

薬剤性腎障害における小腸トランスポーターの
発現変化と基質薬物の吸収挙動に関する研究

令和3年度

北海道医療大学大学院薬学研究科

武 田 芙 蓉

SUMMARY

Various ATP-binding cassette (ABC) and solute carrier (SLC) transporters have been identified in the vital organs and play significant roles in the pharmacokinetics of clinically relevant drugs, often becoming key factors in unfavorable drug-drug interactions. It has been reported that their expression and/or functions are modified markedly across various diseases. For example, the expression of transporters on the apical and basal membranes of renal tubular cells is modulated under acute kidney injury (AKI). However, little is known about alterations in non-renal transporters under AKI conditions. This study aimed to investigate the changes in the expression/function of intestinal efflux transporters, P-glycoprotein (P-gp) and breast cancer resistance protein (Bcrp), and intestinal influx transporters, organic anion transporting polypeptide (Oatp) 1a2 and Oatp2b1, in cisplatin (CDDP)- or gentamicin (GM)-induced AKI rats. Possible alterations in the intestinal absorption of typical substrates for these transporters were also investigated.

1) Alterations in the expression/function of intestinal transporters in rats with CDDP-induced AKI

On day 3 after CDDP (5 mg/kg) administration to SD male rats, hematoxylin-eosin staining revealed slight atrophy in the jejunum and ileum, without any modification in theophylline absorption *via* simple diffusion. Western blotting showed that the expression levels of P-gp and Oatp2b1 were down-regulated in the CDDP-induced AKI rats, whereas that of Oatp1a2 was up-regulated. There was no change in Bcrp expression. In spite of the significant decrease in ileal P-gp expression, the absorption of three P-gp substrates (6 α -methylprednisolone, rhodamine 123, and gatifloxacin) in the CDDP-induced AKI rats remained almost identical to that in the normal rats. These results suggested that, when the expression of intestinal P-gp is down-regulated in CDDP-induced AKI rats, P-gp maintains its potency as the gatekeeper against the absorption of xenobiotics by amplifying individual transport capacities. The plasma levels of pravastatin (PRV), which is known to be a common substrate for Oatp1a2 and Oatp2b1, was significantly lower than that in normal rats after the intraluminal administration of these polypeptides to CDDP-induced AKI rats, implying that PRV absorption is

governed to a greater degree by Oatp2b1 than by Oatp1a2. Such a deduction in the plasma levels was not observed in the case of fexofenadine (FEX), which can be attributed to the offset of absorptive FEX movements *via* increased Oatp1a2 and decreased Oatp2b1.

2) Alterations in the expression and function of intestinal transporters in rats with GM-induced AKI

AKI was induced in the rats by the intraperitoneal administration of GM at a dose of 1,000 mg/kg. On day 4 after GM administration, the mean Scr level was elevated approximately three-fold. At this point of time, the expression of ileal P-gp was up-regulated but no change was observed in Oatp2b1 expression. In spite of the increase in ileal P-gp, there were no alterations in the absorption of MP or rhodamine 123. This finding, which was in opposition to that in CDDP-induced AKI rats, suggested that, when the expression of intestinal P-gp is up-regulated in GM-induced AKI rats, P-gp maintains its potency as the gatekeeper against the absorption of xenobiotics by attenuating individual transport capacities. PRV absorption remained at a level comparable to that in normal rats, reflecting the absence of any modification in Oatp2b1 expression/function in GM-induced AKI rats.

In conclusion, this study provides several relevant findings as follows: 1) intestinal transporters are regulated differently under AKI conditions, in a possibly drug-dependent manner, and 2) when intestinal P-gp is differently up- or down-regulated in drug-induced AKI, the efflux transporter maintains its gatekeeper function against the intestinal absorption of xenobiotics by amplifying or attenuating its transport capacity. This second finding, in particular, is considered to be a novel feature of P-gp that widely governs drug pharmacokinetics in the body. These findings thus afford useful information toward the proper management of patients with drug-induced AKI.

略語集

本文では以下の略語を使用した.

ABC: ATP-binding cassette, ATP 結合カセット

AKI: acute kidney injury, 急性腎障害

ALF: acute liver failure, 急性肝不全

APS: ammonium persulfate, 過硫酸アンモニウム

AUC: area under the plasma concentration-time curve, 血漿中濃度-時間曲線下面積

BBB: blood-brain barrier, 血液脳関門

BCRP: breast cancer resistance protein, 乳がん耐性タンパク質

BSA: bovine serum albumin, ウシ血清アルブミン

CDDP: cisplatin, シスプラチン

CKD: chronic kidney disease, 慢性腎臓病

CYP: cytochrome P450, シトクロム P450

FEX: fexofenadine, フェキソフェナジン

EMA: European Medicines Agency, 欧州医薬品庁

FDA: Food and Drug Administration, アメリカ食品医薬品局

GFLX: gatifloxacin, ガチフロキサシン

GM: gentamicin, ゲンタマイシン

HE: hematoxyline and eosin, ヘマトキシリン・エオシン

HPLC: high performance liquid chromatography, 高速液体クロマトグラフィー

HRP: horseradish peroxidase, ホースラディッシュペルオキシダーゼ

IS: indoxyl sulfate, インドキシル硫酸

MBAA: *N, N'*-methylenebis(acrylamide), *N, N'*-メチレンビス (アクリルアミド)

MP: 6 α -methylprednisolone, 6 α -メチルプレドニゾロン

MRP: multidrug resistance associated protein, 多剤耐性関連タンパク質

NFD: nifedipine, ニフェジピン

OATP: organic anion transporting polypeptide, 有機アニオン輸送ポリペプチド

OCT: organic cation transporter, 有機カチオン輸送担体

OCTN: carnitine/organic cation transporter,

カルニチン/有機カチオントランスポーター

P-gp: P-glycoprotein, P-糖タンパク質

PVDF: polyvinylidene difluoride, ポリフッ化ビニリデン

PRV: pravastatin, プラバスタチン

RHO: rhodamine 123, ローダミン 123

Scr: serum creatin, 血清クレアチニン

SD: Sprague-Dawley, スプラーグドローリー

SDS: sodium dodecyl sulfate, ドデシル硫酸ナトリウム

SDS-PAGE: SDS-polyacrylamide gel electrophoresis,

ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

SLC: solute carrier, 溶質キャリア

TBS: tris-buffered saline, トリス緩衝生理食塩水

TEMED: *N, N, N', N'*-tetramethylethylenediamine,

N, N, N', N'-テトラメチルエチレンジアミン

TH: theophylline, テオフィリン

Tris: tris(hydroxymethyl)aminomethane, トリスヒドロキシメチルアミノメタン

目次

序論.....	1
第1部 シスプラチン誘発性急性腎障害 (AKI) ラットにおける	
トランスポーターの発現変動と基質薬物の消化管吸収性の変化.....	4
第1章 シスプラチン誘発性 AKI ラットにおける小腸粘膜の形態学的変化	4
第1節 緒言	4
第2節 実験材料及び実験方法	5
第1項 使用薬物及び試薬	5
第2項 実験動物	5
第3項 シスプラチン誘発性 AKI ラットの作製.....	5
第4項 小腸粘膜の形態学的変化の観察	6
第5項 健常ラット及びシスプラチン誘発性 AKI ラットにおける	
テオフィリンの消化管吸収性の検討	6
(1) 薬物溶液の調製.....	6
(2) 吸収実験.....	7
(3) 薬物定量.....	7
第6項 統計処理.....	8
第3節 実験結果	8
第1項 シスプラチン腹腔内投与による Scr 値の変化	8
第2項 シスプラチン腹腔内投与による小腸粘膜の形態学的変化.....	8
第3項 健常ラットとシスプラチン誘発性 AKI ラットにおける	
テオフィリンの消化管吸収性の比較	10
第4節 考察	13
第2章 シスプラチン誘発性 AKI ラットにおけるトランスポーターの	
発現変動.....	15
第1節 緒言	15
第2節 実験材料及び実験方法	17
第1項 使用薬物及び試薬	17
第2項 AKI ラットの作製	18

第3項	健常ラット及びシスプラチン誘発性 AKI ラットにおける 小腸 P-gp 及び Bcrp の発現量の確認.....	18
(1)	薬物溶液の調製.....	18
(2)	ラット十二指腸, 空腸, 及び回腸からのタンパク抽出.....	19
(3)	タンパク定量.....	19
(4)	SDS-PAGE.....	19
(5)	転写.....	20
(6)	ブロッキング.....	21
(7)	一次抗体反応.....	21
(8)	二次抗体反応.....	21
(9)	現像.....	21
第4項	健常ラット及びシスプラチン誘発性 AKI ラットにおける 小腸 Oatp1a2 及び Oatp2b1 の発現量の確認.....	22
第5項	統計処理.....	22
第3節	実験結果.....	22
第1項	健常ラットとシスプラチン誘発性 AKI ラットにおける 小腸 P-gp 及び Bcrp の発現量の比較.....	22
第2項	健常ラットとシスプラチン誘発性 AKI ラットにおける 小腸 Oatp1a2 及び Oatp2b1 の発現量の比較.....	25
第4節	考察.....	28
第3章	シスプラチン誘発性 AKI ラットにおける P-gp 基質薬物の 消化管吸収性の検討.....	31
第1節	緒言.....	31
第2節	実験材料及び実験方法.....	32
第1項	使用薬物及び試薬.....	32
第2項	AKI ラットの作製.....	33
第3項	健常ラット及びシスプラチン誘発性 AKI ラットにおける 6 α -メチルプレドニゾロンの消化管吸収性の検討.....	33
(1)	薬物溶液の調製.....	33
(2)	ラット小腸各部位からの吸収実験.....	33

(3) 薬物定量.....	34
第4項 健常ラット及びシスプラチン誘発性 AKI ラットにおける ローダミン 123 の消化管吸収性の検討	34
(1) 薬物溶液の調製.....	34
(2) 吸収実験.....	34
(3) 薬物定量.....	35
第5項 健常ラット及びシスプラチン誘発性 AKI ラットにおける ガチフロキサシンの消化管吸収性の検討	35
(1) 薬物溶液の調製.....	35
(2) 吸収実験.....	35
(3) 薬物定量.....	35
第6項 統計処理	36
第3節 実験結果	37
第1項 健常ラットとシスプラチン誘発性 AKI ラットにおける 6 α -メチルプレドニゾロンの消化管吸収性の比較.....	37
第2項 健常ラットとシスプラチン誘発性 AKI ラットにおける ローダミン 123 の消化管吸収性の比較	38
第3項 健常ラットとシスプラチン誘発性 AKI ラットにおける ガチフロキサシンの消化管吸収性の比較	40
第4節 考察	43
第4章 シスプラチン誘発性 AKI ラットにおける Oatp1a2 及び Oatp2b1 基質 薬物プラバスタチンの消化管吸収性の検討	45
第1節 緒言	45
第2節 実験材料及び実験方法	46
第1項 使用薬物及び試薬	46
第2項 AKI ラットの作製	46
第3項 健常ラット及びシスプラチン誘発性 AKI ラットにおける プラバスタチンの消化管吸収性及び血漿中濃度推移の検討... ..	46
(1) 薬物溶液の調製.....	46
(2) 吸収実験.....	46

(3) 薬物定量.....	47
(4) AUC の算出	48
第 4 項 健常ラット及びシスプラチン誘発性 AKI ラットへの プラバスタチン静脈内投与後の血漿中濃度推移の検討.....	48
(1) 薬物溶液の調製.....	48
(2) ラットへのプラバスタチン静脈内投与実験	48
(3) 薬物定量.....	48
(4) AUC の算出	48
第 5 項 統計処理.....	48
第 3 節 実験結果	49
第 1 項 健常ラットとシスプラチン誘発性 AKI ラットにおける プラバスタチンの消化管吸収性の比較	49
第 2 項 健常ラットとシスプラチン誘発性 AKI ラットにおける プラバスタチンの血漿中濃度推移の比較	51
第 3 項 健常ラットとシスプラチン誘発性 AKI ラットへの プラバスタチン静脈内投与後の血漿中濃度推移の比較.....	52
第 4 節 考察	53
第 5 章 シスプラチン誘発性 AKI ラットにおける P-gp, Oatp1a2 及び Oatp2b1 基質薬物フェキソフェナジンの消化管吸収性の検討.....	55
第 1 節 緒言	55
第 2 節 実験材料及び実験方法	56
第 1 項 使用薬物及び試薬	56
第 2 項 AKI ラットの作製	56
第 3 項 健常ラット及びシスプラチン誘発性 AKI ラットにおける フェキソフェナジンの消化管吸収性及び血漿中濃度推移 の検討.....	56
(1) 薬物溶液の調製.....	56
(2) 吸収実験.....	56
(3) 薬物定量.....	57
(4) AUC の算出	57

第4項	健常ラット及びシスプラチン誘発性 AKI ラットへの フェキソフェナジン静脈内投与後の血漿中濃度推移の検討...	57
(1)	薬物溶液の調製.....	57
(2)	ラットへのフェキソフェナジン静脈内投与実験.....	57
(3)	薬物定量.....	58
(4)	AUC の算出.....	58
第5項	統計処理.....	58
第3節	実験結果.....	58
第1項	健常ラットとシスプラチン誘発性 AKI ラットにおける フェキソフェナジンの消化管吸収性の比較.....	58
第2項	健常ラットとシスプラチン誘発性 AKI ラットにおける フェキソフェナジンの血漿中濃度推移の比較.....	60
第3項	健常ラットとシスプラチン誘発性 AKI ラットへの フェキソフェナジン静脈内投与後の血漿中濃度推移の比較...	61
第4節	考察.....	62
第6章	シスプラチン誘発性 AKI ラットにおける小腸 Cyp3a の発現変化と 代謝能に関する検討.....	64
第1節	緒言.....	64
第2節	実験材料及び実験方法.....	65
第1項	使用薬物及び試薬.....	65
第2項	AKI ラットの作製.....	65
第3項	健常ラット及びシスプラチン誘発性 AKI ラットにおける 小腸 Cyp3a の発現量の確認.....	65
第4項	健常ラット及びシスプラチン誘発性 AKI ラットにおける ニフェジピンの血漿中濃度推移の検討.....	66
(1)	薬物溶液の調製.....	66
(2)	吸収実験.....	66
(3)	薬物定量.....	66
(4)	AUC の算出.....	67
第5項	統計処理.....	67

第3節	実験結果	67
第1項	健常ラットとシスプラチン誘発性 AKI ラットにおける 小腸 Cyp3a の発現量の比較	67
第2項	健常ラットとシスプラチン誘発性 AKI ラットにおける ニフェジピンの血漿中濃度推移の比較	69
第4節	考察	70
第2部	ゲンタマイシン誘発性急性腎障害 (AKI) ラットにおける トランスポーターの発現変動と基質薬物の消化管吸収挙動の検討... 72	
第1章	ゲンタマイシン誘発性 AKI ラットにおけるトランスポーターの 発現変動	72
第1節	緒言	72
第2節	実験材料及び実験方法	73
第1項	使用薬物及び試薬	73
第2項	実験動物	73
第3項	ゲンタマイシン誘発性 AKI ラットの作製	73
第4項	インドキシル硫酸の定量	74
第5項	健常ラット及びゲンタマイシン誘発性 AKI ラットにおける 小腸 P-gp 及び Oatp2b1 の発現量の確認	74
第6項	統計処理	74
第3節	実験結果	75
第1項	ゲンタマイシン腹腔内投与による Scr 値の変化	75
第2項	ゲンタマイシン腹腔内投与による血漿中 IS 濃度の変化	75
第3項	健常ラットとゲンタマイシン誘発性 AKI ラットにおける 小腸 P-gp の発現量の比較	76
第4項	健常ラットとゲンタマイシン誘発性 AKI ラットにおける 小腸 Oatp2b1 の発現量の比較	76
第4節	考察	79
第2章	ゲンタマイシン誘発性 AKI ラットにおける P-gp 基質薬物の 消化管吸収性の検討	82

第1節	緒言	82
第2節	実験材料及び実験方法	82
第1項	使用薬物及び試薬	82
第2項	AKI ラットの作製	82
第3項	健常ラット及びゲンタマイシン誘発性 AKI ラットにおける 6 α -メチルプレドニゾロンの消化管吸収性の検討.....	82
(1)	薬物溶液の調製.....	82
(2)	吸収実験.....	82
(3)	薬物定量.....	83
第4項	健常ラット及びゲンタマイシン誘発性 AKI ラットにおける ローダミン 123 の消化管吸収性の検討	83
(1)	薬物溶液の調製.....	83
(2)	吸収実験.....	83
(3)	薬物定量.....	83
第5項	統計処理	83
第3節	実験結果	83
第1項	健常ラットとゲンタマイシン誘発性 AKI ラットにおける 6 α -メチルプレドニゾロンの消化管吸収性の比較	83
第2項	健常ラットとゲンタマイシン誘発性 AKI ラットにおける ローダミン 123 の消化管吸収性の比較	84
第4節	考察	86
第3章	ゲンタマイシン誘発性 AKI ラットにおける Oatp2b1 基質薬物 プラバスタチンの消化管吸収性の検討.....	88
第1節	緒言	88
第2節	実験材料及び実験方法	88
第1項	使用薬物及び試薬	88
第2項	AKI ラットの作製	88
第3項	健常ラット及びゲンタマイシン誘発性 AKI ラットにおける プラバスタチンの消化管吸収性及び血漿中濃度推移の検討...	88
(1)	薬物溶液の調製.....	88

(2) 吸収実験.....	89
(3) 薬物定量.....	89
(4) AUC の算出.....	89
第 4 項 健常ラット及びゲンタマイシン誘発性 AKI ラットへの プラバスタチン静脈内投与後の血漿中濃度推移の検討.....	89
(1) 薬物溶液の調製.....	89
(2) ラットへのプラバスタチン静脈内投与実験.....	89
(3) 薬物定量.....	89
(4) AUC の算出.....	89
第 5 項 統計処理.....	89
第 3 節 実験結果.....	90
第 1 項 健常ラットとゲンタマイシン誘発性 AKI ラットにおける プラバスタチンの消化管吸収性の比較.....	90
第 2 項 健常ラットとゲンタマイシン誘発性 AKI ラットにおける プラバスタチンの血漿中濃度推移の比較.....	92
第 3 項 健常ラットとゲンタマイシン誘発性 AKI ラットへの プラバスタチン静脈内投与後の血漿中濃度推移の比較.....	93
第 4 節 考察.....	94
総括.....	95
謝辞.....	97
引用文献.....	98

序 論

生体内には、ATP の加水分解により生じるエネルギーを駆動力とし、主に細胞内からの異物排出に関与する ATP 結合カセット (ATP-binding cassette: ABC) トランスポーターが分布し、通常これらは efflux トランスポーターとして分類されている。また生体内には、イオン勾配及び細胞内外の電位差を駆動力とし、主に細胞内への基質取り込みに関与する溶質キャリア (solute carrier: SLC) ファミリートランスポーターが存在し、これらは一般に influx トランスポーターとして分類されている。これらの ABC トランスポーター及び SLC トランスポーターは、小腸や脳、肝や腎など様々な臓器で確認されており¹⁻³⁾、薬物の体内動態に深く関与し、薬物療法における有効性や安全性ばかりでなく薬物間相互作用の重要な要因となることが報告されている。^{4,5)} そのため、これまでに ABC トランスポーターや SLC トランスポーターの基質となる薬物を特定するための研究が数多く行われてきた。さらに種々の疾患時に、関連するトランスポーターの発現量や機能が変化することが報告され、臨床上重要な観点となっている。例えば、SLC トランスポーターの一種である有機アニオン輸送ポリペプチド (organic anion transporting polypeptide: OATP) のうち、OATP1B1 は乳がんや肺がん、大腸がん、前立腺がん、膵がんの細胞膜上で過剰に発現する。⁶⁾ 一方で、原発性硬化性胆管炎や肝硬変の患者の組織では OATP1B1 の発現量が低下する。^{7,8)} また、OATP2B1 は、腸管細胞、⁹⁾ 肝細胞、¹⁰⁾ 骨格筋細胞、¹¹⁾ 胎盤の合体栄養細胞¹²⁾ などに広く発現しているが、肝がん罹患した場合にこの OATP2B1 の発現量は減少する¹³⁾ のに対し、クローン病や潰瘍性大腸炎の患者の腸における発現量は増加する。¹⁴⁾ また、代表的な ABC トランスポーターである P-糖タンパク質 (P-glycoprotein: P-gp) は、抗がん剤耐性となったがん細胞の他に、小腸や腎、脳、肝、胆管、副腎などに広く存在している。¹⁵⁻¹⁷⁾ Murakami ら¹⁸⁾ の最近の総説において、小腸に発現する P-gp が、大腸がんや下痢、潰瘍性大腸炎時には減少する一方、肝不全時やクローン病、ヒト免疫不全ウイルス感染時には増加することが示されている。さらに、P-gp と同様に腸や肝、腎などに発現している乳がん耐性タンパク質 (breast cancer resistance protein: BCRP)¹⁹⁾ は、実験的に糖尿病が誘発されたラットの血液脳関門 (blood-brain barrier: BBB) で発現量が低下することが示されている。²⁰⁾ このように様々な疾患時において薬

物トランスポーターの発現は複雑に制御されることが示唆されている。

薬剤性腎障害は薬物療法における有害事象の中で発生頻度が高く、²¹⁾ 入院患者の急性腎障害 (acute kidney injury: AKI) のうち 15~25%は薬物起因性であるとの報告がある。²²⁾ AKI は様々な薬物により引き起こされ、²³⁾ 特に非ステロイド性抗炎症薬、アミノグリコシド系抗菌薬、白金製剤、ヨード造影剤などで誘発リスクが高い。²⁴⁾ そのため日本では、医療従事者への薬剤性腎障害の啓発を目的として「薬剤性腎障害診療ガイドライン 2016」が作成された。²⁵⁾ そのガイドラインでは、薬剤性腎障害とは、薬剤の投与により新たに発症した腎障害、あるいは既存の腎障害のさらなる悪化を認める場合と定義され、腎障害の判定は AKI あるいは慢性腎臓病 (chronic kidney disease: CKD) の指針に準じる。また、薬剤性腎障害は発症機序に基づき、①中毒性腎障害、②アレルギー機序による急性間質性腎炎 (過敏性腎障害)、③薬剤による電解質異常、腎血流量減少などを介した間接毒性、④薬剤による結晶形成、結石形成による尿路閉塞性腎障害に分類される。また、腎の障害部位に基づき、①薬剤性糸球体障害、②薬剤性尿細管障害、③薬剤性腎間質障害、④薬剤性腎血管障害にも分類される。^{26, 27)} AKI は国際的なヘルスケア問題の一つである CKD のリスクを著しく上昇させることが知られ、^{28, 29)} CKD では、薬物療法に関連して腎やその他臓器でトランスポーターの発現量や機能が変化することが報告されている。^{30, 31)} 例えば、Naud ら³²⁾ は、CKD ラットを用いて小腸に発現する P-gp と多剤耐性関連タンパク質 (multidrug resistance associated protein: MRP) 2 の発現量が有意に低下する一方で、Oatp の発現量は変化しないことを示した。また Shinozaki ら³³⁾ は、CKD マウスでは小腸のカルニチン/有機カチオントランスポーター (carnitine/organic cation transporter: OCTN) 1 の発現量が低下していることを報告している。これらの結果は、CKD と小腸トランスポーターとの間にある連関を示唆しているが、その詳細は明らかにされていない。しかしながら、CKD とは対照的に、AKI を対象としてトランスポーターの発現変動を検討した研究は限られている。AKI におけるトランスポーター機能の変化に関する情報を蓄積することは、薬剤の適正使用を推進する上で大変重要であるにも関わらず、AKI を発症した実験動物の腎におけるトランスポーターの変動に関する報告がある。³⁴⁾ 一方、腎以外の組織に存在するトランスポーターへの影響については不明な点が多いのが現状

である。そこで本研究では、薬剤誘発性 AKI における小腸トランスポーターの発現と機能の変化を明らかにすることを目的とした。検討対象は P-gp, Bcrp, Oatp1a2 及び Oatp2b1 とし、これらトランスポーターのラット小腸における発現変動をウェスタンブロット法により、また基質薬物の吸収挙動の変化を *in situ loop* 法により検討した。第 1 部では、肺がんや胃がん、頭頸部がん、卵巣がん³⁶⁾ など幅広いがん種に対する化学療法で用いられる白金製剤のシスプラチン (cisplatin: CDDP) を用いて、第 2 部では、様々なグラム陰性菌感染症³⁶⁻³⁸⁾ に使用されるアミノグリコシド系抗菌薬のゲンタマイシン (gentamicin: GM) を用いて AKI を誘発させたラットを用いて種々の検討を行った。

第 1 部 シスプラチン誘発性急性腎障害 (AKI) ラットにおけるトランスポーターの発現変動と基質薬物の消化管吸収性の変化

第 1 章 シスプラチン誘発性 AKI ラットにおける小腸粘膜の形態学的変化

第 1 節 緒言

シスプラチン (CDDP) は、卵巣がん、膀胱がん、頭頸部がん、肺がん、胃がんなど多くのがん種を非特異的に標的とする。そのため、CDDP を使用した化学療法時には、その有害事象は全身に出現することが報告されている。³⁹⁾ 腎機能障害は CDDP による化学療法を受けている 2~4 割の患者に出現し、最も深刻な有害事象のうちの一つである。^{40,41)} また、その他にも CDDP による有害事象として骨髄抑制、神経障害、聴力障害、消化器障害等が知られている。³⁵⁾ これらのうち、消化器障害に関して、CDDP は高リスク催吐薬に分類されており⁴²⁾ 高頻度に重症度の高い悪心・嘔吐を引き起こす。⁴³⁾ また、これまでに CDDP によりラットに AKI を誘発させる方法が様々に報告されてきた。Wu ら⁴⁴⁾ は CDDP 5 mg/kg を週 1 回腹腔内投与することを 3 回繰り返し、Aydin ら⁴⁵⁾ は CDDP 7 mg/kg を腹腔内に単回投与し、また Yamamoto ら⁴⁶⁾ は CDDP 6 mg/kg を単回静脈内投与するなど、多様な CDDP 投与量及び投与スケジュールで実験的に AKI モデル作製をしている。本研究第 1 部では CDDP を 5 mg/kg で腹腔内に単回投与して AKI を誘発した。薬物の消化管吸収は、単純拡散とトランスポーター介在輸送で進行する。したがって、CDDP の投与で小腸に顕著な損傷が起こる場合、薬物の消化管吸収が影響を受ける可能性が考えられた。そこで第 1 章ではまず、CDDP 腹腔内投与後の小腸の形態学的変化を確認し、さらに単純拡散によるテオフィリン (theophylline: TH) の吸収に及ぼす影響について検討した。

第2節 実験材料及び実験方法

第1項 使用薬物及び試薬

本実験で用いた薬物及び試薬類は以下の通りである.

Cisplatin (シスプラチン注 50 mg 「日医工」) (日医工株式会社, 富山)

Theophylline (富士フィルム和光純薬株式会社, 大阪)

Lab Assay™ Creatinine (富士フィルム和光純薬株式会社, 大阪)

CDDP 及び TH の構造式を Fig. 1 に示す. その他の試薬及び溶媒は, 全て市販の特級規格品を用いた.

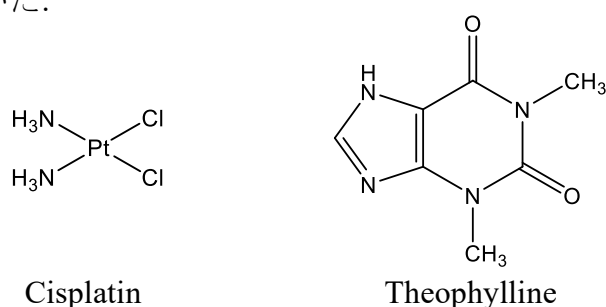


Fig. 1. Chemical Structures of Drugs Used in This Study

第2項 実験動物

実験動物には 10 週齢の Sprague-Dawley (SD) 系雄性ラット (ホクドー, 札幌) を用いた. ラットは北海道医療大学動物実験センター内にて人工照明による一定の明暗環境, 室温, 相対湿度下で飼育され, 水及び固形試料を自由摂取させた. 本研究における全ての動物実験は, 北海道医療大学動物実験規定に従って行った.

第3項 シスプラチン誘発性 AKI ラットの作製

CDDP 誘発性 AKI ラットは, Okabe⁴⁷⁾ らの方法に準拠し, CDDP (5 mg/kg) を SD ラット (300~420 g) の腹腔内に単回投与することにより作製した. CDDP 投与直前及び CDDP 投与 72 時間後に心臓より 1 mL ずつ採血した後, Lab Assay™ Creatinine を用い, ヤッフエ法により血清クレアチニン (serum creatine: Scr) 値を測定した. AKI 診療ガイドラインにおける KDIGO 基準⁴⁸⁾ を考慮して, CDDP 投与 72 時間後における Scr 値が CDDP 投与直前のラットと比較して 2 倍以上

に上昇したものを AKI ラットとして実験に供した.

第 4 項 小腸粘膜の形態学的変化の観察

15~18 時間絶食したラットをイソフルラン (富士フイルム和光純薬株式会社, 大阪) で吸入麻酔し, 十二指腸, 空腸, 及び回腸を摘出した. 小腸の内外を氷冷した生理食塩液で洗浄し, シート状に切開した後, 小腸各部位の上部を東大式縫合糸 (No. 2) で結紮し, 10% 中性緩衝ホルマリンにて固定した. その後の組織薄層切片の作成及びヘマトキシリン・エオシン (hematoxyline and eosin: HE) 染色は, 株式会社モルフォテクノロジー (札幌) に委託した. 組織切片は, 画像閲覧ソフトウェア (NDP.view2, ver. 2.4, 浜松ホトニクス, 静岡) にて観察した.

第 5 項 健常ラット及びシスプラチン誘発性 AKI ラットにおけるテオフィリンの消化管吸収性の検討

(1) 薬物溶液の調製

TH 溶液の調製には, Table 1 に示す組成からなる Tyrode 液を使用した. TH 溶液の濃度は 1 mM とし, 消化管内 pH を考慮して実験に使用する直前に再度 pH を 6.5 に調整した.

Table 1. Composition of Tyrode's Solution

NaCl	137 mM
KCl	3 mM
CaCl ₂ · 2H ₂ O	2 mM
MgCl ₂ · 6H ₂ O	1 mM
NaHCO ₃	12 mM
NaH ₂ PO ₄	0.4 mM
D-glucose	6 mM

pH was adjusted to 6.5 with 1N HCl or 1N NaOH.

(2) 吸収実験

吸収実験は Iwao ら⁴⁹⁾の方法に準拠し, *in situ* 小腸ループ法により行った. ラットを 15~18 時間絶食した後, イソフルランの吸入麻酔下にて, 解剖台に固定した. 腹部正中線に沿って開腹し, 胆汁流入による管腔内 pH や内液量の変動を避けるために, 胆管を予め東大式縫合糸 (No.2) にて結紮した. 胃幽門下 10 cm から回盲部上約 10 cm までに小腸ループ (約 60 cm) を作成し, ループ内を 37°C に温めた生理食塩液 50 mL で洗浄しながら, 残留内容物を除去した後, 空気を通してループ内の生理食塩液を排出し, ループの両端を東大式縫合糸 (No.2) で結紮した. 次に注射用シリンジ (容量 10 mL, 針サイズ 26G × 1/2") を用いてループ内に TH 溶液 6 mL を注入し, 直ちに腸管を腹腔内に戻した. なお, 体温低下による体力消耗を防ぐため, ラットはランプを用いて保温した. TH 投与 15 分又は 30 分後にループを速やかに小腸より単離し, 氷冷した生理食塩液で表面の血液を除去した. ループ内液を全量メスフラスコに回収し, 氷冷した Tyrode 液でループ内を洗浄しながら, 全量を 50 mL とした. また, 粘膜蓄積率を算出するためにループ内液回収後にループをシート状に切開し, 粘膜部分をスライドガラスで擦過した. この擦過物に氷冷した生理食塩液を加えてポリトロン (Kinematia, Kriens-Luzern, Switzerland) にてホモジナイズし全量を 50 mL とした. 得られた各試料は, 定量時まで -30°C で冷凍保存した.

(3) 薬物定量

TH の定量は HPLC 法にて行った. 試料の処理方法を Chart 1 に, HPLC 分析条件を Table 2 に示した.

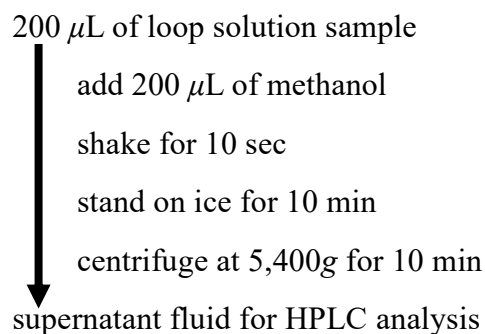


Chart 1. Procedure for Theophylline Assay

Table 2. HPLC Conditions for Theophylline Assay

Apparatus	: LC-10AT _{VP} (Shimadzu, Kyoto)
Column	: Inertsil ODS-3 (5 μ m, 4.6 \times 250 mm, GL Sciences, Tokyo)
Injection vol.	: 20 μ L
Column temp.	: 50°C
Detector	: SPD-6A UV (Shimadzu, Kyoto)
Wave length	: 280 nm
Flow rate	: 1.0 mL/min (retention time: 8 min)
Mobile phase	: 0.01 M CH ₃ COONa : CH ₃ CN = 9 : 1

第 6 項 統計処理

実験結果はすべて平均値 \pm 標準誤差 (mean \pm S.E.) で示した. また有意差検定は Student's *t*-test により行い, $p < 0.05$ をもって有意差ありとした.

第 3 節 実験結果

第 1 項 シスプラチン腹腔内投与による Scr 値の変化

CDDP 投与直前及び投与 72 時間後のラットにおける Scr 値を Table 3 に示した. CDDP 誘発性 AKI ラットの Scr 値は, 健常ラットと比較して高い値を示し, CDDP の単回腹腔内投与により腎障害が誘発されたことが示唆された.

