

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：34509

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590211

研究課題名(和文) 生体内脂質・蛋白の酸化・糖化変性による薬物動態変動機構の解明とその臨床への応用

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of pharmacokinetic change by lipid-, protein-oxidation and glycation, and its clinical application

研究代表者

杉岡 信幸 (Sugioka, Nobuyuki)

神戸学院大学・薬学部・教授

研究者番号：40418934

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：腎移植患者において、酸化ストレス(OS)によってシクロスポリン(CsA)全血クリアランスが低下した。またOSモデルラットにおいて、血中における赤血球移行率、組織分布の増大と代謝能の減弱が認められた。ヒトにおいてもOSによって代謝・分布に寄与する血漿中CsAの量は低下している可能性があり、全血中濃度の評価を再検討する必要がある。肥満モデルラットにおいては、酸化ストレスの動態変動への寄与を特定することは困難であったが、酸化ストレスによる血中分布の変動が初回通過効果に影響し、経口吸収に影響を与える可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In renal transplant recipients, blood clearance of cyclosporine A (CsA) was decreased by oxidative stress. In oxidative stress model rats, elevation of the blood to plasma ratio in the systemic circulation and increase of tissue distribution of CsA were observed. In human, there is also the possibility of decreasing the amount of CsA in plasma contributed to the drug metabolism and tissue distribution. Therefore, reconsideration of the whole blood concentration monitoring of CsA for dose adjustment is needed. In this study, it was difficult to identify the contribution of oxidative stress to the change in drug disposition in obese model rats. However, it was suggested that the change of drug distribution in the blood by oxidative stress affected the first pass effect in oral absorption.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：薬物動態変動 酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

薬物療法を受けているのは疾患により多様な生理的变化が生じている“患者”であるため、投薬時における生理的状态に応じた投与設計が最も現実的である。この病態・薬物相互作用とも言うべき事象に関しては、病態による生理变化と薬物の多様性を考慮すると、未だ発展途上と言わざるをえず、また体系的な研究は少ない。

本邦においては内臓脂肪蓄積、血中脂質異常、インスリン抵抗性などを示す人口がかなりの比率を占める。研究代表者はこれまでに、高血糖がその原因となる血漿蛋白の糖化変性は、薬物の結合蛋白への親和性を変化させ、薬物のクリアランス・薬理作用の変動をもたらすこと、血中脂質異常・酸化ストレスが血中リポ蛋白に対する薬物の親和性を変化させ、薬物の血中動態に著明な変動を与え、実際の薬理効果にも変動をもたらすことなどを明らかにしてきた。臓器移植において免疫抑制剤の適正使用は最重要課題である。シクロスポリン A (CsA) の血中動態において、血中リポ蛋白の酸化変性は CsA の薬物動態に深く関わっており、さらに肝臓における、脂肪肝・酸化ストレスによる酵素変性による代謝変動が大きいことは容易に予想できる。

2. 研究の目的

生活習慣病に伴う、薬物の輸送担体、代謝酵素など、薬物の生体内運命を左右する蛋白や脂質の酸化・糖化変性が薬物の体内動態に与える影響に着目し、薬物療法の適正化・患者毎の個別化、本研究においては移植医療における極めて重要な課題の一つである免疫抑制剤のそれに貢献することを目的とする。蛋白の酸化・糖化変性は老化によっても進行するが、多様な薬物体内動態変動要因の中でも十分な検討が行われているとは言えない。したがって、これらの変性が薬物動態・薬理作用に与える影響について、臨床における薬物動態変動に至るまでの体系的な検討を行うことの重要性は明らかである。本研究はその主要な一端を担うものである。

3. 研究の方法

(1) 京都府立医大病院で 2011 年 10 月から 2012 年 12 月に生体腎移植を施行され CsA またはタクロリムス (Tac) による免疫抑制療法を受けた患者 19 名を対象とし、各患者の移植 2,3,4 週後における全血中トラフ濃度 (C₀)、血中濃度-時間曲線下面積 (AUC) CsA については投与 2 時間後血中濃度 (C₂) と血漿の酸化度、抗酸化度との関連を比較検討した。血漿中過酸化脂質および抗酸化力の測定はフリーラジカル解析装置 Free carpe diem を用いて行った。血漿中過酸化脂質量

(d-ROM, U.CARR) および抗酸化力 (BAP, μmol/L) によって患者を酸化ストレス度正常値群 (320 U.CARR 以下、2200 μmol/L 以上)、低値群 (320 U.CARR 以下、2200 μmol/L 以下)、高値群 (320 U.CARR 以上、2200 μmol/L 以下) の 3 群に分け、血中薬物動態を比較した。

