

博士論文

肥満病態時における免疫抑制剤
シクロスポリン A およびタクロリムスの
体内動態変動に関する研究

金沢大学大学院自然科学研究科（博士後期課程）

生命科学専攻

分子作用学講座

学籍番号 1123032315

学生氏名 澤本 一樹

主任指導教員 石崎 純子 准教授

目次

略語	1
第 1 章 序論.....	3
第 2 章 肥満状態における cyclosporine A および tacrolimus のヒト血中濃度解析.....	5
第 1 節 緒言	5
第 2 節 患者背景	8
第 3 節 BMI 変動と cyclosporine A 血中濃度の関係	8
第 4 節 BMI 変動と tacrolimus 血中濃度の関係.....	9
第 6 節 考察.....	12
第 3 章 肥満状態における tacrolimus 体内動態変動因子の解析	14
第 1 節 緒言	14
第 2 節 実験動物の体重、組織重量および血液中生化学的パラメーター	16
第 3 節 Tacrolimus の体内動態変動.....	17
第 1 項 Tacrolimus 静脈内投与	17
第 2 項 Tacrolimus 経口投与.....	19
第 4 節 Real-time PCR 法による組織中 Cyp およびトランスポーター発現解析	20
第 1 項 肝臓におけるタンパク発現レベル変動	20
第 2 項 小腸各部位におけるタンパク発現レベル変動	21
第 5 節 Western blotting 法による組織中 Cyp およびトランスポーター発現解析	23
第 1 項 肝臓におけるタンパク発現レベル変動	23
第 2 項 小腸各部位におけるタンパク発現レベル変動	24
第 6 節 Real-time PCR 法による組織中の炎症性サイトカイン発現解析.....	25
第 1 項 小腸各部位における mRNA 発現レベル変動.....	25
第 7 節 考察.....	27
第 4 章 総括.....	31
第 5 章 実験の部.....	33
1. 実験試薬, 機器および実験動物.....	33
2. 実験方法.....	35
参考文献.....	45
謝辞	46
引用文献.....	47

略語

本論文において用いた略号、酵素、トランスポーター遺伝子名を以下にまとめた。

なお、本文中の初出部の（ ）内に略語を示し、以後は略語を使用した。

略号

ALT	:	Alanine aminotransferase
AUC	:	Area under the concentration curve
AST	:	Aspartate aminotransferase
BA	:	Bioavailability
BMI	:	Body mass index
BUN	:	Blood urea nitrogen
C/D	:	Dose normalized steady state trough concentration
CL	:	Clearance
FDA	:	Food and Drug Administration
GFR	:	Glomerular filtration rate
HDL	:	High density lipoprotein
HPLC	:	High performance liquid chromatography
IL-1 β	:	Interleukine-1 β
iNos	:	Inducible nitric oxide synthase
LDL	:	Low density lipoprotein
MRT	:	Mean residence time
P-gp	:	P-glycoprotein
PCR	:	Polymerase chain reaction
TDM	:	Therapeutic drug monitoring
TNF- α	:	Tumor necrosis factor- α
VLDL	:	Very low density lipoprotein
WHO	:	World Health Organization

トランスポーター ・ 代謝酵素

Mdr	:	Multi drug resistance
Oatp	:	Organic anion transporting polypeptide
Cyp	:	Cytochrome P-450
UGT	:	UDP-glucuronosyltransferase

第1章 序論

近年、遺伝子多型に基づいた個別化医療が進展し成果を上げつつある。医薬品による副作用をできるだけ最小限に留め、効果を最大限に発揮させるためには、投与薬剤の性質を知るとともに、患者個々に適した用法・用量の選択が重要である。そのためには薬物動態学的情報の収集が必要不可欠となるが、個々の患者および疾患ごとに薬物の体内動態は大きく変動する。すなわち、病態時における薬物動態変動を明らかにし、それらを考慮した投与設計法を確立することは、医薬品適正使用上極めて重要な課題であるといえる。本研究では、病態の中でもとりわけ肥満病態時における薬物動態に着目した。

現在、先進国のみならず発展途上国を含めた全世界的に肥満人口は急速に増加し、糖尿病、脂質異常症、高血圧等の合併症を誘引する因子として深刻な社会問題となっている。世界保健機構（World Health Organization; WHO）の調査によれば、2008年の時点において20歳以上の35%が過体重であり、また11%が肥満者に属することを報告している(1)。また厚生労働省の平成23年国民栄養調査によると、最近10年間における20~60歳代男性の肥満者の割合は増加し続け、平成23年において31.7%となっている。一方で、40~60歳代の女性肥満者の割合はここ10年間でやや低下傾向にあり、平成23年において23%である(2)。このように、日本だけではなく世界各国で肥満者人口が今後も増加し続けることが予想されている(3)。

肥満による生理状態の変化は、薬物の吸収、分布、代謝、排泄の各過程に影響を与えることが示唆されている。肥満状態では体重あたりの脂肪組織重量が増えるため、多くの薬剤において分布容積に影響を与えることが考えられている。これまでに、amikacin、gentamicin等をはじめとする多くの水溶性薬剤については、肥満者に対する標準体重者の体重あたりの分布容積は減少すると報告されている(4-6)。一方で、脂溶性薬剤については、diazepamのように増加するものもあれば(7-9)、digoxinのように減少する薬剤もあり、薬剤ごとに異なった分布容積の変動を示す(10)。また、代謝過程における変化については、食事性誘発肥満モデル動物や遺伝子改変モデル動物等を用いて薬物代謝酵素やトランスポーターの発現変動について数多くの報告がなされている(11-14)。また、ヒトにおいてもCYPプローブ薬剤を用いた検討より、CYP活性の変動についての報告も存在する(15)。CYP2E1の活性および発現については肥満状態で上昇すると一般的に考えられている(15-17)。しかしながら他の薬物代謝酵素やトランスポーターの発現変動について、現状では統一的な見解は得られていない。肥満状態では皮下脂肪量が増加するため、薬剤を皮下投与、経皮投与もし

くは筋肉内投与した際に吸収過程で影響を受ける可能性がある。しかしながら、肥満患者に enoxaparin および insulin を皮下投与したときに薬物動態学的変動は認められなかったと報告されている (18, 19)。また肥満患者と非肥満者との間で midazolam、propranolol 経口投与後の吸収過程で差が認められなかったことも報告されている (20, 21)。しかしながら肥満状態における薬物の消化管吸収過程での変動に関する報告は少ないため、さらなる検討が必要であると考えられている (22)。また肥満状態は、glomerular filtration rate (GFR)、薬物の分泌および再吸収に影響を与えるとされており、腎クリアランスが変動することで薬物の排泄過程も影響を受けるのではないかと考えられている (23)。しかしながら、どのような要因により GFR および腎尿細管での薬物の再吸収、分泌に影響を受けるのか、実際に薬物の血中濃度に影響を与えるのかといったことは現時点で詳しくは解っていない (22, 24-26)。このように肥満状態においては、様々な生理学的要因により薬物の血中濃度に影響を与えることが考えられる。

そのため今日の臨床現場においても、実際に肥満患者に対してある薬剤を投与しようとした時に投与量設定に難渋したことも報告されている (27)。このような現状を受けて、米国の食品医薬品局 (Food and Drug Administration; FDA) は肥満患者を積極的に治験へ参加させて、至適投与量設定のための薬物動態データを収集したいと考えている (22)。しかしながら、肥満患者に対して治験への積極的採用を促すようなガイドラインの制定には未だ至っていない。これまでにいくつかの薬剤については、肥満状態での薬物動態変動についての検討がなされているが、添付文書上などで投与量の調節まで詳細に記入されていることは少ない。中でも肥満病態時における免疫抑制剤の薬物動態変動については、未だ報告が少ないのが現状である。

そこで本研究では、第 2 章においてレトロスペクティブ調査によるヒト血中濃度解析を行い、body mass index (BMI) 値と免疫抑制剤 cyclosporine A および tacrolimus の血中濃度について検討した。さらに第 3 章においては、肥満時での tacrolimus 血中濃度変動の機序を明らかにするため肥満モデルラットに tacrolimus を投与し、薬物動態学的解析を行った。

本論文は、これらの研究経過及び結果の詳述し、考察を加えたものである。

第2章 肥満状態における cyclosporine A および tacrolimus のヒト血

中濃度解析

第1節 緒言

Cyclosporine A および tacrolimus は臨床で用いられている主要な免疫抑制剤であり、臓器移植後の拒絶反応の抑制や種々の自己免疫疾患に適応を持つ。Cyclosporine A は、1970年サンドファーマ社(現ノバルティスファーマ)により、真菌の一種である *Tolypocladium inflatum gams* の培養液中から T 細胞の活性化を抑制する化合物として発見された (28, 29)。一方、tacrolimus は、1984年に藤沢薬品工業(現アステラス製薬)が当時研究所のあった茨城県筑波山近郊の土壌から分離した *Streptomyces tsukubaensis* No. 9993 株の培養液中に見出されたものである (30)。両薬剤ともに類似した作用機序を有し、tacrolimus はまずイムノフィリンと呼ばれる細胞質中レセプタータンパク質 (FK506 binding protein) に結合し、プロテインホスファターゼであるカルシニューリン (calcineurin) を介した T 細胞特異的転写因子 (nuclear factor of activated T cell) の脱リン酸化を阻害することにより核内への移行を阻害し、IL-2 等のサイトカイン産生を抑制する (31-36)。また cyclosporine A は、細胞タンパク質であるシクロフィリンと結合し、同様に calcineurin を介した細胞内情報伝達を阻害することにより T 細胞の活性化を抑制することが知られている (31, 32, 37-42)。