Table 3. Scr Levels in Normal and CDDP-induced AKI Rats

	mg/dL
Normal rats	0.89 \pm 0.05
AKI rats	2.23 \pm 0.08

Values represent the mean \pm S.E. (n = 54).

第 2 項 シスプラチン腹腔内投与による小腸粘膜の形態学的変化

CDDP 投与 72 時間後のラット小腸各部位における HE 染色の結果を Fig. 2 に示した. 十二指腸では形態学的変化はほとんど認められなかった. また, 空腸及び回腸では絨毛が萎縮する傾向が見られたが, 著明な変化は見られなかった.

A. Duodenum

a. Normal rats



b. AKI rats

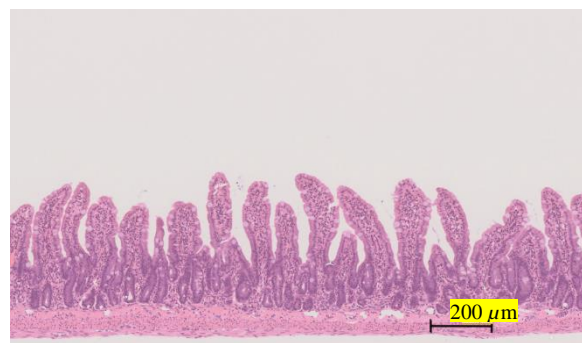


B. Jejunum

a. Normal rats



b. AKI rats



C. Ileum

a. Normal rats



b. AKI rats

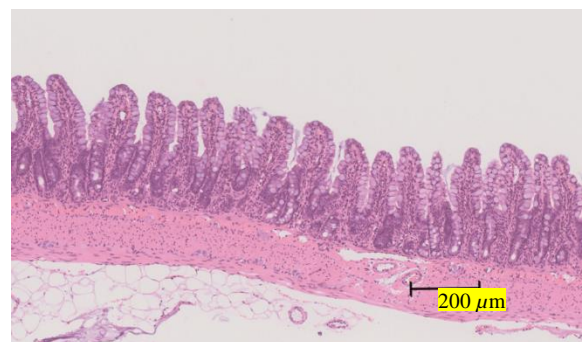


Fig. 2. Representative Microscopic Images of the Duodenum (A), Jejunum (B) and Ileum (C) Stained with Hematoxylin and Eosin

第3項 健常ラットとシスプラチン誘発性 AKI ラットにおけるテオフィリンの 消化管吸収性の比較

第2項で示された CDDP 誘発性 AKI ラットにおける小腸の形態学的変化が薬物の吸収性にどのような影響を及ぼすかを確認するために、単純拡散のモデル薬物として TH を用い、15 分又は 30 分間の吸収挙動を健常ラットと CDDP 誘発性 AKI ラットで比較した。TH 投与後 15 分の健常ラットにおける消失率、粘膜蓄積率及び消失率から粘膜蓄積率を差し引いて算出した正味吸収率はそれぞれ $83.1 \pm 4.0\%$ 、 $1.4 \pm 0.1\%$ 、 $81.8 \pm 4.0\%$ であった。一方、CDDP 誘発性 AKI ラットでは、消失率が $79.1 \pm 1.4\%$ 、粘膜蓄積率が $0.9 \pm 0.1\%$ 、正味吸収率が $78.2 \pm 1.4\%$ であった (Fig. 3)。TH 投与後 30 分の消失率、粘膜蓄積率及び正味吸収率は健常ラットでそれぞれ $93.4 \pm 0.6\%$ 、 $1.4 \pm 0.4\%$ 、 $92.0 \pm 0.9\%$ 、CDDP 誘発性 AKI ラットではそれぞれ、 $88.8 \pm 2.9\%$ 、 $1.2 \pm 0.1\%$ 、 $87.7 \pm 2.8\%$ であった (Fig. 4)。いずれの間においても、健常ラットと CDDP 誘発性 AKI ラットの間に有意な差は認められなかった。

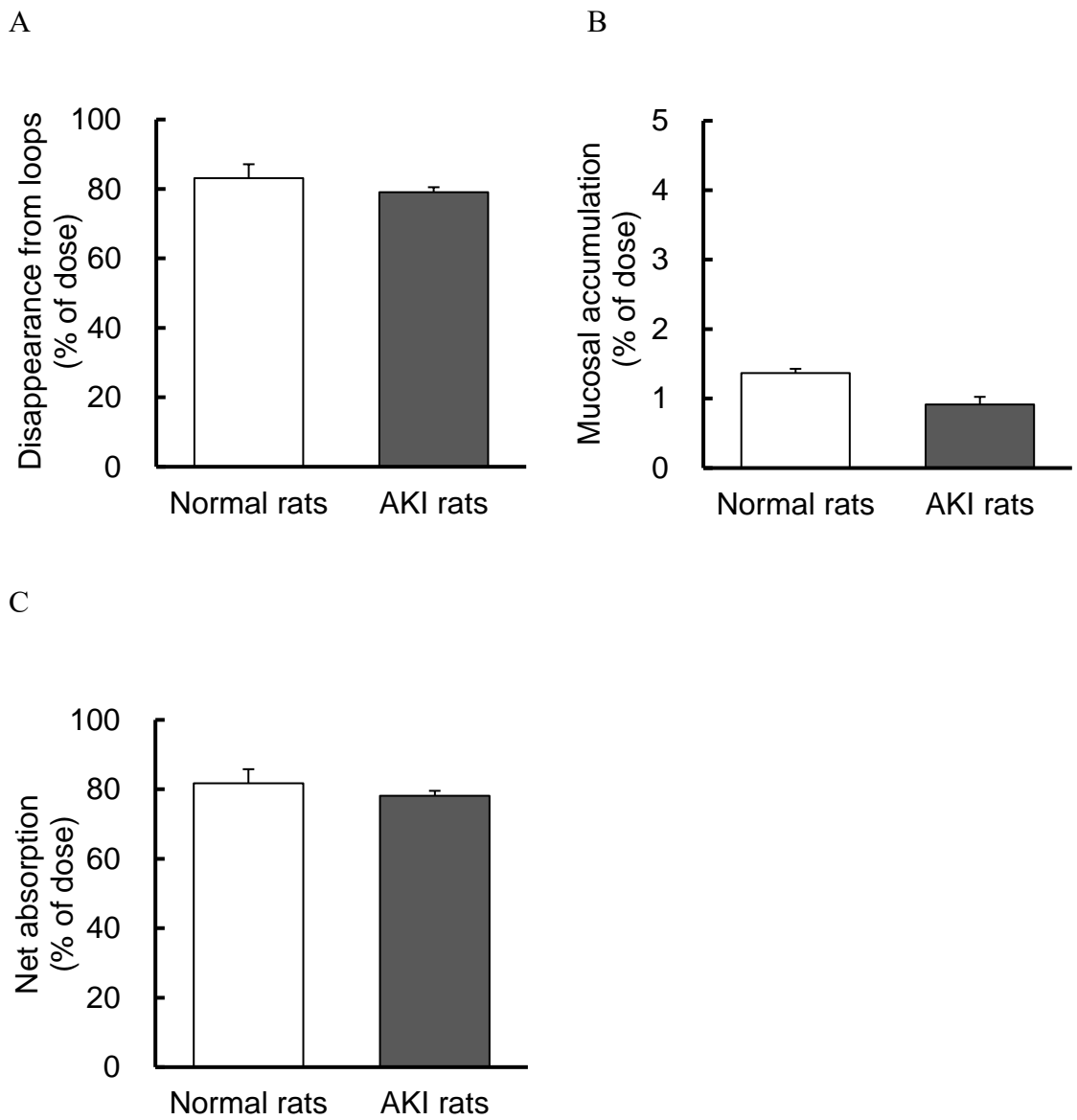


Fig. 3. Disappearance (A), Mucosal Accumulation (B), and Net Absorption (C) of Theophylline 15 min after Intraluminal Administration to Normal and CDDP-induced AKI Rats

Each column represents the mean with S.E. (n = 4).

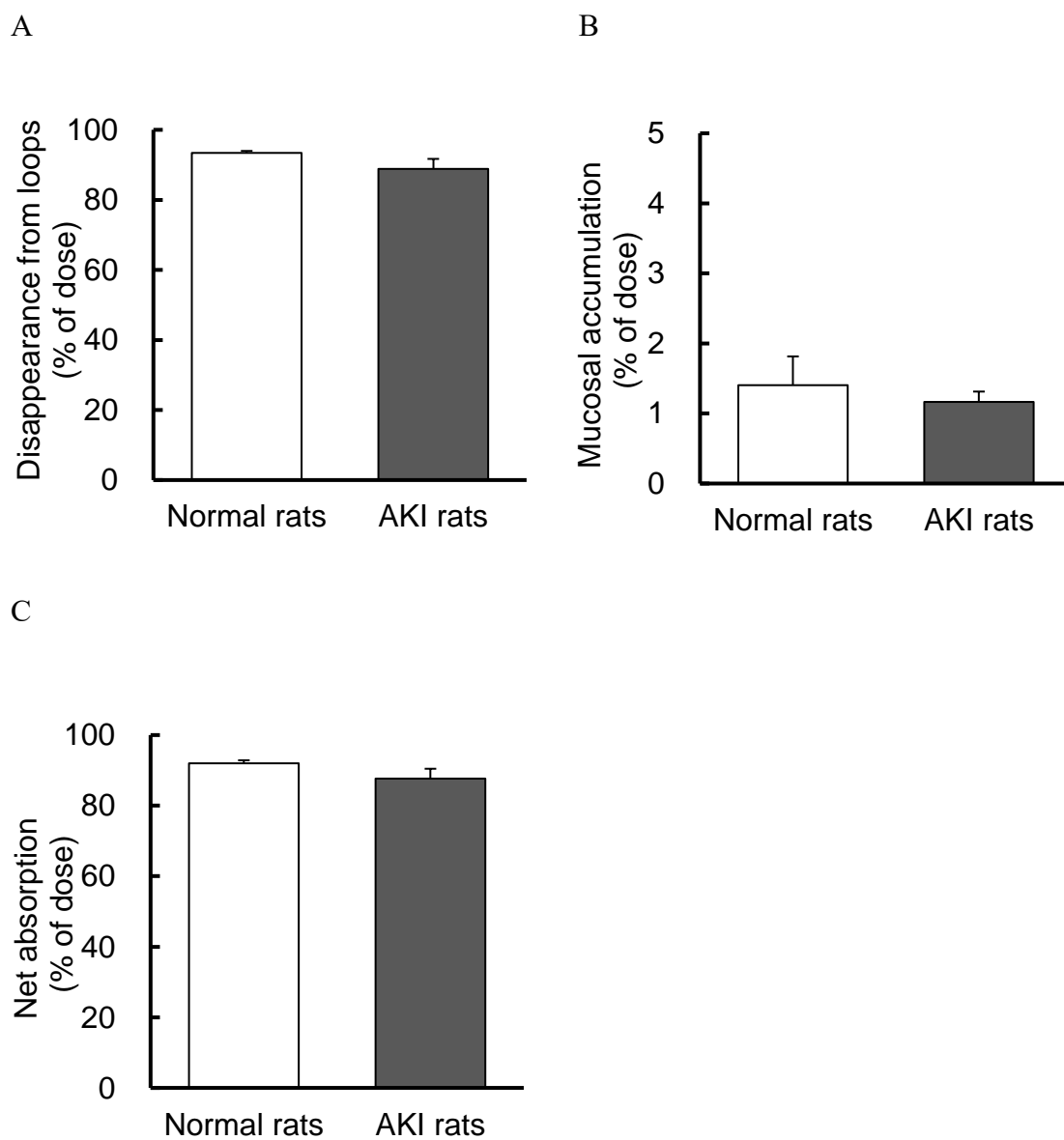


Fig. 4. Disappearance (A), Mucosal Accumulation (B), and Net Absorption (C) of Theophylline 30 min after Intraluminal Administration to Normal and CDDP-induced AKI Rats

Each column represents the mean with S.E. (normal rats, n = 5; AKI rats, n = 4).

第4節 考察

CDDP は多くのがん種に対して有効性を発揮する抗悪性腫瘍薬であるが、重篤な有害事象が全身的に現れることが治療継続上しばしば大きな問題となる。腎障害に加え、消化器障害も頻発する有害事象であるが、³⁵⁾ 消化器障害に付随する粘膜組織への損傷は、小腸の吸収機能に影響を及ぼす可能性がある。第1部では、CDDP により AKI が誘発される場合に、小腸上皮細胞刷子縁膜に存在する efflux トランスポーター及び influx トランスポーターの発現量や機能、さらには基質薬物の吸収性がどのような影響を受けるかを明らかにすることを主目的とした。したがって、CDDP 投与により確実に AKI を誘発させることに加え、その際に小腸の膜透過性に根本的な変化が生じないことが前提条件となる。

これまでに多様な CDDP 投与経路、投与量及び投与スケジュールで実験的に AKI モデル作製をする方法が報告されてきた。⁴⁴⁻⁴⁶⁾ しかしながら、これらの報告ではいずれも絨毛の脱離や絨毛先端の粘膜潰瘍など小腸組織に著明な影響が認められている。また、Shahid ら⁵⁰⁾ は、CDDP を腹腔内に投与した際、3.5 mg/kg 以下の低用量では小腸絨毛の萎縮を引き起こすが、陰窩の深さには影響を及ぼさないこと、6 mg/kg 以上の高用量では粘膜腺構造の歪みや陰窩の破壊、粘膜及び粘膜下層への炎症性細胞の強い浸潤などの顕著な粘膜障害を引き起こされることを示した。これらの報告は CDDP による小腸粘膜障害が CDDP の投与量及び投与スケジュール依存的に出現・悪化することを示唆している。一方、CDDP を 2.5 mg/kg で腹腔内に投与した場合、投与後7日までの Scr 値の上昇はコントロールと比較して 1.5 倍以下となることが報告されており、⁵¹⁾ AKI を十分に誘発できないと考えられた。そこで本研究では、Okabe ら⁴⁷⁾ の方法に準拠し CDDP 5 mg/kg を腹腔内に投与して AKI ラットの作製を行うこととした。

SD 系雄性ラットに CDDP を投与し、投与直前の健常ラットと比較して 72 時間後の Scr 値が 2 倍以上に上昇した個体から小腸各部位の粘膜部分を単離し、HE 染色にて形態学的変化を調べたところ、十二指腸では変化がほとんど認められなかった。また、空腸及び回腸では絨毛の萎縮が観察されたものの、絨毛構造は全体的に維持されているのが確認された (Fig. 2)。したがって、本章における CDDP の投与量では、AKI を誘発させ、かつ小腸の形態学的変化を最小限に抑えることが可能であると見なされた。

さらに、本章で観察された小腸の形態学的変化が単純拡散による薬物の膜透過に影響を及ぼすか否かを検討するために、単純拡散のモデル薬物として TH を用いて、小腸ループ法による吸収実験を行った。その結果、AKI ラットにおける TH 投与 15 分後及び 30 分後の消失率、粘膜蓄積率、正味吸収率は健常ラットとほぼ同程度であった (Figs. 3, 4)。このことから、CDDP 5 mg/kg の投与量で AKI を誘発させても、小腸における単純拡散による薬物の吸収に影響を受ける可能性は小さいと判断された。

以上、本章の検討から、CDDP 5 mg/kg の腹腔内投与により作製した AKI モデルを使用することの妥当性が示され、第 2 章では CDDP 誘発性 AKI ラットにおける小腸各部位のトランスポーターの発現量の変化について検討することとした。

第2章 シスプラチン誘発性 AKI ラットにおけるトランスポーターの発現変動

第1節 緒言

薬物の生体内移行を考える上で重要な因子であるトランスポーターは、薬物の体内及び各臓器への取り込みや体外への排泄に関与することで、体内動態を制御している。¹⁾ 厚生労働省やアメリカ食品医薬品局 (Food and Drug Administration: FDA)、さらには欧州医薬品庁 (European Medicines Agency: EMA) が発出している薬物間相互作用に関するそれぞれのガイドライン⁵²⁻⁵⁴⁾ において、トランスポーターを介した薬物間相互作用が重要視されており、薬物トランスポーターに対する注目は益々高まっている。一方、経口投与剤は、その使用にあたり入院を必要とせず、利便性が高いため、2021年12月現在における薬価基準収載品約14,000品目のうち約60%を占めている。⁵⁵⁾ 経口投与剤の生物学的利用能を決定する因子の一つとして、トランスポーターを介した選択的な膜輸送が挙げられる。近年、トランスポーターの輸送特性の解明のみならず、トランスポーターは様々な疾患によりその発現量及び機能が変動することが明らかとなってきた。⁶⁻¹⁸⁾ 例えば、潰瘍性大腸炎の患者では、小腸の P-gp や Bcrp の発現量が減少していることが報告されている。⁵⁶⁾ 潰瘍性大腸炎の治療薬であるサラゾスルファピリジンは Bcrp の基質であることが知られているため、⁵⁷⁾ 潰瘍性大腸炎患者における BCRP 発現量の低下は、その吸収に大きな影響を及ぼすことが予想され、投与量の設計に注意を要する。また、OATP2B1 の発現量は肝臓がん組織では減少する¹³⁾ のに対し、クローン病や潰瘍性大腸炎の患者の腸内発現量は増加する¹⁴⁾ など、病態時の薬物トランスポーターは、疾患に応じて複雑に変動することが報告されている。また、我が国において重要なヘルスケア問題の一つである CKD も同様に、腎やその他臓器でのトランスポーターの発現量や機能が変化することが報告されている。³⁰⁾ この CKD の発症リスクを著しく上昇させる一つの因子に AKI が挙げられるが、AKI 時におけるトランスポーターの発現量や機能に関する検討は、腎における直接的な影響についての報告がある一方で、腎以外の組織における影響についてはほとんど知られていない。そこで本章では、CDDP 誘発性 AKI ラットにおける十二指腸、空腸、及び回腸でのトランスポーターの発現変動についてウェスタンブロット法にて検討

した. なお, 本研究では **efflux** トランスポーターとして, FDA 並びに EMA のガイドラインにおいて薬物間相互作用に対するリスク評価の必要性が明記されており,^{50,51)} ラットにおいて回腸に多いこと^{58,59)} が報告されている **P-gp** 及び **Bcrp** と, 詳細な局在化は報告されていないものの **influx** トランスポーターとして消化管における薬物の吸収に関与する **Oatp2b1** 並びに, 近年, 消化管での存在が確認された **Oatp1a2**^{60,61)} について検討した.

第2節 実験材料及び実験方法

第1項 使用薬物及び試薬

本章で新たに用いた薬物及び試薬類は以下の通りである。

Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris)	(富士フイルム和光純薬株式会社, 大阪)
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	(富士フイルム和光純薬株式会社, 大阪)
Glycerol	(富士フイルム和光純薬株式会社, 大阪)
2-Mercaptoethanol	(富士フイルム和光純薬株式会社, 大阪)
Acrylamide	(富士フイルム和光純薬株式会社, 大阪)
<i>N, N'</i> -Methylenebis(acrylamide) (MBAA)	(富士フイルム和光純薬株式会社, 大阪)
Bromophenol blue	(富士フイルム和光純薬株式会社, 大阪)
Ammonium persulfate (APS)	(富士フイルム和光純薬株式会社, 大阪)
<i>N, N, N', N'</i> -Tetramethylethylenediamine (TEMED)	(富士フイルム和光純薬株式会社, 大阪)
Bovine serum albumin (BSA)	(ナカライテスク株式会社, 京都)
P-gp antibody	(ABclonal Biotechnology Co., Wuhan, Hubei China)
Bcrp antibody	(ABclonal Biotechnology Co., Wuhan, Hubei China)
Oatp1a2 antibody	(ABclonal Biotechnology Co., Wuhan, Hubei China)
Oatp2b1 antibody	(Bios Antibodies, Woburn, MA, USA)
Horseradish peroxidase (HRP) -conjugated anti mouse secondary antibody	(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)
HRP-conjugated anti rabbit secondary antibody	(Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA)
Bio-Rad Protein Assay Kit	(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)
Millipore Immobilon TM Western Chemiluminescent HRP Substrate	(Millipore, Billerica, MA, USA)

その他の試薬及び溶媒は、全て市販の特級規格品を用いた。

第2項 AKI ラットの作製

AKI ラットの作製は、10 週齢の SD 系雄性ラットを使用し、第1部 第1章 第2節 第2項及び第3項に準拠して行った。

第3項 健常ラット及びシスプラチン誘発性 AKI ラットにおける小腸 P-gp 及び Bcrp の発現量の確認

(1) 薬物溶液の調製

本章において使用した薬物溶液の組成を Table 4 から Table 10 に示した。トリス緩衝生理食塩水 (tris-buffered saline: TBS) の pH は 7.6 とした (Table 4)。各一次抗体は 3% BSA/TBS-T (0.1% Tween 20 in TBS) を用いて 2,000 倍希釈し、各二次抗体は TBS-T にて 5,000 倍希釈とした。その他の薬物溶液は精製水にて調製した。

Table 4. Composition of TBS

Tris	20 mM
NaCl	137 mM

Table 5. Composition of TBS-T

Tris	20 mM
NaCl	137 mM
Tween 20	0.1%

(2) ラット十二指腸、空腸、及び回腸からのタンパク抽出

ラットは腸管摘出前に 15~18 時間絶食した。イソフルランで吸入麻酔したラットを開腹し、十二指腸、空腸、及び回腸を摘出し、氷冷した生理食塩液で洗浄した。これらを 40~200 μ L の Lysis buffer (Table 6) 中で超音波処理を行った後、遠心分離 (20,000g, 10 分, 4°C) し、得られた上清を試料とした。試料はタンパク定量時まで氷冷下にて保存した。

Table 6. Composition of Lysis Buffer

0.25 M Tris-HCl, pH6.8	2 mL
10% SDS	2 mL
Glycerol	1 mL
Ultrapure water	4.5 mL
2-Mercaptoethanol	0.5 mL
Total	10 mL

(3) タンパク定量

タンパク定量は Bradford⁶²⁾ の方法に準拠し, Bio-Rad Protein Assay Kit を用いて 620 nm における吸光度を測定した. 標準物質には BSA を使用した. タンパク定量後に試料を 5 分間 95°C で煮沸し, ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis: SDS-PAGE) を行うまで -80°C で保存した.

(4) SDS-PAGE

本操作に用いた Running gel と Stacking gel の組成を Table 7 に示した. TEMED と 25% APS はゲル板に流し込む直前に添加した. ゲル板を組み立て, ガラス板上端から 1 cm まで Running gel を注入し, すぐに超純水で重層した. 30~45 分ほど放置し, Running gel が固まったことを確認してから超純水を除去した. 続いて Stacking gel を重層し, さらにコームを差して 30~45 分ほど放置した. Stacking gel が固まった後にゲル立てからゲル板を外し, コームを抜き取り, ウェルを静かに洗浄した. ゲル板を泳動装置にセットし泳動 buffer (Table 8) を泳動槽の標線まで注いだ. 続いてウェルに分子量マーカー 2 μ L, 各試料 20 μ g をそれぞれ添加し, 70 mA 条件下で電気泳動を行った. なお, 試料量が大きく異なる場合, Sample buffer (Table 9) を添加し, ウェル内で静かに混合した.

Table 7. Composition of SDS Gel

	Running gel	Stacking gel
30% Acrylamide/MBAA	4.95 mL	0.99 mL
1.5M Tris-HCl, pH 8.8	3.75 mL	-
0.5M Tris-HCl, pH 6.8	-	1.89 mL
10% SDS	150 μ L	75 μ L
Ultrapure water	6.075 mL	4.5 mL
TEMED	12 μ L	6 μ L
25% APS	75 μ L	37.5 μ L
Total	15 mL	7.5 mL

Table 8. Composition of Running

Buffer	
Tris	25 mM
Glycine	200 mM
SDS	3.5 mM

Table 9. Composition of Sample Buffer

0.25 M Tris-HCl, pH6.8	2 mL
10% SDS	2 mL
Glycerol	1 mL
Ultrapure water	4.5 mL
2-Mercaptoethanol	0.5 mL
Bromophenol blue	q. s.
Total	10 mL

(5) 転写

SDS-PAGE 終了後、ゲル板からゲルを剥がし、転写 buffer (Table 10) へ 10 分間浸した。転写装置に転写カセットホルダー、冷却槽を挿入した。転写カセットの上に、転写 buffer に 10 分間以上浸したファイバーパッド、フィルターペーパーを乗せた。その上にゲルを乗せ、次に HPLC 用メタノールへ 5 分間浸した後に転写 buffer へ 10 分以上浸した Immobilon polyvinylidene difluoride transfer membrane (PVDF 膜) を乗せた。さらにフィルターペーパー、ファイバーパッドを乗せ、転写カセットで挟み、350 mA 条件下で転写を行った。なお、転写時間は 60 分とした。

Table 10. Composition of Transcriptional Buffer

Tris	25 mM
Glycine	200 mM
Methanol	20%

(6) ブロッキング

転写後の PVDF 膜を TBS に 5 分間浸し, その後 TBS-T にて 10 分間, 2 回洗浄した. TBS-T を除去した後, 抗体の非特異的な吸着を防ぐため, PVDF 膜を 3% BSA/TBS-T 中で, 室温にて 1 時間静かに振盪した.

(7) 一次抗体反応

ブロッキング後の PVDF 膜を一旦 4°C に冷却した. 冷却後 3% BSA/TBS-T を除去し, 予め 4°C に冷やしておいた一次抗体を添加した. PVDF 膜を密封し, 4°C で一晩反応させた. その後 PVDF 膜を十分な量の TBS-T で 10 分間, 2 回振盪洗浄を行った.

(8) 二次抗体反応

P-gp 及び Bcrp の二次抗体として HRP-conjugated anti rabbit secondary antibody を, β -アクチンの二次抗体として HRP-conjugated anti mouse secondary antibody を使用した. PVDF 膜に 5 mL の二次抗体溶液を添加し, 室温で 1 時間静かに振盪した. その後 PVDF 膜を十分な量の TBS-T で 10 分間, 2 回振盪洗浄を行った.

(9) 現像

PVDF 膜の水分を軽く拭き取った後, Millipore ImmobilonTM Western Chemiluminescent HRP Substrate 1.5 mL に浸し, 室温で 1 分間反応させ, X 線フィルムに露光した. そのバンドを Image J (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA) を用いて定量し, P-gp 及び Bcrp の発現量はそれぞれ β -アクチンの発現量に対する相対比として解析した.

第4項 健常ラット及びシスプラチン誘発性 AKI ラットにおける小腸 Oatp1a2 及び Oatp2b1 の発現量の確認

小腸 Oatp1a2 及び Oatp2b1 の発現量の確認は、第1部 第2章 第2節 第3項 (1)～(9) に準拠し、ウェスタンブロット法にて行った。なお、Oatp1a2 及び Oatp2b1 の二次抗体として、HRP-conjugated anti rabbit secondary antibody を使用した。

第5項 統計処理

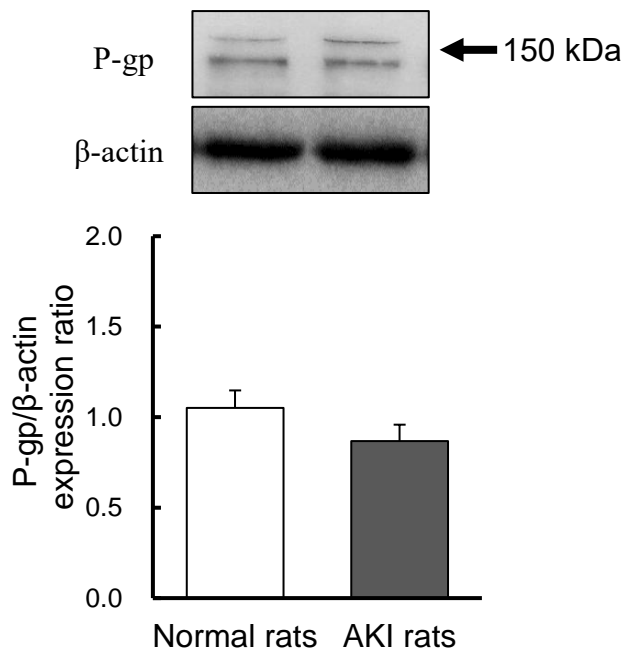
実験結果はすべて平均値 ± 標準誤差 (mean ± S.E.) で示した。また有意差検定は Wilcoxon rank sum test により行い、 $p < 0.05$ をもって有意差ありとした。

第3節 実験結果

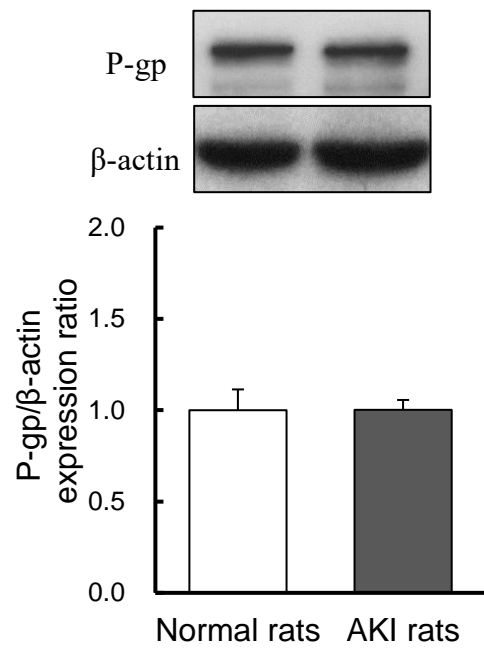
第1項 健常ラットとシスプラチン誘発性 AKI ラットにおける小腸 P-gp 及び Bcrp の発現量の比較

健常ラット及び CDDP 誘発性 AKI ラットの十二指腸、空腸、及び回腸における P-gp の発現量をウェスタンブロット法により解析したところ、小腸各部位において、150 kDa 付近に P-gp に由来する強いバンドが確認された。特に健常ラットの回腸では、他の部位と比較して強いバンドが確認された (Fig. 5)。P-gp 発現量を健常ラットと CDDP 誘発性 AKI ラットで比較すると、十二指腸及び空腸では有意な変化は認められなかった。一方で、CDDP 誘発性 AKI ラットの回腸における P-gp の発現量は、健常ラットの 38.3%にまで有意に減少した。続いて Bcrp の発現量を検討したところ、健常ラット及び CDDP 誘発性 AKI ラットの小腸各部位で 72 kDa 付近に強いバンドが確認された (Fig. 6)。しかしながら、いずれの部位においても健常ラットと CDDP 誘発性 AKI ラット間で発現量の有意な変化は認められなかった。

A. Duodenum



B. Jejunum



C. Ileum

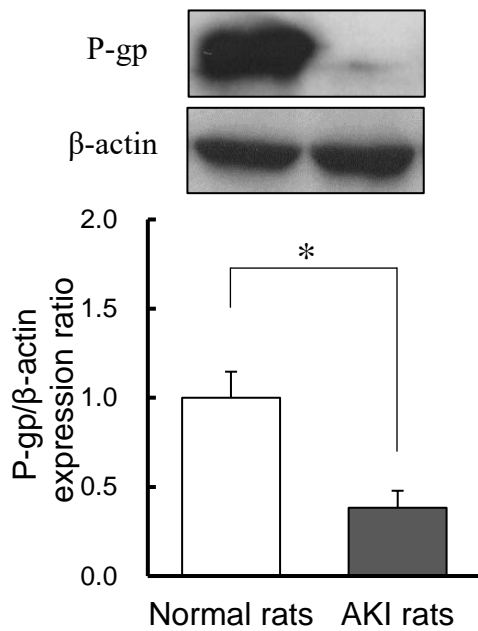
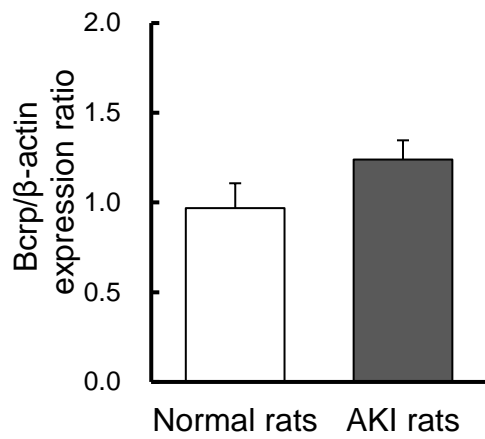
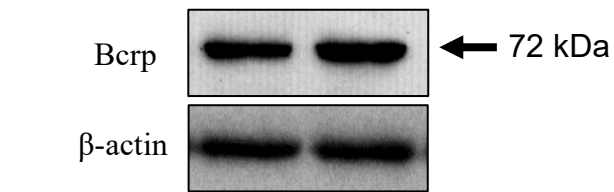


Fig. 5. Comparison of P-gp Expression in the Duodenum (A), Jejunum (B), and Ileum (C) between Normal and CDDP-induced AKI Rats

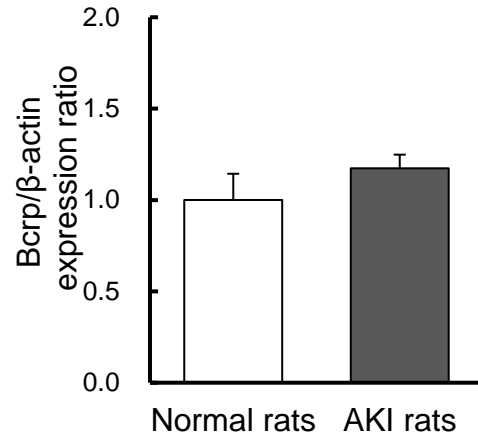
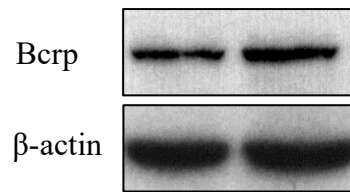
Relative protein expression is shown as the mean with S.E. (n = 3 to 5).

* $p < 0.05$, significantly different from normal rats.

