 18.6 $\mu\text{mol/l}$ と報告されている (Maeda K, 2014)。第一節で得られた OAT1 による尿酸輸送に対する Probenecid の阻害は 10.9 $\mu\text{mol/l}$ (IC_{50}) であり、ほぼ同じであった。なお、 IC_{50} と K_i の間には $IC_{50} = K_i (1 + [S] / K_m)$ という関係があるので、基質濃度 (S , 20 $\mu\text{mol/l}$) が Michaelis 定数 (K_m , 372 $\mu\text{mol/l}$, unpublished data) より十分に低い濃度で実施した場合には $IC_{50} = K_i$ と考えられる。以上のことから、Sulfasalazine 又は Adefovir と尿酸排泄促進薬との相互作用試験の結果が、尿酸の動態にも反映されることが考えられた。

また、今回得られた結果はラットを用いた検討であり、ヒトに外挿するためには種差についても検討する必要がある。ABCG2 の SNP で機能が低下している個人 (421C>A、赤血球における蛋白質発現は 0.15 倍) において Sulfasalazine の AUC_{0-48} が 3 倍に増加することが報告されている (Gotanda K, 2015)。血漿中 Sulfasalazine 濃度を増加させた Benzbromarone 及び Febuxostat では、 AUC_{0-12} の増加は 4-7 倍であり、ヒトの SNP と同等の影響と考えられた。また、Adefovir の尿中排泄率はげっ

菌類で 80% (Naesens L, 1996)、ヒトで 90%と報告されていることから (Cundy KC, 1995)、Adefovir の排泄に及ぼす OAT1 の寄与はげっ歯類とヒトで同様であると推察される。

以上より、ラットを用いた検討で、既存の尿酸排泄促進薬である **Benzbromarone**、**Lesinurad** 及び **Probenecid** は **ABCG2** 又は **OAT1** の典型的基質と相互作用することが明らかとなり、尿酸分泌トランスポーターを介した尿酸の排泄を阻害する可能性が示唆された。一方、**Dotinurad** はいずれの典型的基質とも相互作用がみられなかったため、尿酸の排泄には影響しないと考えられた。

第四節 まとめ

本章では、新規尿酸排泄促進薬である Dotinurad の薬理学的特長の解明を試みた。まず、標的分子である尿酸再吸収トランスポーターURAT1 による尿酸輸送の阻害を評価し、Dotinurad は既存の尿酸排泄促進薬よりも強力な阻害がみられた。次に、尿酸分泌トランスポーターABCG2、OAT1/3 による尿酸輸送の阻害を評価し、Dotinurad は既存の尿酸排泄促進薬よりも URAT1 選択的な阻害がみられた。フサオマキザルを用いた検討で、Dotinurad は Benzbromarone よりも約 30 倍強い血漿中尿酸値低下作用がみられた。また、Benzbromarone の 30 mg/kg で尿中尿酸排泄量の増加傾向はみられているが、血漿中尿酸値の低下は弱いことから、小腸の ABCG2 を阻害した結果として尿中尿酸排泄量が増加している可能性が考えられた。ラットを用いて ABCG2 又は OAT1 の典型的基質の血漿中濃度推移に対する尿酸排泄促進薬の影響を評価したところ、Benzbromarone は小腸の ABCG2 を阻害すること、Probenecid 及び Lesinurad は腎臓の OAT1 を阻害することが示され、これらの薬剤は尿酸輸送も同様に阻害している可能性が示唆された。

URAT1 選択的阻害剤と非選択的阻害剤の血中尿酸値低下作用に及ぼす影響を模式図に示した(図 23)。URAT1 選択的阻害剤は腎臓における尿酸再吸収のみを阻害して効率的に血中尿酸値を低下させることができる。一方、非選択的阻害剤は ABCG2 又は OAT1/3 の阻害により、小腸又は腎臓における尿酸分泌を阻害するため、血中尿酸値低下作用が弱くなる。非選択的阻害剤が URAT1 選択的阻害剤と同程度まで血中尿酸値を下げるためには、より強く URAT1 を阻害し、より尿中に尿酸を排泄させる必要がある。しかしながら、尿中尿酸排泄量を過度に増やすことは尿路結石のリスクになるため、避けるべきである (Yu T, 1967)。