(2) Fe-NTA を腹腔内投与することで OS モデルラットを作製した。血中および組織中の酸化度・抗酸化度は前項の方法に準じた。またチオバルビツール (TBA) 法により過酸化物質量を測定した。

(3) OS ラットに、CsA を静脈内投与し、投与後 24 時間までの全血液中、血漿中濃度を、さらには投与 4 時間後の肝臓中濃度を測定した。測定には HPLC-MS/MS を用いた。

(4) OS ラットにおける肝代謝酵素発現と酵素活性を検討した。Western Blot 法を用いて OS ラットの肝臓、小腸ミクロソームにおける CYP3A の発現量を測定した。また、OS ラット肝ミクロソームにおけるテストステロン・NADPH 生成系により 6-ヒドロキシテストステロンの濃度を定量し、CYP3A 活性を算出した。なお Tac の定量感度の不足から、血漿中 Tac 濃度の測定が不能であったため、現在のところ Tac の検討は進んでいない。

(5) 高脂肪特殊飼料摂取により作成した HF ラットを用いて静脈内・十二指腸内投与実験を行い、さらには in situ 小腸ループ内投与実験を行い吸収量を評価した。また、(4) と同様に in vitro 代謝実験を行い、代謝能の変動と薬物動態との関連を検討した。

4. 研究成果

(1) 方法(1)で示したように Fig.1 に CsA が使用された患者 13 名移植 2,3,4 週後における酸化ストレス度分類の各群分けを示す。mild (軽度群、図左下) の値を示した患者が 72% で最も多く、normal (正常群、図左上) が 14%、severe (重度群、図右下) が同じく 14% であった。

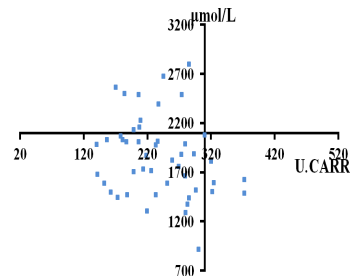


Fig. 1 Oxidative-Stress classification of patients based on d-ROM and BAP.

Fig. 2 では酸化ストレス度分類に従い、対象患者の C₀/dose を比較した結果を示す。C₀/dose はストレス度正常では低値を示し、酸化ストレス度の上昇に伴い約 1.3 倍有意に高値 (p < 0.05) を示した。一方、C₂/dose、

AUC/dose を同様に比較した結果、顕著な傾向は認められなかったが、酸化ストレス度の上昇に伴い C_2 /dose は減少傾向、AUC/dose は上昇傾向がみられた。

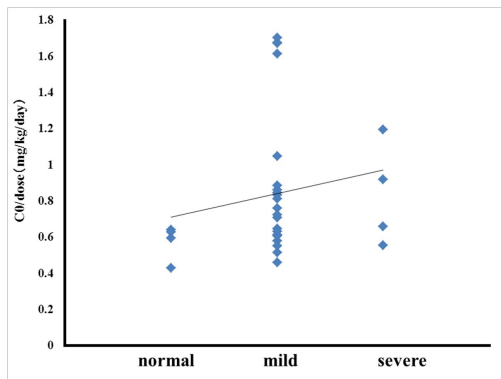


Fig. 2 Comparison of C_0 /dose between patients classified with d-ROM and BAP, normal, mild and severe

以上の結果より、腎移植患者においては酸化ストレスの程度が増加するほど CsA の全血クリアランスは低下する傾向にあることが分かった。なお、Tac を使用した患者 6 名についてはすべてが酸化ストレス normal 群であったため。現在のところ解析不能である。

(2) Table 1 に作製した OS モデルラットの血中および肝臓中酸化ストレスの程度を示す。酸化度を反映するいずれの指標も増加し、抗酸化力はむしろ増加していた。このことは一過性の生体防御反応によるものであると考えられる。

Table 1 Oxidative stress indexes of control and OS rats

	control	Fe-NTA
d-ROM (U.CARR)	366.75 ± 19.21	484.0 ± 52.69*
BAP(mol/L)	2134.2 ± 145.5	3910.6 ± 366.2*
TBA _{plasma} (μM)	4.26±0.28	23.30±3.10*
TBA _{Liver} (nmol/g)	73.12±1.7	391.40±1.7*

*p<0.05
Each value represents the mean ± S.E. (n=4).