Cyclosporine A は分子量が 1202.61 の化合物であり、11 個のアミノ酸からなる疎水性の環状ポリペプチド構造を有する (Figure 1)。オクタノール/水分配係数 $\log P$ が 2.92 と脂溶性が非常に高い薬剤である。当初、ノバルティスファーマ社よりサンディミュンTM経口剤、注射剤として市販されていたが、現在では吸収性を改良したネオーラルTMカプセル、液剤も市販されている。Cyclosporine A の尿中未変化体排泄率は 1%以下で、その大部分は肝臓の CYP3A で代謝され胆汁中に排泄される (43)。血漿タンパク結合率は 98%と高く (44)、また腎移植患者での分布容積は 4.5 L/kg であることが報告されている (45)。一方、tacrolimus は分子量が 822.03 の化合物であり、分子内に α , β ジケトアミド構造を含む 23員環マクロライド構造を持つ (Figure 1)。Cyclosporine A 同様にオクタノール/水分配係数 $\log P$ が 3 以上と脂溶性が非常に高い。アステラス製薬よりプログラフとしてカプセル、顆粒、注射剤として市販されているが、現在では徐放製剤化されたグラセプターTMカプセルも市販されている。Tacrolimus の尿中未変化体排泄

率は1%以下で、cyclosporine A 同様に大部分は肝臓の CYP3A で代謝され胆汁中に排泄される (46, 47)。血漿タンパク結合率は98.8%で、分布容積は1 L/kg であると報告されている (48-50)。また両薬剤ともに薬物排出トランスポーターである P-glycoprotein (P-gp) の基質になることが知られている (51-53)。また cyclosporine A、tacrolimus ともに治療域が狭く、疾患により異なるが一般的に有効血中濃度はそれぞれ 50-200 ng/mL、5-20 ng/mL、中毒域は 300 ng/mL 以上、20 ng/mL 以上であることが知られている (54, 55)。副作用として、特に腎機能障害、血清 K 値の上昇に注意を要する。また、両薬剤ともに体内動態の個人間変動が大きいことから、therapeutic drug monitoring (TDM) による厳密な血中濃度管理が必要となる (54-57)。

肥満時の薬物動態変動については数多くの報告が存在するが、中でも免疫抑制剤に関するものは少ない。これまでに標準体重患者と比較して、過体重および肥満患者で cyclosporine A および tacrolimus の血中濃度が上昇しやすいことを示唆した報告はいくつかある。しかし、どの報告も腎移植等の特定の疾患に限った時の解析である (58, 59)。よって本研究では、疾患別ではなく本薬剤が使用されている全患者を対象として、体格変動に伴う血中動態変動を検討することとした。

本章では、肥満状態が cyclosporine A および tacrolimus のヒト血中動態に与える影響について明らかにするため、金沢大学附属病院 (本院) の電子カルテシステムを用いた retrospective 調査を行い、body mass index (BMI) 値と cyclosporine A および tacrolimus の dose normalized steady state trough concentration ratio (C/D ratio) との関係性を検討することとした。

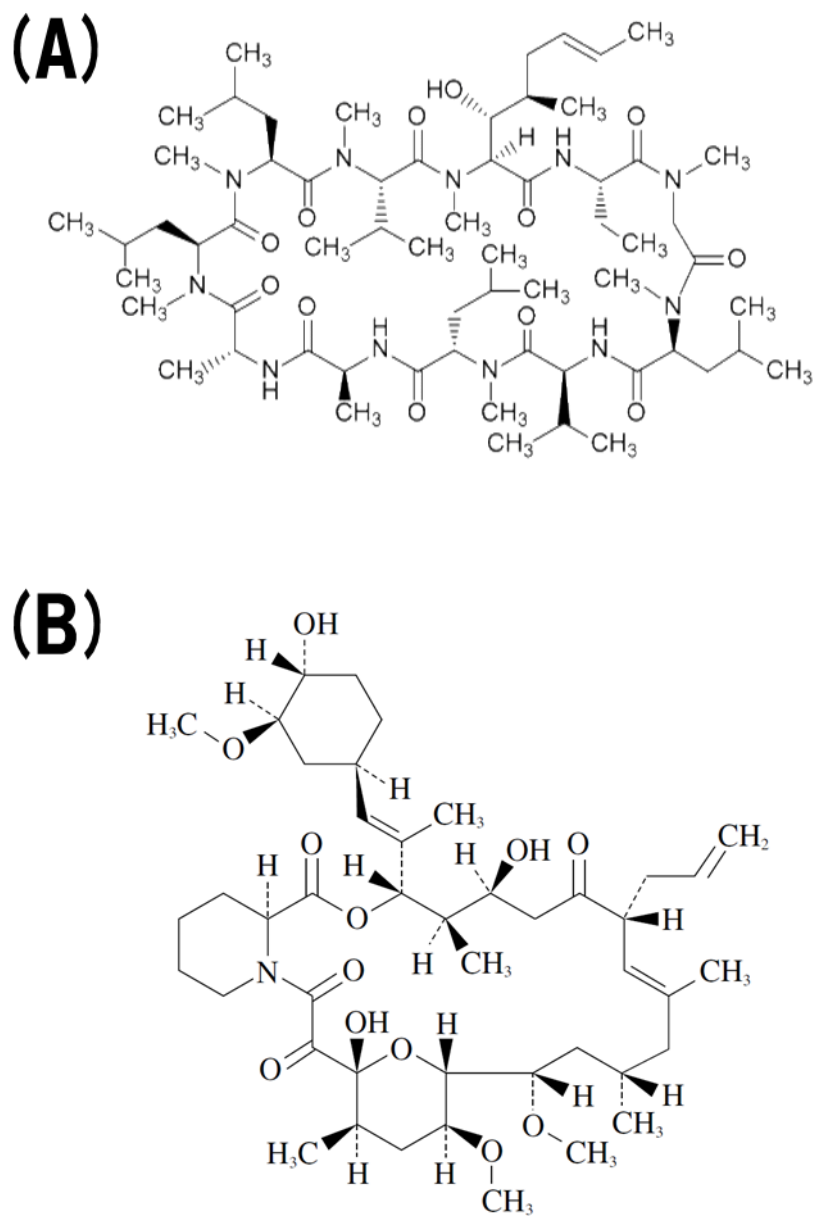


Figure 1. Structures of cyclosporine A (A) and tacrolimus.

第2節 患者背景

研究対象とした患者背景を Table 1 に示す。Cyclosporine A および tacrolimus が投与された患者ともに年齢、男女の構成に差はなかった。

Table 1. Patient background.

	Cyclosporine A	Tacrolimus
Number of patients	52	98
Sex (male/female)	(23/29)	(34/64)
Age (median \pm S.D.)	52 \pm 20	52 \pm 18
Age (male)	52 \pm 22	52 \pm 17
Age (female)	53 \pm 18	55 \pm 18
BMI, n (male/female)		
< 18.5	11 (6/5)	19 (7/12)
\geq 18.5, < 25	25 (10/15)	60 (20/40)
\geq 25	16 (7/9)	19 (7/12)

第3節 BMI 変動と cyclosporine A 血中濃度の関係

Cyclosporine A C/D 比と BMI 値の関係を Figure 2 に示す。肥満患者、標準体重患者、低体重患者の3群間で cyclosporine A C/D 比に差はみられなかった。また、BMI 値と cyclosporine A C/D 比に相関を示さなかった。

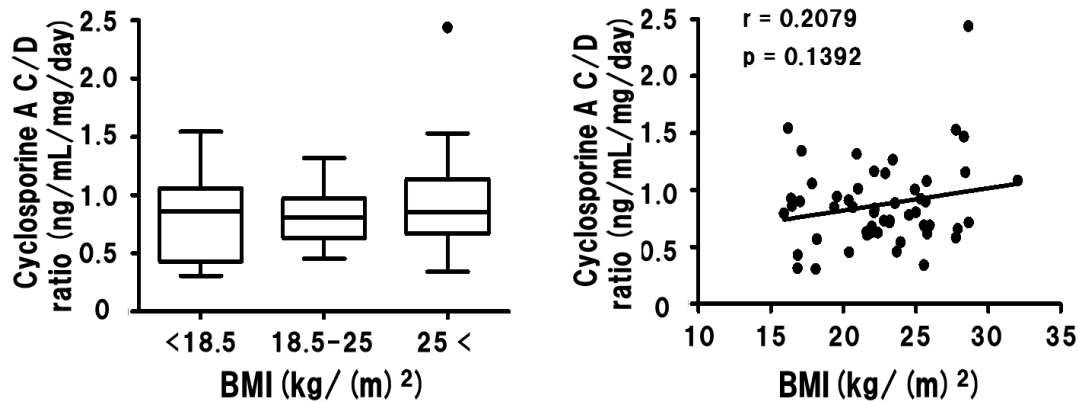


Figure 2. Comparison and correlation of C/D ratio of cyclosporine A among patients having various BMIs.