以上のことから、Dotinurad は強力で選択的な URAT1 阻害剤であり、尿酸分泌トランスポーター (ABCG2 及び OAT1/3) に対する影響は小さいため、フサオマキザルで Benzbromarone に比べて低用量で効率的に血中尿酸値を低下させたと考えられた。

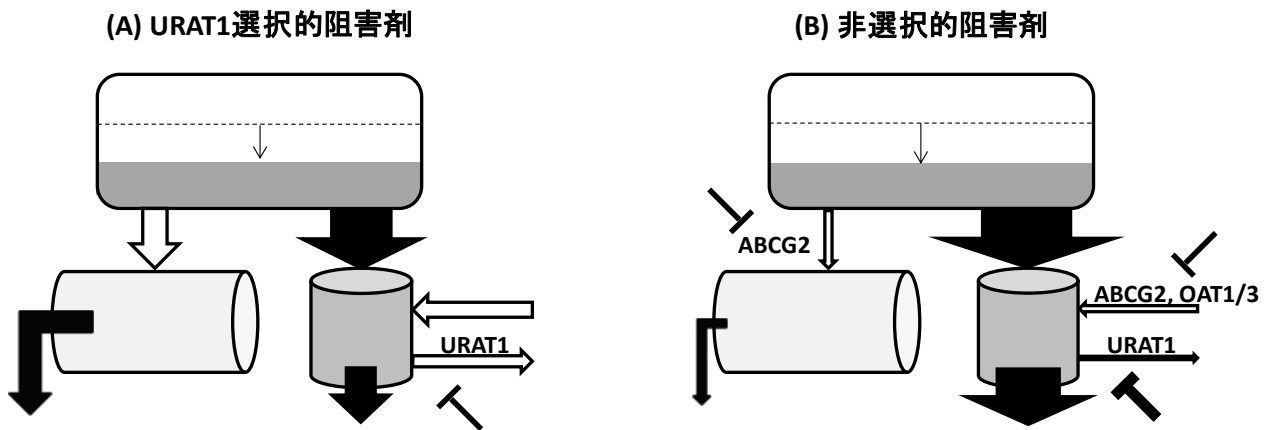
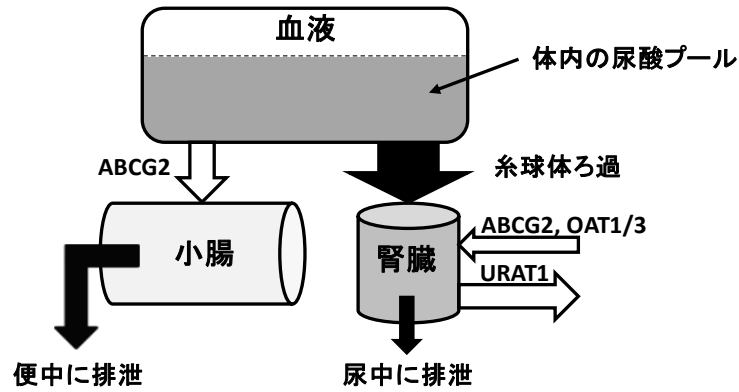


図 23 URAT1 選択的阻害剤 (A) と非選択的阻害剤 (B) の血中尿酸値低下作用

URAT1 選択的阻害剤と非選択的阻害剤の血中尿酸値低下作用の強さを比較した。上図：薬剤非投与時の尿酸代謝を示した。A：URAT1 選択的阻害剤は腎臓における尿酸再吸収のみを阻害して効率的に血中尿酸値を低下させる。B：非選択的阻害剤は ABCG2 や OAT1/3 を阻害するため、小腸又は腎臓における尿酸分泌を阻害する分、血中尿酸値低下作用が弱くなる。非選択的阻害剤が URAT1 選択的阻害剤と同程度まで血中尿酸値を下げるためには、より強く URAT1 を阻害し、より尿中に尿酸を排泄させる必要がある。

総括

尿酸排泄促進薬の治療対象である尿酸排泄低下型の素因を持つ高尿酸血症患者は 85%であるが、既存の尿酸排泄促進薬に複数の問題点（投与回数が多さ、薬物相互作用、劇症肝炎、腎機能障害）があるため、ほとんど処方されていない。安全性と薬理効果に優れた新規の尿酸排泄促進薬が求められているが、薬理効果のスクリーニングで汎用されるげっ歯類とヒトと種差が大きいため尿酸排泄促進薬の評価が適切にできない状況であった。