(3) Table2 には OS ラットに CsA を急速静脈内投与後の血漿中および全血中 CsA の薬物動態学的パラメータを、Fig.3 には全血中濃度推移を示す。

Table 2. Pharmacokinetic parameters of CsA after intravenous administration of 5mg/kg CsA to control and OS rats. (n=4-9)

	t _{1/2} (min)	AUC _{0→∞} (μg/mL·min)	CL _{tot} (mL/min/kg)	V _{dss} (L/kg)
(Blood)				
control	291.2±13.4	2410.9±202.2	2.0±0.02	0.86±0.09
Fe-NTA	662.3±27.2*	2016.9±136.2	2.0±0.04	1.82±0.12*
(Plasma)				
control	320.6±8.1	1371.3±60.8	4.0±0.01	1.49±0.08
Fe-NTA	608.5±43.1*	651.6±23.2*	8.0±0.02*	4.87±0.17*

*p<0.05
Each value represents the mean ± S.E. (n=4).

OS ラットにおいては半減期が約 2 倍に延長し、分布容積の著明な増加が認められた。また、Fig.4 には各採血時点における全血/血漿中濃度比を示す。

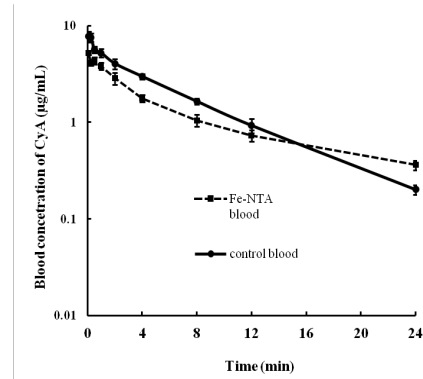


Fig. 3. Blood concentration time profiles of CsA after iv administration to control () and OS rats (). (n=6)

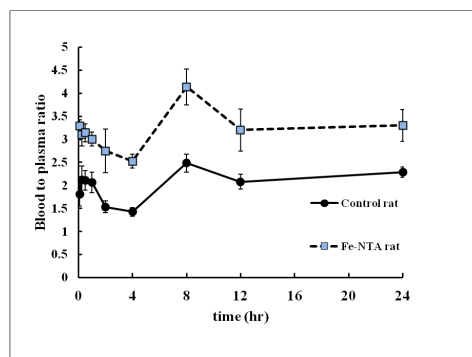


Fig. 4. Comparison of Blood-plasma ratio in control and OS rats. *p<0.05
Each value represents the mean ± S. E. (n=4-9).

いずれの採血時点においても、約 1.5 ~ 2 倍の値を示し、薬物の赤血球移行の増大が認められた。このことは薬物の組織移行の増大を示唆し、OS ラットにおける分布容積の増大を反映するものと考えられる。

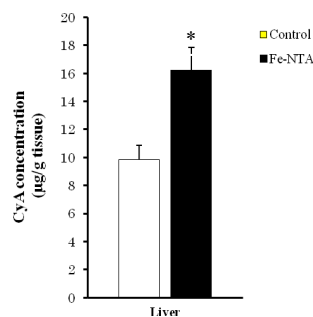


Fig.4. Liver concentration of CsA at 4 hr after i.v. administration to control and OS rats. Each symbol with a bar represents the mean ± S.E. of 4 rats. (*p<0.05)

Fig.4 には投与 4 時間後の肝臓中 CsA 濃度を示す。約 1.6 倍の増加が認められ、このこと

は前述した組織移行増大を反映するものである。しかしながら、肝臓への薬物移行増大にも関わらず、消失半減期は延長していた。このことは酸化ストレスによる肝代謝能の減弱が示唆される。

(4) Table 3 には代謝酵素発現・活性測定に供した OS ラットにおける酸化ストレスの程度を示す。血中および肝臓中過酸化脂質は著明に増加し、血中抗酸化力は約 2 倍に増加していた。

Table 3 Oxidative stress indexes of control and OS rats

	Control	OS
d-ROM (U.CARR)	334 ± 10	500 ± 71*
BAP(mol/L)	2104 ± 586	4223 ± 269*
Plasma TBA (μM)	1.69 ± 0.46	28.72 ± 5.98**
Liver TBA (μmol/g protein)	1.06 ± 1.00	10.71 ± 3.28*

*p<0.05, **p<0.01

Each value represents the mean ± S.E. (control, n=8; OS, n=8).