Each point represents individual patient's value. (n = 52)

The bottom and top of the box are the 25th and 75th percentile, and the band near the middle of the box is the median.

第4節 BMI変動と tacrolimus 血中濃度の関係

Tacrolimus C/D 比と BMI 値の関係を Figure 3 に示す。肥満患者では標準体重患者、低体重患者と比べ tacrolimus C/D 比が有意に上昇した ($p < 0.05$)。標準体重患者と低体重患者間では tacrolimus C/D 比に有意な差を示さなかった。また、BMI 値と tacrolimus C/D 比に有意な正の相関を示した ($r = 0.2665$; $p = 0.008$)。

また、tacrolimus が投与された患者の各測定点から、必要項目について検討を行った。男女混合の患者における tacrolimus C/D 比と BMI 値の関係を Table 2 に示す。肥満患者、標準体重患者、低体重患者の 3 群間で肝機能マーカーである ALT および AST に差はみられなかった。また tacrolimus トラフ血中濃度についても差は認められなかった。体重で補正した tacrolimus C/D 比は、標準体重患者、低体重患者に対して肥満患者で有意な上昇が認められた ($p < 0.05$)。一方で、体重で補正を行わなかった tacrolimus C/D 比については 3 群間で差は認められなかった。

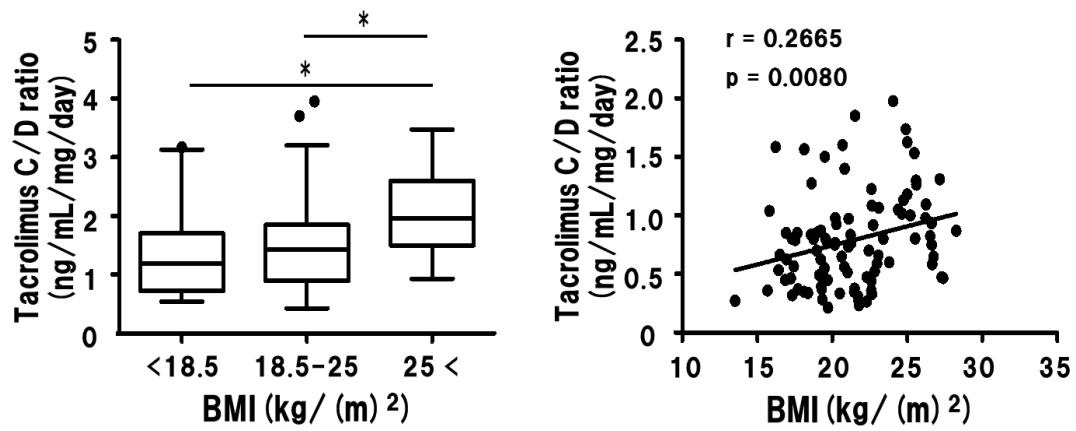


Figure 3. Comparison and correlation of C/D ratio of tacrolimus among patients having various BMIs.

Each point represents individual patient's value. (n = 98)

The bottom and top of the box are the 25th and 75th percentile, and the band near the middle of the box is the median.

***Significantly differences from low BMI patients at $p < 0.05$.**

Table 2. Characteristics and steady-state trough concentration/dose ratio of tacrolimus in patients.

BMI (kg/m²)	< 18.5	≥ 18.5, < 25	≥ 25
Number of patients	26	92	17
Sex (male/female)	5/21	30/62	3/14
Age (years)	51 ± 16	50 ± 17	50 ± 17
ALT (IU/mL)	22 ± 13	20 ± 17	24 ± 16
AST (IU/mL)	24 ± 10	22 ± 13	24 ± 12
Total number of measurements	141	764	111
Trough concentration of tacrolimus (ng/mL)	4.8 ± 2.5	4.8 ± 2.4	4.3 ± 1.7
Tacrolimus C/D ratio ([ng/mL] / [mg/kg/day])	79 ± 64.2*	103 ± 72	143 ± 57.9*
Tacrolimus C/D ratio ([ng/mL] / [mg/day])	1.88 ± 1.67	1.87 ± 1.27	2.05 ± 0.86

Values are expressed as means ± S.D.

* Significantly different from the BMI 18.5–25 group at $p < 0.05$; one-way ANOVA with Dunnett's *post hoc* test.

第5節 考察

本研究のヒト血中動態解析においては、肥満の尺度として BMI 値を用いた。BMI 値はヒトの肥満度を表す体格指数であり、体重と身長との 2 つのパラメーターのみから簡便に算出できる。過去の報告より体脂肪率とよく相関することが示されているが (60)、BMI 値は筋肉量や水分量の変動についても影響を受けるため、必ずしも肥満度を反映しているとは限らないことが欠点である。Retrospective 調査を行うに当たり、本院の多くの患者では体脂肪率の測定は行っていなかったため BMI 値を肥満指数として用いることにした。BMI 値に基づいた肥満度の判定については世界各国で異なり、WHO では 18.5 未満が痩せ型、18.5 以上 25 未満が標準型、25 以上 30 未満が過体重型、30 以上が肥満型と定義されている (61)。一方で日本においては、18.5 未満が痩せ型、18.5 以上 25 未満が標準型、25 以上が肥満型であると日本肥満学会が定めている。よって、本研究では対象患者を日本肥満学会が定める基準に従い 3 群に分け検討することとした。

本章での検討から、tacrolimus を投与された患者において、BMI 値 25 以上の肥満患者群で非肥満患者群と比べて C/D 比の有意な上昇が認められ、また、BMI 値と C/D 比に正の相関関係がみられた。一方で、cyclosporine A を投与された患者については、BMI 値による C/D 比の差は認められなかった。これまでに腎移植患者については、cyclosporine A、tacrolimus 血中濃度と BMI 値との関係についての検討がなされている。Hortal らは BMI 値が 30 以上の肥満患者では標準体重患者と比較して、より低用量の cyclosporine A 投与で同等のトラフ血中濃度を維持できることを報告している (58)。また Rodrigo らは、初期 tacrolimus 血中濃度が 15 ng/mL 以上となった腎移植患者の 72% で BMI 値は 25 以上であり、肥満の腎移植患者では tacrolimus 開始時の初期血中濃度が高くなりやすいことを報告している (59)。これらの報告から、腎移植以外の患者についても肥満で cyclosporine A、tacrolimus の血中濃度が上昇する可能性が考えられた。本研究においては、対象患者や検討項目は異なるものの tacrolimus を投与された患者については過去の腎移植患者を対象に行われた検討と一致した結果が得られた。そこで次に、肥満状態における薬物動態学的パラメーターの変動について考える。定常状態における C/D 比は、全身クリアランス (total clearance: CL_{tot}) とバイオアベイラビリティ (bioavailability: F) を用いて、以下の式で表すことができる。

$$\frac{C}{D} = \frac{F}{CL_{tot}}$$

よって C/D 比の上昇には、 CL_{tot} の低下もしくは F の上昇が考えられる。

Cyclosporine A および tacrolimus は CYP3A および P-gp の基質となることが知られている (43, 46, 51-53)。肥満状態において CYP3A 活性が低下する報告が散見されることから (62-65)、C/D 比の上昇は CYP3A 活性の低下による両薬剤の肝固有クリアランス (hepatic intrinsic clearance: $CL_{h,int}$) の減少を反映している可能性がある。また、F 変動の可能性については、小腸における CYP3A および P-gp の発現レベル変動が重要となる。肥満状態の小腸では CYP3A4 のタンパク発現が低下し、一方で P-gp のタンパク発現には差は認められなかったという報告がある (66)。しかしながら、肥満患者の小腸での薬物代謝酵素およびトランスポーター発現を検討した報告は他にはない。よって C/D 比の上昇には、小腸 CYP3A4 の発現レベル低下にともなう F の上昇が関与する可能性がある。

母集団解析の結果より、多くの薬物についてはクリアランスと体重が比例することが知られている。Tacrolimus についても母集団解析による過去の結果から、肝移植患者の tacrolimus 経口クリアランスは体重と比例することが報告されている (67)。また、腎移植患者を対象とした解析によると、体重が tacrolimus の維持量に大きな影響を与える因子の一つであることも知られている (68)。しかしながら一方で、近年では CYP3A5 の遺伝子多型を考慮した研究が盛んに行われており、体重よりも CYP3A5 の遺伝子型が tacrolimus のクリアランスに与える影響が強いことも報告されている (69-71)。よって、現在のところ tacrolimus のクリアランスが体重と比例関係にあるかという点については議論が分かれるところである。今回、体重で補正した投与量を用いて C/D ratio を算出した場合、3 群間で差を認めたが、投与量を体重で補正しない場合については各群間で C/D ratio に顕著な差を認めなかった (Table 2)。したがって、体重で補正した投与量を用いた場合、tacrolimus の C/D ratio を大きく見積もってしまう可能性も否定できないため、今後の検討が必要である。

本章より BMI 値が極端に高い患者に tacrolimus を投与する場合には、血中濃度の上昇に注意が必要であることが示された。

第3章 肥満状態における tacrolimus の体内動態変動因子の解析

第1節 諸言

前章において、tacrolimus が投与された患者の C/D 比は BMI の増加にともない上昇することを示した。この結果は、肥満患者において cyclosporine A および tacrolimus のクリアランスが低下すること、またバイオアベイラビリティが上昇する可能性を示唆している。よって、肥満状態の各臓器において薬物代謝酵素およびトランスポーターの発現が変動している可能性が考えられる。Cyclosporine A および tacrolimus の両薬剤ともに CYP3A および P-gp の基質となることが知られており (53, 72, 73)、血中動態の変動とそれらタンパクの発現変動を合わせて評価することが必要である。