第一章では、ヒトとげっ歯類の尿酸代謝の種差に着目し、種差の要因を改善したラットモデルを用いて尿酸排泄促進薬の評価を試みた。3 種のラットモデル（Pyrazinamide 処置ラット、oxonate 処置ラット、Topiroxostat 処置ラット）の評価から、尿酸代謝の種差の中でもラットにおいて尿酸再吸収の寄与が低いこと及びプリン代謝回転が速いことが、尿酸排泄促進薬の評価が難しい要因と考えられた。これらのモデルを用いた評価で、Dotinurad は Pyrazinamide 処置ラットで Probenecid に比べて 1/10 の用量で同等の尿酸排泄促進作用を示し、8 時間までの持続性が認められた。また、Dotinurad は Topiroxostat 処置ラットで尿酸排泄促進作用を伴う血漿中尿酸値低下を示したため、有望な尿酸排泄促進薬であると考えられた。

第二章では、尿酸再吸収トランスポーターURAT1 及び尿酸分泌トランスポーターABCG2、OAT1/3 による尿酸輸送の阻害を評価し、Dotinurad は Benzbromarone、Lesinurad 及び Probenecid よりも強力で選択的な URAT1 阻害剤であることが明らかとなった。フサオマキザルを用いた検討で、Dotinurad は Benzbromarone よりも約 30 倍強い尿酸排泄促進作用及び血漿中尿酸値低下作用を示したことから、URAT1 選択性が薬効に影響している可能性が考えられた。ラットを用いて ABCG2 及び OAT1 の典型的基質の血漿中濃度推移に対する尿酸排泄促進薬の影響を評価したところ、Benzbromarone は小腸の管腔側に発現する ABCG2 を阻害すること、Probenecid 及び Lesinurad は近位尿細管の血管側に発現する OAT1 を阻害することが示された。一方、Dotinurad は ABCG2 及び OAT1 の典型的基質のいずれとも相互作用はみられなかった。

以上のことから、Dotinurad は強力で選択的な URAT1 阻害剤であり、尿酸分泌トランスポーター（ABCG2 及び OAT1/3）に対する影響は小さいため、効率的に血中尿酸値を低下させるという薬理

学的特長を持つ薬剤であることが明らかとなった。Dotinurad は臨床試験において 0.5–4 mg で血中尿酸値低下作用が認められており、Probenecid (0.5–2 g) や Benzbromarone (25–150 mg) と比べて低用量で薬効を示している。このことから、Dotinurad は低用量で効率的な血中尿酸値低下を示すことが裏付けられている。

Dotinurad は強力で選択的な URAT1 阻害剤であることに加え、良好な薬物動態プロファイル（生物学的利用率が約 90% であり、分布容積が小さく、かつ全身クリアランスが小さいことから、高い血漿中濃度が持続する）、良好な安全性プロファイル（非臨床試験では肝臓及び腎臓の病理組織学的変化は認められず、ヒトにおいて障害を発現するリスクは低いと評価された）を示したことから、既存の尿酸排泄促進薬を上回る資質を兼ね備えている。Dotinurad は痛風・高尿酸血症患者の治療に新たな選択肢を提供する薬剤であり、QOL 改善に貢献することを期待したい。

謝辞

博士論文の作成にあたり、終始懇切丁寧なるご指導・ご鞭撻を賜りました免疫微生物学講座の今井康之教授に厚く御礼申し上げます。また、ご助言・ご助力を賜りました同講座の黒羽子孝太講師に厚く御礼申し上げます。

博士論文の副査を引き受けて下さり、ご助言・ご高閲を賜りました生化学講座の鈴木隆教授、薬理学講座の石川智久教授、薬剤学講座の尾上誠良教授に厚く御礼申し上げます。

本研究の創案及び実施にあたり、ご指導・ご鞭撻を賜りました株式会社富士薬品の岩永崇博士、芦澤直樹博士、松本浩二博士に厚く御礼申し上げます。また、本研究の実施にあたり有益なご助言・ご助力を賜りました株式会社富士薬品の元木啓介氏に厚く御礼申し上げます。