A. Duodenum



B. Jejunum



C. Ileum

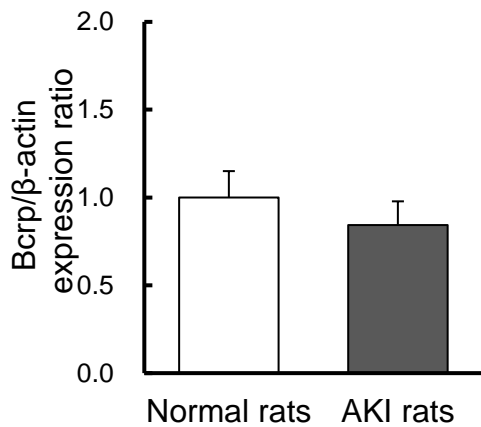
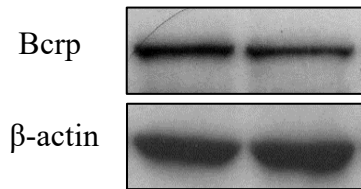


Fig. 6. Comparison of Bcrp Expression in the Duodenum (A), Jejunum (B), and Ileum (C) between Normal and CDDP-induced AKI Rats

Relative protein expression is shown as the mean with S.E. (n = 3 to 5).

第2項 健常ラットとシスプラチン誘発性 AKI ラットにおける小腸 Oatp1a2 及び Oatp2b1 の発現量の比較

健常ラット及び CDDP 誘発性 AKI ラットの十二指腸, 空腸, 及び回腸における Oatp1a2 の発現量について比較した. いずれのラットにおいても, 小腸各部位において, 64 kDa 付近に Oatp1a2 に由来する強いバンドが確認された (Fig. 7). Oatp1a2 の発現量を健常ラットと AKI ラットで比較すると, 空腸及び回腸では両群間に有意な変化は認められなかった. 一方, CDDP 誘発性 AKI ラットの十二指腸における Oatp1a2 の発現量は健常ラットと比較して 153.4%にまで有意に増加した (Fig. 7). 続いて, Oatp2b1 の発現量を検討したところ, いずれのラットにおいても, 小腸各部位において, 77 kDa 付近にバンドが確認された (Fig. 8). CDDP 誘発性 AKI ラットの空腸における Oatp2b1 の発現量は健常ラットと比較して有意な変化が認められなかったのに対し, 十二指腸及び回腸では健常ラットと比較して, それぞれ 44.9%及び 68.0%と有意に減少した.

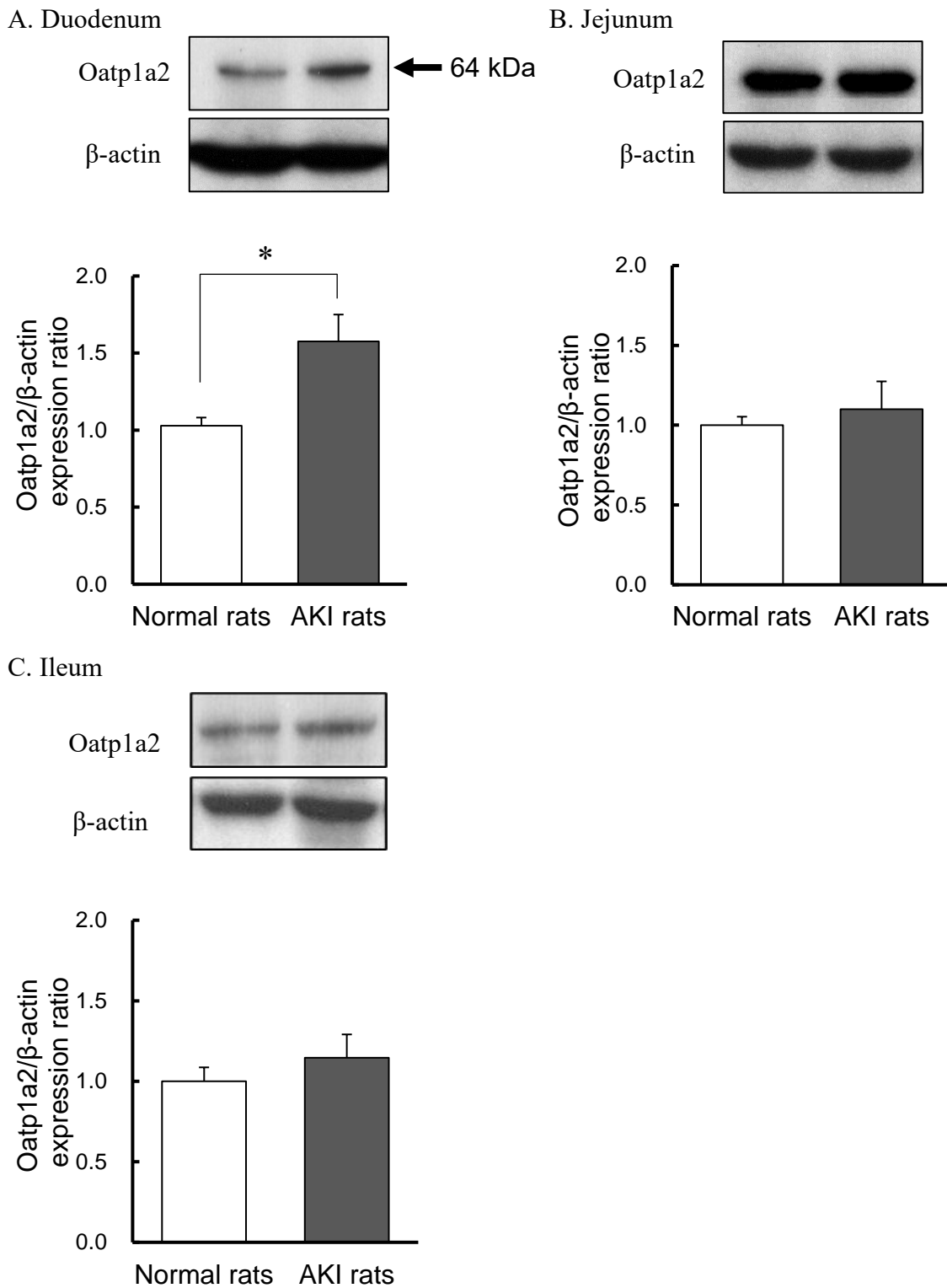


Fig. 7. Comparison of Oatp1a2 Expression in the Duodenum (A), Jejunum (B), and Ileum (C) between Normal and AKI Rats

Relative protein expression is shown as the mean with S.E. (n = 4 or 5).

* $p < 0.05$, significantly different from normal rats.

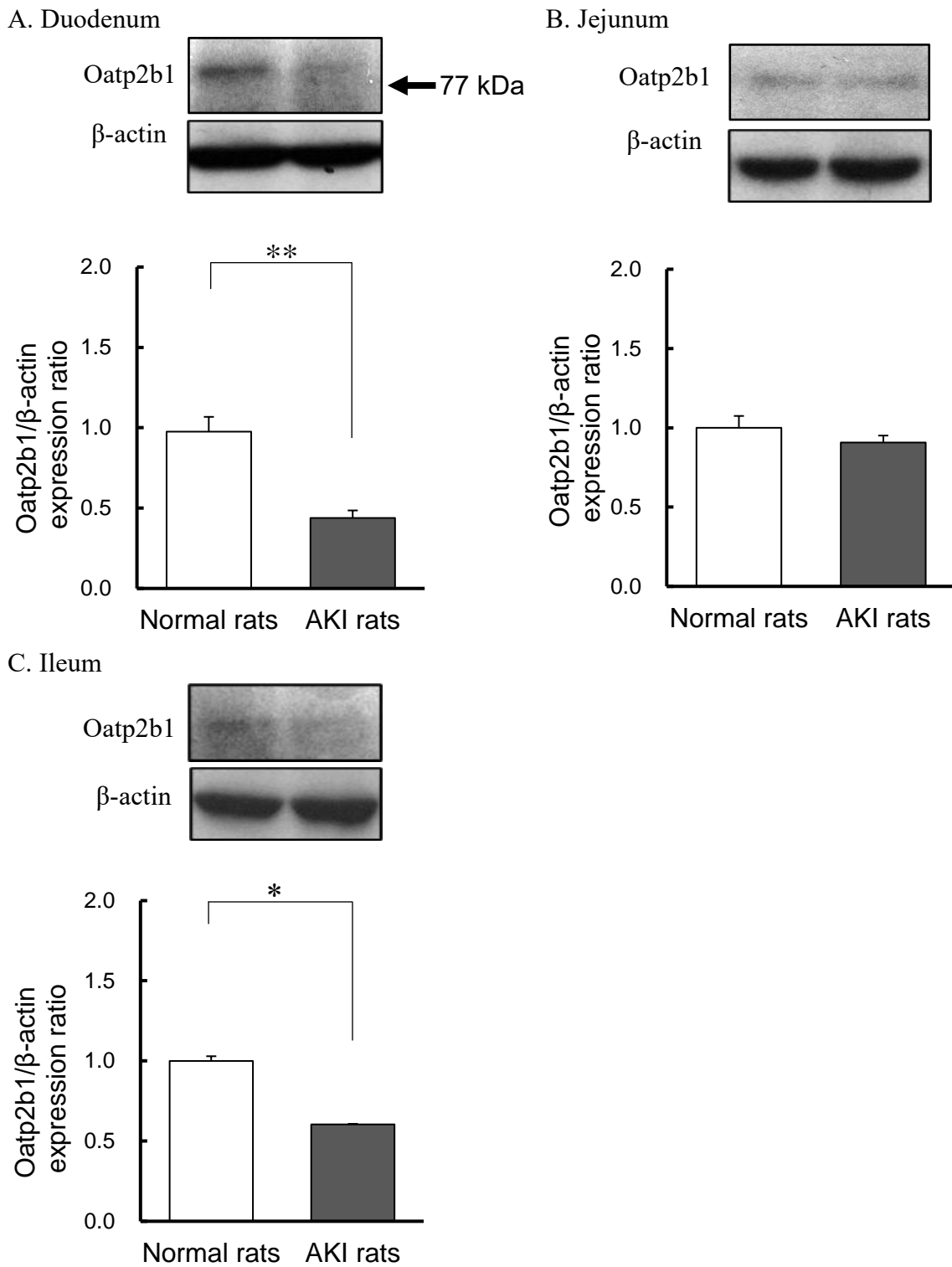


Fig. 8. Comparison of Oatp2b1 Expression in the Duodenum (A), Jejunum (B), and Ileum (C) between Normal and AKI Rats

Relative protein expression is shown as the mean with S.E. (n = 3 to 5).

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, significantly different from normal rats.

第4節 考察

本章では、CDDP によって AKI が誘発された時、小腸に存在するトランスポーターの発現量がどのような影響を受けるかについて検討を加えた。まず、健常ラット及び CDDP 誘発性 AKI ラットにおいて、代表的な efflux トランスポーターである P-gp の発現量を比較した。その結果、CDDP 誘発性 AKI ラットの十二指腸及び空腸では両群間で P-gp の発現量に有意な変化が認められなかったのに対し、回腸では CDDP 誘発性 AKI ラットにおける P-gp の発現量が健常ラットの約 38% にまで顕著に減少した (Fig. 5)。Aleksunes ら³⁴⁾ は以前に、CDDP 誘発性 AKI マウスにおいて、腎 P-gp の発現量が増加したことを報告している。本章での結果を合わせると CDDP によって AKI が誘発される時、腎と小腸 (回腸) では P-gp の発現変化が真逆の方向に進むことを示唆している。また ABC トランスポーターの発現変化について、Naud ら³²⁾ は CKD ラットの回腸では P-gp に加えて Mrp2 の発現量も低下することを報告している。さらに Herraiez ら⁶³⁾ は、CDDP への曝露により抵抗性を獲得した大腸がん細胞においては、ファルネソイド X 受容体依存性及び非依存性のメカニズムを介して BCRP 及び MRP2 の発現量が増加することを報告した。これらの報告に基づくと、ABC トランスポーターは同一の条件下では一方向的に制御される可能性が考えられた。そこで、CDDP 誘発性 AKI ラットの回腸における他の ABC トランスポーターの発現量の変化を知る目的で、回腸 Bcrp の発現量を評価した。その結果、Fig. 6 に示すように、CDDP 誘発性 AKI ラットにおける回腸 Bcrp の発現量には、十二指腸、空腸、回腸いずれの部位においても健常ラットと比較して有意な変化が認められなかった。この結果は、前述の可能性を明確に否定するものだった。ある疾患時に ABC トランスポーターの発現変化が共通の方向性で生じないことに関して、Wang ら⁶⁴⁾ は急性肝不全 (acute liver failure: ALF) モデルラットでは、回腸 P-gp の発現量が有意に減少するが回腸 Bcrp はほとんど変化しないことを報告している。この報告において、ALF ラットの回腸 P-gp と Bcrp が異なる調節を受ける機序については十分に説明されていないが、CDDP 誘発性 AKI ラットにおいて回腸 P-gp は減少し Bcrp は変化しないという本章での結果は、Wang らの報告と関連するように思われる。

次に、回腸に発現する influx トランスポーターが CDDP 誘発性 AKI 時にどの

ような影響を受けるかを検討した。本検討において着目した Oatp2b1 は小腸上皮細胞膜上に密に発現していることが報告されている。^{3,9)} 一方、小腸における Oatp1a2 の存在に関しては多くの議論がなされてきたが、ごく最近の報告で、小腸に分布することが改めて示されている。^{60,61)} 本検討においても、ウェスタンブロット法により健常ラットの腸粘膜に Oatp2b1 と Oatp1a2 の分布が確認された (Figs. 7, 8)。しかし、Oatp2b1 と Oatp1a2 の CDDP 誘発性 AKI ラットにおける発現調節は大きく異なっていた。Fig. 8 に示すように、CDDP 誘発性 AKI ラットにおける Oatp2b1 の発現量は、健常ラットと比較し十二指腸及び回腸にて有意に低下した。一方、Oatp1a2 の発現量は健常ラットと比較して十二指腸にて有意に増加した (Fig. 7)。これらの結果は、CDDP 誘発性 AKI ラットでは P-gp 及び Bcrp の場合と同様に、小腸 Oatps の発現量変化が一方向的に起こるのではないことを示唆した。小腸 Oatps の発現に関して Naud ら³²⁾ 及び Sukkumee ら⁶⁵⁾ は、それぞれ CKD ラットあるいは敗血症由来の AKI マウスでは変化していないことを報告している。本章での結果とこれらの報告を合わせると、CKD と AKI の間及び疾患由来と有害事象由来の AKI の間で小腸に発現するトランスポーターの発現調節が異なる可能性が浮かび上がってくる。

Oatp1a2 の発現変動には、核内受容体であるプレグナン X 受容体⁶⁶⁾ や N-グリコシル化の関与⁶⁷⁾、Oatp2b1 に関しては postsynaptic density 95, discs large, zonulaoccluden-1 ドメインタンパク質といった足場タンパクとの相互作用など、Oatps の細胞内制御を説明するいくつかの機序が提示されているが、現在のところ AKI ラットでの発現変化のメカニズムを正確に確認することは困難である。⁶⁸⁾ また、Herraez ら⁶³⁾ は、腸管モデル細胞である Caco-2 細胞に、ラットへの CDDP 静脈内投与 1 時間後の小腸内容物に検出される濃度に匹敵する³⁵⁾ 20 μM CDDP を添加し 72 時間後における P-gp 及び BCRP の mRNA 量を測定すると、いずれも増加したことを報告している。一方、この報告では P-gp と Bcrp のタンパク発現量については検討されておらず、CDDP が小腸トランスポーターに及ぼす直接的な影響についてはさらなる検証が必要と考えられる。

第 1 章において、CDDP 5 mg/kg の腹腔内投与によりラットの空腸と回腸に絨毛の萎縮が確認された。しかしながら、空腸において P-gp, Bcrp, Oatp1a2, Oatp2b1 の発現量がいずれも変化していなかったことから、これらのトランス

ポーターが形態学的変化により小腸粘膜から脱落することはないと判断された。したがって、回腸における P-gp や Oatp2b1 の発現量の低下は、CDDP によって直接的にあるいは AKI という病態下で間接的に引き起こされた変化であると推察された。

これまで複数の論文で、小腸 P-gp の発現量の低下は、P-gp 基質薬物の吸収促進あるいは腸内分泌の低下に繋がると報告されている。^{32,64)} また、Oatps は単純拡散による膜透過性が低い親水性薬物の細胞内への取り込みに関与し、薬物療法における治療効果や副作用発現などに密接に関わる。⁶⁹⁾ そこで、第 3 章では数種の P-gp 基質薬物を用いて CDDP 誘発性 AKI ラットにおける消化管吸収挙動の変化を検討することとした。さらに、第 4 章では Oatp1a2 及び Oatp2b1 の同時基質薬物であるプラバスタチンの消化管吸収挙動について、第 5 章では P-gp, Oatp1a2, Oatp2b1 の同時基質薬物であるフェキソフェナジンの消化管吸収挙動について検討を進めることとした。

第3章 シスプラチン誘発性 AKI ラットにおける P-gp 基質薬物の消化管吸収性の検討

第1節 緒言

第2章において、CDDP 誘発性 AKI ラットの回腸では、efflux トランスポーターである P-gp の発現量が有意に減少することが明らかとなった。P-gp は小腸において上皮細胞の刷子縁膜上に発現し、管腔内から上皮細胞中に移行した基質（異物や薬物など）を能動的に管腔側に排出することで、基質が血液中へ移行するのを制御する役割を担う。したがって、P-gp の機能変化は基質の体内動態に大きな影響を及ぼす。例えば、P-gp の発現遺伝子 *multidrug resistance 1a (mdr1)* を欠損したマウスにおいては、経口投与後の P-gp 基質薬物の血中濃度が増加することが報告されている。⁷⁰⁾ また、ヒトにおいて P-gp に対して強い阻害作用を示すシクロスポリンやケトコナゾールを P-gp 基質薬物と併用すると P-gp 基質薬物の血中濃度が著しく上昇することが報告されている。⁷¹⁾ その他にも小腸 P-gp の機能について、ラット反転腸管や培養細胞を用いた *in vitro* の実験で様々な検討がなされてきた。^{32,72,73)} しかしながら、これまで、CDDP により AKI を誘発した場合に P-gp の輸送能がどのように変化するかについては検討されていない。そこで本章では、CDDP 誘発性 AKI ラットで見出された回腸における P-gp の発現量の低下が、基質薬物の吸収にどのような変化を引き起こすかについて検討した。

第2節 実験材料及び実験方法

第1項 使用薬物及び試薬

本章で新たに用いた薬物及び試薬類は以下の通りである。

6 α -Methylprednisolone (MP) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)

Rhodamine 123 (RHO) (関東化学株式会社, 東京)

Gatifloxacin (GFLX) (富士フィルム和光純薬株式会社, 大阪)

Verapamil hydrochloride (富士フィルム和光純薬株式会社, 大阪)

MP, RHO, GFLX, ベラパミル塩酸塩の構造式を Fig. 9 に示す. その他の試薬及び溶媒は, 全て市販の特級規格品を用いた.

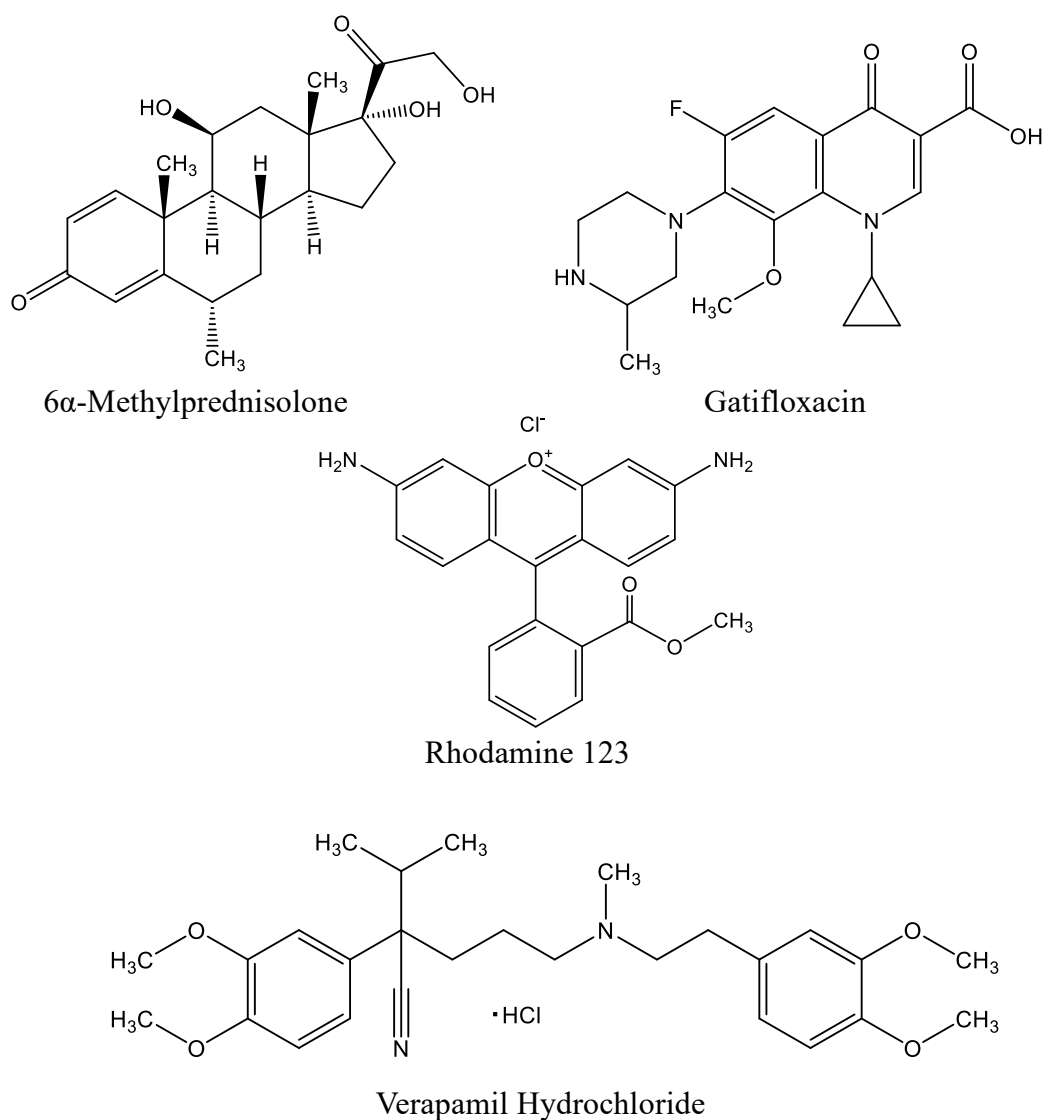


Fig. 9. Chemical Structures of Drugs Used in This Study

第2項 AKI ラットの作製

AKI ラットの作製は、10 週齢の SD 系雄性ラットを使用し、第1部 第1章 第2節 第2項及び第3項に準拠して行った。

第3項 健常ラット及びシスプラチン誘発性 AKI ラットにおける 6 α -メチルプレドニゾロンの消化管吸収性の検討

(1) 薬物溶液の調製

MP 溶液の調製は、第1部 第1章 第2節 第5項 (1) に基づいて行った。なお、濃度は 100 μ M とした。また、CDDP 誘発性 AKI ラットにおけるベラパミルの併用実験では、MP 溶液とベラパミル溶液の混合溶液を調製し、ベラパミルの濃度は 250 μ M^{74, 75)} とした。

(2) ラット小腸各部位からの吸収実験

吸収実験は Saitoh⁷⁴⁾ らの方法に準拠して行った。ラットを 15~18 時間絶食した後、イソフルランで吸入麻酔し、解剖台に固定した。腹部正中線に沿って開腹し、小腸に 3 カ所のループを作成した。3 カ所のループを作成する際は、胃幽門部直下から長さ約 10 cm の部分を十二指腸ループ、その下方に約 10 cm の間隔をあけ、そこから下方へ約 10 cm の部分を空腸ループ、回盲部より約 5 cm あけ、そこから上方へ約 10 cm の部分を回腸ループとした。各ループ内に 37°C に温めた生理食塩液 10 mL を流入させて残留内容物を除去した後、通気しながら残存するループ内液を排出した。その後、各ループの両端を東大式縫合糸 (No.2) を用いて結紮した。次いで各ループ内に MP 溶液 1 mL をテルモシリンジ (容量 1 mL, 針サイズ 26G \times 1/2") を用いて注入し、直ちに腸管を腹腔内に戻した。なお、胆汁流入を避けるため、胆管を予め縫合糸を用いて結紮した。また、体温低下による体力消耗を防ぐため、ラットはランプを用いて保温した。MP 投与 30 分後に各ループを速やかに小腸より単離し、氷冷した生理食塩液で表面の血液を除去した。ループ内液を全量メスフラスコに回収し、氷冷した Tyrode 液でループ内を洗浄しながら、全量を 10 mL とした。得られたループ内液は、定量時まで -30°C で冷凍保存した。

(3) 薬物定量

MP の定量は HPLC 法にて行った。試料の処理方法は第 1 部 第 1 章 第 2 節 第 5 項 (3) に基づいて行い、HPLC 分析条件を Table 11 に示した。

Table 11. HPLC Conditions for 6 α -Methylprednisolone Assay

Apparatus	: LC-10AT _{VP} (Shimadzu, Kyoto)
Column	: Cosmosil 5C ₁₈ -AR-II (5 μ m, 4.6 \times 150 mm, Nacalai Tesque, Kyoto)
Injection vol.	: 40 μ L
Column temp.	: 50 $^{\circ}$ C
Detector	: SPD-6A UV (Shimadzu, Kyoto)
Wave length	: 246 nm
Flow rate	: 1.0 mL/min (retention time: 5 min)
Mobile phase	: 0.05 M KH ₂ PO ₄ : CH ₃ CN = 6 : 4

第 4 項 健常ラット及びシスプラチン誘発性 AKI ラットにおけるローダミン 123 の消化管吸収性の検討

(1) 薬物溶液の調製

RHO は難水溶性であるため、予めメタノールに溶解させて原液を調製した。これを Tyrode 液で 100 μ M に希釈し、pH を 6.5 に調整して実験に供した。メタノールの最終含量は 2%以下となるようにした。また、CDDP 誘発性 AKI ラットにおけるベラパミルの併用実験は、第 1 部 第 3 章 第 2 節 第 3 項 (1) に基づいて行った。

(2) 吸収実験

吸収実験は、第 1 部 第 1 章 第 2 節 第 5 項 (2) に基づいて行った。なお、実験時間は 60 分とした。

(3) 薬物定量

RHO の定量は HPLC 法にて行った。試料の処理方法は第 1 部 第 1 章 第 2 節 第 5 項 (3) に基づいて行い、HPLC 分析条件を Table 12 に示した。

Table 12. HPLC Conditions for Rhodamine 123 Assay

Apparatus	: LC-10AT _{VP} (Shimadzu, Kyoto)
Column	: Cosmosil 5C ₁₈ -AR-II (5 μ m, 4.6 \times 150 mm, Nacalai Tesque, Kyoto)
Injection vol.	: 20 μ L
Column temp.	: 50 $^{\circ}$ C
Detector	: SPD-6A UV (Shimadzu, Kyoto)
Wave length	: 500 nm
Flow rate	: 0.6 mL/min (retention time: 6 min)
Mobile phase	: 0.05 M KH ₂ PO ₄ : CH ₃ CN = 6 : 4

第 5 項 健常ラット及びシスプラチン誘発性 AKI ラットにおけるガチフロキサシンの消化管吸収性の検討

(1) 薬物溶液の調製

GFLX 溶液の調製は、第 1 部 第 1 章 第 2 節 第 5 項 (1) に基づいて行った。なお、GFLX の濃度は 1 mM 及び 100 μ M とした。

(2) 吸収実験

吸収実験は、第 1 部 第 1 章 第 2 節 第 5 項 (2) に基づいて行った。なお、実験時間は 60 分とした。AKI ラットにおけるベラパミルの併用実験は、第 1 部 第 3 章 第 2 節 第 3 項 (1) に基づいて行った。

(3) 薬物定量

GFLX の定量は HPLC 法にて行った。試料の処理方法は第 1 部 第 1 章 第 2 節 第 5 項 (3) に準拠した。HPLC 分析条件を Table 13 に示した。

Table 13. HPLC Conditions for Gatifloxacin Assay

Apparatus	: LC-10AT _{VP} (Shimadzu, Kyoto)
Column	: Inertsil ODS-3 (5 μ m, 4.6 \times 250 mm, GL Sciences, Tokyo)
Injection vol.	: 40 μ L
Column temp.	: 50°C
Detector	: SPD-6A UV (Shimadzu, Kyoto)
Wave length	: 280 nm
Flow rate	: 0.7 mL/min (retention time: 8 min)
Mobile phase	: 0.05 M KH ₂ PO ₄ /2% CH ₃ COOH (pH = 5) : CH ₃ OH = 1 : 1

第 6 項 統計処理

実験結果の呈示及び有意差検定は、第 1 部 第 1 章 第 2 節 第 6 項に準拠した。

第3節 実験結果

第1項 健常ラットとシスプラチン誘発性 AKI ラットにおける 6 α -メチルプレドニゾロンの消化管吸収性の比較

第2章にて確認された P-gp 発現量の減少 (Fig. 5) が基質薬物の消化管吸収にどの程度影響を及ぼすかを明らかにするために, P-gp 基質として報告されている MP⁷⁰⁾を用いて, ラット小腸各部位における消失率を健常ラットと CDDP 誘発性 AKI ラット間で比較した. なお, MP は吸収過程で小腸の Cytochrome P450 (CYP) 3a によって代謝される⁷⁶⁾ため, 粘膜蓄積率は測定しなかった. 健常ラットにおける MP の消失率は, 十二指腸で $95.6 \pm 1.4\%$, 空腸で $62.7 \pm 5.4\%$, 回腸で $43.3 \pm 4.7\%$ であり (Fig. 10), これらの値は, Fig. 5 に示す P-gp の発現量と逆相関を示した. 一方, CDDP 誘発性 AKI ラットにおける MP の消失率は, 十二指腸で $77.0 \pm 3.6\%$, 空腸で $46.0 \pm 4.6\%$, 回腸で $45.2 \pm 6.3\%$ であり, 十二指腸及び空腸では, 健常ラットと比較して有意に低下した. これに対し, 回腸における MP の消失率は, 健常ラットと CDDP 誘発性 AKI ラットで変化は見られなかった. 代表的な P-gp 阻害剤であるベラパミルを共存させると, CDDP 誘発性 AKI ラットにおける消失率は, 十二指腸で $91.9 \pm 1.8\%$, 空腸で $80.8 \pm 1.4\%$, 回腸で $79.1 \pm 5.3\%$ といずれも有意に増加した (Fig. 10).

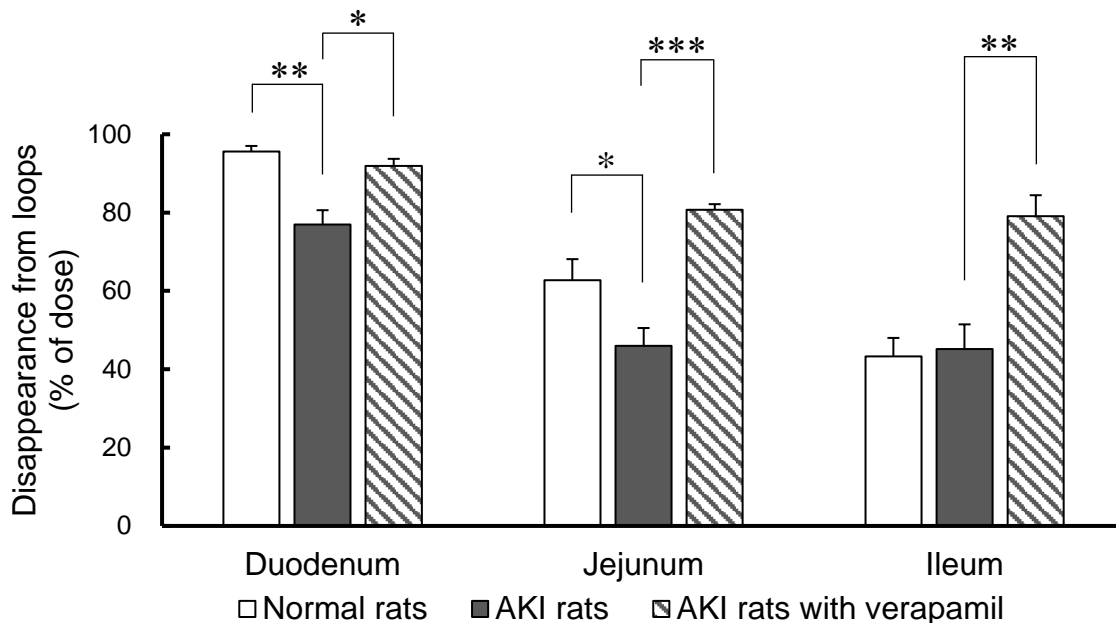


Fig. 10. Disappearance of 6α-Methylprednisolone after Administration into the Duodenal, Jejunal and Ileal loops of Normal and CDDP-induced AKI Rats

Each column represents the mean with S.E. (normal rats, n = 5; AKI rats, n = 8; AKI rats with verapamil, n = 4).

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, significantly different from normal or AKI rats.