肥満患者を対象とした研究においては、各臓器の薬物代謝酵素およびトランスポーターの発現変動を検討することは倫理的にも難しいため、その殆どが CYP プロブ薬剤および CYP 内因性基質の代謝物による CYP 活性の測定に限られていた。しかしながら、そのような検討ではどの臓器の CYP 活性および発現変動が薬物の体内動態変動に重要であるのかを明らかにしづらい。そのため、モデル動物を用いて薬物代謝酵素およびトランスポーターの発現変動の検討が報告されている。食餌誘導性肥満や遺伝的肥満モデルラットおよびマウスを用いた検討により、肥満状態の肝臓で第 I 相薬物代謝酵素の発現レベルが変動することや UDP-glucuronosyltransferase 1a1 (Ugt1a1)、Ugt1a6 などの第 II 相薬物代謝酵素の発現レベルにも影響を与えることが知られている (12, 74-78)。またトランスポーターの発現レベルにも影響を与えることが分かっている (13, 14)。しかし、肥満による発現変動は一様ではなく、肥満モデル動物の作成方法による差異が存在することも事実であり、検討が容易ではないのが現状である。また、これら代謝酵素およびトランスポーターの発現変動の検討に加え、いくつかの薬物についてはその PK/PD に与える影響についても検討がなされている。これまでに、食餌性肥満モデルマウスの肝臓で Cyp3a11 の発現が低下し、midazolam による睡眠作用が延長することや (79)、高脂肪食投与ラットの肝臓 Cyp3a1/2 mRNA 発現の低下と fluvastatin による副作用発現の程度に影響を与えることが報告されている (80)。また、肥満モデルラットにおける nelfinavir のクリアランス低下に肝臓 Cyp3a の発現低下が関与する可能性が知られている (81)。近年、肥満患者では肝臓中 Organic anion transporting polypeptide 1B1 (OATP1B1) のタンパク発現が低下し atorvastatin の経口クリアランスが減少することを明ら

かにした報告もあるが (66)、現状ではヒトを対象とした肥満時の体内動態変動に加えて、その機序の検討を同時に行うことは極めて難しいと思われる。そのため、今後臨床研究へと発展していく際には、事前にモデル動物を用いた基礎的な検討を行い、ヒトで起こりうるであろう機序の予測を前もって立てておくことは非常に重要であると考えられる。

Tacrolimus に比べ cyclosporine A では、これまでに肥満状態における体内動態変動について多くの報告が存在する。肥満患者において cyclosporine A の体重あたりの分布容積が減少することがいくつかの検討から明らかにされている (82)。また、食餌誘発性肥満モデル動物を用いた検討から、肥満群において分布容積およびクリアランスが低下し、さらにバイオアベイラビリティの低下が認められたことも報告されている (83)。しかしながら、tacrolimus については肥満状態における体内動態変動の機序については未だ報告はない。そこで本章では、tacrolimus に着目し肥満状態における体内動態変動の詳細な機序を検討することとした。

第2節 実験動物の体重、組織重量および血液中生化学的パラメーター

本研究では遺伝的肥満モデル Zucker (+/+) ラット群を正常群、Zucker (fa/fa) ラット群を肥満群とした。

実験に使用した Zucker ラット 9~18 週齢の体重推移を Figure 4 に示す。9 週齢において、肥満群は正常群と比較して有意な体重増加を認めたが ($p < 0.05$)、18 週齢においてその差は顕著であった。

また 18 週齢における組織重量および生化学的パラメーターを Table 3 に示す。肝臓、脂肪、腎臓の各組織重量は、正常群と比較して肥満群で有意に増加していた ($p < 0.05$)。血液中生化学的パラメーター検討したところ、正常群と比較して肥満群においては血清中の total protein, total cholesterol, triglyceride 濃度は顕著に上昇していたが ($p < 0.05$)、albumin 濃度に関しては差を認めなかった。肝機能マーカーである alanine aminotransferase (ALT) および alanine aminotransferase (AST)、腎機能マーカーである blood urea nitrogen (BUN) についても両群で差を認めなかった。

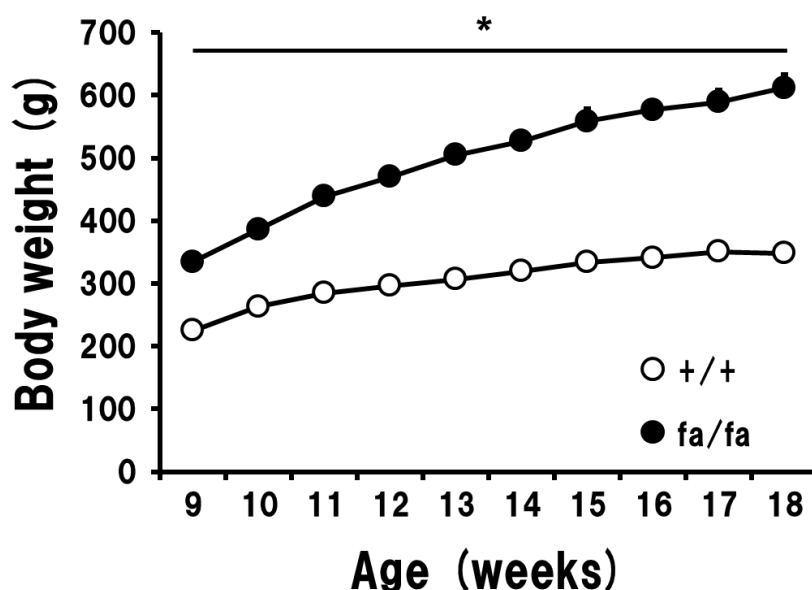


Figure 4. Weight change of lean (+/+) and obese (fa/fa) Zucker rats from age 9 to 20 weeks.

Data are means \pm S.D. (n = 6-9).

*Significantly different from the lean group at $p < 0.05$; Student's unpaired *t*-test.

Table 3. Phenotypic and biochemical parameters of Zucker rats.

	Lean (+/+)	Obese (fa/fa)
Body weight (g)	368.7 ± 24.1	598.1 ± 27.2*
Liver weight (g)	9.4 ± 1.2	17.4 ± 2.2*
Epididymal fat weight (g)	3.4 ± 1.1	15.5 ± 1.0*
Kidney weight (g)	2.3 ± 0.4	3.2 ± 0.4*
ALT (IU/mL)	72.0 ± 15.2	93.7 ± 23.6
AST (IU/mL)	167.2 ± 97.3	169.0 ± 108.2
BUN (mg/dL)	17.7 ± 1.0	17.1 ± 1.7
Total protein (g/dL)	5.5 ± 0.2	6.4 ± 0.2*
Albumin (g/dL)	3.5 ± 0.2	3.6 ± 0.5
Total Cholesterol (mg/dL)	77.7 ± 4.5	126.3 ± 11.2*
Triglyceride (mg/dL)	39.8 ± 15.7	322.5 ± 88.8*

Data were obtained from 18-week-age fasted lean and obese Zucker rats (n = 6-9) and are expressed as means ± S.D.

***Significantly different from the lean group at $p < 0.05$; Student's unpaired *t*-test.**

第3節 Tacrolimus の体内動態変動

第1項 Tacrolimus 静脈内投与

18週齢の Zucker ラットに tacrolimus を 1 mg/kg 静脈内投与した後の血中濃度推移を Figure 5 に示す。肥満群では正常群に比べ全体的に濃度は高く推移し、投与後 5 分、10 分、20 分、30 分、60 分、120 分、180 分、720 分、1440 分で有意に上昇していた。

次に、tacrolimus の薬物動態パラメーターを算出した結果を Table 4 に示す。血中濃度-時間曲線下面積 (AUC) は、肥満群においては正常群と比較して有意な増大を認め、約 1.6 倍増大していた ($p < 0.05$)。それに伴い、全身クリアランス (CL_{tot}) は肥満群で有意な低下を認めた ($p < 0.05$)。また、定常状態における分布容積 (Vd_{ss}) は肥満群で有意に減少したが ($p < 0.05$)、MRT については両群

間で差を認めなかった。β相における半減期 ($t_{1/2}$) は、正常群に比べ肥満群では延長傾向にあった ($p = 0.06$)。

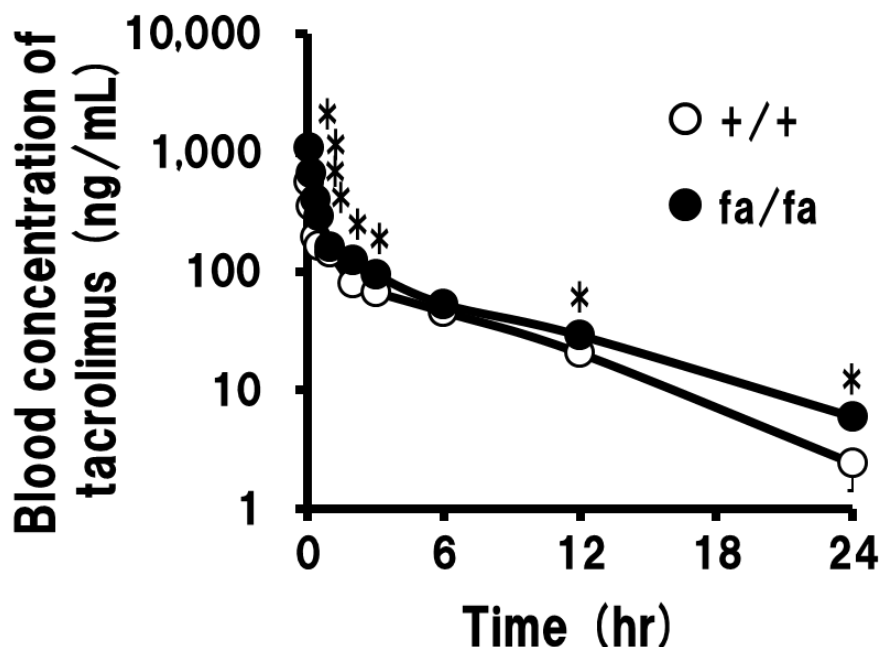


Figure 5. Blood concentration–time profiles of tacrolimus after intravenous administration of tacrolimus (1 mg/kg) to lean (open circles) and obese (closed circles) rats.