本研究の実施にあたり、ご助力を賜りました株式会社富士薬品の近松典子氏、酒井美来氏、萩原千晴氏、宮本和美氏に厚く御礼申し上げます。また、本研究に対して有益なご助言を賜りました持田製薬株式会社の橋場雅道博士、齋藤亮博士、株式会社富士薬品の齋藤和宏氏に厚く御礼申し上げます。

引用文献

- 医薬品医療機器総合機構. 医薬品開発と適正な情報提供のための薬物相互作用ガイドライン. 2018年.
- 宇治康明, 柏崎禎夫, 段孝, 酒井雅宏, 深沢宣, 折笠祐子, 神山博, 岡崎彬. 健常成人男子における AA-193 連続経口投与時の安全性, 薬物動態および薬力学的検討. 臨床医薬. 1994年 10巻. p1057-76.
- サラゾピリン®錠 500 mg 医薬品インタビューフォーム. 2014年2月改訂 (第6版).
- トピロリック®錠 20 mg、トピロリック®錠 40 mg、トピロリック®錠 60 mg 医薬品インタビューフォーム. 2016年6月改訂 (第5版).
- 厚生労働省. 平成28年国民生活基礎調査. 2016年.
- 中村徹. 高尿酸血症・痛風の診療. メディカルレビュー社. 2003年. p21-39.
- 日本痛風・核酸代謝学会ガイドライン改定委員会. 高尿酸血症・痛風の診療ガイドライン (第3版). 診断と治療社. 2018年. p48-51: Clinical Question 2, p110-3: 尿酸降下薬の種類と選択.
- ベネシッド®錠 250 mg 医薬品インタビューフォーム. 2011年7月改訂 (第5版).
- Ahn SO, Ohtomo S, Kiyokawa J, Nakagawa T, Yamane M, Lee KJ, Kim KH, Kim BH, Tanaka J, Kawabe Y, Horiba N. Stronger uricosuric effects of the novel selective URAT1 Inhibitor UR 1102 lowered plasma urate in tufted capuchin monkeys to a greater extent than benzbromarone. *J Pharmacol Exp Ther* 2016, 357: 157-66.
- Biber J, Stieger B, Haase W, Murer H. A high yield preparation for rat kidney brush border membranes. Different behaviour of lysosomal markers. *Biochim Biophys Acta* 1981, 647: 169-76.
- Cundy KC, Petty BG, Flaherty J, Fisher PE, Polis MA, Wachsman M, Lietman PS, Lalezari JP, Hitchcock MJ, Jaffe HS. Clinical pharmacokinetics of cidofovir in human immunodeficiency virus-infected patients. *Antimicrob Agents Chemother* 1995, 39: 1247-52.
- Dan T, Koga H, Onuma E, Tanaka H, Sato H, Aoki B. The activity of AA-193, a new uricosuric agent, in animals. *Adv Exp Med Biol* 1989, 253A: 301-8.