第2項 健常ラットとシスプラチン誘発性 AKI ラットにおけるローダミン 123 の消化管吸収性の比較

CDDP 誘発性 AKI ラットにおける P-gp 基質薬物の消化管吸収性の変化についてさらに検討するために、代表的な P-gp 基質として知られる RHO⁷⁾ を小腸ループに投与し、60 分後の吸収率を検討した。健常ラットでの RHO の消失率、粘膜蓄積率及び正味吸収率はそれぞれ $21.0 \pm 3.0\%$, $3.7 \pm 0.9\%$, $17.3 \pm 2.2\%$ であった (Fig. 11)。一方, CDDP 誘発性 AKI ラットでは消失率が $17.9 \pm 2.8\%$, 粘膜蓄積率が $2.3 \pm 0.4\%$, 正味吸収率が $15.6 \pm 2.7\%$ であった。健常ラットと比較して、いずれの値もわずかに低下したものの有意な変化は認められなかった。ベラパミルを共存させると, CDDP 誘発性 AKI ラットにおける RHO の消失率, 粘膜蓄積率, 正味吸収率はそれぞれ, $39.3 \pm 2.9\%$, $8.25 \pm 0.3\%$, $31.0 \pm 3.1\%$ となり, 有意に増加することが示された。

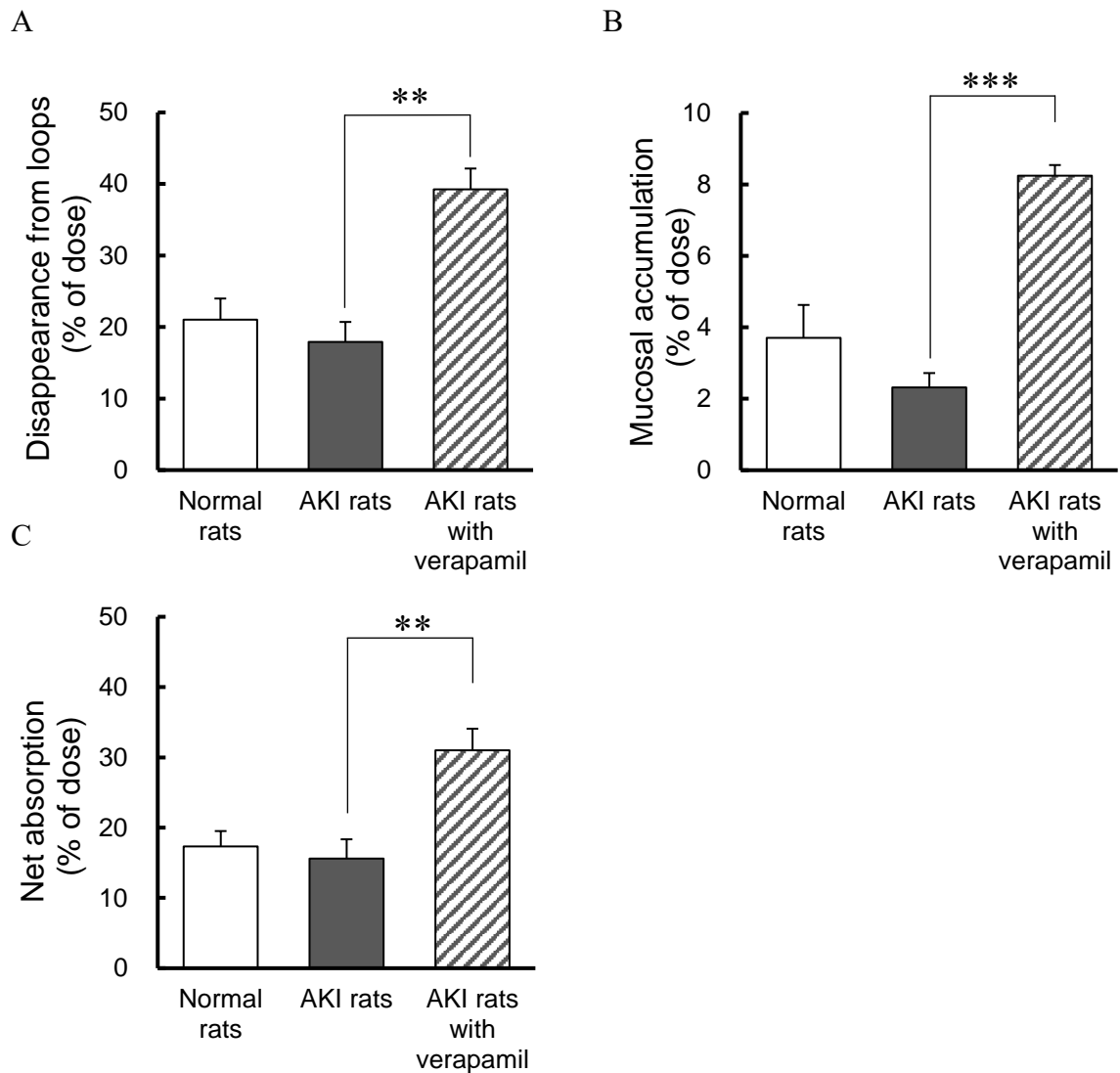


Fig. 11. Disappearance (A), Mucosal Accumulation (B), and Net Absorption (C) of Rhodamine 123 after Administration into Small Intestinal Loops of Normal and CDDP-induced AKI Rats

Each column represents the mean with S.E. (normal rats, n = 4; AKI rats, n = 5; AKI rats with verapamil, n = 4).

** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, significantly different from AKI rats.

第3項 健常ラットとシスプラチン誘発性 AKI ラットにおけるガチフロキサシンの消化管吸収性の比較

MP や RHO と同様に P-gp の基質として知られている GFLX⁷⁸⁾ を用いて、CDDP 誘発性 AKI ラットにおける P-gp 基質薬物の吸収挙動をさらに検討した。

100 μ M GFLX を RHO の場合と同様に小腸ループ内に投与すると、60 分後の消失率、粘膜蓄積率、正味吸収率は健常ラットではそれぞれ $52.2 \pm 4.9\%$, $4.2 \pm 0.6\%$, $47.9 \pm 4.9\%$, CDDP 誘発性 AKI ラットではそれぞれ $26.6 \pm 3.5\%$, $3.6 \pm 1.1\%$, $23.0 \pm 3.1\%$ であった (Fig. 12). 健常ラットと比較して、CDDP 誘発性 AKI ラットでは粘膜蓄積率に有意な変化は認められなかったものの、消失率及び正味吸収率は有意に低下した。ベラパミルを共存させた場合の CDDP 誘発性 AKI ラットにおける GFLX の消失率、粘膜蓄積率、正味吸収率はそれぞれ $68.2 \pm 3.3\%$, $8.3 \pm 0.3\%$, $31.0 \pm 3.1\%$ であり、GFLX 単独投与時と比較して有意に増加した (Fig. 12).

1 mM の GFLX を用いて同様の検討を行ったところ、投与 60 分後の健常ラットにおける消失率、粘膜蓄積率、正味吸収率はそれぞれ $68.5 \pm 5.9\%$, $2.9 \pm 0.8\%$, $65.6 \pm 5.8\%$, CDDP 誘発性 AKI ラットでは $42.5 \pm 6.0\%$, $1.4 \pm 0.5\%$, $41.1 \pm 5.6\%$ であった。100 μ M GFLX 投与時の結果と同様に健常ラットと比較して、CDDP 誘発性 AKI ラットでは粘膜蓄積率が減少傾向を示し、吸収率及び正味吸収率は有意に低下した (Fig. 13).

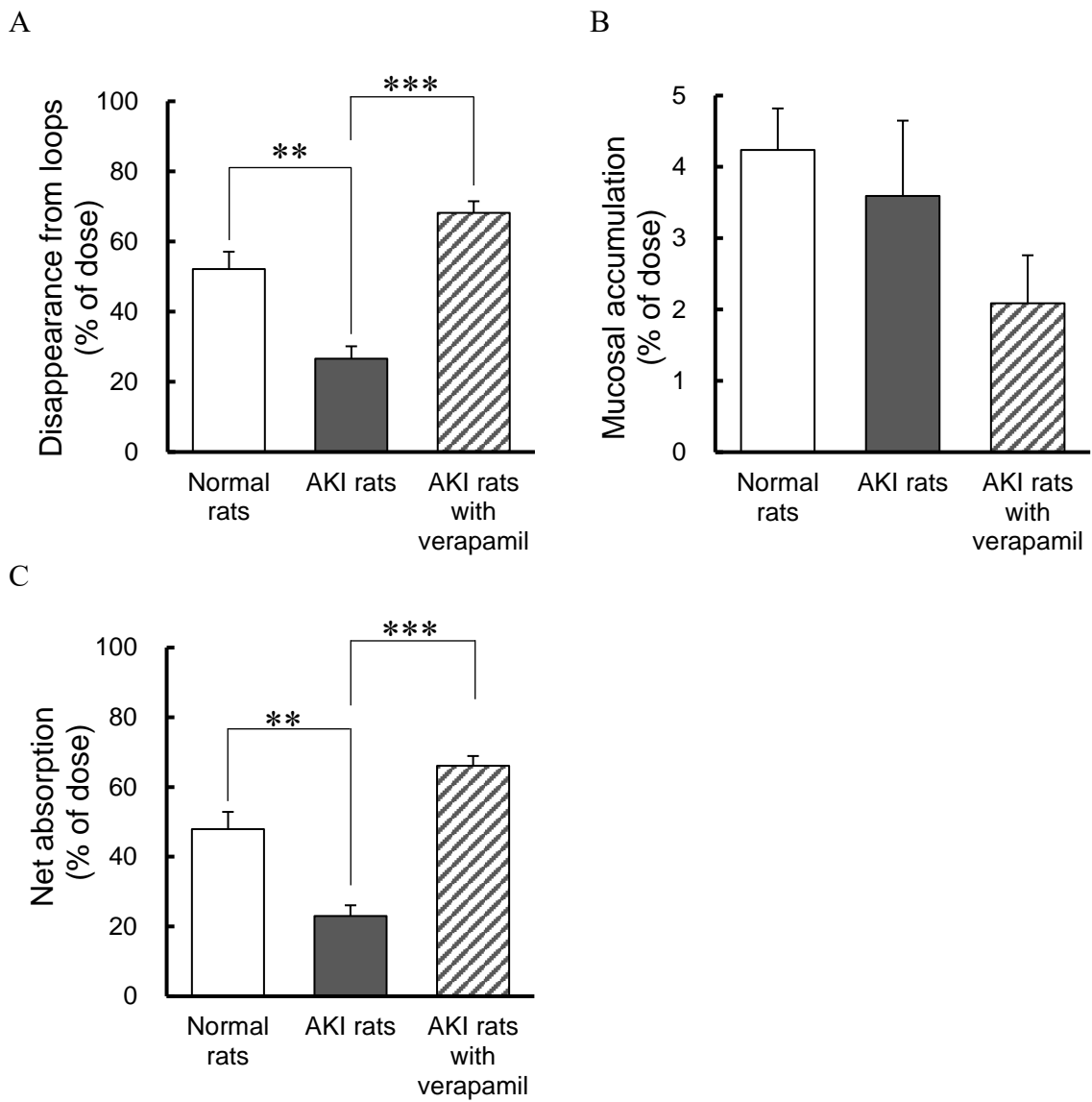


Fig. 12. Disappearance (A), Mucosal Accumulation (B), and Net Absorption (C) of 100 μ M Gatifloxacin after Administration into Small Intestinal Loops of Normal and CDDP-induced AKI Rats

Each column represents the mean with S.E. (n = 4).

** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, significantly different from normal or AKI rats.

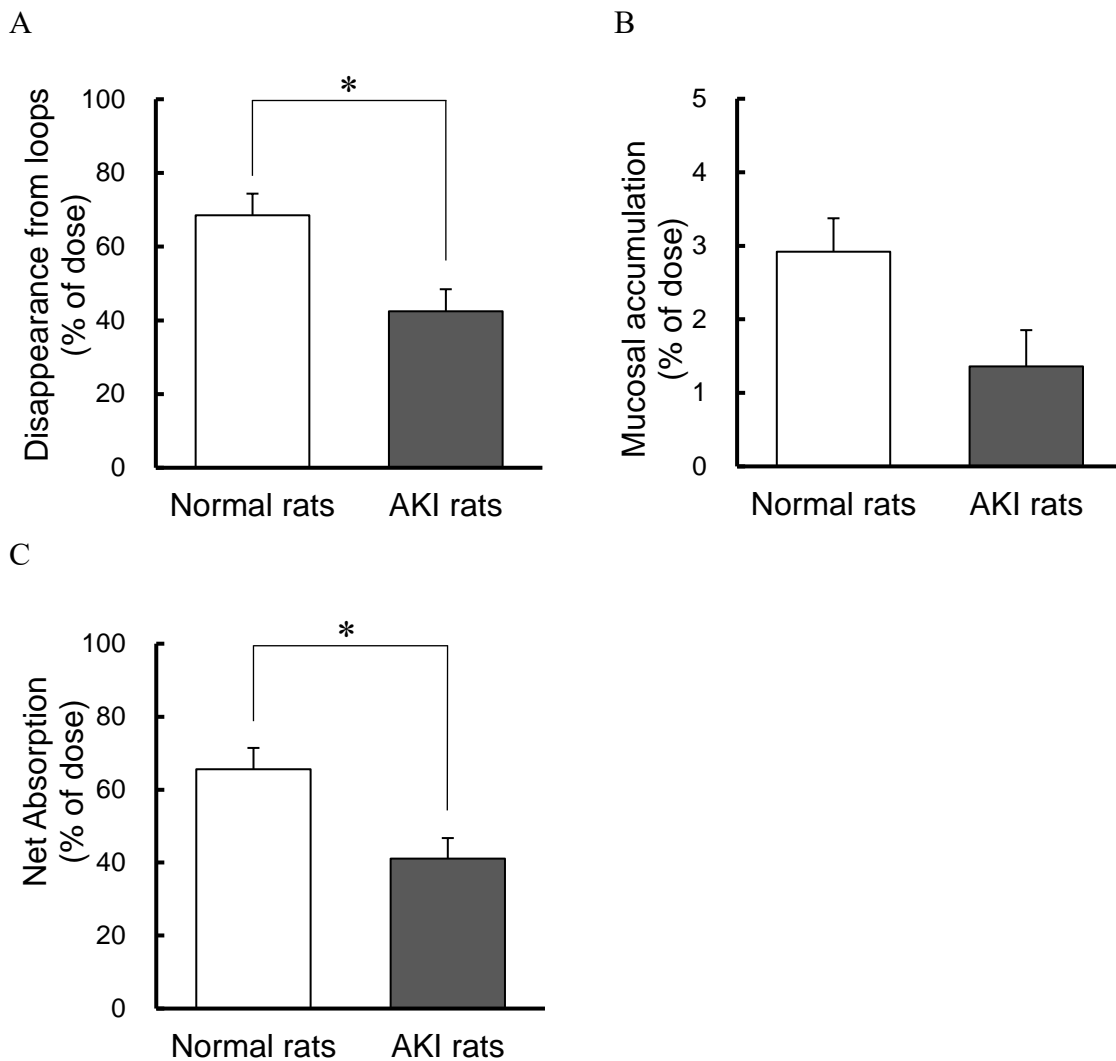


Fig. 13. Disappearance (A), Mucosal Accumulation (B), and Net Absorption (C) of 1 mM Gatifloxacin after Administration into Small Intestinal Loops of Normal and CDDP-induced AKI Rats

Each column represents the mean with S.E. (normal rats, n = 4; AKI rats, n = 5).

* $p < 0.05$, significantly different from normal rats.

第4節 考察

第1章において、CDDP 誘発性 AKI ラットの回腸で P-gp の発現量が有意に減少することが示された。小腸 P-gp の発現量の低下は、P-gp 基質薬物の小腸管腔内への分泌の低下を介して消化管吸収を促進されることが予想された。そこで本章では、3種の P-gp の基質薬物 (MP, RHO, GFLX) を用いて CDDP 誘発性 AKI ラットにおける吸収挙動を検討した。

まず、十二指腸、空腸、回腸に約 10 cm のループを作製し、各ループにおける MP の消失率を健常ラットと CDDP 誘発性 AKI ラットで比較した。その結果、CDDP 誘発性 AKI ラットにおいて P-gp 発現量が低下していた回腸における MP の消失率は健常ラットと同程度の値を示し、P-gp 発現量の大幅な低下を全く反映していなかった。一方、P-gp 阻害剤であるベラパミル共存下において、CDDP 誘発性 AKI ラットの回腸ループにおける MP の消失率は単独投与時の $45.2 \pm 6.3\%$ から $79.1 \pm 5.3\%$ にまで大幅に増加したことから、ベラパミルが P-gp を強く阻害したことが示された。当研究室では過去に、健常ラットの回腸ループに同濃度のベラパミルを共存させると MP の消失率が約 82% まで上昇することを報告した^{74,75)} が、本章の結果はこの報告の消失率に合致した。したがって、本章で得られた結果は、CDDP 誘発性 AKI ラットでは回腸 P-gp の発現量が減少しても、MP に対する P-gp の吸収抑制効果は健常ラットと同程度に維持されていることを強く示唆した。このことはすなわち、CDDP 誘発性 AKI ラットの回腸では、P-gp の発現量が減少しても残存する個々の P-gp が基質輸送能を増幅することで、基質に対する吸収抑制効果を健常ラットと同程度に維持するという可能性を示唆している。CDDP 誘発性 AKI ラットの十二指腸及び空腸では、P-gp 発現量に変化が認められなかったにも関わらず、MP の消失率が有意に低下した。これは、十二指腸及び空腸に存在する P-gp の輸送能も回腸の P-gp と同様に亢進していることに起因すると考えられた。

上述の可能性をさらに検証するために、健常ラットと CDDP 誘発性 AKI ラットに約 60 cm の小腸ループを作製し、小腸全体における RHO 及び GFLX の吸収挙動を比較検討した。その結果、MP の場合と同じく、RHO と GFLX の消失率及び正味吸収率には P-gp 発現量の減少を反映する増加は認められなかった (Figs. 11-13)。

GFLX の消失率及び正味吸収率は, CDDP 誘発性 AKI ラットで有意に低下した (Figs. 12, 13). 現時点でこの要因については不明であるが, ニューキノロン系抗菌薬は吸収率の高さから特殊的な輸送機構の存在が推測されている.^{79,80)}したがって, その輸送機構の変動を反映している可能性も考えられることから, 今後の更なる検討が必要である.

以上, 本章の検討から, 「CDDP 誘発性 AKI ラットでは, 回腸における P-gp の発現量が大幅に減少しても生体異物の吸収に対するゲートキーパー機能を維持するために P-gp 輸送能の増強が起こる」という, P-gp の特性に関する極めて重要な新知見を見出した.

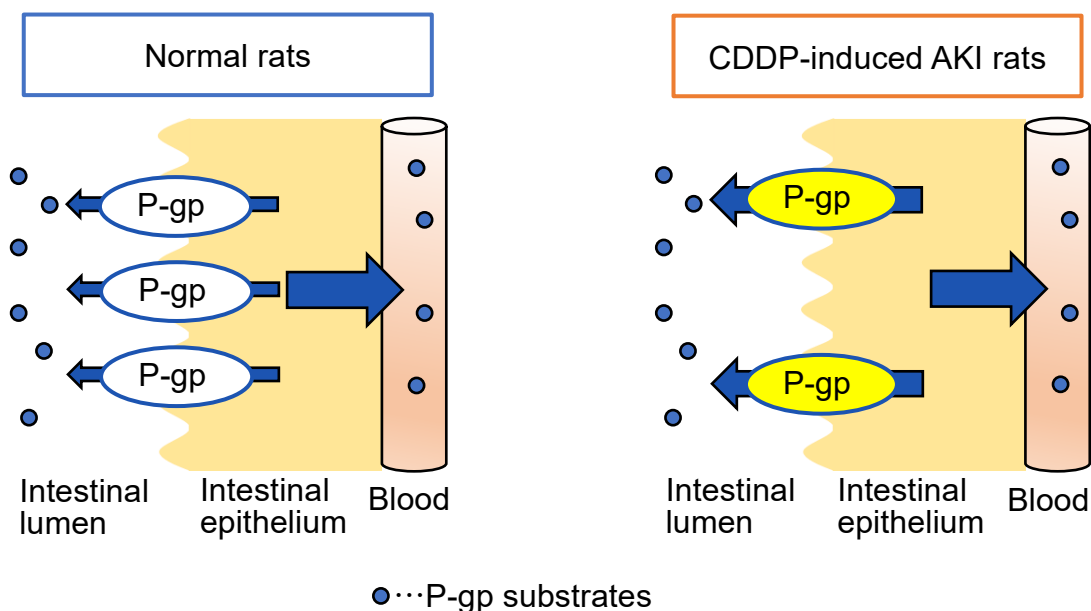


Fig. 14. Possible Changes of Ileal P-gp in CDDP-induced AKI Rats

第4章 シスプラチン誘発性 AKI ラットにおける Oatp1a2 及び Oatp2b1 基質薬物プラバスタチンの消化管吸収性の検討

第1節 緒言

小腸に発現する Oatps は、様々な薬物の吸収に関与する^{2,3,81)} ため、Oatps の発現量や機能が変化すると基質となる薬物の体内動態が様々な影響を受ける可能性がある。例として、グレープフルーツジュースやアップルジュース⁸²⁾ あるいは緑茶⁸³⁾ などに含まれるフラボノイド類などの成分が小腸の Oatps を阻害し、その結果 Oatps の基質である抗ヒスタミン薬のフェキソフェナジン⁸²⁾ や β 受容体遮断薬であるセリプロロール⁸⁴⁾、ナドロール⁸⁵⁾ などの血中濃度が低下することが報告されている。また、Oatp1a2 及び Oatp2b1 の基質薬物として知られている脂質異常症治療薬のプラバスタチン (pravastatin: PRV) もグレープフルーツジュースで服用すると血中濃度が低下することが報告されている。⁸⁶⁾ 一方で、PRV は血中濃度が上昇すると重大な有害事象である横紋筋融解症が起こるリスクが高まる。^{87,88)} したがって、AKI 時における PRV の血中動態を把握することは重要である。

第2章において、CDDP 誘発性 AKI ラットでは健常ラットと比較して Oatp1a2 の発現量が十二指腸にて増加し、一方で Oatp2b1 の発現量が十二指腸及び回腸で減少することが示された。そこで本章では、CDDP 誘発性 AKI ラットにおける Oatp1a2 と Oatp2b1 の発現変動が基質薬物の消化管吸収にどのように反映されるかを明らかにするために、両 Oatp の基質薬物である PRV の吸収挙動を検討した。

第2節 実験材料及び実験方法

第1項 使用薬物及び試薬

本章で新たに用いた薬物及び試薬類は以下の通りである。

Pravastatin sodium (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)

PRV の構造式を Fig. 15 に示す。その他の試薬及び溶媒は、全て市販の特級規格品を用いた。

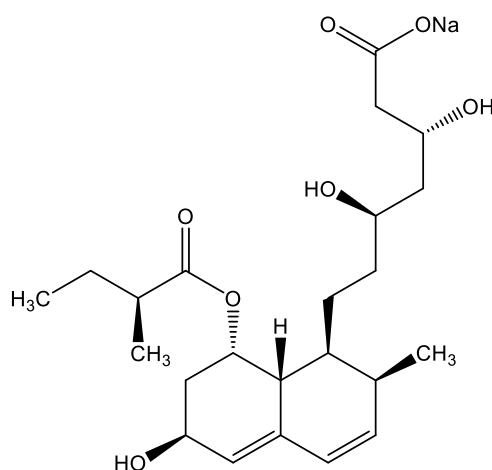


Fig. 15. Chemical Structure of Pravastatin Sodium

第2項 AKI ラットの作製

AKI ラットの作製は、10 週齢の SD 系雄性ラットを使用し、第1部 第1章 第2節 第2項及び第3項に準拠して行った。

第3項 健常ラット及びシスプラチン誘発性 AKI ラットにおけるプラバスタチンの消化管吸収性及び血漿中濃度推移の検討

(1) 薬物溶液の調製

PRV 溶液の調製は、第1部 第1章 第2節 第5項 (1) に基づいて行った。なお、PRV の濃度は 100 μM とした。

(2) 吸収実験

吸収実験は、第1部 第1章 第2節 第5項 (2) に基づき、小腸ループ法により行った。なお、実験時間は 120 分とした。また、PRV 投与直前及び投与後 30、

60, 90, 120 分にヘパリン (10,000 単位/10 mL, ニプロ, 大阪) で処理したシリンジを用いて頸静脈より 0.8 mL ずつ採血した. 採取した血液は直ちに遠心分離 (5,400g, 15 分, 5°C) し, 血漿画分を得た. 得られた各試料は, 定量時まで-30°C で冷凍保存した.

(3) 薬物定量

PRV の定量は HPLC 法にて行った. ループ内液及び粘膜部の処理方法は第 1 部 第 1 章 第 2 節 第 5 項 (3) に基づいて行い, 血漿試料の処理は Chart 2 に示す方法で行った. PRV の HPLC 分析条件を Table 14 に示した.

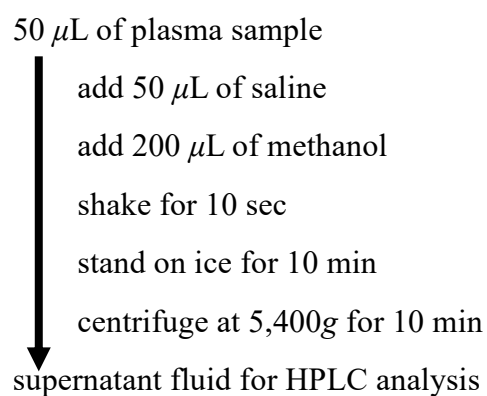


Chart 2. Procedure for Pravastatin Assay

Table 14. HPLC Conditions for Pravastatin Assay

Apparatus	: LC-10AT _{VP} (Shimadzu, Kyoto)
Column	: Inertsil ODS-3 (5 μ m, 4.6 \times 250 mm, GL Sciences, Tokyo)
Injection vol.	: 40 μ L
Column temp.	: 40°C
Detector	: SPD-6A UV (Shimadzu, Kyoto)
Wave length	: 238 nm
Flow rate	: 1.0 mL/min (retention time: 8 min)
Mobile phase	: 2.5 mM CH ₃ COONH ₄ : CH ₃ CN = 7 : 3

(4) AUC の算出

PRV を小腸ループに投与後 120 分までの血漿中濃度-時間曲線下面積 (area under the plasma concentration-time curve: AUC₀₋₁₂₀) を台形法により算出した。

第4項 健常ラット及びシスプラチン誘発性 AKI ラットへのプラバスタチン静脈内投与後の血漿中濃度推移の検討

(1) 薬物溶液の調製

静注用 PRV 溶液はポリエチレングリコール 400 と生理食塩液の 1 : 1 混合液に溶解し、濃度は 1 mM とした。

(2) ラットへのプラバスタチン静脈内投与実験

ラットを 15~18 時間絶食した後、イソフルランで吸入麻酔し、解剖台に固定した。PRV の投与量は 2 $\mu\text{mol/kg}$ とし、テルモシリンジ (容量 1 mL, 針サイズ 26G \times 1/2") を用いて頸静脈より投与した。PRV の投与直前及び投与後 2, 5, 10, 20, 30 分に PRV 投与を行っていない側の頸静脈よりヘパリンで処理したシリンジを用いて 0.4 mL ずつ採血した。採取した血液は直ちに遠心分離 (5,400g, 15 分, 5°C) して血漿画分を得た。得られた血漿試料は定量時まで -30°C で保存した。

(3) 薬物定量

PRV の定量は第 1 部 第 4 章 第 2 節 第 3 項 (3) に示す試料の処理方法及び HPLC 条件にて行った。

(4) AUC の算出

静脈内に PRV 投与後 2 分から 30 分までの AUC₂₋₃₀ は台形法により算出した。

第5項 統計処理

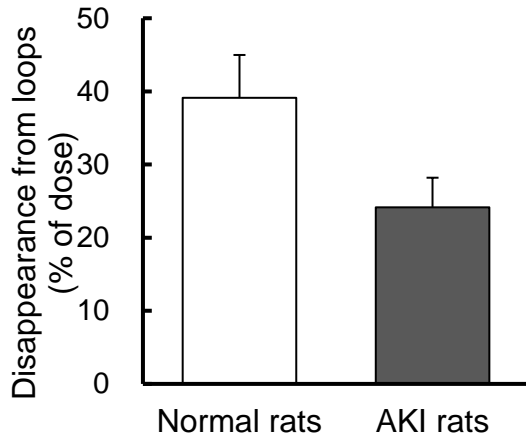
実験結果の呈示及び有意差検定は、第 1 部 第 1 章 第 2 節 第 6 項に準拠した。

第3節 実験結果

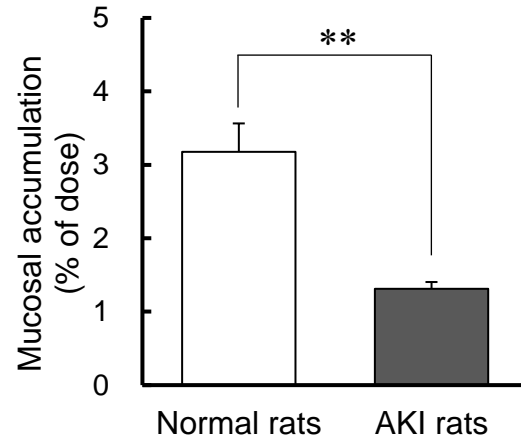
第1項 健常ラットとシスプラチン誘発性 AKI ラットにおけるプラバスタチンの消化管吸収性の比較

健常ラットの小腸ループ内に PRV を投与し, 120 分後にループ内液を回収して消失率, 粘膜蓄積率及び正味吸収率を求めたところ, それぞれ $39.1 \pm 5.9\%$, $3.8 \pm 0.4\%$, $35.9 \pm 5.6\%$ であった (Fig. 16). 一方, CDDP 誘発性 AKI ラットで同様の検討を行ったところ, PRV の消失率は $24.1 \pm 4.1\%$, 粘膜蓄積率は $1.3 \pm 0.1\%$, 正味吸収率は $22.8 \pm 4.0\%$ であった. 有意差は認められなかったものの, CDDP 誘発性 AKI ラットにおける PRV の消失率及び正味吸収率は健常ラットと比較して低下傾向を示した. また, 粘膜蓄積率が AKI ラットにおいて有意に低値を示したが, 消失率に対する粘膜蓄積率の割合はいずれもラット群でも小さく, 正味吸収率と比較して, AKI 時における影響は少ないと判断された.

A



B



C

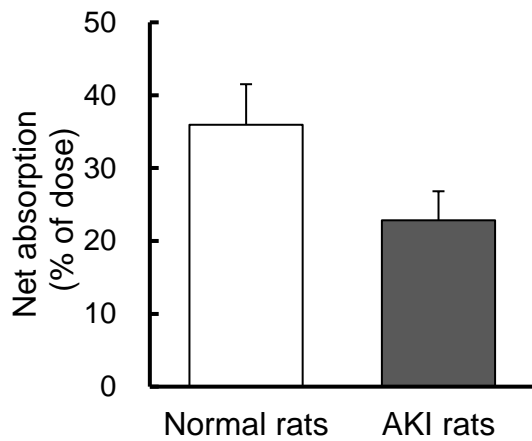


Fig. 16. Disappearance (A), Mucosal Accumulation (B), and Net Absorption (C) of Pravastatin after Intraluminal Administration to Normal and CDDP-induced AKI Rats

Each column represents the mean with S.E. (normal rats, n = 7; AKI rats, n = 5).

** $p < 0.01$, significantly different from normal rats.

第2項 健常ラットとシスプラチン誘発性 AKI ラットにおけるプラバスタチンの血漿中濃度推移の比較

健常ラットと CDDP 誘発性 AKI ラットの小腸に作製したループ内に PRV を投与後 120 分までの血漿中 PRV 濃度推移を Fig. 17 に示した. 健常ラットと比較して CDDP 誘発性 AKI ラットの血漿中 PRV 濃度は投与後 30 分より低下傾向を示し, 投与後 60, 90 及び 120 分では有意に低下した. また, AUC_{0-120} は, 健常ラットの 31.3%にまで有意に低下した (Table 15).

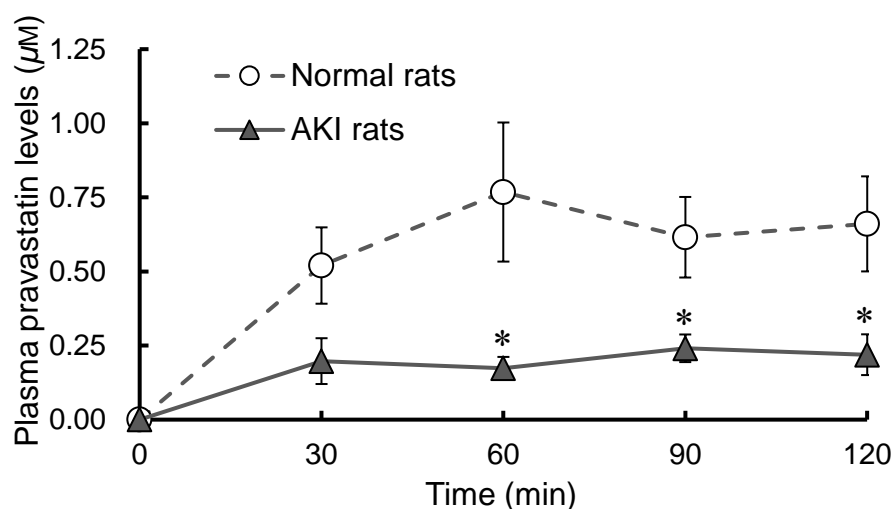


Fig. 17. Time Courses of Plasma Pravastatin Levels after Intraluminal Administration into Rat Small Intestinal Loops of Normal and CDDP-induced AKI Rats

Each point represents the mean with S.E. (normal rats, n = 7; AKI rats, n = 5).

* $p < 0.05$, significantly different from normal rats.

Table 15. AUC_{0-120} of Pravastatin after Administration into Small Intestinal Loops of Normal and CDDP-induced AKI Rats

	AUC_{0-120} ($\mu\text{mol}\cdot\text{min/L}$)
Normal rats	67.0 ± 16.7
AKI rats	$21.6 \pm 4.5^*$

Values represent the mean \pm S.E. (normal rats, n = 7; AKI rats, n = 5).

* $p < 0.05$, significantly different from normal rats.