Data are means \pm S.E. (n = 6).

*Significantly different from the lean (+/+) group at $p < 0.05$; Student's unpaired *t*-test.

Table 4. Pharmacokinetic parameters of tacrolimus after intravenous administration to lean (+/+) and obese (fa/fa) Zucker rats.

	Lean (+/+)	Obese (fa/fa)
$AUC_{0 \rightarrow \infty}$ (ng h/mL)	888 \pm 50	1381 \pm 90*
CL_{tot} (mL/min/kg)	19.1 \pm 1.1	12.3 \pm 0.8*
MRT (h)	5.49 \pm 0.21	5.77 \pm 0.28
Vd_{ss} (L/kg)	6.29 \pm 0.44	4.26 \pm 0.33*
$t_{1/2}$ (h)	4.35 \pm 0.43	5.39 \pm 0.24

Data are means \pm S.E. (n = 6).

*Significantly different from the lean group at $p < 0.05$; Student's unpaired *t*-test.

第2項 Tacrolimus 経口投与

18週齢の Zucker ラットに tacrolimus を 3.2 mg/kg 経口投与した後の血中濃度推移を Figure 6 に示す。肥満群では正常群に比べ全体的に濃度は高く推移し、投与後 15 分、30 分、1440 分で有意に上昇していた。

次に、tacrolimus の薬物動態パラメーターを算出した結果を Table 5 に示す。AUC は、肥満群においては正常群と比較して有意な増大を認め、約 3.1 倍増大していた ($p < 0.05$)。それに伴い、経口クリアランス (CL_{tot}/F) は fa/fa 群で有意な低下を認めた ($p < 0.05$)。また、最高血中濃度 (C_{max}) および最高血中濃度到達時間 (T_{max}) については両群間で差を認めなかった。バイオアベイラビリティ (bioavailability: BA) は正常群と比較して肥満群では有意に上昇していた ($p < 0.05$)。

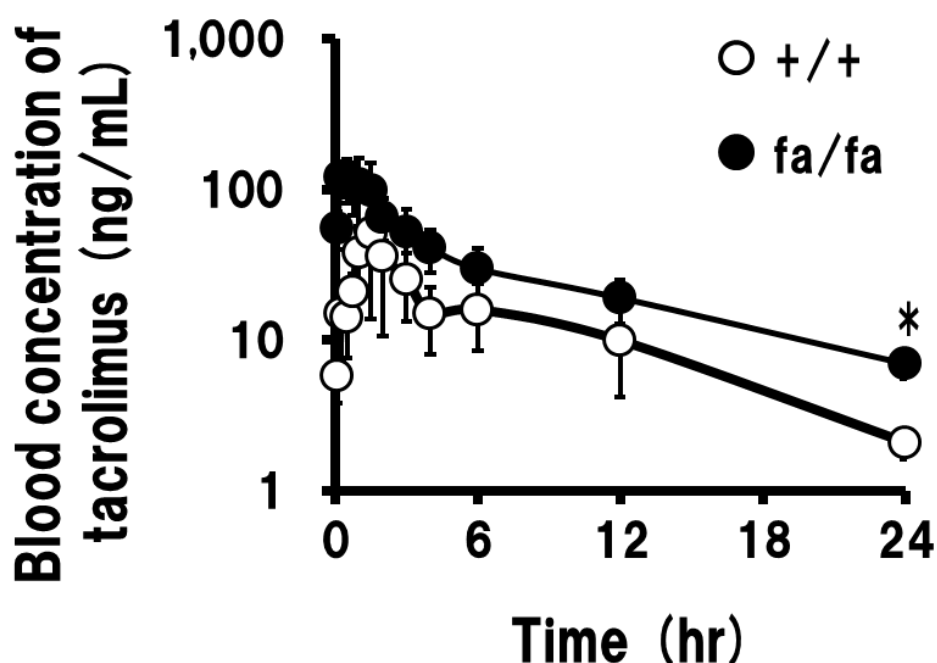


Figure 6. Blood concentration–time profiles of tacrolimus after oral administration of tacrolimus (3.2 mg/kg) to lean (open circles) and obese (closed circles) rats.

Data are means \pm S.E. (n = 5).

*Significantly different from the lean (+/+) group at $p < 0.05$; Student's unpaired *t*-test.

Table 5. Pharmacokinetic parameters of tacrolimus after oral administration to lean (+/+) and obese (fa/fa) Zucker rats.

	Lean (+/+)	Obese (fa/fa)
AUC _{0→∞} (ng h/mL)	257 ± 108	800 ± 119.4*
CL _{tot} /F (mL/min/kg)	323.9 ± 82.7	72.2 ± 7.8*
CL _{tot} (mL/min/kg)	17.2 ± 0.2	12.5 ± 0.1*
T _{max} (h)	1.4 ± 0.5	0.5 ± 0.1
C _{max} (ng/mL)	64.5 ± 35.3	141.3 ± 43.5
F (%)	8.30 ± 3.49	18.60 ± 2.53*

Data are means ± S.E. (n = 5).

*Significantly different from the lean group at $p < 0.05$; Student's unpaired *t*-test.

第4節 Real-time PCR 法による組織中 Cyp およびトランスポーター発現解析

本節では tacrolimus を基質とし、発現量の変動により tacrolimus の体内動態に影響を及ぼす可能性が考えられる薬物代謝酵素およびトランスポーターとして、Cyp3a2、Mdr1a、Mdr1b について、Real-time PCR 法により messenger RNA (mRNA) 発現レベルの解析を行った。

第1項 肝臓中 mRNA 発現レベル変動

Zucker ラット 18 週齢の肝臓中 Cyp3a2、Mdr1a、Mdr1b mRNA 発現レベルを Figure 7 に示す。Cyp3a2 の発現レベルは、肥満群と比べて正常群で顕著に低下していた ($p < 0.05$)。Mdr1a、Mdr1b の発現レベルについては、肥満群と正常群の両群の間で差を認めなかった。

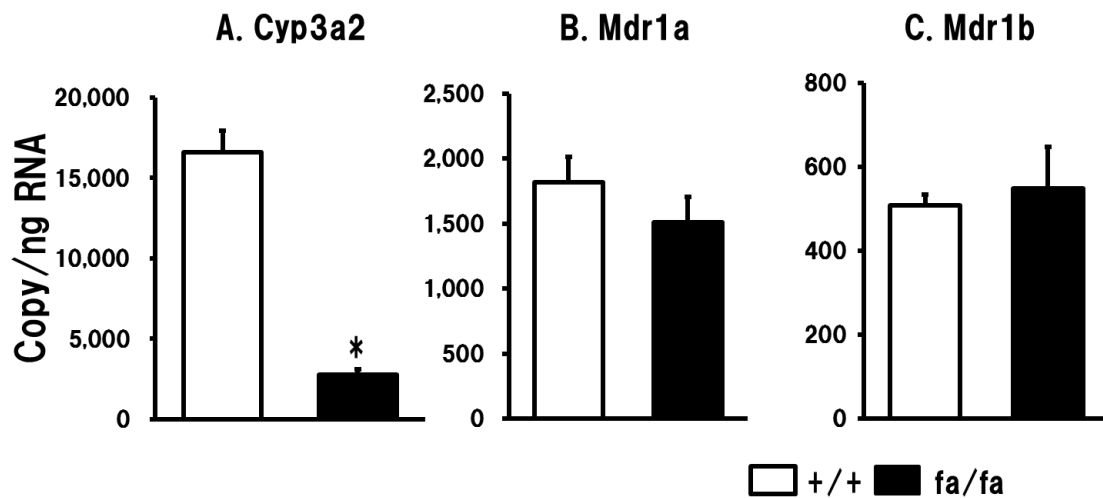


Figure 7. mRNA expression of Cyp3a2 (A), Mdr1a (B), and Mdr1b (C) in the liver of lean (+/+) (open column) and obese (fa/fa) (closed column) Zucker rats.

Data are means \pm S.E. (n = 3-4).