- Dinour D, Gray NK, Campbell S, Shu X, Sawyer L, Richardson W, Rechavi G, Amariglio N, Ganon L, Sela BA, Bahat H, Goldman M, Weissgarten J, Millar MR, Wright AF, Holtzman EJ. Homozygous SLC2A9 mutations cause severe renal hypouricemia. *J Am Soc Nephrol* 2010, 21: 64–72.
- Enomoto A, Kimura H, Chairoungdua A, Shigeta Y, Jutabha P, Cha SH, Hosoyamada M, Takeda M, Sekine T, Igarashi T, Matsuo H, Kikuchi Y, Oda T, Ichida K, Hosoya T, Shimokata K, Niwa T, Kanai Y, Endou H. Molecular identification of a renal urate anion exchanger that regulates blood urate levels. *Nature* 2002, 417: 447–52.
- Fanelli GM, Bohn DL, Russo HF. Renal clearance of uric acid in nonhuman primates. *Comp Biochem Physiol* 1970, 33: 459–64.
- Food and drug administration, center for drug evaluation and research. Pharmacology review(s), Application Number: 207988Orig1s000 (Lesinurad). 2015, p34.
- Friedman TB, Polanco GE, Appold JC, Mayle JE. On the loss of uricolytic activity during primate evolution-I. Silencing of urate oxidase in a hominoid ancestor. *Comp Biochem Physiol B* 1985, 81: 653–9.
- Gerdan V, Akkoc N, Ucan ES, Bulac Kir S. Paradoxical increase in uric acid level with allopurinol use in pyrazinamide-induced hyperuricemia. *Singap Med J* 2013, 54: e125–6.
- Gotanda K, Tokumoto T, Hirota T, Fukae M, Ieiri I. Sulfasalazine disposition in a subject with 376C>T (nonsense mutation) and 421C>A variants in the ABCG2 gene. *Br J Clin Pharmacol* 2015, 80: 1236–7.
- Hosomi A, Nakanishi T, Fujita T, Tamai I. Extra renal elimination of uric acid via intestinal efflux transporter BCRP/ABCG2. *PLoS One* 2012, 7: e30456.
- Hosoya T, Ohno I, Nomura S, Hisatome I, Uchida S, Fujimori S, Yamamoto T, Hara S. Effects of topiroxostat on the serum urate levels and urinary albumin excretion in hyperuricemic stage 3 chronic kidney disease patients with or without gout. *Clin Exp Nephrol* 2014, 18: 876–84.

- Ichida K, Hosoyamada M, Kamatani N, Kamitsuji S, Hisatome I, Shibasaki T, Hosoya T. Age and origin of the G774A mutation in SLC22A12 causing renal hypouricemia in Japanese. *Clin Genet* 2008, 74: 243–51.
- Ichida K, Hosoyamada M, Kimura H, Takeda M, Utsunomiya Y, Hosoya T, Endou H. Urate transport via human PAH transporter hOAT1 and its gene structure. *Kidney Int* 2003, 63: 143–55.
- Iseki K, Ikemiya Y, Inoue T, Iseki C, Kinjo K, Takishita S. Significance of hyperuricemia as a risk factor for developing ESRD in a screened cohort. *Am J Kidney Dis* 2004, 44: 642–50.
- Ishikawa T, Aw W, Kaneko K. Metabolic interactions of purine derivatives with human ABC transporter ABCG2: genetic testing to assess gout risk. *Pharmaceuticals (Basel)* 2013, 6: 1347–60.
- Iwanaga T, Sato M, Maeda T, Ogihara T, Tamai I. Concentration-dependent mode of interaction of angiotensin II receptor blockers with uric acid transporter. *J Pharmacol Exp Ther* 2007, 320: 211–7.
- Janssen CA, Oude Voshaar MAH, Vonkeman HE, Jansen TLTA, Janssen M, Kok MR, Radovits B, van Durme C, Baan H, van de Laar MAFJ. Anakinra for the treatment of acute gout flares: a randomized, double-blind, placebo-controlled, active-comparator, non-inferiority trial. *Rheumatology (Oxford)* 2019, in press (DOI: 10.1093/rheumatology/key402).
- Jullien V, Tréluyer JM, Pons G, Rey E. Determination of tenofovir in human plasma by high-performance liquid chromatography with spectrofluorimetric detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2003, 785: 377–81.
- Jutabha P, Anzai N, Kimura T, Taniguchi A, Urano W, Yamanaka H, Endou H, Sakurai H. Functional analysis of human sodium-phosphate transporter 4 (NPT4/SLC17A3) polymorphisms. *J Pharmacol Sci* 2011, 115: 249–53.
- Kimura K, Hosoya T, Uchida S, Inaba M, Makino H, Maruyama S, Ito S, Yamamoto T, Tomino Y, Ohno I, Shibagaki Y, Iimuro S, Imai N, Kuwabara M, Hayakawa H, Ohtsu H, Ohashi Y; FEATHER Study Investigators. Febuxostat therapy for patients with stage 3 CKD and asymptomatic hyperuricemia: a randomized trial. *Am J Kidney Dis* 2018, 72: 798–810.