第3項 健常ラットとシスプラチン誘発性 AKI ラットへのプラバスタチン静脈内投与後の血漿中濃度推移の比較

健常ラット及び CDDP 誘発性 AKI ラットに PRV を静脈内投与し, 30 分後までの血漿中濃度推移を検討した. Fig. 18 に示すように, 両ラット群において PRV は投与直後から速やかに血漿中より消失した. また, いずれの採血時間においても健常ラットと CDDP 誘発性 AKI ラットの血漿中濃度に有意な差はなかった. AUC₂₋₃₀ においても同様に, 有意な差は認められなかった.

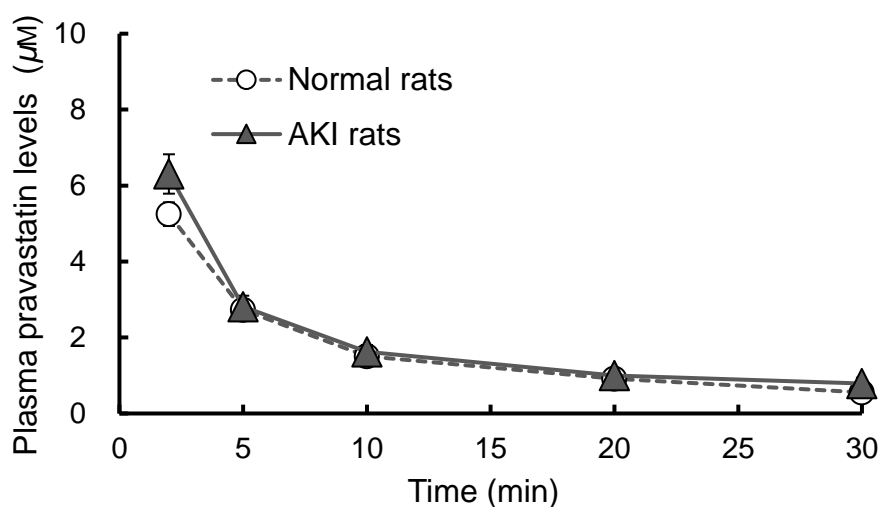


Fig. 18. Time Courses of Plasma Pravastatin Levels after Intravenous Administration to Normal and CDDP-induced AKI Rats

Each point represents the mean with S.E. (normal rats, n = 4; AKI rats, n = 5).

Table 16. AUC₂₋₃₀ for Pravastatin after Intravenous Administration to Normal and CDDP-induced AKI Rats

	AUC ₂₋₃₀ (μmol·min/L)
Normal rats	42.0 ± 5.2
AKI rats	46.8 ± 4.8

Values represent the mean ± S.E. (normal rats, n = 4; AKI rats, n = 5).

第4節 考察

第2章において、ウェスタンブロット法によりSD系雄性ラットの小腸にはOatp2b1とOatp1a2が存在すること、またCDDP誘発性AKIラットでは十二指腸及び回腸でOatp2b1の発現量の低下、十二指腸でOatp1a2の発現量の増加が起こることが示された。そこで本章では、Oatp1a2とOatp2b1の同時基質であるPRVをCDDP誘発性AKIラットの小腸ループ内に投与した場合の吸収挙動を検討した。

その結果、CDDP誘発性AKIラットにおけるPRVの正味吸収率は健常ラットよりも低下する傾向を示し、また血漿中濃度及びAUC₀₋₁₂₀は健常ラットと比較して有意に低下した(Figs. 16C, 17, Table 15)。PRVは水溶性が非常に高いため、⁸⁷⁾単純拡散による吸収の寄与は限定的と見なされ、吸収の大部分はOatp2b1とOatp1a2を介して進行すると考えられる。しかしながら、本章で得られたCDDP誘発性AKIラットにおける正味吸収率とAUC₀₋₁₂₀の低下は、十二指腸と回腸におけるOatp2b1の発現量の低下を反映した結果と考えられた。PRVはOatp1a2の基質でもあることから、^{89,90)}もしOatp1a2がPRVの吸収に大きな寄与をなしているならば、AKIラットの十二指腸におけるOatp1a2の発現増加はPRVの吸収促進に繋がり、Oatp2b1の発現低下によるPRVの吸収減少を相殺することも予測された。しかし本章では、そのような結果は得られなかった。PRVの吸収におけるOatp2b1とOatp1a2の相対的な寄与率は現在も不明であるが、本章での結果はOatp1a2の寄与は大きくないことを示唆した。第3章で詳述したように、CDDP誘発性AKIラットでP-gpの発現量が減少した場合、P-gpは輸送能を増幅させてゲートキーパー機能を維持するが、Oatp2b1では輸送能の増幅が起こる可能性はないと考えられた。

Fig. 17に示したように、CDDP誘発性AKIラットでは小腸ループ内にPRV投与後の血漿中PRV濃度が健常ラットよりも有意に低く推移した。PRVの血中からの消失には肝細胞内への取り込みが関与し、これにはOatp2b1に加えて、肝特異的なOatp1b1及びOatp1b3も寄与することが報告されている。^{2,3)}CDDP誘発性AKIラットにおいて小腸Oatp2b1の発現量が減少する場合(Fig. 8)、肝細胞の類洞側膜上に発現するOatpsも何らかの影響を受け、血漿中PRV濃度の変化に寄与する可能性が考えられた。そこで、健常ラットとCDDP誘発性AKIラ

ットに PRV を静脈内投与して血漿中濃度推移を比較したところ, Fig. 18 に示すように, 健常ラットと CDDP 誘発性 AKI ラットの血漿中濃度推移と AUC₂₋₃₀ には差が認められず, このことから肝に発現する Oatps を介した PRV の血漿クリアランスは変化していないことが示された. また, PRV は Oatps により肝細胞に取り込まれた後, Mrp2 を介して高率に胆汁中へと排泄されることが知られているが,⁹¹⁾ CDDP 誘発性 AKI ラットにおいて胆管側膜上の Mrp2 の発現や機能が変化しているかについては今後の検討が必要である. また, Mrp2 は小腸にも発現している⁹²⁾ が, Kivisto ら⁹³⁾ は PRV の消化管吸収における Mrp2 の関与は小さいことを報告している.

以上, 本章での検討から, CDDP 誘発性 AKI ラットにおいては小腸 Oatp2b1 のダウンレギュレーションが起これり, これにより基質薬物の吸収低下が起これることが明らかとなった.

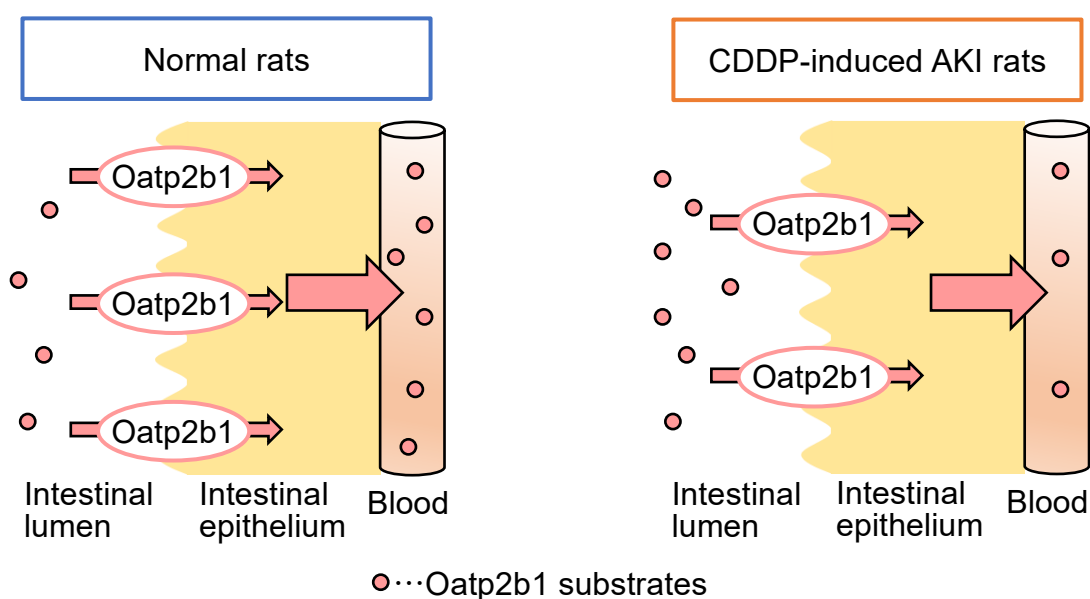


Fig. 19. Possible Changes of Intestinal Oatp2b1 in CDDP-induced AKI Rats

第 5 章 シスプラチン誘発性 AKI ラットにおける P-gp, Oatp1a2 及び Oatp2b1 基質薬物フェキソフェナジンの消化管吸収性の検討

第 1 節 緒言

これまで第 3 章及び第 4 章では, CDDP 誘発性 AKI ラットにおける 3 種の P-gp 基質薬物 (MP, RHO, GFLX) 及び Oatp1a2 と Oatp2b1 の同時基質とされる PRV の吸収挙動の変化について検討した. 現在, 臨床に用いられる薬物の中には, 消化管吸収過程において複数のトランスポーターによって輸送されるものがあり,³⁾ ヒスタミン H₁ 受容体拮抗作用を有するアレルギー性疾患治療薬のフェキソフェナジン (fexofenadine: FEX) は, *in vitro* の実験から P-gp 及び OATP1A2, OATP2B1 の基質薬物であることが報告されている.^{3,94,95)} FEX はテルフェナジンの活性代謝物として見出されたが, ヒトに投与された後ほとんど代謝を受けず, 未変化体として尿中及び糞中に排泄される.⁹⁶⁾ 一方, ラットの小腸からの FEX の吸収率は, 投与後 120 分においても十二指腸で最大 20~30%程度であり, 消化管から吸収されにくいことが報告されている.⁹⁶⁾ FEX の低吸収性は P-gp, OATP1A2, OATP2B1 が複雑に関わることによって引き起こされると推察される. 第 2 章において, CDDP 誘発性 AKI ラットの腸では P-gp と Oatp2b1 の発現量が低下し, Oatp1a2 の発現量は逆に増加することが示された.

そこで本章では, CDDP 誘発性 AKI ラットにおける P-gp, Oatp1a2, Oatp2b1 の発現変化が FEX の吸収性にどのような変化を引き起こすかについて検討を加えた.

第2節 実験材料及び実験方法

第1項 使用薬物及び試薬

本章で新たに用いた薬物及び試薬類は以下の通りである。

Fexofenadine hydrochloride (東京化成工業株式会社, 東京)

FEX の構造式を Fig. 20 に示す。その他の試薬及び溶媒は、全て市販の特級規格品を用いた。

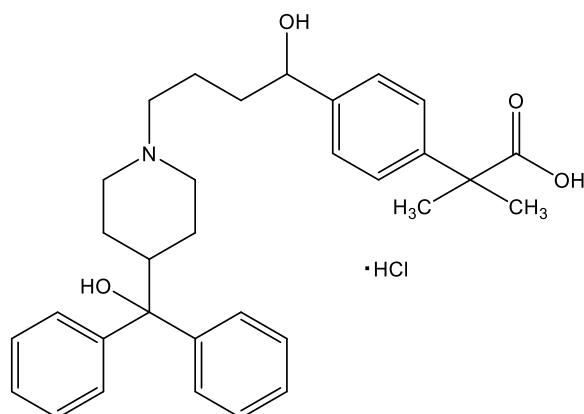


Fig. 20. Chemical Structure of Fexofenadine Hydrochloride

第2項 AKI ラットの作製

AKI ラットの作製は、10 週齢の SD 系雄性ラットを使用し、第1部 第1章 第2節 第2項及び第3項に準拠して行った。

第3項 健常ラット及びシスプラチン誘発性 AKI ラットにおけるフェキソフェナジンの消化管吸収性及び血漿中濃度推移の検討

(1) 薬物溶液の調製

静注用 FEX 溶液の調製は、第1部 第4章 第2節 第4項 (1) に基づいて行った。なお、FEX の濃度は 1 mM とした。

(2) 吸収実験

吸収実験は、第1部 第1章 第2節 第5項 (2) に基づいて行った。

(3) 薬物定量

FEX の定量は HPLC 法にて行った。ループ内液及び粘膜部は第 1 部 第 1 章 第 2 節 第 5 項 (3) に、血漿試料は、第 1 部 第 4 章 第 2 節 第 4 項 (3) に基づいてそれぞれ処理した。FEX の HPLC 分析条件を Table 17 に示した。

Table 17. HPLC Conditions for Fexofenadine Assay

Apparatus	: LC-10AT _{VP} (Shimadzu, Kyoto)
Column	: Inertsil ODS-3 (5 μ m, 4.6 \times 250 mm, GL Sciences, Tokyo)
Injection vol.	: 40 μ L
Column temp.	: 50°C
Detector	: RF-10A _{XL} (Shimadzu, Kyoto)
Wave length	: Ex 230 nm/ Em 280 nm
Flow rate	: 0.8 mL/min (retention time: 18 min)
Mobile phase	: 0.05 M KH ₂ PO ₄ : CH ₃ CN = 65 : 35

(4) AUC の算出

AUC の算出は、第 1 部 第 4 章 第 2 節 第 4 項 (4) に基づいて行った。

第 4 項 健常ラット及びシスプラチン誘発性 AKI ラットへのフェキソフェナジン静脈内投与後の血漿中濃度推移の検討

(1) 薬物溶液の調製

FEX が水に難溶性を示すため、FEX 溶液の調製は、第 1 部 第 3 章 第 2 節 第 4 項 (1) に基づいて行った。

(2) ラットへのフェキソフェナジン静脈内投与実験

ラットへの FEX 静脈内投与実験は、第 1 部 第 4 章 第 2 節 第 4 項 (2) に基づいて行った。なお、FEX の投与量は 2 μ mol/kg とし、採血は FEX 投与直前及び投与後 2, 5, 10, 20, 30, 60, 90, 120 分に行った。

(3) 薬物定量

FEX の定量は HPLC 法にて行い、血液試料の処理方法及び HPLC 条件は第 1 部 第 4 章 第 2 節 第 3 項 (3)、第 1 部 第 5 章 第 2 節 第 3 項 (3) に準拠した。

(4) AUC の算出

AUC の算出は、第 1 部 第 4 章 第 2 節 第 3 項 (4) に基づいて行った。

第 5 項 統計処理

実験結果の呈示及び有意差検定は、第 1 部 第 1 章 第 2 節 第 6 項に準拠した。

第 3 節 実験結果

第 1 項 健常ラットとシスプラチン誘発性 AKI ラットにおけるフェキソフェナジンの消化管吸収性の比較

健常ラットと CDDP 誘発性 AKI ラットの小腸ループ内に FEX を投与し、120 分後における消失率、粘膜蓄積率及び正味吸収率を算出したところ、健常ラットではそれぞれ $30.0 \pm 4.2\%$ 、 $3.0 \pm 0.5\%$ 、 $26.9 \pm 4.0\%$ であった(Fig. 21)。一方、CDDP 誘発性 AKI ラットでは、消失率は $19.9 \pm 2.9\%$ 、粘膜蓄積率は $1.3 \pm 0.3\%$ 、正味吸収率は $18.7 \pm 3.0\%$ であった。第 4 章の PRV の場合と同様に有意差は認められなかったものの、CDDP 誘発性 AKI ラットにおける正味吸収率は健常ラットよりも低下する傾向を示した。

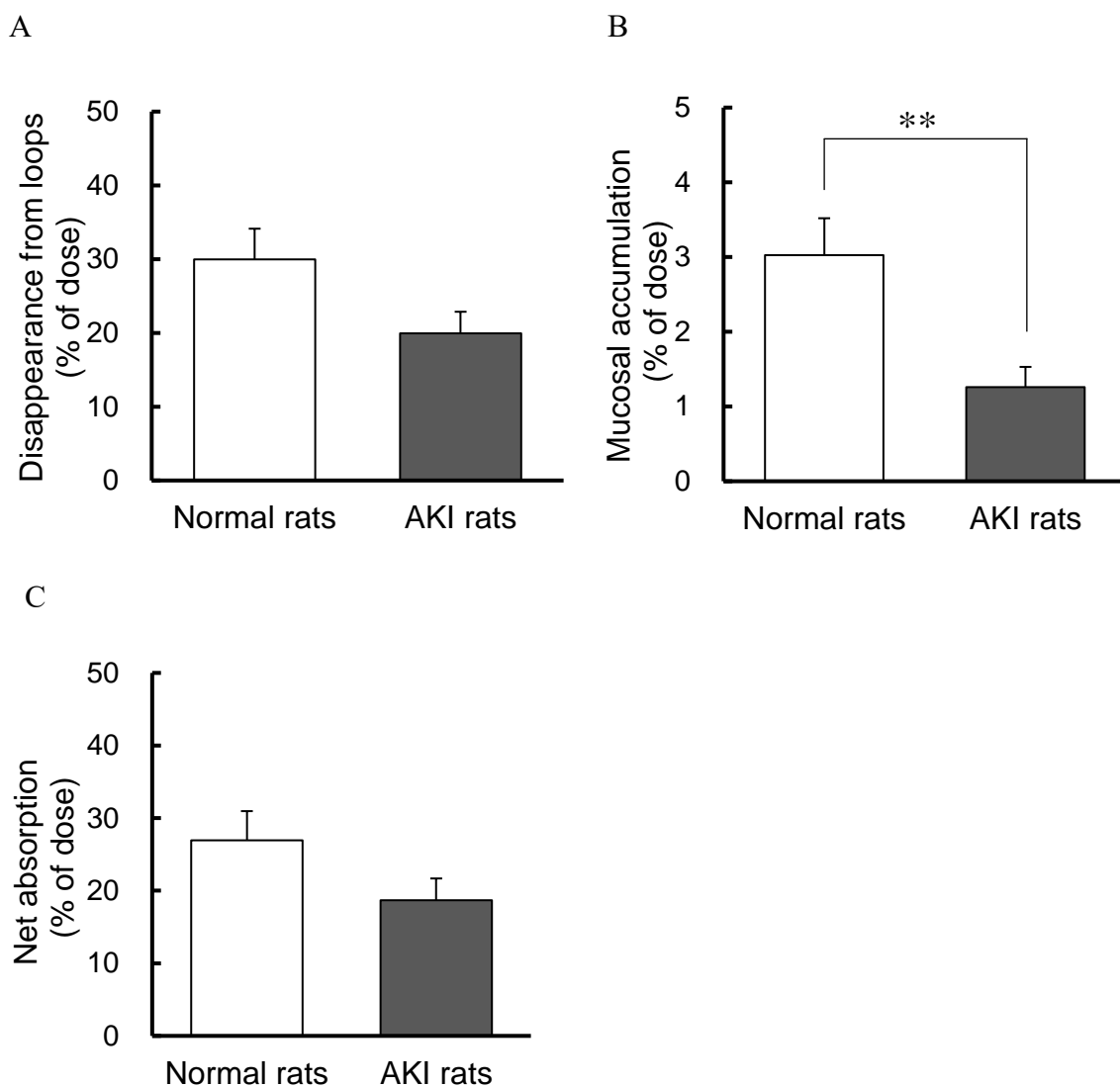


Fig. 21. Disappearance (A), Mucosal Accumulation (B), and Net Absorption (C) of Fexofenadine after Intraluminal Administration to Normal and CDDP-induced AKI Rats

Each column represents the mean with S.E. (normal rats, n = 5; AKI rats, n = 6).

** $p < 0.01$, significantly different from normal rats.

第2項 健常ラットとシスプラチン誘発性 AKI ラットにおけるフェキソフェナジンの血漿中濃度推移の比較

健常ラットと CDDP 誘発性 AKI ラットの小腸ループ内に FEX を投与し、120 分後まで血漿中 FEX 濃度を測定した結果を Fig. 22 に示した。投与後 30 分における FEX 血漿中濃度は、健常ラットで $0.23 \pm 0.05 \mu\text{M}$ 、CDDP 誘発性 AKI ラットで $0.27 \pm 0.07 \mu\text{M}$ であり、その後 120 分まではほぼ一定の値で推移した。また、いずれの採血時間においても健常ラットと CDDP 誘発性 AKI ラットの血漿中濃度には差がなく、 AUC_{0-120} にも有意差は認められなかった (Table. 18)。

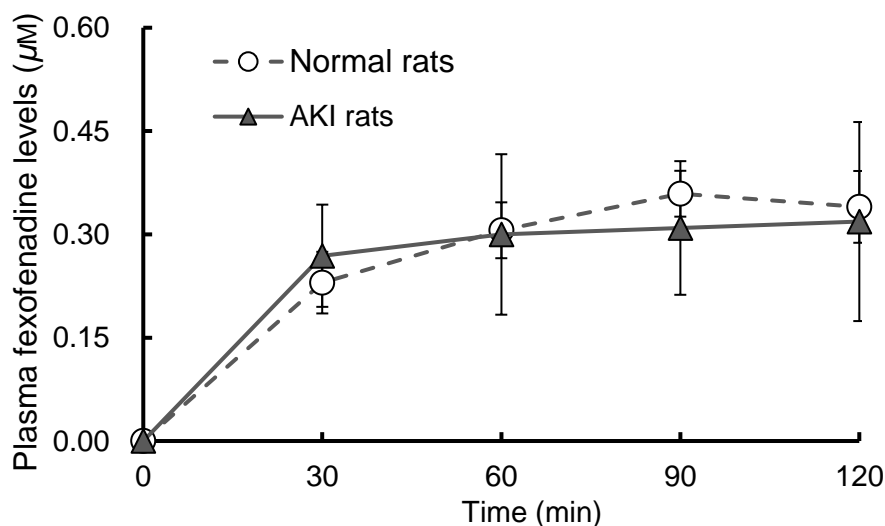


Fig. 22. Time Courses of Plasma Fexofenadine Levels after Intraluminal Administration to Normal and CDDP-induced AKI Rats

Each point represents the mean with S.E. (n = 4).

Table 18. AUC_{0-120} of Fexofenadine after Intraluminal Administration to Normal and CDDP-induced AKI Rats

	AUC_{0-120} ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}/\text{L}$)
Normal rats	32.0 ± 2.6
AKI rats	31.1 ± 10.7

Values represent the mean \pm S.E. (n = 4).

第3項 健常ラットとシスプラチン誘発性AKIラットへのフェキソフェナジン
静脈内投与後の血漿中濃度推移の比較

健常ラットと CDDP 誘発性 AKI ラットに FEX を静脈内投与後 120 分までの血中濃度推移を検討した. Fig. 23 に示すように, いずれのラットにおいても FEX を投与直後から速やかに血漿中より消失した. 健常ラットと CDDP 誘発性 AKI ラットの血漿中濃度推移及び AUC_{2-120} に有意な差は認められなかった (Table. 19).

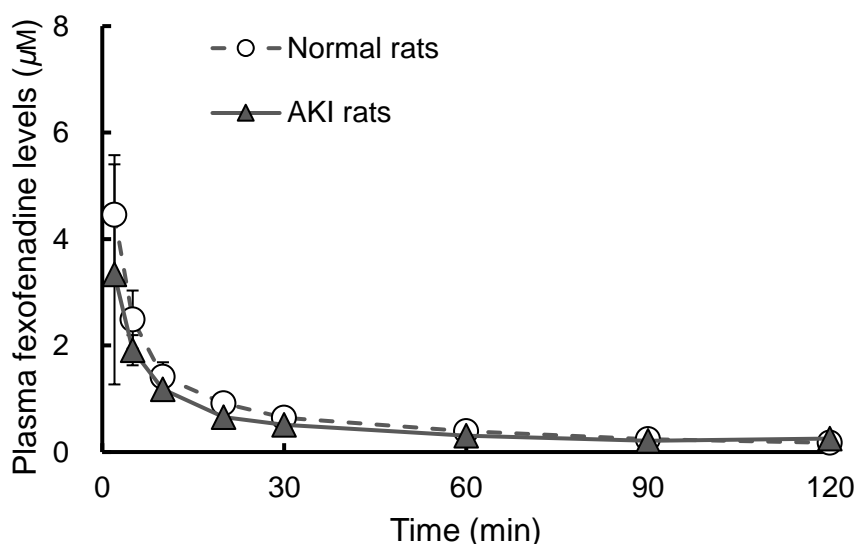


Fig. 23. Time Courses of Plasma Fexofenadine Levels after Intravenous Administration to Normal and CDDP-induced AKI Rats

Each point represents the mean with S.E. (normal rats, n = 5; AKI rats, n = 3).

Table 19. AUC_{2-120} for Fexofenadine after Intravenous Administration to Normal and CDDP-induced AKI Rats

	AUC_{2-120} ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}/\text{L}$)
Normal rats	70.8 ± 7.5
AKI rats	57.6 ± 8.3

Values represent the mean \pm S.E. (normal rats, n = 5; AKI rats, n = 3).

第4節 考察

本章では第二世代の抗ヒスタミン薬である FEX の吸収挙動を健常ラットと CDDP 誘発性 AKI ラット間で比較した。その結果、CDDP 誘発性 AKI ラットの 小腸ループからの FEX の正味吸収率は、健常ラットと比較して低下傾向を示したものの、その程度は小さく有意差は認められなかった (Fig. 21C)。また、FEX の血漿中濃度推移及び AUC₀₋₁₂₀ にも健常ラットと CDDP 誘発性 AKI ラット間で差は認められなかった (Table 18)。FEX は、*in vitro* の研究で P-gp⁹⁷⁾、Oatp2b1 及び Oatp1a2^{89,90,95)} の基質であることが示されている。したがって、FEX の小腸ループからの消失や血中への移行は、これら 3 つのトランスポーターによって制御されていると見なされる。しかし、FEX の *in vivo* での吸収におけるこれらトランスポーターの相対的寄与については十分に解明されていない。これまでに Glaeser ら⁹⁷⁾ は、FEX の消化管吸収には小腸 P-gp と Oatp1a2 間の相互作用が重要であることを報告している。また、当研究室における以前の研究でも、P-gp が FEX の低吸収性を引き起こす要因であることが示されている。⁹⁸⁾ 一方、グレープフルーツジュースやアップルジュースなどのフルーツジュースが小腸の Oatp2b1 を阻害し、FEX の消化管吸収を低下させることが報告されている。^{99,100)}

第2章で、CDDP 誘発性 AKI ラットでは部位依存的に小腸 P-gp 及び Oatp2b1 の発現量が低下し、一方 Oatp1a2 の発現量は逆に増加することが明らかになった。また第3章では、P-gp の発現が低下しても P-gp の基質輸送能が増幅されることで P-gp による吸収抑制が健常ラットと同程度に維持されることが示された。この知見に基づけば、CDDP 誘発性 AKI ラットの 小腸上皮細胞では、P-gp を介した FEX の分泌は健常ラットと同程度に起こると推察される。この点を踏まえると、CDDP 誘発性 AKI ラットにおける正味吸収率や血中濃度推移が健常ラットと変化がなかったのは、Oatp1a2 のアップレギュレーションによる FEX の輸送促進と Oatp2b1 のダウンレギュレーションによる輸送低下が同時に進行することで、上皮細胞における FEX の移行が相殺され、見かけ上健常ラットと同程度になっている可能性が考えられた。

また、FEX は主に肝から未変化体のままで胆汁中に排出される。^{94, 101)} 第4章で検討した PRV と同様に、FEX の肝取り込みには肝細胞類洞側膜に存在する Oatps が密接に関与する。Shimizu ら¹⁰²⁾ は、HEK293 細胞に OATP1B1, OATP1B3,

OATP2B1 を強制発現させて FEX の肝取り込みへの寄与を検討し, OATP1B3 がヒトにおける最も主要なトランスポーターであることを報告している. PRV の静脈内投与後の血漿クリアランスは健常ラットと CDDP 誘発性 AKI ラット間で差が見られなかったことから, CDDP 誘発性 AKI ラットにおいて肝 Oatps の発現変動や機能変動は起こらないと推測された. それを再確認するために, FEX を健常ラットと CDDP 誘発性 AKI ラットに静脈内投与し血中濃度推移を比較した. Fig. 23 に示すように, FEX は血漿中から速やかに消失し, また, CDDP 誘発性 AKI ラットでは健常ラットと比較して AUC_{2-120} が低下する傾向が見られたものの有意差は認められなかった. この結果から, 肝に存在する Oatps を介した FEX の血漿クリアランスは変化していないと考えられた.

以上, 本章の検討から, CDDP 誘発性 AKI ラットでは, FEX の消化管吸収挙動は, 消化管吸収における P-gp, Oatp1a2 及び Oatp2b1 のこれら 3 つのトランスポーターの調節が複雑に関与することで, 治療効果に及ぼす影響を最小限に抑える機構の存在が示唆された.

第6章 シスプラチン誘発性 AKI ラットにおける小腸 Cyp3a の発現変化と代謝能に関する検討

第1節 緒言

CYP は、種々の薬物や発がん物質を含む生体異物の酸化的代謝を触媒する最も重要な代謝酵素であり、複数の分子種が存在する。CYP は主に肝に存在するが、小腸や腎、肺などにおいてもその存在が確認され、^{103,104)} 中でも CYP3A は小腸にも高率に発現していることが明らかとなっている。¹⁰⁵⁾ そのため CYP3A は、肝ばかりでなく小腸でも基質薬物の初回通過効果に重要な役割を果たすと見なされている。¹⁰⁶⁾ 例えば、CYP3A の阻害薬であるケトコナゾールを予め経口投与し、その後に CYP3A 基質であるミダゾラムを静脈内投与又は経口投与したところ、静脈内投与時にはミダゾラムの AUC が約 5 倍上昇するのに対し、経口投与時には AUC が約 16 倍にまで上昇することが報告されている。¹⁰⁷⁾ また、高血圧症治療薬であるジヒドロピリジン系 Ca 拮抗薬は代表的な CYP3A 基質薬物として知られているが、グレープフルーツジュースと併用するとその血漿中濃度が上昇し AUC が増大することが報告されている。¹⁰⁸⁾ これは CYP3A による小腸での初回通過効果がグレープフルーツジュース中の成分により阻害されるためであり、^{109,110)} 小腸 CYP3A の機能変化が基質薬物のバイオアベイラビリティに大きな影響を及ぼすことを示唆している。^{111,112)} CYP3A は多種多様な薬物を基質とするが、その中には同時に P-gp の基質になるものも多く含まれることから、小腸において CYP3A と P-gp は協同して異物処理機構を形成していると認識されるようになった。¹¹³⁾ そこで本章では、CDDP 誘発性 AKI ラットにおける小腸 Cyp3a の発現変化をウェスタンブロット法により評価し、さらに Cyp3a の機能変化を知るために代表的基質であるジヒドロピリジン系 Ca 拮抗薬ニフェジピン (nifedipine: NFD) を健常ラットと CDDP 誘発性 AKI ラットに作製した小腸ループ内に投与して血漿中濃度推移を比較した。なお、当研究室での以前の検討により、NFD は吸収過程で P-gp による分泌を受けないことが示されている。¹¹⁴⁾

第2節 実験材料及び実験方法

第1項 使用薬物及び試薬

本章で新たに用いた薬物及び試薬類は以下の通りである。

Nifedipine (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)

Cyp3a antibody (ABclonal Biotechnology Co., Wuhan, Hubei China)

NFD の構造式を Fig. 24 に示す。その他の試薬及び溶媒は、全て市販の特級規格品を用いた。

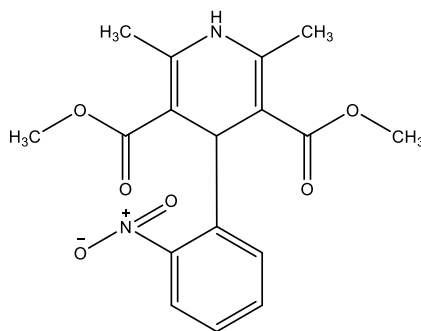


Fig. 24. Chemical Structure of Nifedipine

第2項 AKI ラットの作製

AKI ラットの作製は、10 週齢の SD 系雄性ラットを使用し、第1部 第1章 第2節 第2項及び第3項に準拠して行った。

第3項 健常ラット及びシスプラチン誘発性 AKI ラットにおける小腸 Cyp3a の発現量の確認

小腸 Cyp3a の発現量の確認は、第1部 第2章 第2節 第3項 (1)~(9) に基づき、ウェスタンブロット法にて行った。なお、Cyp3a の二次抗体として、HRP-conjugated anti rabbit secondary antibody を使用した。

第4項 健常ラット及びシスプラチン誘発性AKIラットにおけるニフェジピンの血漿中濃度推移の検討

(1) 薬物溶液の調製

NFDは水に極めて難溶であることから、予めメタノールに溶解した原液を調製し、これを1% β -シクロデキストリン含有Tyrode液(pH 6.5)を用いて希釈し、実験に供した。¹¹⁵⁾なお、メタノールの最終含量は2%以下となるようにした。NFDの濃度は100 μ Mとし、実験直前に消化管内pHを考慮して6.5に再度調整した。

(2) 吸収実験

吸収実験は、第1部第1章第2節第5項(2)に準拠した。また薬物投与直前及び薬物投与後10, 20, 30, 60, 90, 120分にヘパリンナトリウムで処理したシリンジを用いて頸静脈より0.8 mLずつ採血した。採取した血液は直ちに遠心分離(5,400g, 15分, 5°C)し、血漿画分を得た。得られた各試料は、定量時まで-30°Cで冷凍保存した。

(3) 薬物定量

NFDの定量はHPLC法にて行った。試料の処理方法は、第1部第4章第2節第4項(3)に基づいて行い、HPLC分析条件をTable 20に示した。

Table 20. HPLC Conditions for Nifedipine Assay

Apparatus	: LC-10AT _{VP} (Shimadzu, Kyoto)
Column	: Cosmosil 5C ₁₈ -AR-II (5 μ m, 4.6×150 mm, Nacalai Tesque, Kyoto)
Injection vol.	: 50 μ L
Column temp.	: 50°C
Detector	: SPD-6A UV (Shimadzu, Kyoto)
Wave length	: 240 nm
Flow rate	: 0.8 mL/min (retention time: 10 min)
Mobile phase	: 0.085% H ₃ PO ₄ : CH ₃ CN = 3 : 2

(4) AUC の算出

AUC の算出は, 第 1 部 第 4 章 第 2 節 第 4 項 (4) に基づいて行った.