***Significantly different from the lean (+/+) group at $p < 0.05$: Student's unpaired *t*-test.**

第2項 小腸各部位における mRNA 発現レベル変動

Zucker ラット 18 週齢の小腸各部位における Cyp3a2、Mdr1a、Mdr1b mRNA 発現レベルを Figure 8 に示す。小腸上部、中部、下部のいずれの部位においても、Cyp3a2、Mdr1a、Mdr1b mRNA 発現レベルは肥満群と正常群の間で差を認めなかった。

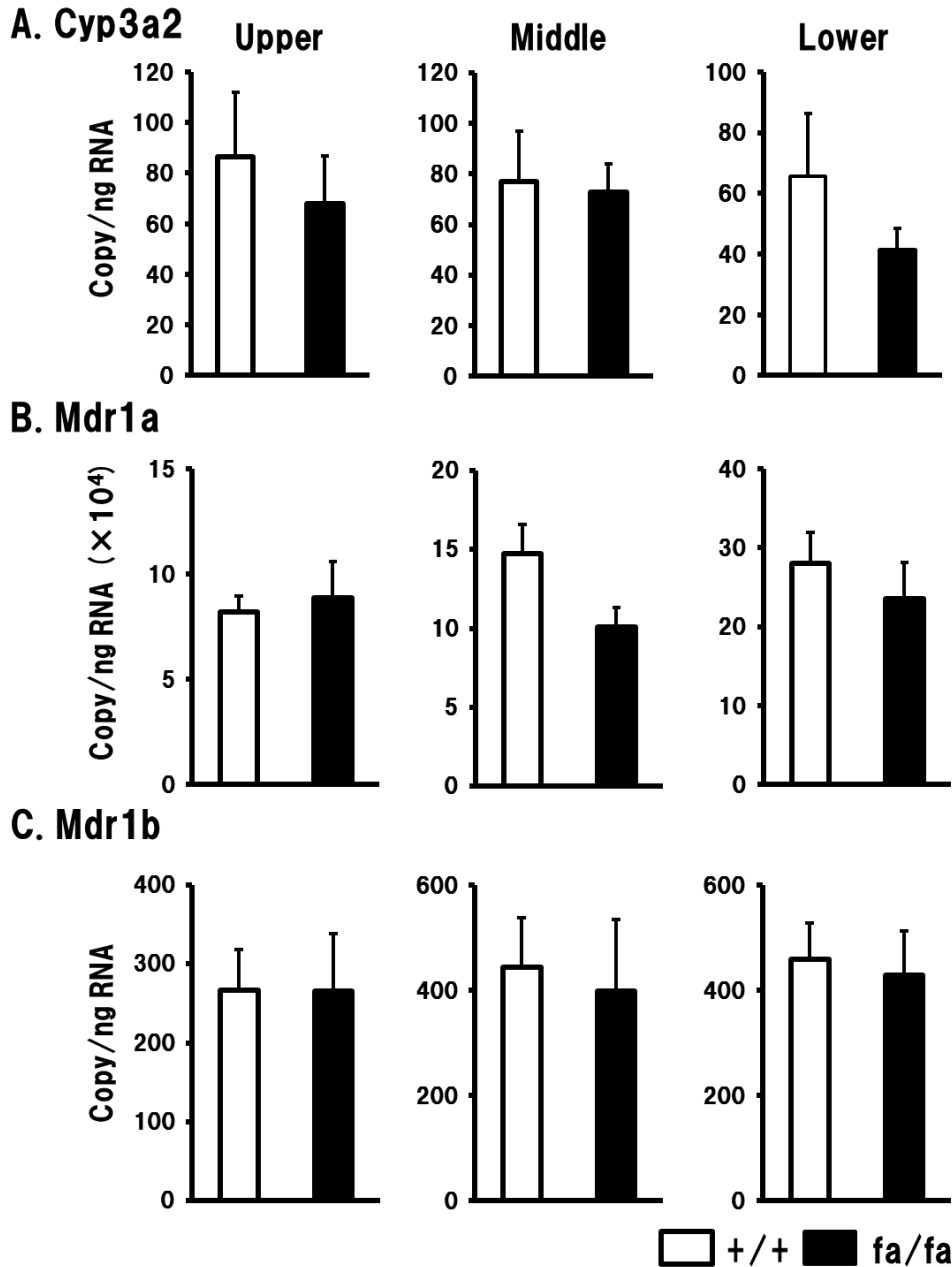


Figure 8. mRNA expression of Cyp3a2 (A), Mdr1a (B), and Mdr1b (C) in the upper, middle and lower sites of the small intestine of lean (+/+) (open column) and obese (fa/fa) (closed column) Zucker rats. Data are means \pm S.E. (n = 4-5).

***Significantly different from the lean (+/+) group at $p < 0.05$; Student's unpaired *t*-test.**

第5節 Western blotting 法による組織中 Cyp およびトランスポーター発現解析

本節では tacrolimus を基質とし、発現量の変動により tacrolimus の体内動態に影響を及ぼす可能性が考えられる薬物代謝酵素またはトランスポーターとして、Cyp3a2 および P-gp について、Western blotting 法によりタンパク発現レベルの解析を行った。

第1項 肝臓中タンパク発現レベル変動

Zucker ラット 18 週齢の肝臓中 Cyp3a2 および P-gp タンパク発現レベルを Figure 9 に示す。Cyp3a2 の発現レベルは、肥満群と比べて正常群で顕著に低下していた ($p < 0.05$)。一方で、P-gp の発現レベルについては、肥満群と正常群の両群の間で差を認めなかった。

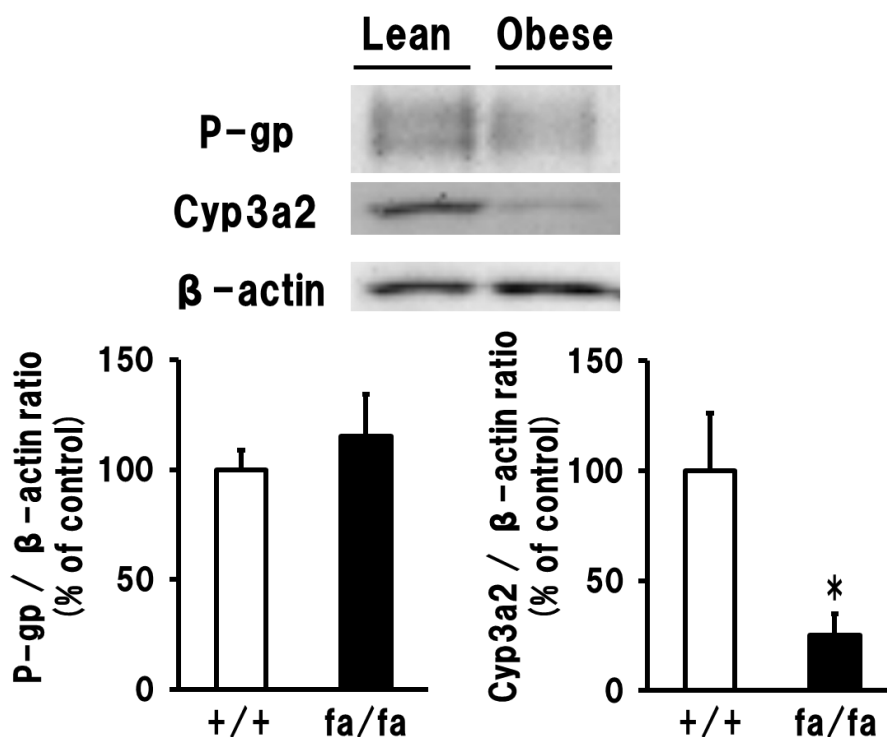


Figure 9. Western blot analysis of protein expression of P-glycoprotein and Cyp3a2 in the liver of lean (+/+) (open column) and obese (fa/fa) (closed column) Zucker rats.

Data are means \pm S.E. (n = 6).

*Significantly different from the lean (+/+) group at $p < 0.05$; Student's unpaired *t*-test.

第2項 小腸各部位におけるタンパク発現レベル変動

Zucker ラット 18 週齢の小腸各部位における Cyp3a2 および P-gp タンパク発現レベルを Figure 10 に示す。小腸上部および中部においては、肥満群と比べて正常群で P-gp のタンパク発現レベルは顕著に低下していた ($p < 0.05$)。一方で、Cyp3a2 のタンパク発現レベルには両群で差を認めなかった。小腸下部においては、肥満群と比べて正常群で P-gp のタンパク発現レベルは低下傾向を示したが ($p = 0.08$)、Cyp3a2 のタンパク発現レベルには両群で差を認めなかった。