肝ミクロソーム代謝実験の結果を Fig.5 に示す。Lineweaver-burk plot により、ミカエリスメンテン定数 (K_m)、最大反応速度 (V_{max})、代謝クリアランス (CL_{int}) を算出した結果を Table 4 に示す。 K_m に有意な差は認められなかったが、OS ラットにおいては V_{max} は約 80% 減少し、それを反映して CL_{int} は著明な減少を認めた。またこの阻害様式は非競合阻害であることから、脂質過酸化の亢進により酵素蛋白が変性し、活性が低下したと考えられる。このことは前項、OS ラットにおける CsA 血中消失半減期の延長を反映するものである。

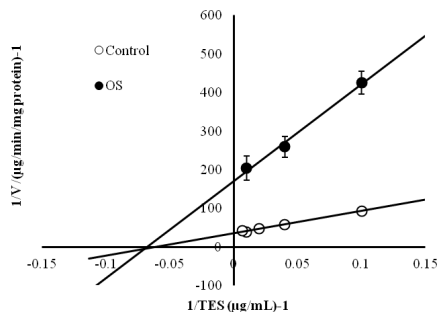


Fig.5. Lineweaver-Burk plot of testosterone 6β-hydroxylation activity (CYP3A) in control and OS rats.

Each value represents the mean ± S.E. (n=5)

Table 3 Kinetics of intestinal microsomal metabolism of CsA

	Control	OS
V_{max} (mg/min/mg protein)	30.20 ± 6.2	6.01 ± 0.6*
K_m (μg/mL)	19.0 ± 7.7	15.6 ± 3.3
CL_{int} (L/min/mg protein)	1.86 ± 0.3	0.42 ± 0.1*

Each value represents the mean ± S.E. (n=5)

*p<0.05

Fig.6 にウェスタンブロットによる OS ラットの肝臓・腎臓における CYP3A 発現量を示す。いずれも対照との間に有意差は認められな

かった。このことから OS ラットの代謝能減弱は、酵素蛋白の酸化変性や過酸化脂質亢進の影響による酵素活性の低下によるものと考えられる。

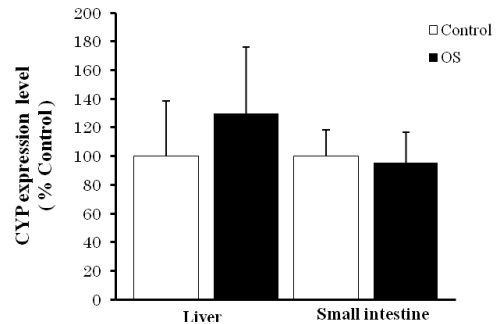


Fig. 6. Western blot analysis for CYP3A in the liver and small intestine in control and OS rats.

Fold induction compared with control rats was calculated based on signal intensity from the photographs.

Each value represents the mean ± S.D. (n=6)

No statistical significant difference was observed against control in each organ.

(5) HF ラットにおける CsA (1.25 mg/kg) 静脈内投与後の、CsA 全血中濃度プロファイルを図.7 に、その薬物動態学的パラメーターを Table 4 に示す。 $AUC_{i.v.}$ は約 2.8 倍に有意に増加し、全身クリアランス (CL_{tot}) および分布容積 (Vd_{ss}) はそれぞれ約 1/3 倍、約 1/2 倍に有意に減少した。一方、消失半減期 ($t_{1/2}$) に有意な変化は認められなかった。

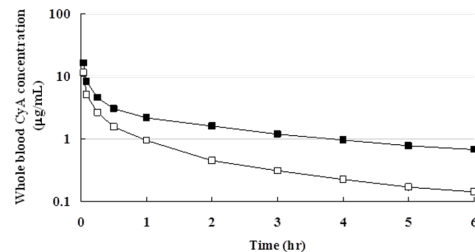


Fig.7. Whole blood CsA concentration vs time curves after intravenous administration in control (□) and HF (■) rats

Each value represents the mean ± S.E. (n=6)

Table 4. Pharmacokinetic parameters of CyA after intravenous administration

	Control rats	HF rats
$AUC_{i.v.}^{\infty}$ (μg·hr/mL)	4.57 ± 0.32	12.80 ± 0.64**
$t_{1/2}$ (hr)	2.85 ± 0.09	2.94 ± 0.06
CL_{tot} (L/hr/kg)	0.28 ± 0.02	0.10 ± 0.01**
Vd_{ss} (L/kg)	0.62 ± 0.04	0.35 ± 0.02**