第 5 項 統計処理

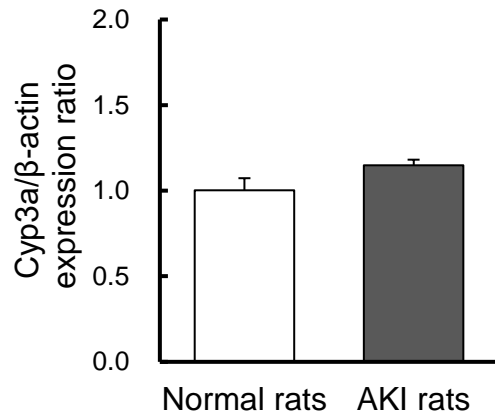
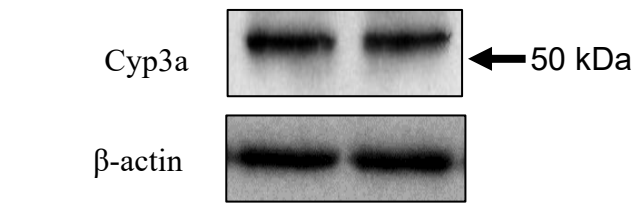
実験結果の呈示及び有意差検定は, 第 1 部 第 1 章 第 2 節 第 6 項及び第 1 部 第 2 章 第 2 節 第 5 項に準拠した.

第 3 節 実験結果

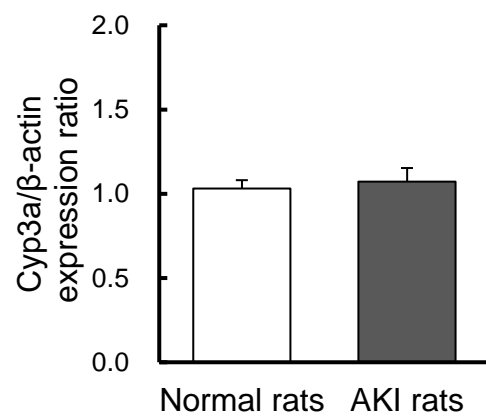
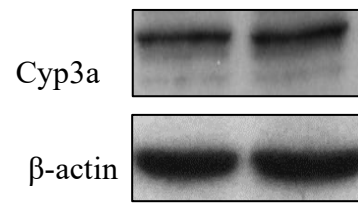
第 1 項 健常ラット及びシスプラチン誘発性 AKI ラットにおける小腸 Cyp3a の発現量の比較

CDDP (5 mg/kg) を単回腹腔内投与し, 72 時間後の十二指腸, 空腸, 及び回腸における Cyp3a の発現量をウェスタンブロット法により解析した (Fig. 25). 小腸各部位において, 50 kDa 付近に Cyp3a に由来する強いバンドが確認された. 発現量を検討すると, いずれの部位においても健常ラットと CDDP 誘発性 AKI ラット間で有意な変動は見られなかった.

A. Duodenum



B. Jejunum



C. Ileum

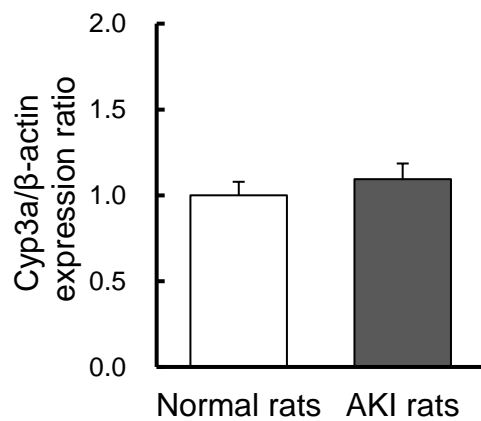
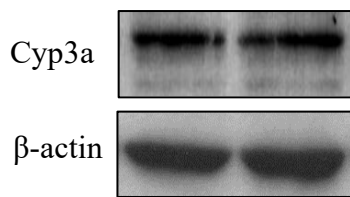


Fig. 25. Comparison of Cyp3a Expression in the Duodenum (A), Jejunum (B), and Ileum (C) between Normal and CDDP-induced AKI Rats
Relative protein expression is shown as the mean with S.E. (n = 4 or 5).

第2項 健常ラット及びシスプラチン誘発性AKIラットにおけるニフェジピンの血漿中濃度推移の比較

健常ラットとCDDP誘発性AKIラットの小腸ループ内にNFDを投与し、120分後までの血漿中濃度推移を比較した (Fig. 26). CDDP誘発性AKIラットにおけるNFDの血漿中濃度は、健常ラットと比較していずれの時間においても高く推移したが、有意差は認められなかった. AUC_{0-120} も同様に、有意差は認められないもののCDDP誘発性AKIラットでは高値を示した (Table. 21).

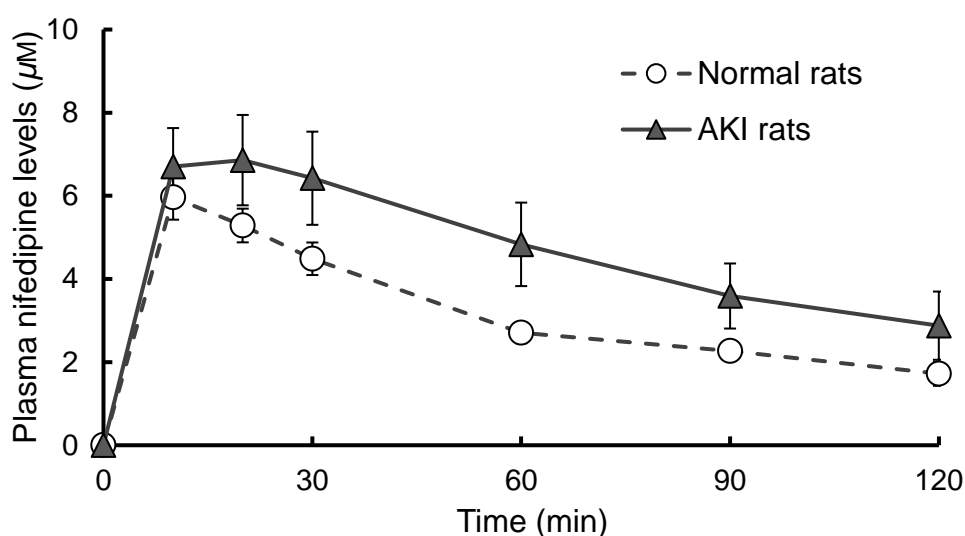


Fig. 26. Time Courses of Plasma Nifedipine Levels after Intraluminal Administration to Normal and CDDP-induced AKI Rats
Each point represents the mean with S.E. (n = 6).

Table 21. AUC_{0-120} of Nifedipine after Intraluminal Administration to Normal and CDDP-induced AKI Rats

	AUC_{0-120} ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}/\text{L}$)
Normal rats	377.1 ± 31.7
AKI rats	559.9 ± 104.2

Values represent the mean \pm S.E. (n = 6).

第4節 考察

第2章及び第3章にて、CDDP誘発性AKIラットで小腸P-gpの発現量が減少しても、個々のP-gpの輸送能を増幅させることにより、生体異物の吸収に対するゲートキーパー機能を維持することが示唆された。Cyp3aは、P-gpと同様に小腸におけるゲートキーパーとして基質薬物の初回通過効果に重要な役割を果たす。抗結核薬のリファンピシンは小腸P-gp¹¹⁶⁾及びCYP3a¹¹⁷⁾を共に誘導することが報告されており、CYP3aとP-gpの転写調節には、プレグナンX受容体や構成性アンドロスタン受容体などの核内受容体が重要な役割を担うことが知られている。¹¹⁸⁾このことから、CDDP誘発性AKIラットで小腸P-gpの発現量が減少する場合、Cyp3aも同様のダウンレギュレーションを受ける可能性がある。これまで、デキストラン硫酸ナトリウムを投与して作成した潰瘍性大腸炎モデルマウスでは、小腸のCyp3a及びP-gpの発現量がデキストラン硫酸ナトリウム投与7日後に共に低下すること、¹¹⁹⁾また、炎症性反応時にはこれら核内受容体の発現量が減少することに加えアジュバント関節炎モデルラットでは小腸Cyp3aの活性が低下することなどが報告されている。¹²⁰⁾そこで本章ではまず、ウェスタンブロット法でCDDP誘発性AKIラットにおけるCyp3aの発現変化の有無を検討した。その結果、小腸Cyp3aの発現量は、Fig. 25に示すように十二指腸、空腸、回腸いずれの部位においても健常ラットと比較して有意な変化は認められなかった。

次に、Cyp3aの代謝活性の変動の有無を確認する目的で、Cyp3aによって高率に初回通過効果を受けるNFDを小腸ループ内に投与し、血漿中濃度推移を検討した。Fig. 26に示すように、CDDP誘発性AKIラットにおけるNFDの血漿中濃度は全ての採血時間において健常ラットよりも高い値を示す傾向が見られた。また、CDDP誘発性AKIラットにおいては血漿中濃度の個体間変動が大きかったため有意差は得られなかったが、CDDP誘発性AKIラットにおけるAUC₀₋₁₂₀は、健常ラットにおけるAUC₀₋₁₂₀の約150%の値を示した。本章では肝のCyp3aの発現と代謝能の変化については検討を加えていないが、CDDP誘発性AKIラットにおけるAUC₀₋₁₂₀の増加は個々の小腸Cyp3aの活性が低下した可能性を示している。

以上、本章での検討により、小腸のゲートキーパーとして協同的な役割を担

う Cyp3a と P-gp は, CDDP によって AKI が誘発される時、異なる応答性を示すことが示唆された。

第 2 部 ゲンタマイシン誘発性急性腎障害 (AKI) ラットにおけるトランスポーターの発現変動と基質薬物の消化管吸収挙動の検討

第 1 章 ゲンタマイシン誘発性 AKI ラットにおけるトランスポーターの発現変動

第 1 節 緒言

近年、種々の原因菌による感染症が増加し、抗菌薬による薬物療法が幅広く行われているが、抗菌薬は薬剤性腎障害の原因薬剤の 17.5%を占めると報告されている。¹²¹⁾ 細菌のリボソーム 30s サブユニットに結合することでタンパク合成の開始を阻害し、さらに細胞膜に障害を与えることで強力な殺菌作用を発揮するアミノグリコシド系薬は特に腎障害を起こしやすく、用量依存的に急性尿細管壊死を誘発することが知られている。²⁶⁾ アミノグリコシド系薬は消化管で吸収されないため、筋注又は点滴静注で患者に投与され、治療有効域と中毒域が近いことから、血中濃度のモニタリングが必要な薬物群である。¹²²⁾

第 1 部 第 2 章で、CDDP によって AKI が引き起こされた場合、P-gp や Oatp2b1 の発現量が部位依存的に減少したが、CDDP 以外の薬物で AKI が誘発される場合にも、P-gp や Oatp2b1 の発現量や機能が CDDP の場合のように制御されるか否かを知ることは、AKI 時の治療薬選択において重要な情報となる。アミノグリコシド系薬のゲンタマイシン (gentamicin: GM) はグラム陰性菌感染症に対する有効な薬剤であり、その広域スペクトル、耐性レベルの低さ、低コストなどの理由から現在も広く使用されているが、CDDP の場合と同様に重篤な腎尿管毒性を有することがしばしば臨床現場での使用の妨げとなる。¹²³⁾

本章では、CDDP で AKI を誘発した実験条件を考慮して、GM の単回腹腔内投与後 3 日程度で AKI ラットを作製することを前提条件としたが、これに合致する条件で行われた報告は見出せなかった。そこで独自に投与条件を設定することとし、GM 投与後における Scr 値及び腎機能低下時に体内に蓄積することが報告されている尿毒症物質の一つであるインドキシル硫酸 (indoxyl sulfate: IS)¹²⁴⁾ を測定した。さらにウェスタンブロット法を用いて、小腸各部位における P-gp と Oatp2b1 の発現変化について検討を加えた。

第2節 実験材料及び実験方法

第1項 使用薬物及び試薬

本章で新たに用いた薬物及び試薬類は以下の通りである。

Gentamicin sulfate (ナカライテスク株式会社, 京都)

Indoxyl sulfate potassium salt (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)

GM の構造式を Fig. 27 に示す。その他の試薬及び溶媒は、全て市販の特級規格品を用いた。

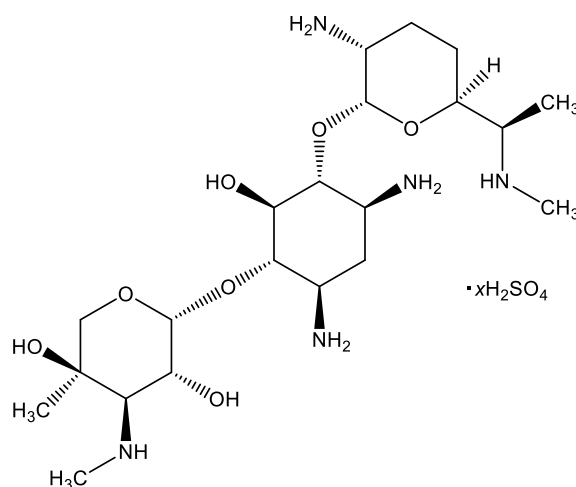


Fig. 27. Chemical Structure of Gentamicin Sulfate

第2項 実験動物

実験動物は、10 週齢の SD 系雄性ラットを使用し、第1部 第1章 第2節 第2項に準拠した。

第3項 ゲンタマイシン誘発性 AKI ラットの作製

GM を生理食塩液にて溶解し、50 mg/mL の溶液を調製した。その GM 溶液を SD ラット (300~420 g) の腹腔内に 500 mg/kg 又は 1,000 mg/kg の投与量で単回投与した。GM 投与直前及び GM 投与 24, 48, 72, 96 時間後に心臓より 1 mL ずつ採血し、第1部 第1章 第2節 第3項に準拠して、Scr 値を測定した。

第4項 インドキシル硫酸の定量

GM 投与直前及び投与 96 時間後における血漿中 IS 濃度を HPLC 法にて測定した。血漿試料の処理方法は、第1部 第3章 第2節 第3項 (3) に基づいて行った。IS の HPLC 分析条件を Table 22 に示した。

Table 22. HPLC Conditions for Indoxyl Sulfate Assay

Apparatus	: LC-10AT _{VP} (Shimadzu, Kyoto)
Column	: Cosmosil 5C ₁₈ -AR-II (5 μ m, 4.6 \times 150 mm, Nacalai Tesque, Kyoto)
Injection vol.	: 40 μ L
Column temp.	: 50°C
Detector	: SPD-6A UV (Shimadzu, Kyoto)
Wave length	: 280 nm
Flow rate	: 1.0 mL/min (retention time: 20 min)
Mobile phase	: 0.05 M KH ₂ PO ₄ : CH ₃ CN = 95 : 5

第5項 健常ラット及びゲンタマイシン誘発性 AKI ラットにおける小腸 P-gp 及び Oatp2b1 の発現量の確認

GM 誘発性 AKI ラットの腸における P-gp 及び Oatp2b1 の発現量は、第1部 第2章 第2節 第3項 (1)~(9) 及び第1部 第2章 第2節 第4項に準拠し、ウェスタンブロット法にて確認した。

第6項 統計処理

実験結果はすべて平均値 \pm 標準誤差 (mean \pm S.E.) で示した。また有意差検定は Student's *t*-test, Paired *t*-test 及び Wilcoxon rank sum test により行い、 $p < 0.05$ をもって有意差ありとした。

第3節 実験結果

第1項 ゲンタマイシン腹腔内投与による Scr 値の変化

GM 投与直前の健常ラットにおける Scr 値は 0.85 ± 0.05 mg/dL であった。腹腔内に GM を 500 mg/kg で投与した場合、投与後 96 時間まで Scr 値の上昇は認められなかった。一方、GM を 1,000 mg/kg で投与した場合、48 時間後より Scr 値の上昇が確認され、96 時間後には 2.95 ± 0.53 mg/dL に達した (Fig. 28)。この Scr 値の顕著な上昇は重度の腎障害が誘発されていることを反映すると考えられた。この結果を基に第2部では、GM 1,000 mg/kg を投与したラットのうち 96 時間後の Scr 値が GM 投与直前のラットと比較して 2 倍以上に上昇したものを GM 誘発性 AKI ラットとして実験に供することとした。

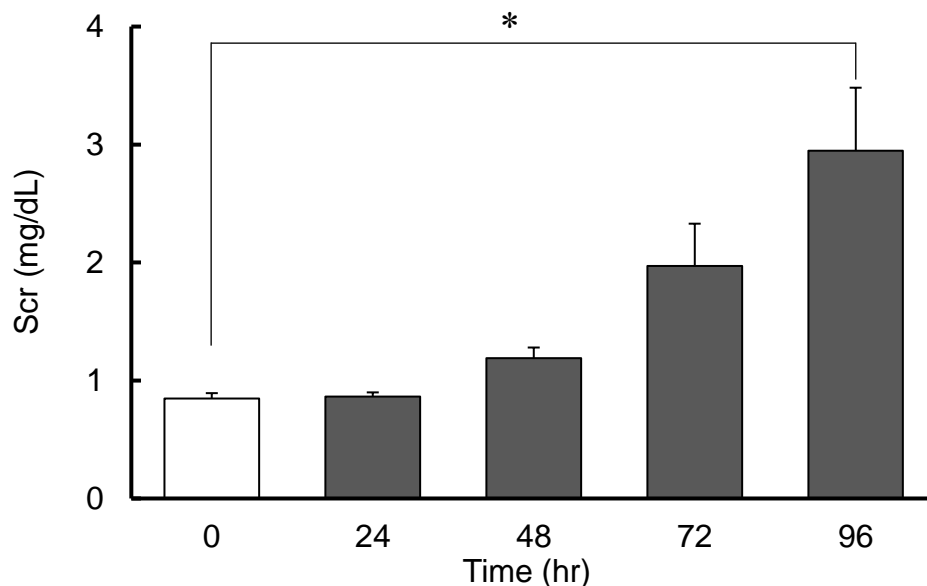


Fig. 28. Changes of Scr in Rats after Intraperitoneal Administration of GM at a Dose of 1,000 mg/kg

Each column represents the mean with S.E. (n = 4).

* $p < 0.05$, significantly different from time 0 hr.

第2項 ゲンタマイシン腹腔内投与による血漿中 IS 濃度の変化

SD ラットに GM (1,000 mg/kg) 投与直前及び投与 96 時間後の血漿中 IS 濃度はそれぞれ 7.1 ± 1.7 μ M, 80.6 ± 20.7 μ M であり、健常ラットと比較して、96 時間後に血漿中 IS 濃度は著しく上昇した (Fig. 29)。

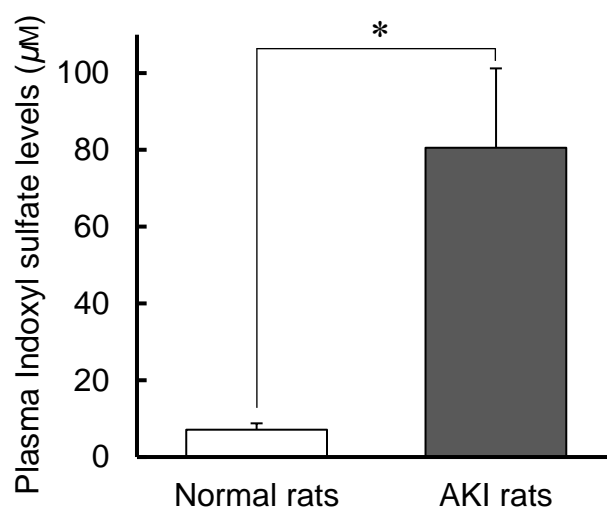


Fig. 29. Comparison of Plasma Indoxyl Sulfate Levels between Normal and GM-induced AKI Rats

Each column represents the mean with S.E. (n = 5).

* $p < 0.05$, significantly different from normal rats.

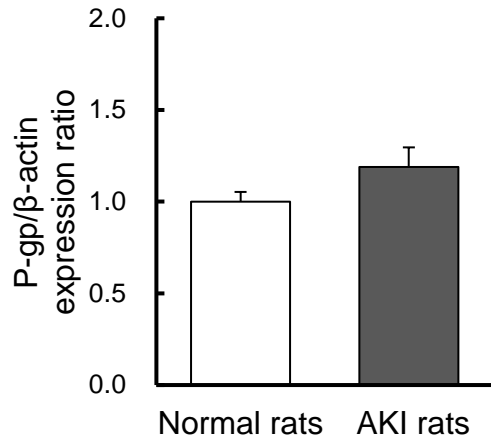
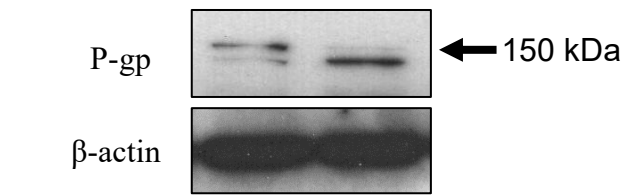
第 3 項 健常ラット及びゲンタマイシン誘発性 AKI ラットにおける小腸 P-gp の発現量の比較

GM 誘発性 AKI ラットの十二指腸及び空腸における P-gp の発現量は、健常ラットと比較して変化しなかったのに対し、GM 誘発性 AKI ラットの回腸における P-gp の発現量は、健常ラットと比較して 162%にまで有意に増加した (Fig. 30).

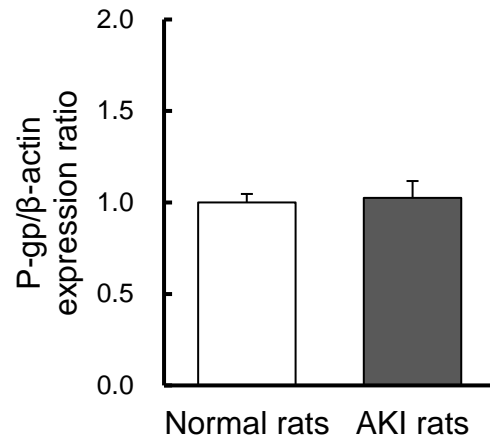
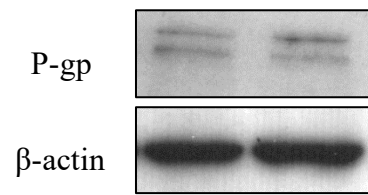
第 4 項 健常ラット及びゲンタマイシン誘発性 AKI ラットにおける小腸 Oatp2b1 の発現量の比較

GM 誘発性 AKI ラットの小腸 Oatp2b1 の発現量は、十二指腸、空腸、回腸のいずれの部位においても健常ラットと比較して、有意な変化を示さなかった (Fig. 31).

A. Duodenum



B. Jejunum



C. Ileum

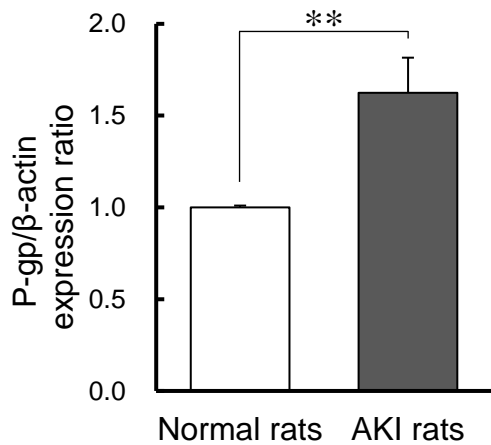
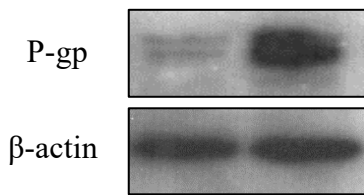
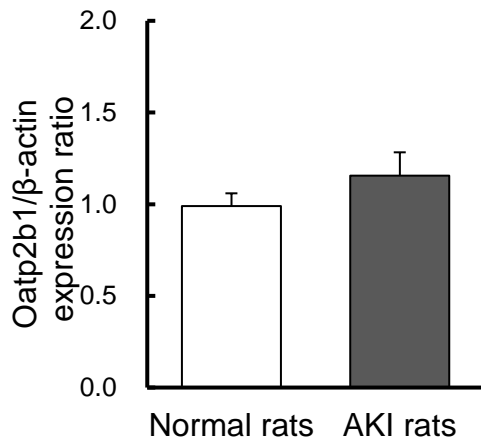
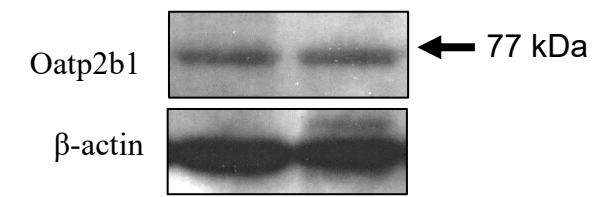


Fig. 30. Comparison of P-gp Expression in the Duodenum (A), Jejunum (B), and Ileum (C) between Normal and GM-induced AKI Rats

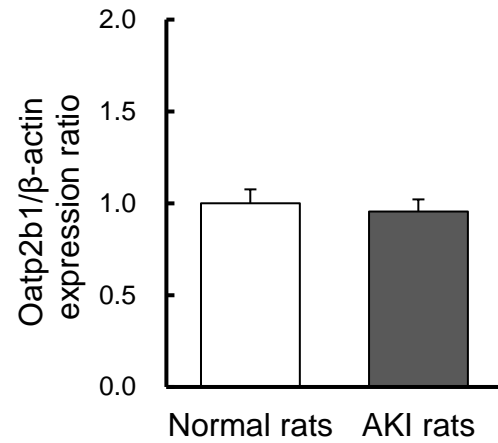
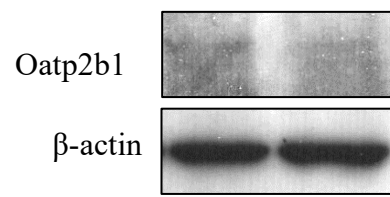
Relative protein expression is shown as the mean with S.E. (n = 4 or 5).

** $p < 0.01$, significantly different from normal rats.

A. Duodenum



B. Jejunum



C. Ileum

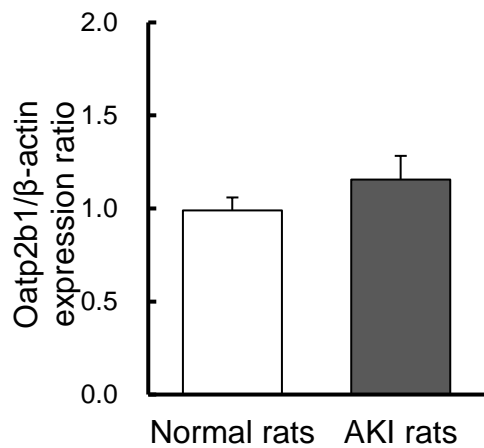
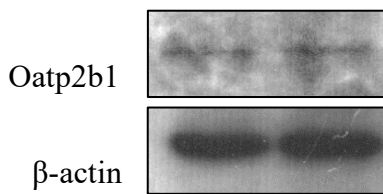


Fig. 31. Comparison of Oatp2b1 Expression in the Duodenum (A), Jejunum (B), and Ileum (C) between Normal and GM-induced AKI Rats

Relative protein expression is shown as the mean with S.E. (normal rats, n = 4 or 5; AKI rats, n = 5).

第4節 考察

本章では、CDDP による AKI で見られた小腸トランスポーターの発現変化が他の薬物で誘発された AKI でも共通に見られるかを検証することを目的とした。そこで、CDDP と同様に急性尿細管壊死を介して腎障害を引き起こすアミノグリコシド系抗菌薬の GM により AKI を誘発させたラットを実験に供した。

GM 投与による AKI ラットの作製法についてはこれまで複数の論文で報告されてきた。Shibata ら¹²⁵⁾ は GM 150 mg/kg/day を 5 日間連続皮下投与し、GM 最終投与から 72 時間かけて、Chen ら¹²⁶⁾ は GM 200 mg/kg を 1 日 2 回、2 日間連続皮下投与し、GM 最終投与から 120 時間かけて、Hosohata ら¹²⁷⁾ は GM 120 mg/kg を 1 日 1 回、9 日間連続腹腔内投与し、GM 最終投与から 48 時間かけて AKI ラット作製するなど、GM 投与量、投与部位、投与間隔は様々である。本章では、CDDP で AKI を誘発した実験条件を考慮して、GM の単回腹腔内投与後 3 日程度で AKI ラットを作製することを前提条件としたが、これに合致する条件で行われた報告は見出せなかった。そこで独自に投与条件を設定することとし、様々な投与量で検討した結果、GM 1,000 mg/kg を単回投与した場合に投与 48 時間後から Scr 値が上昇し、96 時間後には平均 Scr 値が GM 投与直前の約 3 倍になった (Fig. 28)。そこで GM 1,000 mg/kg を投与されたラットのうち、96 時間後の Scr 値が投与直前のラットの 2 倍以上に上昇したものを GM 誘発性 AKI ラットとして実験に用いた。

第 1 部で CDDP 誘発性 AKI ラットにおいて小腸トランスポーターの発現変動が生じた機序は不明であるが、AKI 時に体内に蓄積する物質が小腸上皮細胞内に移行してトランスポーターの発現を制御する可能性が考えられた。この場合、最も当てはまるのは尿毒症物質である。尿毒症物質は現在 150 種近く知られている¹²⁸⁾ が、その中で有害作用や体内動態について最もよく研究されているのが IS である。Fig. 29 に示すように、GM 誘発性 AKI ラットにおいて、血漿中 IS 濃度は $80.6 \pm 20.8 \mu\text{M}$ まで上昇したが、当研究室のこれまでの検討で CDDP 誘発性 AKI ラットにおいても $44.7 \pm 5.8 \mu\text{M}$ まで上昇することを確認している。また Morimoto ら¹²⁹⁾ は、CKD ラットに IS を静脈内投与すると、小腸内への IS 分泌が起こることを報告している。IS 又は関連物質が AKI 時の小腸トランスポーターの変動に関与する可能性があるとするならば、CDDP 以外の薬物で AKI

を誘発した場合にも、第 1 部と同様な小腸トランスポーターの発現変化が起こると予想される。

そこで、GM 誘発性 AKI 時の小腸におけるトランスポーターの発現量の変化をウェスタンブロット法にて検討したところ、健常ラットと比較して、P-gp の発現量は回腸で大幅に増加し、一方 Oatp2b1 の発現量は十二指腸、空腸、回腸いずれの部位においても有意な変化を示さなかった (Figs. 30, 31)。どちらのトランスポーターの発現量も第 1 部の CDDP 誘発性 AKI ラットでの変化とは明らかに異なっており、これらの結果は前述した可能性を明確に否定した。すなわち、第 1 部で見出されたトランスポーターの発現変動は、AKI という病態時に共通に起こるのではなく、AKI 誘発薬物に依存する可能性が考えられた。本研究で用いた CDDP と GM ではミトコンドリアの機能障害や酸化ストレスの誘発などを介し、多因子的に腎障害が進行していくことが報告されている。^{130,131)} しかし、CDDP は DNA 障害を介する過程を有するのに対し、GM はそのような特性は有していない。このことから、AKI 時に生じる炎症応答反応は誘発薬物に依存することが考えられる。したがって、腎に CDDP と GM が取り込まれた後に AKI を引き起こす機序の違いにより生じる生体内反応がトランスポーターの制御に異なる影響を及ぼしている可能性が推察される。これに関して、GM 誘発性 AKI 時には有機カチオン輸送体 (organic cation transporter: OCT) 1 の発現量が増加する¹³²⁾ のに対し、CDDP 誘発性 AKI ラットでは腎 Oct1 の発現量は変動しない¹³³⁾ ことが報告されている。また Terada ら¹³⁴⁾ は、Caco-2 細胞の P-gp 発現量が、過酸化水素を添加した場合、濃度が $1\mu\text{M}$ では有意に増加するのに対し、 $10\mu\text{M}$ 以降は濃度依存的に低下することを報告しており、AKI 時に発生した酸化ストレスへの応答性の違いが関与している可能性も考えられる。近年、小腸と腎の機能について相互に影響を及ぼしているという「腸腎連関」に関する報告が多数なされるようになってきた。¹³⁵⁾ 腸腎連関として腎機能低下時には、トリプトファンの吸収が低下すること¹³⁶⁾ や CKD ラットの腸では P-gp や Mrp2 の発現量が低下すること³²⁾ が報告されている。AKI が引き起こされた場合に小腸トランスポーターを制御する因子については、今後詳細な検討が必要と考えられる。

本検討では、AKI 状態を呈するまでに要する時間を考慮して、CDDP 投与 72 時

間後, GM 投与 96 時間後に P-gp と Oatp2b1 の発現量を確認した. 本研究で明らかになった小腸トランスポーターの発現変化が, AKI の進展に伴いどのように推移するかは, AKI 時の薬物動態を考える上で大変重要な点である. 例えば, ストレプトゾトシン誘発性糖尿病モデルラットを用いた検討では, 血糖値の上昇が見られた投与 9 日後には小腸 P-gp 発現量が減少したのに対し, 投与 15 日後にはその発現量が投与前のレベルに戻ることが示されている.¹³⁷⁾ 今後の詳細な検討が必要であるが, このことは小腸のトランスポーターの発現が AKI の進行状態により変化していく可能性を示唆している.

第2章 ゲンタマイシン誘発性 AKI ラットにおける P-gp 基質薬物の消化管吸収性の検討

第1節 緒言

第1部 第3章では, CDDP 誘発性 AKI ラットにおいて回腸 P-gp の発現量が著しく減少しても, 残存する個々の P-gp が基質輸送能を増幅することで, 基質に対する吸収抑制効果 (ゲートキーパー機能) が一定に維持されるという知見を得た. 一方, 第2部 第1章において, GM 誘発性 AKI ラットの場合には回腸 P-gp の発現量が健常ラットと比較して有意に増加し, P-gp の発現変化が CDDP 誘発性 AKI ラットとは異なる方向に進行することが示唆された. そこで本章では, GM 誘発性 AKI ラットにおける P-gp の発現増加が基質薬物の吸収挙動にどのような影響を及ぼすのかを明らかにするために, CDDP 誘発性 AKI ラットにおける検討と同様に小腸ループ法を用いた吸収実験を行った.