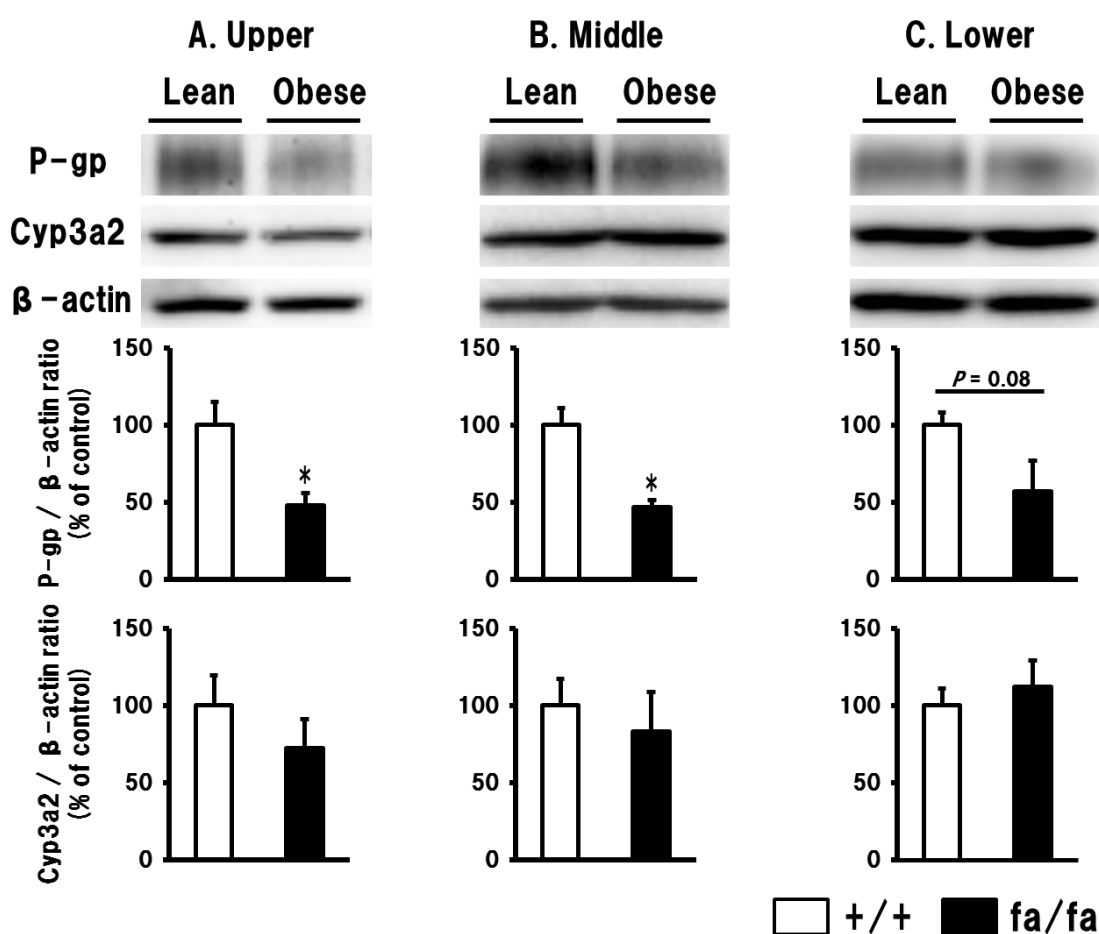


Figure 10. Western blot analysis of protein expression of P-glycoprotein and Cyp3a2 in the upper, middle and lower sites of the small intestine of lean (+/+) (open column) and obese (fa/fa) (closed column) Zucker rats. Data are means \pm S.E. (n =5).

***Significantly different from the lean (+/+) group at $p < 0.05$; Student's unpaired *t*-test.**

第 6 節 Real-time PCR 法による組織中の炎症性サイトカイン発現解析

本節では Cyp およびトランスポーター発現に影響を及ぼす可能性が考えられる炎症性サイトカインとして、TNF α 、IL-1 β および iNOS について Real-time PCR 法により mRNA 発現レベルの解析を行った。

第 1 項 小腸各部位における mRNA 発現レベル変動

Zucker ラット 18 週齢の小腸各部位における TNF α 、IL-1 β および iNOS mRNA 発現レベルを Figure 11 に示す。TNF α の mRNA 発現レベルは小腸中部において、正常群と比べて肥満群で有意に上昇していたが ($p < 0.05$)、その他の部位では両群間で発現レベルに差はなかった。IL-1 β の mRNA 発現レベルも同様に、小腸中部において有意な上昇を認めたが ($p < 0.05$)、その他の部位では差はなかった。また、iNOS の mRNA 発現レベルは小腸のいずれの部位についても両群間で差は認められなかった。

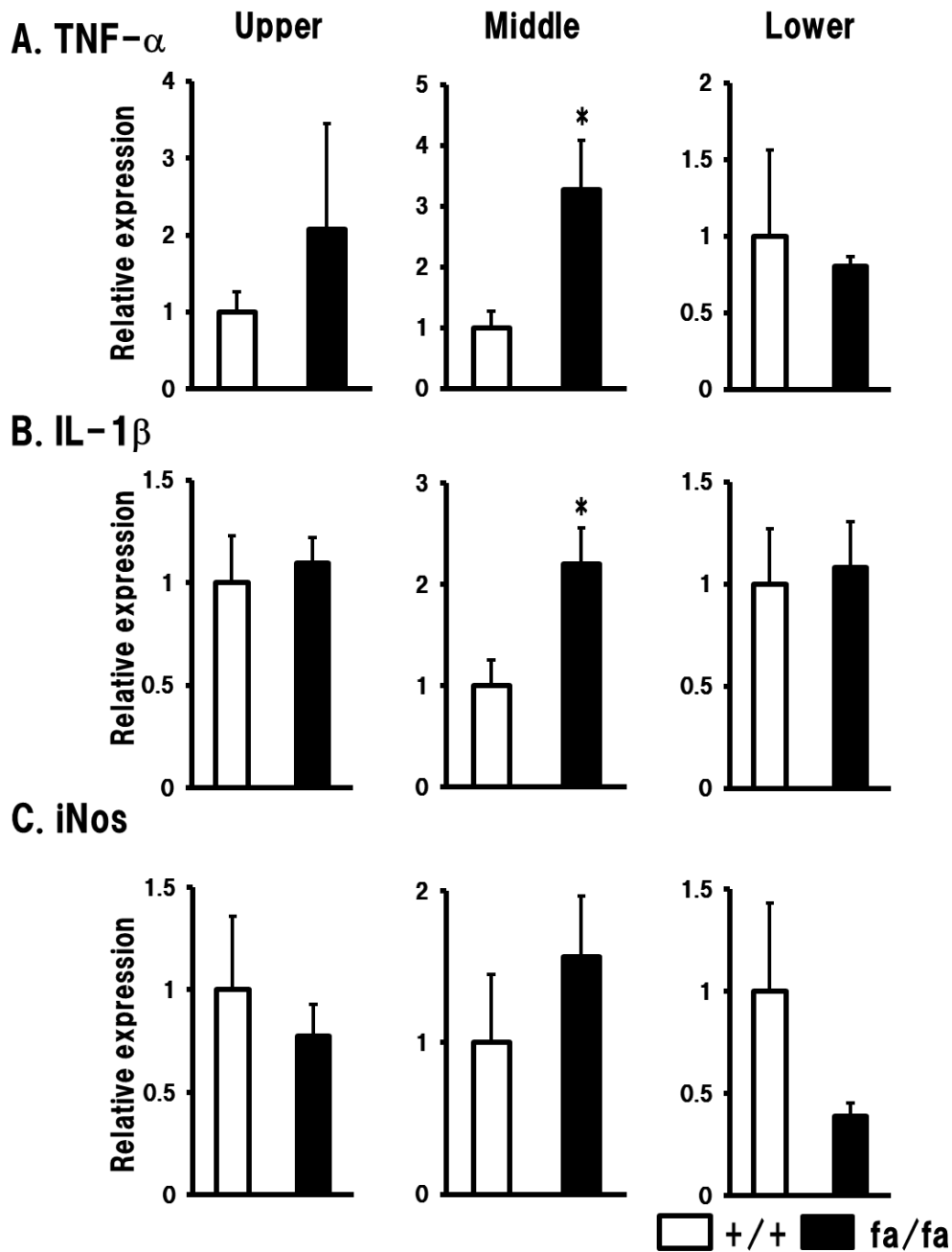


Figure 11. mRNA expression of TNF- α (A), IL-1 β (B), and iNos (C) in the upper, middle and lower sites of the small intestine of lean (+/+) (open column) and obese (fa/fa) (closed column) Zucker rats. Data are means \pm S.E. (n = 3-4). *Significantly different from the lean (+/+) group at $p < 0.05$: Student's unpaired t -test.