- Klotz U. Clinical pharmacokinetics of sulphasalazine, its metabolites and other prodrugs of 5-aminosalicylic acid. *Clin Pharmacokinet* 1985, 10: 285–302.
- Kosa RE, Lazzaro S, Bi YA, Tierney B, Gates D, Modi S, Costales C, Rodrigues AD, Tremaine LM, Varma MV. Simultaneous assessment of transporter-mediated drug–drug interactions using a probe drug cocktail in *Cynomolgus* monkey. *Drug Metab Dispos* 2018, 46: 1179–89.
- Kuo CF, Grainge MJ, Zhang W, Doherty M. Global epidemiology of gout: prevalence, incidence and risk factors. *Nat Rev Rheumatol* 2015, 11: 649–662.
- Loeb JN. The influence of temperature on the solubility of monosodium urate. *Arthritis Rheum* 1972, 15: 189-92.
- Martinon F, Pétrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* 2006, 440: 237–41.
- Matsumoto K, Okamoto K, Ashizawa N, Nishino T. FYX-051: a novel and potent hybrid-type inhibitor of xanthine oxidoreductase. *J Pharmacol Exp Ther* 2011, 336: 95–103.
- Matsuo H, Takada T, Ichida K, Nakamura T, Nakayama A, Ikebuchi Y, Ito K, Kusanagi Y, Chiba T, Tadokoro S, Takada Y, Oikawa Y, Inoue H, Suzuki K, Okada R, Nishiyama J, Domoto H, Watanabe S, Fujita M, Morimoto Y, Naito M, Nishio K, Hishida A, Wakai K, Asai Y, Niwa K, Kamakura K, Nonoyama S, Sakurai Y, Hosoya T, Kanai Y, Suzuki H, Hamajima N, Shinomiya N. Common defects of ABCG2, a high-capacity urate exporter, cause gout: a function-based genetic analysis in a Japanese population. *Sci Transl Med* 2009, 1: 5-11.
- Miner JN, Tan PK, Hyndman D, Liu S, Iverson C, Nanavati P, Hagerty DT, Manhard K, Shen Z, Girardet JL, Yeh LT, Terkeltaub R, Quart B. Lesinurad, a novel, oral compound for gout, acts to decrease serum uric acid through inhibition of urate transporters in the kidney. *Arthritis Res Ther* 2016, 18: 214.
- Misawa T, Saitoh T, Kozaki T Park S, Takahama M, Akira S. Resveratrol inhibits the acetylated α -tubulin-mediated assembly of the NLRP3-inflammasome. *Int Immunol* 2015, 27: 425–34.

- Miyata H, Takada T, Toyoda Y, Matsuo H, Ichida K, Suzuki H. Identification of febuxostat as a new strong ABCG2 inhibitor: potential applications and risks in clinical situations. *Front Pharmacol* 2016, 7: 518.
- Naesens L, Balzarini J, Bischofberger N, De Clercq E. Antiretro viral activity and pharmacokinetics in mice of oral bis(pivaloyloxymethyl)-9-(2-phosphonylmethoxyethyl)adenine, the bis(pivaloyloxymethyl) ester prodrug of 9-(2-phosphonylmethoxyethyl)adenine. *Antimicrob Agents Chemother* 1996, 40: 22–8.
- Obermayr RP, Temml C, Gutjahr G, Knechtelsdorfer M, Oberbauer R, Klauser Braun R. Elevated uric acid increases the risk for kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2008, 19: 2407–13.
- Parks DA, Granger DN. Xanthine oxidase: biochemistry, distribution and physiology. *Acta Physiol Scand Suppl* 1986, 548: 87–99.
- Roch-Ramel F, Guisan B, Diezi J. Effects of uricosuric and antiuricosuric agents on urate transport in human brush-border membrane vesicles. *J Pharmacol Exp Ther* 1997, 280: 839–45.
- Roddy E, Doherty M. Gout and osteoarthritis. *Joint Bone Spine* 2012, 79: 425–7.
- Santer R, Kinner M, Lassen CL, Schneppenheim R, Eggert P, Bald M, Brodehl J, Daschner M, Ehrlich JH, Kemper M, Li Volti S, Neuhaus T, Skovby F, Swift PG, Schaub J, Klaerke D. Molecular analysis of the SGLT2 gene in patients with renal glucosuria. *J Am Soc Nephrol* 2003, 14: 2873–82.
- Sato S, Tatsumi K, Nishino T. A novel xanthine dehydrogenase inhibitor (BOF-4272). *Adv Exp Med Biol* 1991, 309A: 135–8.
- Schlesinger N, Mysler E, Lin HY, De Meulemeester M, Rovensky J, Arulmani U, Balfour A, Krammer G, Sallstig P, So A. Canakinumab reduces the risk of acute gouty arthritis flares during initiation of allopurinol treatment: results of a double-blind, randomised study. *Ann Rheum Dis* 2011, 70: 1264–71.
- Schumacher HR Jr, Sundy JS, Terkeltaub R, Knapp HR, Mellis SJ, Stahl N, Yancopoulos GD, Soo Y, King-Davis S, Weinstein SP, Radin AR; 0619 Study Group. Riloncept (interleukin-1 trap) in the prevention of acute gout flares during initiation of urate-lowering therapy: results of a phase II randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum* 2012, 64: 876–84.