第2節 実験材料及び実験方法

第1項 使用薬物及び試薬

使用薬物及び試薬は, 第1部 第3章 第2節 第1項に準拠した.

第2項 AKI ラットの作製

AKI ラットの作製は, 10 週齢の SD 系雄性ラットを使用し, 第2部 第1章 第2節 第2項及び第3項に準拠して行った.

第3項 健常ラット及びゲンタマイシン誘発性 AKI ラットにおける 6 α -メチルプレドニゾロンの消化管吸収性の検討

(1) 薬物溶液の調製

MP 溶液の調製は, 第1部 第3章 第2節 第3項 (1) に準拠した.

(2) 吸収実験

吸収実験は, 第1部 第3章 第2節 第3項 (2) に準拠した.

(3) 薬物定量

MP の定量は、第 1 部 第 3 章 第 2 節 第 3 項 (3) に準拠した。

第 4 項 健常ラット及びゲンタマイシン誘発性 AKI ラットにおけるローダミン 123 の消化管吸収性の検討

(1) 薬物溶液の調製

RHO 溶液の調製は、第 1 部 第 3 章 第 2 節 第 4 項 (1) に準拠した。

(2) 吸収実験

吸収実験は、第 1 部 第 3 章 第 2 節 第 4 項 (2) に準拠した。

(3) 薬物定量

RHO の定量は、第 1 部 第 3 章 第 2 節 第 4 項 (3) に準拠した。

第 5 項 統計処理

実験結果の呈示及び有意差検定は、第 1 部 第 1 章 第 2 節 第 6 項に準拠した。

第 3 節 実験結果

第 1 項 健常ラットとゲンタマイシン誘発性 AKI ラットにおける 6 α -メチルプレドニゾロンの消化管吸収性の比較

健常ラットと GM 誘発性 AKI ラットの小腸に、十二指腸ループ、空腸ループ、回腸ループを作製し、MP の吸収挙動を比較した。投与 30 分後の MP の消失率は、健常ラットの場合、十二指腸で $95.6 \pm 1.4\%$ 、空腸で $62.7 \pm 5.4\%$ 、回腸で $43.3 \pm 4.7\%$ であった。一方、GM 誘発性 AKI ラットにおける MP の消失率は、十二指腸で $92.4 \pm 2.2\%$ 、空腸で $86.3 \pm 2.2\%$ 、回腸で $51.5 \pm 4.2\%$ であった。GM 誘発性 AKI ラットの空腸における MP の消失率は、健常ラットと比較して有意に増加したが、回腸における MP の消失率には、健常ラットと GM 誘発性 AKI ラット間で有意な変化が認められなかった (Fig. 32)。

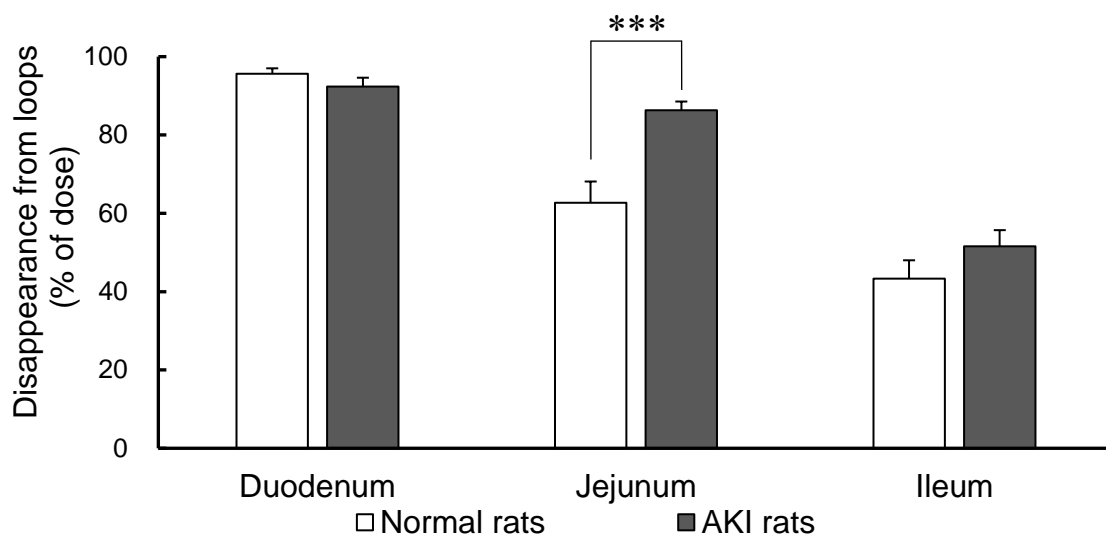


Fig. 32. Disappearance of 6 α -Methylprednisolone after Administration into the Duodenal, Jejunal and Ileal Loops of Normal and GM-induced AKI Rats

Each column represents the mean with S.E. (normal rats, n = 5; AKI rats, n = 8).

*** $p < 0.001$, significantly different from normal rats.

第 2 項 健常ラットとゲンタマイシン誘発性 AKI ラットにおけるローダミン 123 の消化管吸収性の比較

GM 誘発性 AKI ラットにおける P-gp 基質薬物の消化管吸収性の変化についてさらに検討するため、次に RHO を小腸ループに投与し 60 分後の吸収挙動を健常ラットと GM 誘発性 AKI ラット間で比較した。その結果、健常ラットにおける RHO の消失率、粘膜蓄積率、正味吸収率はそれぞれ $21.0 \pm 3.0\%$, $3.7 \pm 0.9\%$, $17.3 \pm 2.2\%$ であった。一方、GM 誘発性 AKI ラットにおける RHO の消失率は $28.7 \pm 5.0\%$, 粘膜蓄積率は $6.6 \pm 1.0\%$, 正味吸収率は $22.1 \pm 4.3\%$ であり、いずれの値も健常ラットとの間で有意な変化は認められなかった (Fig. 33).

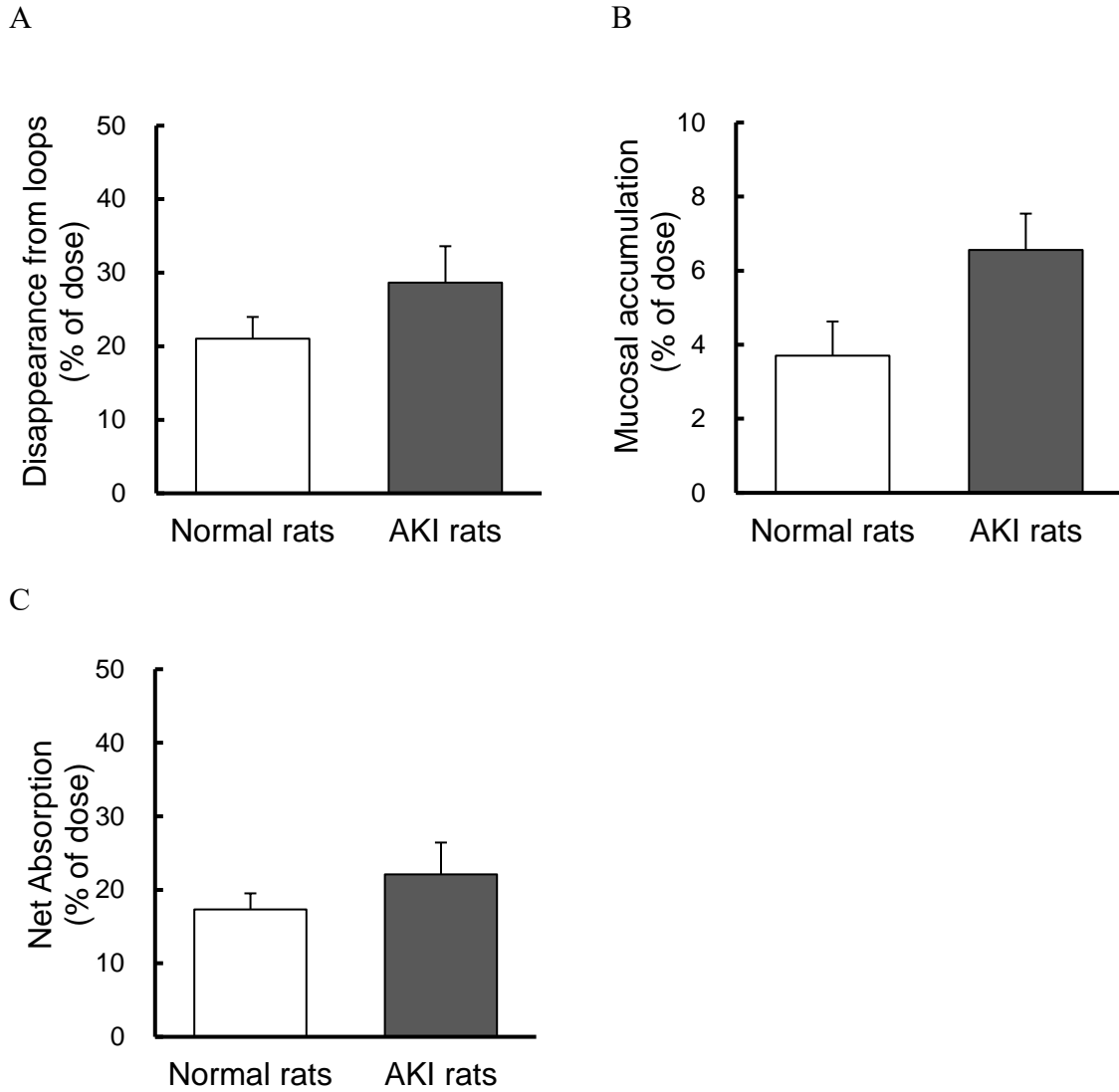


Fig. 33. Disappearance (A), Mucosal Accumulation (B), and Net Absorption (C) of Rhodamine 123 after Administration into Small Intestinal Loops of Normal and GM-induced AKI Rats

Each column represents the mean with S.E. (normal rats, n = 4; AKI rats, n = 5).

第4節 考察

第1章において、GM誘発性AKIラットの回腸でP-gpの発現量が健常ラットと比較して約1.6倍有意に増加することが示された。そのためGM誘発性AKIラットでは健常ラットに比べ、P-gp基質薬物の吸収低下が起こることが予想された。そこで本章では、P-gp基質薬物であるMP及びRHOを用いて、GM誘発性AKIラットにおける消化管吸収性の変化について検討を加えた。

GM誘発性AKIラットの回腸におけるMPの消失率は、健常ラットと同程度に維持され (Fig. 32)、P-gp発現量の有意な増加を反映する結果は得られなかった。これは、発現量が増加したP-gpの基質輸送能が減衰したことで、MPに対する吸収抑制が健常ラットと同程度に維持されたことによると考えられた。GM誘発性AKIラットの空腸ではP-gp発現量に変化がなかった (Fig. 30) にも関わらず、MP消失率が有意に上昇した (Fig. 32) ことは、回腸と同様に、空腸に発現するP-gpの輸送能が減衰していることに起因する可能性が考えられた。RHOの吸収実験においても、健常ラットとGM誘発性AKIラットの間に差がなく、吸収抑制効果の増強は認められなかった。

GM誘発性AKIラットにおけるP-gpの発現変動は、CDDP誘発性AKIラットでの検討と比較して真逆の方向性を示したものの、基質薬物の吸収性は、CDDP誘発性及びGM誘発性AKIラットの両群において同程度であった。トランスポーターの発現変動と機能の変化のどちらが先に生じているかは現時点で不明だが、P-gp発現量の変化が輸送能力の変化を引き起こす、又は、輸送能力の変化がP-gp発現量の変化を引き起こすという二つのパターンが考えられた。

以上、本章の検討から、小腸に発現するP-gpは、薬剤性AKI時に発現量の増減が引き起こされても、その輸送能を調節することで小腸におけるゲートキーパー機能を一定に維持している可能性が示唆された。

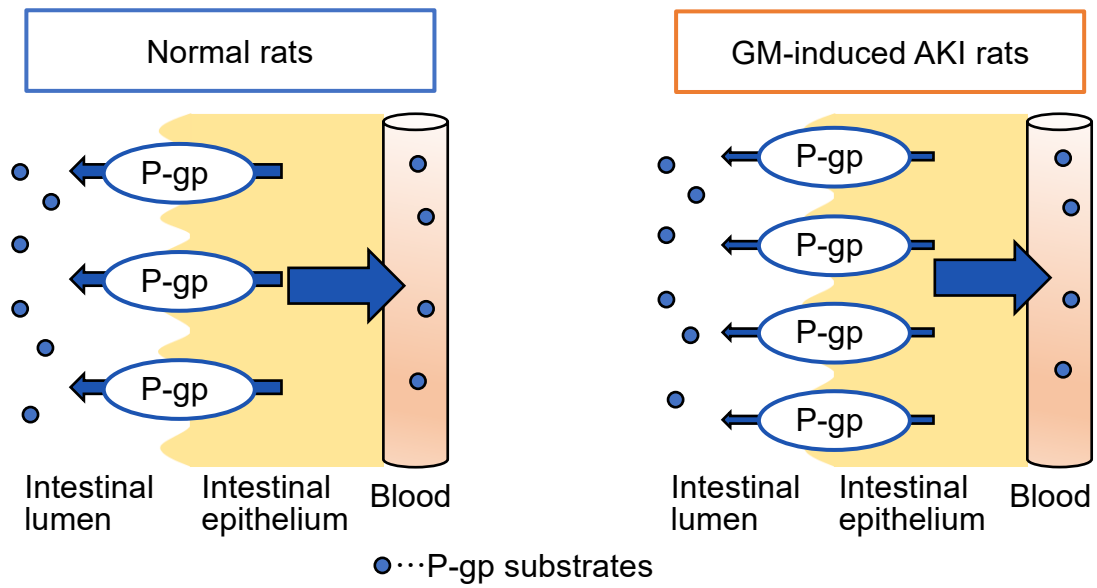


Fig. 34. Possible Changes of Ileal P-gp in GM-induced AKI Rats

第3章 ゲンタマイシン誘発性 AKI ラットにおける Oatp2b1 基質薬物プラバスタチンの消化管吸収性の検討

第1節 緒言

第1部 第2章及び第4章で論述したように, CDDP 誘発性 AKI ラットにおいては Oatp2b1 の発現量が低下し, これに呼応するように基質薬物 PRV の吸収が低下した. しかしながら, 第2部 第1章において, GM 誘発性 AKI ラットの小腸 Oatp2b1 の発現量には, 健常ラットと比較して十二指腸, 空腸, 回腸いずれの部位においても有意な変化は認められなかった. この結果は, CDDP 誘発性 AKI と GM 誘発性 AKI では小腸 Oatp2b1 の発現応答が異なることを示唆し, GM 誘発性 AKI ラットでは基質薬物の吸収も変化しないことが予測される. しかしながら, Oatp2b1 の発現量は変化しなくともその輸送能が変化し, 基質薬物の吸収が影響を受ける可能性が残されている. この点を明らかにするために, 本章では, GM 誘発性 AKI ラットにおける PRV の吸収挙動の変化の有無を小腸ループ法を用いた吸収実験により検討した.

第2節 実験材料及び実験方法

第1項 使用薬物及び試薬

使用薬物及び試薬は, 第1部 第4章 第2節 第1項に準拠した.

第2項 AKI ラットの作製

AKI ラットの作製は, 10 週齢の SD 系雄性ラットを使用し, 第2部 第1章 第2節 第2項及び第3項に準拠した.

第3項 健常ラット及びゲンタマイシン誘発性 AKI ラットにおけるプラバスタチンの消化管吸収性及び血漿中濃度推移の検討

(1) 薬物溶液の調製

PRV 溶液の調製は, 第1部 第4章 第2節 第3項 (1) に準拠した.

(2) 吸収実験

吸収実験は、第1部 第4章 第2節 第3項 (2) に準拠した。

(3) 薬物定量

PRV の定量は、第1部 第4章 第2節 第3項 (3) に準拠した。

(4) AUC の算出

薬物投与後 120 分までの AUC_{0-120} は、第1部 第4章 第2節 第3項 (4) に準拠した。

第4項 健常ラット及びゲンタマイシン誘発性 AKI ラットへのプラバスタチン
静脈内投与後の血漿中濃度推移の検討

(1) 薬物溶液の調製

PRV 溶液の調製は、第1部 第4章 第2節 第4項 (1) に準拠した。

(2) ラットへのプラバスタチン静脈内投与実験

静脈内投与実験は、第1部 第4章 第2節 第4項 (2) に準拠した。

(3) 薬物定量

PRV の定量は、第1部 第4章 第2節 第3項 (3) に準拠した。

(4) AUC の算出

薬物投与後 2 分から 30 分までの AUC_{2-30} は、第1部 第4章 第2節 第4項 (4) に準拠した。

第5項 統計処理

実験結果の呈示及び有意差検定は、第1部 第1章 第2節 第6項に準拠した。

第3節 実験結果

第1項 健常ラットとゲンタマイシン誘発性 AKI ラットにおけるプラバスタチンの消化管吸収性の比較

健常ラットと GM 誘発性 AKI ラットの小腸ループ内に PRV を投与し, 120 分後における消失率, 粘膜蓄積率, 正味吸収率を比較した. 健常ラットではそれぞれ $53.8 \pm 6.4\%$, $4.6 \pm 1.1\%$, $49.2 \pm 5.7\%$ であったのに対し, GM 誘発性 AKI ラットではそれぞれ $58.9 \pm 3.4\%$, $3.8 \pm 0.3\%$, $55.1 \pm 3.3\%$ であった (Fig. 35). いずれの部位の値にも健常ラットと GM 誘発性 AKI ラット間で有意な差は認められなかった.

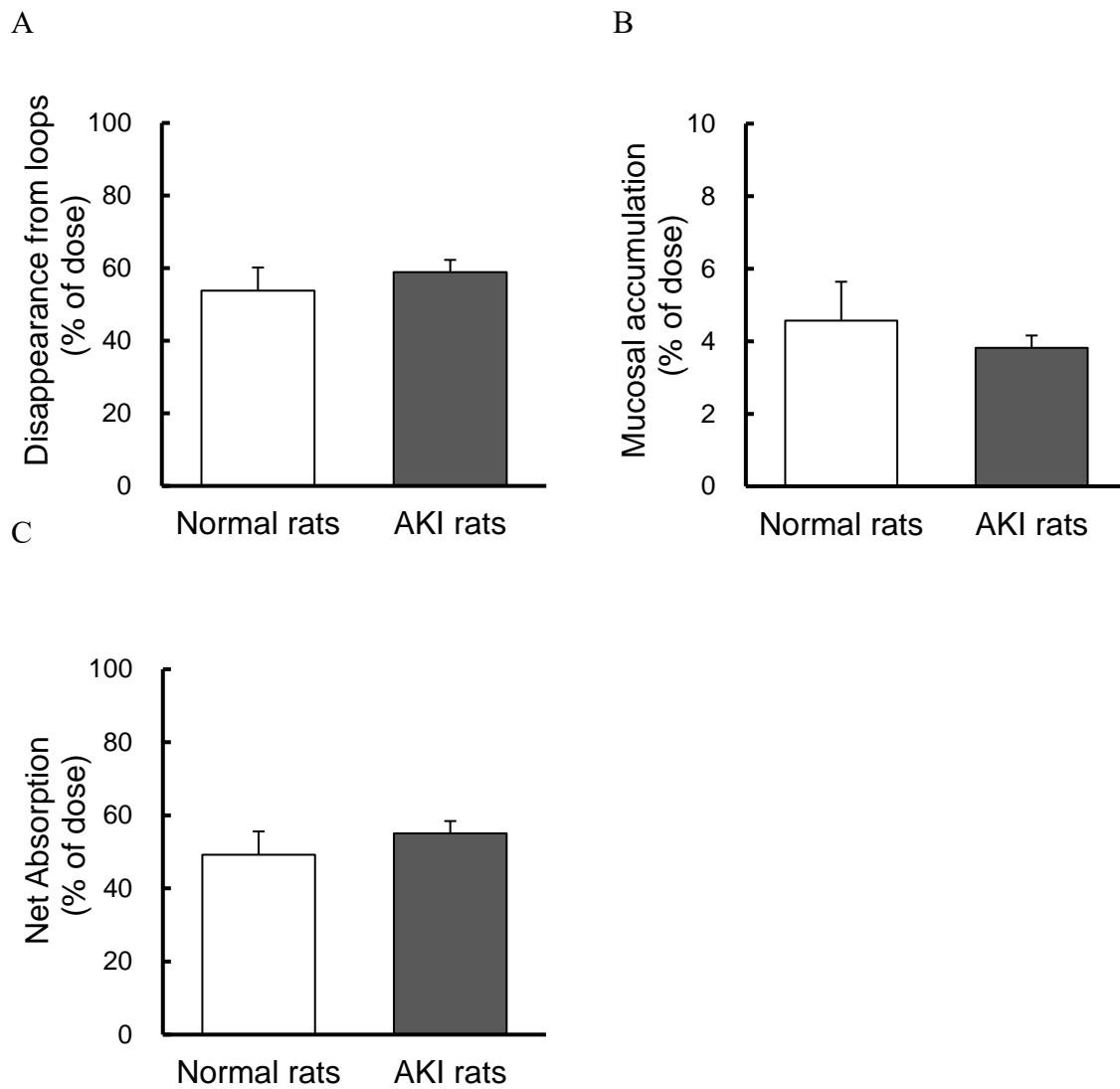


Fig. 35. Disappearance (A), Mucosal Accumulation (B), and Net Absorption (C) of Pravastatin after Intraluminal Administration to Normal and GM-induced AKI Rats

Each column represents the mean with S.E. (normal rats, n = 11; AKI rats, n = 6).

第2項 健常ラットとゲンタマイシン誘発性AKIラットにおけるプラバスタチンの血漿中濃度推移の比較

小腸ループ内に PRV を投与した後 120 分までの血漿中 PRV 濃度推移を Fig. 36 に示す. すべての採血時間において, 健常ラット群と GM 誘発性 AKI ラット群の血漿中濃度はほぼ同じ値で推移した. この結果を反映して AUC_{0-120} にも差は見られなかった (Table 23).

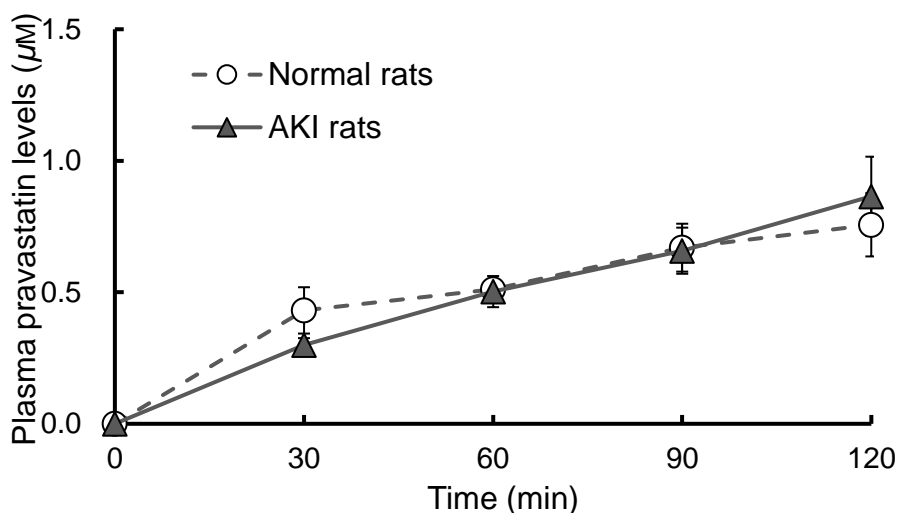


Fig. 36. Time Courses of Plasma Pravastatin Levels after Intraluminal Administration into Rat Small Intestinal Loops of Normal and GM-induced AKI Rats

Each point represents the mean with S.E. (normal rats, n = 9-11; AKI rats, n = 6).

Table 23. AUC_{0-120} of Pravastatin after Administration into Small Intestinal Loops of Normal and GM-induced AKI Rats

	AUC_{0-120} ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}/\text{L}$)
Normal rats	61.6 ± 8.6
AKI rats	56.8 ± 7.2

Values represent the mean \pm S.E. (normal rats, n = 9-11; AKI rats, n = 6).

第3項 健常ラットとゲンタマイシン誘発性 AKI ラットへのプラバスタチン静脈内投与後の血漿中濃度推移の比較

PRV を健常ラットと GM 誘発性 AKI ラットの静脈内に投与し, 30 分後までの血漿中濃度推移を検討した. Fig. 37 に示すように, いずれのラット群においても PRV は投与後速やかに血漿中から消失し, 各採血時間における血漿中濃度及び AUC₂₋₃₀ の間に有意な差は認められなかった (Table 24).

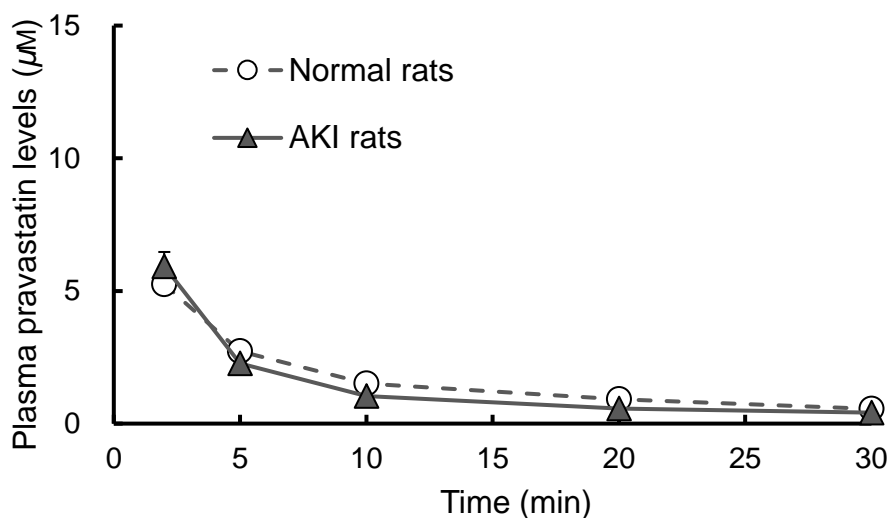


Fig. 37. Time Courses of Plasma Pravastatin Levels after Intravenous Administration to Normal and GM-induced AKI Rats

Each point represents the mean with S.E. (normal rats, n = 4; AKI rats, n = 5).

Table 24. AUC₂₋₃₀ for Pravastatin after Intravenous Administration to Normal and GM-induced AKI Rats

	AUC ₂₋₃₀ (µmol·min/L)
Normal rats	42.0 ± 5.2
AKI rats	33.6 ± 3.8

Values represent the mean ± S.E. (normal rats, n = 4; AKI rats, n = 5).

第4節 考察

第2部 第1章において、健常ラットと GM 誘発性 AKI ラットの小腸 Oatp2b1 の発現量には、十二指腸、空腸、回腸いずれにおいても差が認められなかった (Fig. 31). このことから PRV の吸収量は変化しないと予想された. そこでラット小腸ループを用いた PRV の吸収実験を行ったところ、健常ラットと GM 誘発性 AKI ラット間の正味吸収率及び血漿中 PRV 濃度は両ラット群でほぼ同等であり (Figs. 35C, 36), Oatp2b1 の発現量に変化が認められないことを反映した. また、この結果は同時に、GM 誘発性 AKI ラットでは Oatp2b1 の輸送能の変化も起こらないことを示唆している.

PRV を静脈内に投与した実験において、血漿中濃度推移及び AUC₂₋₃₀ に健常ラットと GM 誘発性 AKI ラットで有意な変化は認められなかった (Fig. 37, Table 24). このことから、PRV の血漿クリアランスに關与する肝の Oatps にも発現変動や輸送能の変動は生じていないと推察された.

以上、本章の検討から、GM 誘発性 AKI 時では Oatp2b1 の基質薬物の服用時に得られる治療効果に大きな変化が現れることはないと考えられた. しかし、第1部で検討した CDDP 誘発性 AKI ラットの場合は、小腸 Oatp2b1 の発現量の低下に伴って基質薬物の吸収低下により、治療効果が減弱する恐れがあり、薬剤性 AKI 時には、誘発薬物依存的に治療薬を選択することが必要になる可能性が示唆された.

総括

最後に、本研究から得られた知見を以下にまとめる。

CDDP 誘発性 AKI ラットにおけるトランスポーターの発現変動と基質薬物の消化管吸収性の変化について

1. CDDP (5 mg/kg) 腹腔内投与後、十二指腸の形態学的変化は観察されなかったのに対し、空腸及び回腸では絨毛が萎縮する傾向が見られた。しかしながら、単純拡散による薬物吸収には、この形態学的変化による影響は現れなかった。
2. CDDP 誘発性 AKI ラットの小腸において P-gp の発現量は回腸で減少したが、Bcrp の発現量はいずれの部位においても変化しなかった。また、Oatp1a2 の発現量が十二指腸で増加したのに対し、Oatp2b1 の発現量は十二指腸及び回腸で減少した。これらの結果から、CDDP 誘発性 AKI において、小腸トランスポーターの発現量は様々に変化することが明らかになった。
3. CDDP 誘発性 AKI ラットの回腸における P-gp 発現量が大幅に減少しても、P-gp 基質薬物の吸収は増大しなかった。このことより、個々の P-gp が輸送能を増強することで、生体異物の吸収に対するゲートキーパー機能が維持されることが示唆された。
4. 小腸 Oatp2b1 の発現量が減少することにより、PRV の吸収率の低下を招くことが示唆され、また PRV の吸収には Oatp1a2 よりも Oatp2b1 に依存していることが推察された。
5. P-gp, Oatp1a2 及び Oatp2b1 の基質である FEX の CDDP 誘発性 AKI ラットにおける吸収は、健常ラットと同程度で変化しなかった。CDDP 誘発性 AKI ラットでは、Oatp1a2 の発現増加と Oatp2b1 の発現低下により FEX 吸収に対する影響が相殺されていると考えられた。
6. CDDP 誘発性 AKI ラットの小腸 Cyp3a の発現量には変化が見られないものの、Cyp3a の代謝能が低下する可能性が示唆された。

GM 誘発性 AKI ラットにおけるトランスポーターの発現変動と基質薬物の消化管吸収性の変化について

1. GM (1,000 mg/kg) 単回腹腔内投与では 96 時間後に AKI が誘発され、それに伴い血中 IS 濃度が GM 投与前より著しく上昇した。
2. GM 誘発性 AKI ラットの小腸において、P-gp の発現量が回腸で増加したが、Oatp2b1 の発現量はいずれの部位においても変化しなかった。このことより、薬剤性 AKI 時における小腸トランスポーターの発現変動は、AKI という病態時に共通に起こるのではなく、誘発薬物依存的に起こると推察された。
3. GM 誘発性 AKI ラットの回腸における P-gp 発現量が増加しても、MP や RHO の吸収が抑制されることはなく、GM 誘発性 AKI ラットでは P-gp の輸送能が減衰していると考えられた。このことより、AKI 時に小腸 P-gp の発現量が増減すると輸送能を調節して小腸のゲートキーパー機能を一定に維持する機構が存在することが示唆された。
4. GM 誘発性 AKI ラットでは、Oatp2b1 の発現量が増加しなかったことを反映して、PRV の吸収率や血中濃度推移には変化が見られなかった。しかし、CDDP 誘発性 AKI ラットでは Oatp2b1 の発現低下に伴い PRV の吸収率の低下が見られたことから、薬効や治療効果が低下する恐れがあり、薬剤性 AKI 時には誘発薬物依存的に治療薬を選択する必要がある可能性が示唆された。

本研究より、薬剤性 AKI 時にはトランスポーターの発現や機能は、一方的に制御されるのではなく、薬物の体内動態に複雑で多面的な影響を及ぼすことが示唆された。トランスポーターの発現及び機能変動のメカニズムについては今後更なる解明が求められるものの、本研究で得られた知見は、薬剤性 AKI 時における薬物の体内動態の変化の一端を明らかにしたものであり、臨床現場における薬剤の適正かつ安全な薬物治療や個別化医療の最適化に繋がる有用なものである。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究に際して、終始懇切なるご指導ご鞭撻を賜り、副査としてご審査を賜りました北海道医療大学大学院薬学研究科薬剤学分野 小田雅子准教授に深く感謝いたします。

本論文の主査としてご審査を賜り、また発表の際の座長としてご助言を賜りました北海道医療大学大学院薬学研究科薬剤学分野 小林道也教授に深く御礼申し上げます。

また、副査として本論文のご審査を賜りました北海道医療大学大学院薬学研究科衛生薬学分野 浜上尚也教授、北海道医療大学大学院薬学研究科実務薬学分野 平野剛教授に深く感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、終始有益なご指導ご助言を賜りました北海道医療大学大学院薬学研究科衛生薬学分野 小島弘幸教授、北海道医療大学大学院薬学研究科衛生薬学分野 寺崎将准教授、北海道医療大学薬学部衛生薬学講座 (環境衛生学) 窪田篤人助教に深く感謝いたします。

本研究に際して、暖かいご支援を賜りました北海道医療大学薬学部薬剤学講座 (薬剤学) 井関健教授に厚く御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、多大なご支援ご助言を賜りました北海道医療大学 齊藤浩司名誉/客員教授に厚く御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、終始有益なご指導ご支援を賜りました北海道医療大学薬学部薬剤学講座 (薬剤学) 市村祐一助教に深く感謝いたします。

本研究の実施にあたり、終始有益なご支援を賜り、種々の検討にご協力いただきました武田瑛司学士、三好そよ香学士、浅田啓太学士、谷口優香学士、富岡沙代氏、鈴木秋聖氏、横田佳映氏、和田華弥氏に心より感謝いたします。

本研究に際し、終始多大なるご協力と暖かいご支援を賜りました北海道医療大学薬剤学講座 (薬剤学) の皆様に感謝いたします。

最後に心身共に多くの部分での支えとなってくださった家族、友人をはじめ、すべての方に心より感謝いたします。

令和4年3月20日

北海道医療大学大学院薬学研究科

武田 芙蓉

引用文献

- 1) Giacomini K. M., Huang S. M., Transporters in drug development and clinical pharmacology. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **94**, 3-9 (2013).
- 2) Kalliokoski A., Niemi M., Impact of OATP transporters on pharmacokinetics. *Br. J. Pharmacol.*, **158**, 693-705 (2009).
- 3) Shitara Y., Maeda K., Ikejiri K., Yoshida K., Horie T., Sugiyama Y., Clinical significance of organic anion transporting polypeptides (OATPs) in drug disposition: their roles in hepatic clearance and intestinal absorption. *Biopharm. Drug Dispos.*, **34**, 45-78 (2012).
- 4) Gessner A., Konig J., Fromm M. F., Clinical aspects of transporter-mediated drug-drug interactions. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **105**, 1386-1394 (2019).
- 5) Liu X., Transporter-mediated drug-drug interactions and their significance. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **1141**, 241-291 (2019).
- 6) Murray M., Zhou F., Trafficking and other regulatory mechanisms for organic anion transporting polypeptides and organic anion transporters that modulate cellular drug and xenobiotic influx and that are dysregulated in disease. *Br. J. Pharmacol.*, **174**, 1908-1924 (2017).
- 7) Oswald M., Kullak-Ublick G. A., Paumgartner G., Beuers U., Expression of hepatic transporters OATP-C and MRP2 in primary sclerosing cholangitis. *Liver*, **21**, 247-253 (2001).
- 8) Taniguchi T., Zanetti-Yabur A., Wang P., Usyk M., Burk R. D., Wolkoff A. W., Interindividual diversity in expression of organic anion uptake transporters in normal and cirrhotic human liver. *Hepatol. Commun.*, **4**, 739-752 (2020).
- 9) Kobayashi D., Nozawa T., Imai K., Nezu J., Tsuji A., Tamai I., Involvement of human organic anion transporting polypeptide OATP-B (SLC21A9) in pH-dependent transport across intestinal apical membrane. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **306**, 703-708 (2003).