Each value represents the average (± S.E.) of 6 experiments

** p<0.01 compared to control. (Student unpaired t-test)

HF ラットにおける CsA 十二指腸内投与後の CsA 全血中濃度プロファイルを図.8 に、薬物動態学的パラメーターを Table 6 に示す。HF ラットにおける $AUC_{i.d.}$ は約 1.5 倍に有意に増加したが、BA は約 1/2 倍に有意に減少した。また、 $t_{1/2}$ 、 CL_{tot}/F および Vd_{ss}/F は有意に

減少した。

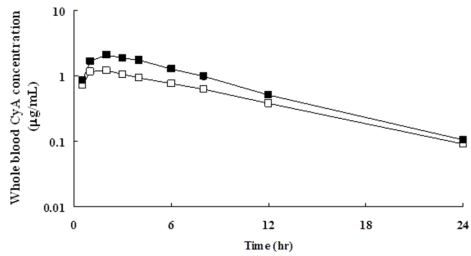


Fig. 8. Whole blood CsA concentration vs time curves after intraduodenal administration in control (□) and HF (■) rats. Each value represents the mean \pm S.E. (n=6)

Table 5. Pharmacokinetic parameters of CyA after intraduodenal administration

	Control rats	HF rats
AUC ₀₋₂₄ (µg·hr/mL)	12.57 \pm 0.49	19.04 \pm 1.72 *
t _{1/2} (hr)	5.92 \pm 0.16	4.95 \pm 0.05 **
Cl _{int} /F (L/hr/kg)	0.40 \pm 0.02	0.27 \pm 0.02 **
Vd _{ss} /F (L/kg)	3.54 \pm 0.20	2.06 \pm 0.15 **
BA (%)	68.74 \pm 2.68	37.19 \pm 3.37 **

Each value represents the average (\pm S.E.) of 5 experiments
* p<0.05, ** p<0.01 compared to control. (Student unpaired t-test)

HF ラットにおける CsA 腸管ループ内投与後の、CsA 全血中濃度プロファイルを図.9 に、薬物動態学的パラメータを Table 6 に示す。HF ラットにおける AUC₀₋₃ は約 1.5 倍に有意に増加したが、BA_{t-last} は約 1/2 倍に有意に減少した。

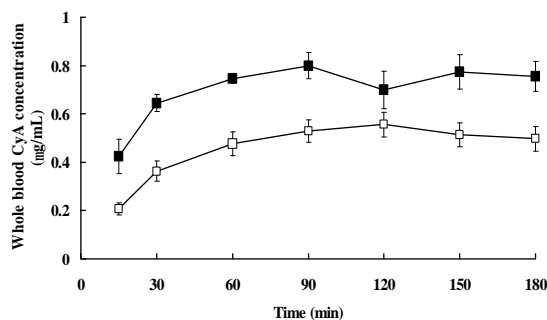


Fig. 9. Whole blood CsA concentration vs time curves after intraloop administration in control (□) and HF (■) rats. Each value represents the mean \pm S.E. (n=5)

Table 6. Pharmacokinetic parameters of CyA after intraloop administration

	Control rats	HF rats
AUC ₀₋₃ (µg·hr/mL)	1.35 \pm 0.13	2.05 \pm 0.13 **
BA _{t-last} (%)	7.39 \pm 0.69	4.00 \pm 0.26 **

The value represents the average (\pm S.E.) of 5 experiments
** p<0.01 compared to control. (Student unpaired t-test)

HF ラットにおける CsA 静脈内投与後 4 時間の肝組織中 CsA 量は約 2 倍に有意に増加した。

(Fig.10) しかしながら、肝臓 1 g あたりに含まれる CsA の量においては、有意な差は認められなかった。

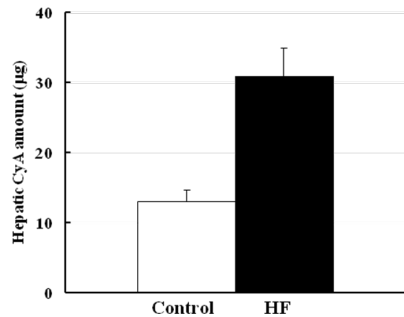


Fig. 10. Hepatic CsA amount in control (□) and HF (■) rats at 4 hr after intravenous administration. Each value represents the mean \pm S.E. (n=6)

Lineweaver-burk plot により、肝ミクロソームにおける K_m、V_{max}、代謝クリアランス CL_{int} (V_{max}/K_m) を算出した結果を図.11, Table 7 に示した。肝臓における CL_{int} (V_{max}/K_m) は、HF ラットは約 1.2 倍とわずかに増加した。