- Shimo T, Ashizawa N, Moto M, Iwanaga T, Nagata O. Study on species differences in nephropathy induced by FYX-051, a xanthine oxidoreductase inhibitor. *Arch Toxicol* 2011, 85: 505–12.
- Shimo T, Ashizawa N, Moto M, Matsumoto K, Iwanaga T, Nagata O. FYX-051, a xanthine oxidoreductase inhibitor, induces nephropathy in rats, but not in monkeys. *Toxicol Pathol* 2009, 37: 438–45.
- Shin HJ, Takeda M, Enomoto A, Fujimura M, Miyazaki H, Anzai N, Endou H. Interactions of urate transporter URAT1 in human kidney with uricosuric drugs. *Nephrology* 2011, 16: 156–62.
- Shinosaki T, Inagaki H, Nakai T, Yamashita T, Yonetani Y. Circadian rhythm of plasma uric acid and handling stress-induced hyperuricemia in conscious cebus monkeys. *Jpn J Pharmacol* 1992, 58: 443–50.
- Sinclair DS, Fox IH. The pharmacology of hypouricemic effect of benzbromarone. *J Rheumatol* 1975, 2: 437–45.
- Skeith MD, Healey LA. Urate clearance in Cebus monkeys. *Am J Physiol* 1968, 214: 582–4.
- Sorensen LB, Levinson DJ. Origin and extrarenal elimination of uric acid in man. *Nephron* 1975, 14: 7-20.
- Stalpleton FB, Arant BS Jr. Ontogeny of renal uric acid excretion in the mongrel puppy. *Pediatr Res* 1981, 15: 1513–6.
- Takeda M, Narikawa S, Hosoyamada M, Cha SH, Sekine T, Endou H. Characterization of organic anion transport inhibitors using cells stably expressing human organic anion transporters. *Eur J Pharmacol* 2001, 419: 113–20.
- Tan PK, Liu S, Gunic E, Miner JN. Discovery and characterization of verinurad, a potent and specific inhibitor of URAT1 for the treatment of hyperuricemia and gout. *Sci Rep* 2017, 7: 665.
- Terkeltaub R, Bushinsky DA, Becker MA. Recent developments in our understanding of the renal basis of hyperuricemia and the development of novel antihyperuricemic therapeutics. *Arthritis Res Ther* 2006, 8(Suppl 1): S4.

- Van Aubel RA, Smeets PH, van den Heuvel JJ, Russel FG. Human organic anion transporter MRP4 (ABCC4) is an efflux pump for the purine end metabolite urate with multiple allosteric substrate binding sites. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005, 288: F327–33.
- Wu W, Bush KT, Nigam SK. Key role for the organic anion transporters, OAT1 and OAT3, in the in vivo handling of uremic toxins and solutes. *Sci Rep* 2017, 7: 4939.
- Yonetani Y, Ishii M, and Iwaki K. Hyperuricemia induced by some antihypertensives and uricosuric drugs in oxonate treated rats. *Jpn J Pharmacol* 1980, 30: 829–40.
- Yu T, Gutman AB. Uric acid nephrolithiasis in gout. Predisposing factors. *Ann Intern Med* 1967, 67: 1133–48.
- Yu TY, Jee JH, Bae JC, Jin SM, Baek JH, Lee MK, Kim JH. Serum uric acid: A strong and independent predictor of metabolic syndrome after adjusting for body composition. *Metabolism* 2016, 65: 432–40.