- 10) Kullak-Ublick G. A., Ismail M. G., Stieger B., Landmann L., Huber R., Pizzagalli F., Fattinger K., Meler P. J., Hagenbush B., Organic anion-transporting polypeptide B (OATP-B) and its functional comparison with three other OATPs of human liver. *Gastroenterology*, **120**, 525-533 (2001).
- 11) Knauer M. J., Urquhart B. L., Meyer zu Schwabedissen H.E., Schwarz U.I., Lemke C. J., Leake B. F., Kim R. B., Tiroma R. G., Human skeletal muscle drug transporters determine local exposure and toxicity of statin. *Circ. Res.*, **106**, 297-306 (2010).
- 12) St-Pierre M. V., Hagenbuch B., Ugele B., Meier P. J., Stallmach T., Characterization of an organic anion-transporting polypeptide (OATP-B) in human placenta. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **87**, 1856-1863 (2002).
- 13) Pressler H., Sissung T. M., Venzon D., Price D. K., Figg W. D., Expression of OATP family members in hormone-related cancers: potential markers of progression. *PloS One*, **6**, e20372 (2011).
- 14) Wojtal K. A., Eloranta J. J., Hruz P., Gutmann H., Drewe J., Staumann A., Beglinger C., Fried M., Kullak-Ublick G.A., Vavricka S.R., Changes in mRNA expression levels of solute carrier transporters in inflammatory bowel disease patients. *Drug Metab. Dispos.*, **37**, 1871-1877 (2009).
- 15) Chen C. J., Chin J. E., Ueda K., Clark D. P., Pastan I., Gottesman M. M., Roninson I. B., Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. *Cell*, **47**, 381-389 (1986).
- 16) Fojo A. T., Ueda K., Slamon D. J., Poplack D. G., Gottesman M. M., Pastan I., Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **84**, 265-369 (1987).
- 17) Tchiebaut F., Tsuruo T., Hamada H., Gottesman M. M., Pastan I., Willingham M. C., Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **84**, 7735-7738 (1987).

- 18) Murakami T., Bodor E., Bodor N., Modulation of expression/function of intestinal P-glycoprotein under disease states. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, **16**, 59-78 (2020).
- 19) Maliepaard M., Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues. *Cancer Res.*, **61**, 3458-3464 (2001).
- 20) Liu L., Liu X. D., Alteration in function and expression of ABC transporters at blood-brain barrier under diabetes and the clinical significances. *Front. Pharmacol.*, **5**, 273 (2014).
- 21) Hoste E. A., Bagshaw S. M., Bellomo R., Cely C. M., Colman R., Cruz D. N., Edipidis K., Forni L. G., Gomersall C. D., Govi D., Honore P. M., Joannes-Boyau O., Joannidis M., Korhonen A. M., Lavrentieva A., Mehta R. L., Palevsky P., Roessler E., Ronco C., Uchino S., Vazquez J. A., Vidal Andrade E., Webb S., Kellum J. A., Epidemiology of acute kidney injury in critically ill patients: the multinational AKI-EPI study. *Intensive Care Med.*, **41**, 1411-1423 (2015).
- 22) Gurwitz J. H., Field T. S., Harrold L. R., Rothschild J., Debellis K., Seger A. C., Vadoret C., Fish L. S., Garber L., Kelleher M., Bates D. W., Incidence and preventability of adverse drug events among older persons in the ambulatory setting. *JAMA.*, **289**, 1107-1116 (2003).
- 23) Petejova N., Martinek A., Zadrazil J., Teplan V., Acute toxic kidney injury. *Ren. Fail.*, **41**, 576-594 (2019).
- 24) Khan S., Loi V., Rosner M. H., Drug-induced kidney injury in the elderly. *Drugs Aging.*, **34**, 729-741 (2017).
- 25) Usui J., Yamagata K., Imai E., Okuyama H., Kajiyama H., Kanamori H., Kaneko S., Kono E., Sakai Y., Sakai N., Sakamaki Y., Taniguchi Y., Nakai K., Nishiwaki H., Hirata S., Yamaya H., Tsuruoka S., Terada Y., Yokoyama H., Wada T., Narita I., Clinical practice guideline for drug-induced kidney injury in Japan 2016: digest version. *Clin. Exp. Nephrol.*, **20**, 322-341 (2016).
- 26) 薬剤性腎障害診療ガイドライン 2016, 日腎会誌, **58**, 477-555 (2016).

- 27) Loh A. H. L., Cohen A. H., Drug-induced kidney disease--pathology and current concepts. *Ann. Acad. Med. Singap.*, **38**, 240-250 (2009).
- 28) Polichnowski A. J., Microvascular rarefaction and hypertension in the impaired recovery and progression of kidney disease following AKI in preexisting CKD states. *Am. J. Physiol. Ren. Physiol.*, **315**, F1513-1518 (2018).
- 29) Lv J. C., Zhang L. K., Prevalence and disease burden of chronic kidney disease. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **1165**, 3-15 (2019).
- 30) Liu B., Luo F., Luo X., Duan S., Gong Z., Peng J. Metabolic enzyme system and transport pathways in chronic kidney diseases. *Curr. Drug Metab.*, **19**, 568-576 (2018).
- 31) Torres A. M., Dnyanmote A. V., Granados J. C., Nigam S. K., Renal and non-renal response of ABC and SLC transporters in chronic kidney disease. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, **17**, 515-542 (2021).
- 32) Naud J., Michaud J., Boisvert C., Desbiens K., Leblond F. A., Mitchell A., Jones C., Bonnardeaux A., Pichette V., Downregulation of intestinal drug transporters in chronic renal failure in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **320**, 978-985 (2007).
- 33) Shinozaki Y., Furuichi K., Toyama T., Kitajima S., Hara A., Iwata Y., Sakai N., Shimizu M., Kaneko S., Isozumi N., Nagamori S., Kanai Y., Sugiura T., Kato Y., Wada T., Impairment of the carnitine/organic cation transporter 1-ergothioneine axis is mediated by intestinal transporter dysfunction in chronic kidney disease. *Kidney Int.*, **92**, 1356-1369 (2017).
- 34) Aleksunes L. M., Augustine L. M., Scheffer G. L., Cherrington N. J., Manautou J. E., Renal xenobiotic transporters are differentially expressed in mice following cisplatin treatment. *Toxicology*, **250**, 82-88 (2008).
- 35) ランダ®注, 医薬品インタビューフォーム, 日本化薬株式会社, 2021年4月改訂
- 36) ゲンタシン®注, 医薬品インタビューフォーム, 高田製薬株式会社, 2021年4月改訂
- 37) Leis J. A., Rutka J. A., Gold W.L., Aminoglycoside-induced ototoxicity. *CMAJ.*, **187**, E52 (2015).

- 38) Kurt A., Wargo K. A., Edwards J. D., Aminoglycoside-induced nephrotoxicity. *J. Pharm. Pract.*, **27**, 573-577. (2014).
- 39) Tsang R. Y., Al-Fayea T., Au H., Cisplatin overdose: toxicities and management. *Drug Saf.*, **32**, 1109-1122 (2009).
- 40) Pabla N., Dong Z., Cisplatin nephrotoxicity: mechanisms and renoprotective strategies. *Kidney Int.*, **73**, 994-1007 (2008).
- 41) Qun R., Moussa Y. E., Wheate N. J., The side effects of platinum-based chemotherapy drugs: a review for chemists. *Dalton Trans.*, **47**, 6645-6653 (2018).
- 42) 制吐薬適正使用ガイドライン 2015 年 10 月 (第 2 版) 一部改訂版 (ver.2.2), 日本癌治療学会, 2018 年 10 月
- 43) Hesketh P. J., Kris M. G., Basch E., Bohlke K., Barbour S. Y., Clark-Snow R. A., Danso M. A., Dennis K., Dupuis L. L., Dusetzina S. B., Eng C., Feyer P. C., Jordan K., Noonan K., Sparacio D., Somerfield M. R., Lyman G.H., Antiemetics: American society of clinical oncology clinical practice guideline update. *J. Clin. Oncol.*, **35**, 3240-3261 (2017).
- 44) Wu C. H., Ko J. L., Liao J. M., Huang S. S., Lin M. Y., Lee L. H., Chang L. Y., Ou C. C., D-methionine alleviates cisplatin-induced mucositis by restoring the gut microbiota structure and improving intestinal inflammation. *Ther. Adv. Med. Oncol.*, **11**, 1-18 (2019).
- 45) Aydin I., Kalkan Y., Ozer E., Yucel A. F., Pergel A., Cure E., Cure M. C., Sahin D. A., The protective effect of infliximab on cisplatin-induced intestinal mucosa toxicity. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, **18**, 2076-2083 (2014).
- 46) Yamamoto H., Ishihara K., Takeda Y., Koizumi W., Ichikawa T., Changes in the mucus barrier during cisplatin-induced intestinal mucositis in rats. *Biomed. Res. Int.*, 276186 (2013).
- 47) Okabe H., Hashimoto Y., and Inui K., Pharmacokinetics and bioavailability of tacrolimus in rats with experimental renal dysfunction. *J. Pharm. Pharmacol.*, **52**, 1467-1472 (2000).
- 48) Khwaja A., KDIGO clinical practice guidelines for acute kidney injury. *Nephron. Clin. Pract.*, **120**, 179-184 (2012).

- 49) Iwao K., Kawai R. T., Oda M., Saitoh H., Investigation on the Interactions between Various Drugs and Aojiru (Green Juice) Using a Simple Centrifugation Method. *Biol. Pharm. Bull.*, **40**, 1566-1571 (2017).
- 50) Shahid F., Farooqui Z., Khan F., Cisplatin-induced gastrointestinal toxicity: an update on possible mechanisms and on available gastroprotective strategies. *Eur. J. Pharmacol.*, **827**, 49-57 (2018).
- 51) Saito Y., Okamoto K., Kobayashi M., Narumi K., Furugen A., Yamada T., Iseki K., Magnesium co-administration decreases cisplatin-induced nephrotoxicity in the multiple cisplatin administration. *Life Sci.*, **189**, 18-22 (2017).
- 52) 厚生労働省: 「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 (最終案)の公表について」, 審査管理課事務連絡 (2014).
- 53) US Food and Drug Administration (FDA): Guidance for Industry, Drug Interaction Studies--Study Design, Data Analysis, Implications for Dosing, and Labeling Recommendations, DRAFT GUIDANCE (2012).
- 54) European Medicine Agency (EMA): Guideline on the investigation of drug interactions (2013).
- 55) 厚生労働省, 薬価基準収載品目リスト及び後発医薬品に関する情報について (令和3年12月10日適用) (2021).
- 56) Zaher H., Khan A., Palandra J., Brayman T. G., Yu L., Ware J. A., Breast cancer resistance protein (Bcrp/abcg2) is a major determinant of sulfasalazine absorption and elimination in the mouse. *Mol. Pharm.*, **3**, 55-61 (2006).
- 57) Englund G., Jacobson A., Rorsman F., Artursson P., Kindmark A., Ronnblom A., Efflux transporters in ulcerative colitis: decreased expression of BCRP (ABCG2) and Pgp (ABCB1). *Inflamm. Bowel Dis.*, **13**, 291-297 (2007).
- 58) Wada S., Kano T., Mita S., Idota Y., Morimoto K., Yamashita F., Ogihara T., The role of inter-segmental differences in P-glycoprotein expression and activity along the rat small intestine in causing the double-peak phenomenon of substrate plasma concentration. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **28**, 98-103 (2013).

- 59) Tanaka Y., Slitt A.L., Leazer T. M., Maher J. M., Klaassen C. D., Tissue distribution and hormonal regulation of the breast cancer resistance protein (Bcrp/Abcg2) in rats and mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **326**, 181-187 (2005).
- 60) Akazawa T., Uchida Y., Miyauchi E., Tachikawa M., Ohtsuki S., Terasaki T., High Expression of UGT1A1/1A6 in Monkey Small Intestine: Comparison of Protein Expression Levels of Cytochromes P450, UDP-Glucuronosyltransferases, and Transporters in Small Intestine of Cynomolgus Monkey and Human. *Mol. Pharm.*, **15**, 127-140 (2018).
- 61) Couto N., Al-Majdoub Z. M., Gibson S., Davies P. J., Achour B., Harwood M. D., Carlson G., Barber J., Rosutami-Hodjiegan A., Warhurst G., Quantitative proteomics of clinically relevant drug-metabolizing enzymes and drug transporters and their intercorrelations in the human small intestine. *Drug Metab. Dispos.*, **48**, 245-254 (2020).
- 62) Bradford M. M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-54 (1976).
- 63) Herraez E., Gonzalez-Sanchez E., Vaquero J., Romero M. R., Marin J. J. G., Briz O., Cisplatin-induced chemoresistance in colon cancer cells involves FXR dependent and FXR-independent up-regulation of ABC. *Mol. Pharm.*, **9**, 2565-2576 (2012).
- 64) Wang F., Miao M., Sun B., Wang Z., Tang X., Chen Y., Xhao K., Liu X., Liu L., Acute liver failure enhances oral plasma exposure of zidovudine in rats by downregulation of hepatic UGT2BT and intestinal P-gp. *Acta Pharmacol. Sin.*, **38**, 1554-1565 (2017).
- 65) Sukkumee W., Jittisak P., Wonganan P., Wittayalertpanya S., Chariyavilaskul P., Leelahavanichkul A., The prominent impairment of liver/intestinal cytochrome P450 and intestinal drug transporters in sepsis-induced acute kidney injury over acute and chronic renal ischemia, a mouse model comparison. *Ren. Fail.*, **41**, 314-325 (2019).

- 66) Henriette E. M. S., Rommel G. T., Cindy S. Y., Richard H. H., Richard B. K., Interplay between the Nuclear Receptor Pregnane X Receptor and the Uptake Transporter Organic Anion Transporter Polypeptide 1A2 Selectively Enhances Estrogen Effects in Breast Cancer. *Cancer Res.*, **68**, 9338-9347 (2008).
- 67) Lee W., Glaeser H., Smith L. H., Roberts R. L., Moeckel G. W., Gervasini G., Leake B. F., Kim R. B., Polymorphisms in human organic anion-transporting polypeptide 1A2 (OATP1A2): implications for altered drug disposition and central nervous system drug entry. *J. Biol. Chem.*, **280**, 9610-9617 (2005).
- 68) Lee W., Ha J., Sugiyama Y., Post-translational regulation of the major drug transporters in the families of organic anion transporters and organic anion-transporting polypeptides. *J. Biol. Chem.*, **295**, 17349-17364 (2020).
- 69) Giacomini K. M., Galetin A., Huang S. M., The international transporter consortium: summarizing advances in the role of transporters in drug development. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **104**, 766-771 (2018).
- 70) Glaeser H., Fromm M. F., Animal models and intestinal drug transport. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, **4**, 347-361 (2008).
- 71) Rashid H., Direct renin inhibition: an evaluation of the safety and tolerability of aliskiren. *Curr. Med. Res. Opin.*, **24**, 2627-2637 (2008).
- 72) Veau C., Leroy C., Banide H., Auchere D., Tardivel S., Farinotti R., Lacour B., Effect of chronic renal failure on the expression and function of rat intestinal P-glycoprotein in drug excretion. *Nephrol. Dial. Transplant.*, **16**, 1607-1614 (2001).
- 73) Sukhai M., Yong A., Pak A., Piquette-Miller M., Decreased expression of P-glycoprotein in interleukin-1beta and interleukin-6 treated rat hepatocytes. *Inflamm. Res.*, **50**, 362-370 (2001).
- 74) Saitoh H., Hatakeyama M., Eguchi O., Oda M., Takada M., Involvement of intestinal P-glycoprotein in the restricted absorption of methylprednisolone from rat small intestine. *J. Pharm. Sci.*, **87**, 73-75 (1998).
- 75) Nakayama A., Saitoh H., Oda M., Takada M., Aungst B.J., Region-dependent disappearance of vinblastine in rat small intestine and characterization of its P-glycoprotein-mediated efflux system. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **11**, 317-324 (2000).

- 76) Varis T., Kaukonen K. M., Kivisto K. T., Neuvonen P. J., Plasma concentrations and effects of oral methylprednisolone are considerably increased by itraconazole. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **64**, 363-368 (1998).
- 77) Hayashi M., Tomita M., Mechanistic analysis for drug permeation through intestinal membrane. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **22**, 66-77 (2007).
- 78) Kwatra D., Krishna R., Vadlapatia R. K., Vadlapudi A. H., Pal D., Mitra A. K., Interaction of gatifloxacin with efflux transporters: a possible mechanism for drug resistance. *Int. J. Pharm.*, **395**, 114-121 (2010).
- 79) Yamaguchi H., Yano I., Hashimoto Y., Inui K., Secretory mechanisms of grepafloxacin and levofloxacin in the human intestinal cell line Caco-2. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **295**, 360-366 (2000).
- 80) Hirano T., Iseki K., Sato I., Miyazaki S., Takada M., Kobayashi M., Sugawara M., Miyazaki K., The intestinal transport mechanism of fluoroquinolones: inhibitory effect of ciprofloxacin, an enoxacin derivative, on the membrane potential-dependent uptake of enoxacin. *Pharm. Res.*, **12**, 1299-1303 (1995).
- 81) Gone I. Y., Kim R. B., Impact of genetic variation in OATP transporters to drug disposition and responses. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **28**, 4-18 (2013).
- 82) Dresser G. K., Bailey D. G., Leake B. F., Schwarz U. I., Dawson P. A., Freeman D. J., Kim R. B., Fruit juices inhibit organic anion transporting polypeptide-mediated drug uptake to decrease the oral availability of fexofenadine. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **71**, 11-20 (2002).
- 83) Fuchikami H., Satoh H., Tsujimoto M., Ohdo S., Ohtani H., Sawada Y., Effects of herbal extracts on the function of human organic anion-transporting polypeptide OATP-B., *Drug Metab. Dispos.*, **34**, 577-582 (2006).
- 84) Lilja J. J., Backman J. T., Laitila J., Luurila H., Neuvonen P. J., Itraconazole increases but grapefruit juice greatly decreases plasma concentrations of celiprolol. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **73**, 192-198 (2003).

- 85) Misaka S., Yatabe J., Muller F., Takano K., Kawabe K., Glaeser H., Yatabe M. S., Onoue S., Werba J. P., Watanabe H., Yamada S., Fromm M. F., Kimura J., Green tea ingestion greatly reduces plasma concentrations of nadolol in healthy subjects. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **95**, 432-438 (2014).
- 86) Fukazawa I., Uchida N., Uchida E., Yasuhara H., Effects of grapefruit juice on pharmacokinetics of atorvastatin and pravastatin in Japanese. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **57**, 448-455 (2004).
- 87) メバロチン[®]錠・細粒, 医薬品インタビューフォーム, 第一三共株式会社, 2018年11月改訂
- 88) Uchiyama H., Tsujimoto M., Shinmoto T., Ogino H., Oda T., Yoshida T., Furukubo T., Izumi S., Yamakawa T., Tachiki H., Minegaki T., Nishiguchi K., Uremic toxins enhance statin-induced cytotoxicity in differentiated human rhabdomyosarcoma cells. *Toxins (Basel)*, **6**, 2612-2625 (2014).
- 89) Shirasaka Y., Suzuki K., Nakanishi T., Tamai I., Intestinal absorption of HMG-CoA reductase inhibitor pravastatin mediated by organic anion transporting polypeptide. *Pharm. Res.*, **27**, 2141-2149 (2010).
- 90) Ronaldson P., Brzica H., Abdullahi W., Reilly B. G., Davis T. P., Transport properties of statins by organic anion transporting polypeptide 1A2 and regulation by transforming growth factor- β signaling in human endothelial cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **376**, 148-160 (2021).
- 91) Yamazaki M., Akiyama S., Ni'inuma K., Nishigaki R., Sugiyama Y., Biliary excretion of pravastatin in rats: contribution of the excretion pathway mediated by canalicular multispecific organic anion transporter. *Drug Metab. Dispos.*, **25**, 1123-1129 (1997).
- 92) Ito K., Suzuki H., Horie T., Sugiyama Y., Apical/basolateral surface expression of drug transporters and its role in vectorial drug transport. *Pharm. Res.*, **22**, 1559-1577 (2005).

- 93) Kivisto K. T., Grisk O., Hofmann U., Meissner K., Moritz K. U., Ritter C., Arnold K. A., Lutjohann D., Bergmann K., Kloting I., Eichelbaum M., Kroemer H. K., Disposition of Oral and intravenous pravastatin MRP2-deficient TR-rats. *Drug Metab. Dispos.*, **33**, 1593-1596 (2005).
- 94) Tahara H., Kusuhara H., Fuse E., Sugiyama Y., P-glycoprotein plays a major role in the efflux of fexofenadine in the small intestine and blood-brain barrier, but only a limited role its biliary excretion. *Drug Metab. Dispos.*, **33**, 963-968 (2005).
- 95) Yu J., Zhou Z., Tay-Sontheimer J., Levy R. H., Ragueneau-Majlessi I., Intestinal drug interactions mediated by OATPs: a systematic review of preclinical and clinical findings. *J. Pharm. Sci.*, **106**, 2312-2325 (2017).
- 96) アレグラ[®], 医薬品インタビューフォーム, サノフィ株式会社, 2015 年 12 月改訂
- 97) Glaeser H., Bailey D. G., Dresser G. K., Gregor J. C., Schwarz U. I., McGrath J. S., Jolicoeur E., Lee W., Leake B. F., Tirona R. G., Kim R. B., Intestinal drug transporter expression and the impact of grapefruit juice in humans. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **81**, 362-370 (2007).
- 98) Ujie K., Oda M., Kobayashi M., Saitoh H., Relative contribution of absorptive and secretory transporters to the intestinal absorption of fexofenadine in rats. *Int. J. Pharm.*, **361**, 7-11 (2008).
- 99) Tamai I., Nakanishi T., OATP transporter-mediated drug absorption and interaction. *Curr. Opin. Pharmacol.*, **13**, 859-863 (2013).
- 100) Imanaga J., Kotegawa T., Imai H., Tsutsumi K., Yoshizato T., Ohyama T., Shirasaka Y., Tamai I., Tateishi T., Ohashi K., The effects of the SLCO2B1 c.1457C > T polymorphism and apple juice on the pharmacokinetics of fexofenadine and midazolam in humans. *Pharmacogenet. Genomics*, **21**, 84-93 (2011).
- 101) Cvetkovic M., Leake B., Fromm M. F., Wilkinson G. R., Kim R. B., OATP and P-glycoprotein transporters mediate the cellular uptake and excretion of fexofenadine. *Drug Metab. Dispos.*, **27**, 866-871 (1999).

- 102) Shimizu M., Fuse K., Okudaira K., Nshigaki R., Maeda K., Kusuhara H., Sugiyama Y., Contribution OATP (organic anion-transporting polypeptide) family transporters to the hepatic up take of fexofenadine in humans. *Drug Metab. Dispos.*, **33**, 1477-1481 (2005).
- 103) Jana S., Paliwal J., Molecular mechanisms of cytochrome p450 induction: potential for drug-drug interactions. *Curr. Protein Pept. Sci.*, **8**, 619-628 (2007).
- 104) Guengerich F. P., Characterization of human cytochrome P450 enzymes., *FASEB. J.*, **6**, 745-748 (1992).
- 105) Hall S. D., Thummel K. E., Watkins P. B., Lown K. S., Benet L. Z., Paine M. F., Mayo R. R., Turgeon D. K., Bailey D. G., Fontana R. J., Wrighton S. A., Molecular and physical mechanisms of first-pass extraction. *Drug Metab. Dispos.*, **27**, 161-166 (1999).
- 106) Evans W. E., Mcleod H. L., Pharmacogenomics--drug disposition, drug targets, and side effects. *N. Engl. J. Med.*, **348**, 538-549 (2003).
- 107) Tsunoda S. M., Velez R. L., von Moltken L. L., Greenblatt D. J., Differentiation of intestinal and hepatic cytochrome P450 3A activity with use of midazolam as an in vivo probe: effect of ketoconazole. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **66**, 461-471 (1999).
- 108) Ohtani M., Kawabata S., Kariya S., Uchino K., Itou K., Kotaki H., Kasuyama K., Morikawa A., Seo I., Nishida N., Effect of grapefruit pulp on the pharmacokinetics of the dihydropyridine calcium antagonists nifedipine and nisoldipine. *Yakugaku Zasshi*, **122**, 323-329 (2002).
- 109) Doherty M. M., Charman W. N., The mucosa of the small intestine: how clinically relevant as an organ of drug metabolism? *Clin. Pharmacokinet.*, **41**, 235-253 (2002).
- 110) Bailey D. G., Malcolm J., Arnold O., Spence J. D., Grapefruit juice-drug interactions. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **46**, 101-110 (1998).
- 111) Bailey D. G., Dresser G. K., Interactions between grapefruit juice and cardiovascular drugs., *Am. J. Cardiovasc. Drugs.*, **4**, 281-291 (2004).

- 112) Guengerich F. P., Brian W. R., Iwasaki M., Sari M. A., Baarnhielm C., Berntsson P., Oxidation of dihydropyridine calcium channel blockers and analogues by human liver cytochrome P-450 IIIA4., *J. Med. Chem.*, **34**, 1838-1344 (1991).
- 113) van Waterschoot R. A., Schinkel A.H., A critical analysis of the interplay between cytochrome P450 3A and P-glycoprotein: recent insights from knockout and transgenic mice. *Pharmacol. Rev.*, **63**, 390-410 (2011).
- 114) 関根有貴 (北海道医療大学大学院薬学研究科薬剤学講座), 修士論文, 21-31 (2008).
- 115) Oda M., Saitoh H., Kobayashi M., Aungst B. J., Beta-cyclodextrin as a suitable solubilizing agent for in situ absorption study of poorly water-soluble drugs., *Int. J. Pharm.*, **280**, 95-102 (2007).
- 116) Greiner B., Eichelbaum M., Fritz P., Kreichgauer H. P., Richter O., Zundler J., Kroemer H. K., The role of intestinal P-glycoprotein in the interaction of digoxin and rifampin. *J. Clin. Invest.*, **104**, 147-153 (1999).
- 117) Niemi M., Backman J. T., Fromm M. F., Neuvonen P. J., Kivisto K. T., Pharmacokinetic interactions with rifampicin: clinical relevance. *Clin. Pharmacokinet.*, **42**, 819-850 (2003).
- 118) Cerveny L., Svecova L., Anzenbacherova E., Vrzal R., Staud F., Dvorak Z., Ulrichova H., Anzenbacher P., Pavek P., Valproic acid induces CYP3A4 and MDR1 gene expression by activation of constitutive androstane receptor and pregnane X receptor pathways. *Drug Metab. Dispos.*, **35**, 1032-1041 (2007).
- 119) Kawauchi S., Nakamura T., Miki I., Inoue J., Hamaguchi T., Tanahashi T., Mizuno S., Downregulation of CYP3A and P-glycoprotein in the secondary inflammatory response of mice with dextran sulfate sodium-induced colitis and its contribution to cyclosporine A blood concentrations. *J. Pharmacol. Sci.* **124**, 180-191 (2014).
- 120) Uno S., Kawase A., Tsuji A., Tanino T., Iwaki M., Decreased intestinal CYP3A and P-glycoprotein activities in rats with adjuvant arthritis. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **22**, 313-321 (2007).

- 121) 横山仁, 山谷秀喜, 奥山宏, 慢性腎臓病の進行を促進する薬剤等による腎障害の早期診断法と治療法の開発に関する研究 (平成 25 年度), 厚生労働科学研究費補助金難治性疾患等克服研究事業 総括・分担研究報告書, **42259** (2015).
- 122) 抗菌薬 TDM ガイドライン 2016, 日本化学療法学会, 日本 TDM 学会, 抗菌薬 TDM ガイドライン作成委員会 (2016).
- 123) Bennett W. M., Mechanisms of aminoglycoside nephrotoxicity. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **16**, 1-6 (1989).
- 124) Vanholder R., De Smet R., Glorieux G., Argiles A., Baurmeister U., Brunet P., Clark W., Cohen G., De Deyn P.P., Deppisch R., Descamps-Latscha B., Henle T., Jorres A., Lemke H.D., Massy Z.A., Passlick-Deetjen J., Rodriguez M., Stegmayr B., Stenvinkel P. Tetta C., Wanner C., Zidek W., European Uremic Toxin Work Group (EUTox). *Kidney Int.*, **63**, 1934-1943 (2003).
- 125) Shibata N., Morimoto J., Hoshino N., Minouchi T., Yamaji A., Factors that affect absorption behavior of cyclosporin a in gentamicin-induced acute renal failure in rats. *Ren. Fail.*, **22**, 181-94 (2000).
- 126) Chen Q., Cui Y., Ding G., Jia Z., Zhang Y., Zhang A., Huang S., PEA3 protects against gentamicin nephrotoxicity: role of mitochondrial dysfunction. *Am. J. Transl. Res.*, **9**, 2153-2162 (2017).
- 127) Hosohata K., Ando H., Fujimura A., Urinary vanin-1 as a novel biomarker for early detection of drug-induced acute kidney injury. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **341**, 656-662 (2012).
- 128) Duranton F., Cohen G., De Smet R., Rodriguez M., Jankowski J., Vanholder R., Argiles A., Normal and pathologic concentrations of uremic toxins., *J. Am. Soc. Nephrol.*, **23**, 1258-1270 (2012).
- 129) Morisaki T., Matsuzaki Yokoo K., Kusumoto M., Iwata K., Hamada A., Saito H., Regulation of renal ion transporters in cisplatin-induced acute kidney injury and uremia in rats. *Pharm. Res.*, **25**, 2526-2533 (2008).
- 130) Miller R. P., Tadagavadi R. K., Ramesh G., Reeves W. B., Mechanisms of Cisplatin nephrotoxicity. *Toxins (Basel)*, **2**, 2490-2518 (2010).

- 131) Lopez-Novoa J. M., Quiros Y., Vicente L., Morales A. I., Lopez-Hernandez F. J., New insights into the mechanism of aminoglycoside nephrotoxicity: an integrative point of view. *Kidney Int.*, **79**, 33-45 (2011).
- 132) Ma Y. R., Luo X., Wu Y. F., Zhang T., Zhang F., Zhang G. Q., Wu X. A., Alteration of renal excretion pathways in gentamicin-induced renal injury in rats. *J. Appl. Toxicol.*, **38**, 968-977 (2018).
- 133) Morisaki T., Matsuzaki Yokoo K., Kusumoto M., Iwata K., Hamada A., Saito H., Regulation of renal ion transporters in cisplatin-induced acute kidney injury and uremia in rats. *Pharm. Res.*, **25**, 2526-2533 (2008).
- 134) Terada Y., Ogura J., Tsujimoto T., Kuwayama K., Koizumi T., Sasaki S., Maruyama H., Kobayashi M., Yamaguchi H., Iseki K., Intestinal P-glycoprotein expression is multimodally regulated by intestinal ischemia-reperfusion. *J. Pharm. Pharm. Sci.* **17**, 266-276 (2014).
- 135) Mishima E., Fukuda S., Mukawa C., Yuri A., Kanemitsu Y., Matsumoto Y., Akiyama Y. Fukuda N.N., Tsukamoto H., Asaji K., Shima H., Kikuchi K., Suzuki C., Suzuki T., Tomioka Y., Soga T., Ito S., Abe T., Evaluation of the impact of gut microbiota on uremic solute accumulation by a CE-TOFMS-based metabolomics approach. *Kidney Int.*, **92**, 634-645 (2017).
- 136) Lehmann J., Persson S., Walinder J., Wallin L., Tryptophan malabsorption in dementia. Improvement in certain cases after tryptophan therapy as indicated by mental behaviour and blood analysis. *Acta. Psychiatr. Scand.*, **64**, 123-131(1981).
- 137) Nawa A., Fujita-Hamabe W., Tokuyama S., Regulatory action of nitric oxide synthase on ileal P-glycoprotein expression under streptozotocin-induced diabetic condition. *Biol. Pharm. Bull.*, **34**, 436-438 (2011).