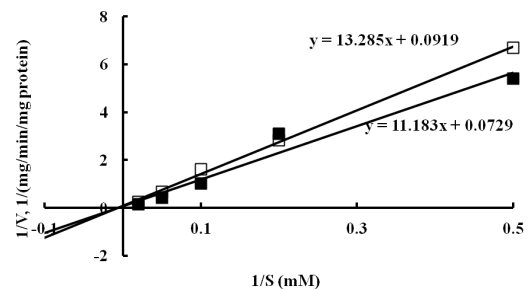


Fig. 11 Kinetics of liver microsomal metabolism of CsA in control (□) and MetS (■) rats

Table 7. Kinetics of liver microsomal metabolism of CyA

	Control rats	HF rats
K _m (µM)	144.69 \pm 3.36	146.11 \pm 12.48
V _{max} (µmol/min/mg protein)	10.89 \pm 0.19	13.11 \pm 1.19
V _{max} /K _m (µL/min/mg protein)	62.58 \pm 0.44	74.47 \pm 1.46 **

The values of K_m and V_{max} were estimated by a non-linear regression analysis using Michaelis-Menten equation

Each value represents the average (\pm S.E.) of 4 experiments
** p<0.01 compared to control. (Student unpaired t-test)

しかしながら、当研究室においては HF ラット肝ミクロソームにおいて CYP3A の発現が減少していることを報告している。したがって HF ラットにおける肝固有クリアランスにはほとんど差はないものと思われる。

また、データは示さないが、小腸ミクロソームにおける K_m、V_{max}、CL_{int} は有意な変化は認められなかった。また HF ラットにおいて、小腸上皮ミクロソーム中の CYP3A、P-糖蛋白の発現に差は認められないことを既に報告している。したがって血中における脂質増大による CsA の遊離型分率の低下が初回通過を回避させたとも考えられる。また HF ラットにおいては肝重量は約 3 倍、肝脂肪の割合

は約 7 倍に増加していたが、肝臓 1g あたりの CsA 量に差は認められなかった。すなわち正常肝細胞に取り込まれる CsA の割合は減少していることになる。このことも BA の低下の一因かもしれない。

総括

CsA による免疫抑制療法を受けた腎移植患者においては OS によって全血クリアランスが低下することがわかった。また OS ラットにおいて、血中における赤血球移行、組織分布の増大と代謝能の減弱が認められ、全血クリアランスには差が認められないものの、分布容積の増大から血漿クリアランスは増大した。CsA の血中濃度は全血測定値であるが、これらの結果から、ヒトにおいても酸化ストレスによって代謝・分布に寄与する血漿中 CsA の量は低下している可能性があり、全血中濃度の評価を再検討する必要がある。

多大な酸化ストレスに曝されている HF ラットにおいては、その体組成や血中脂質増大の影響により、酸化ストレスの動態変動への寄与を特定することは困難であったが、脂肪肝の CsA 代謝への影響は酸化ストレスよりもむしろ脂肪組成の変動が大きく寄与し、酸化ストレスによる血中分布の変動が初回通過効果に影響し、吸収を変動させる可能性があることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

Fukushima K, Yoshida K, Ito Y, Takada K, Sugioka N. Effects of obesity induced by high-fat diet on the pharmacokinetics of cyclosporine A in rats. Biomed Prev Nutri. **2011**, Jul-Sep; 1(3):195-20 (査読有)

[学会発表](計 2 件)

宮崎 綾, 石野 愛弓, 大西 優里, 国府 孝敏, 牛込 秀隆, 吉村 了勇, 福島 恵造, 杉岡 信幸 酸化ストレス病態下におけるシクロスポリンの血球移行率の変動 第 23 回日本医療薬学会 2013.9.21、仙台

中村 有里, 大西 優里, 岡田 章, 福島 恵造, 杉岡 信幸. 薬物体内動態における酸化ストレスの影響 日本薬学会第 134 年会、2014.3.30、熊本

(1)研究代表者

杉岡 信幸 (SUGIOKA Nobuyuki)
神戸学院大学・薬学部・教授
研究者番号：40418934

(2)研究分担者

牛込 秀隆 (USHIGOME Hidetaka)
京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師
研究者番号：90405283

福島 恵造 (FUKUSHIMA Keizo)
神戸学院大学・薬学部・助教
研究者番号：40418934

6. 研究組織