第7節 考察

第2章の tacrolimus ヒト血中濃度解析において、BMI が 25 以上の肥満患者群ではその他の群と比較して C/D 比が上昇することを見出した。そこで本章では、肥満状態において tacrolimus 血中濃度が上昇する機序を明らかにするため、肥満モデルラットである Zucker ラットを用いて検討を行った。

Zucker ラットは遺伝的にレプチン受容体を欠損するラットであり、肥満研究に頻用されている (84, 85)。18 週齢において、肥満群は正常群と比較して有意な体重の増加を認め、体重あたりの肝重量および脂肪重量も増加していたことから、十分な肥満状態を呈していると考えられる。さらに、肝機能マーカーである ALT および AST、腎機能マーカーである BUN に両群間で差はなかった。重篤な肥満状態は、非アルコール性肝炎、および慢性腎臓病といった合併症の重要な危険因子であることが知られている。重篤な肝障害を伴う患者では、肝臓 CYP3A4 の活性が低下することにより tacrolimus の消失が遅延することが示唆されている。また、腎機能障害が tacrolimus の血中動態に与える影響については未だ明確にはされていない。第2章の tacrolimus ヒト血中濃度解析においても、BMI 値別に患者を 3 群に分割したとき肝機能マーカーである ALT および AST に差は認められなかったことから (Table 3)、肝腎機能マーカーに肥満群で変動がなく、いずれの臓器に関する合併症を呈していない状態で tacrolimus 薬物動態変動の検討を行うことが望ましいと考えた。そこで、以降の動物実験においては 18 週齢のラットを用いて検討を行うこととした。

まず、tacrolimus を Zucker ラットに静脈内および経口投与し、tacrolimus 血中濃度推移と薬物動態パラメーターの算出を行った。静脈内投与後の tacrolimus 血中濃度推移は正常群と比較して肥満群で高く推移した (Figure 5)。同様に、tacrolimus 経口投与時においても tacrolimus 血中濃度推移は正常群と比較して肥満群で高く推移したが (Figure 6)、静脈内投与時と比較して経口投与時では tacrolimus 血中濃度の上昇がより顕著であった。静脈内投与時の tacrolimus 血中濃度推移から、薬物動態パラメーターの算出を行ったところ、正常群と比較して肥満群で $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ は 1.6 倍に増大し、それに伴い CL_{tot} は低下した。また、 Vd_{ss} についても肥満群では正常群と比較して低下を認めた (Table 4)。Tacrolimus は、オクタノール/水分配係数 $\log P$ が 3 以上と非常に脂溶性が高い薬物であり、また肥満群では正常群と比較してラット体重あたりの脂肪組織重量が増加していたことから、体重あたりの分布容積は肥満群で増加するものと予想されたが逆であった。Tacrolimus は肝臓でそのほとんどが代謝され胆汁中に排泄されるため、肝代謝型の薬物であることが知られている (86)。またラットの肝血流量を 70

mL/min/kg として+/+群および肥満群の CL_{tot} から肝抽出率 (E_H) を見積もると 30% 以下となるため、クリアランス律速型の薬物であることを確認した。そのため、tacrolimus の CL_{tot} は以下のような式で表される。

$$CL_{tot} = CL_H = Q_H \cdot CL_H = \frac{Q_H \cdot f_u \cdot CL_{H,int}}{Q_H + f_u \cdot CL_{H,int}} \cong f_u \cdot CL_{H,int}$$

f_u を tacrolimus の血中における遊離形分率とし、 $CL_{H,int}$ を肝固有クリアランスとすると CL_{tot} は f_u と $CL_{H,int}$ の積で表される。よって、 CL_{tot} と Vd_{ss} が肥満群で低下した一つの要因としては肥満状態における tacrolimus f_u の変動が考えられる。Zahir らの報告によれば、血中 tacrolimus の 85% 以上は赤血球、残りの 15% 程度は血漿中タンパクと結合している (87)。また、血漿中タンパクの中でも、high density lipoprotein (HDL)、low density lipoprotein (LDL)、very low density lipoprotein (VLDL) といったリポ蛋白とも tacrolimus は結合している (87, 88)。肥満患者の多くは、肝臓からの LDL、VLDL の産生が増加することが知られているが、今回実験に使用したラットにおいても LDL、VLDL を構成する triglyceride および total cholesterol の血清中濃度が上昇していたことから、血清中リポ蛋白タンパク濃度の上昇が tacrolimus f_u の低下につながった可能性が考えられる。また、ヒト血液中においては 85% 以上の tacrolimus が赤血球と結合するとされている (87, 88)。本研究では全血中の tacrolimus 濃度を測定しているために肥満状態での tacrolimus の血球分布の変化を考慮した動態変動について考えることも重要であると思われる。これまでに肥満患者では、循環血中の赤血球数が増加することが報告されている (89-91)。よって、肥満状態により赤血球数が増加した場合には血漿中 tacrolimus 濃度から算出される分布容積は増加すると考えられるが、一方で血中 tacrolimus から算出される分布容積に変化はないと考えられる。仮に、増加した赤血球中に tacrolimus が取り込まれ、 f_u が低下するほどの影響を受けたならば CL_{tot} が低下する可能性も考えられる。日本 SLC 社のデータによると、およそ 18 週齢の Zucker ラットの正常群と肥満群の両群間で赤血球の数に変化はない。そのため今回の検討では、肥満状態における CL_{tot} および Vd_{ss} といった動態パラメーターは赤血球による影響を受けていないと思われる。なお、LC/MS を使用して tacrolimus f_u の測定を試みたが、定量限界が 100 ng/mL 程度であったため、今回の動物実験の条件においては f_u の算出は困難であると判断した。また、第 2 章におけるヒト血中濃度解析においては C/D 比の算出しが行なっておらず、ヒトにおける分布容積の変動を考えることはできなかった。そのため、肥満患者での tacrolimus 分布容積の変動とその要因については今後の検討課題である。このように、肥満状態においては tacrolimus の血中タンパク結合の上昇により CL_{tot} が低下し、血中から各組織への tacrolimus の移行が妨げられることにより

$V_{d_{ss}}$ が低下する可能性が考えられた。また、肥満群で CL_{tot} が低下した要因としては、 $CL_{H, int}$ が低下した可能性もある。さらに、 F は肥満群で有意に上昇していたことから、小腸吸収過程においても何らかの変化が起きているのではないかと考え、次に小腸および肝臓における Cyp およびトランスポーターの発現変動を検討することとした。

Tacrolimus は、薬剤排出型のトランスポーターである $P-gp$ および薬物代謝酵素 $CYP3A$ の基質になることが知られている (46, 51-53)。とりわけ、ラットにおいてはヒト $CYP3A4$ に相当する $Cyp3a2$ によって代謝される (72)。そこで、正常群と肥満群での肝臓、小腸における $P-gp$ および $Cyp3a2$ の発現レベル変動について検討を行った。肥満群では正常群と比較して、肝臓 $Cyp3a2$ のタンパク発現レベルは有意な低下を認め (Figure 9)、遺伝子レベルにおいても同様に低下を認めた (Figure 7)。よって、 fa/fa 群における肝臓 $Cyp3a2$ のタンパク発現レベルの低下は遺伝子レベルでの調節を受けていることが示唆された。これまでに、肥満群において $Cyp3a$ の活性が低下すること (92)、また食餌性肥満モデルマウスにおいて肝臓 $Cyp3a2$ の発現が低下することも報告されている (12)。よって、今回の結果は、過去の報告と一致するものと考えられた。一方で、小腸 $P-gp$ のタンパク発現レベルは $+/+$ 群と比較して肥満群で低下したが、 $Cyp3a2$ の発現には両群間で差を認めなかった。食餌性誘発肥満モデルラットを用いた過去の検討では、小腸の $P-gp$ タンパク発現レベルが 30% 低下し、 $Cyp3a$ 発現には差が見られなかったという報告もあり (81)、今回の結果と同じ傾向がみられた。また、 $mdr1a$ ノックアウトマウスに tacrolimus を投与すると BA が上昇するという報告もあることから (28)、今回肥満群で F が上昇した一つの要因としては小腸 $P-gp$ の発現低下が関与している可能性がある。

肥満状態は低レベルの炎症状態であると特徴づけられており、肥満患者の脂肪組織を始めとした肝臓、筋肉といった代謝臓器に加えて、膵臓等の全身のあらゆる臓器にマクロファージ等の様々な免疫担当細胞が浸潤し、炎症を惹起することが明らかとなっている (93-95)。肥満患者および肥満モデル動物を用いた検討においては、肥大化した脂肪組織から $TNF-\alpha$ 、 $IL-6$ 、 $iNOS$ 等の炎症性分子の発現が亢進することが明らかにされている (96-103)。よって、腸間膜脂肪を含めた内臓脂肪より産生されるこれらの炎症性サイトカインおよびメディエーターが小腸に作用し、炎症状態を惹起することも考えられる。実際に、肥満患者および食餌誘発性肥満モデル動物の腸において、炎症反応が亢進することが既に明らかになっている (104-107)。Blokzijl らの報告によれば、クローン病や潰瘍性大腸炎等の炎症性腸疾患の患者の消化管では $P-gp$ の発現が低下する (108)。また、streptozotocin 誘導糖尿病モデルマウスにおいて小腸における $iNOS$ の発現が亢進することにより、小腸 $P-gp$ の発現が低下することが明らかとなっ

ている (109)。In vitro レベルでは、ヒト結腸癌由来細胞株である Caco-2 細胞に TNF- α を処置することにより、P-gp の発現が抑制されることも報告されている (110)。これらのことより、肥満状態の小腸でも炎症状態の亢進により、P-gp の発現が引き起こされた可能性も考えられる。本研究においても、Zucker 肥満ラットの小腸各部位における炎症性サイトカインである TNF- α 、IL-1 β 、iNOS の遺伝子発現レベルを検討したところ、各部位において TNF- α および IL-1 β の発現レベルの上昇がみられたことから (Figure 11)、fa/fa 群における P-gp の発現抑制に一部関与している可能性が示唆された。しかし、小腸の Mdr1a および Mdr1b 発現レベルに変動は認められなかった (Figure 8)。炎症状態の小腸ではユビキチンプロテアソーム系が活性化することで P-gp のタンパク発現レベルが低下することも報告されている (111)。よって、タンパク分解による影響も考えられる。一方でヒトにおいては、BMI 値と小腸 P-gp のタンパク発現レベルは相関しないという臨床研究の結果も報告されている (66)。しかしながら、肥満患者における小腸の P-gp 発現レベル変動について明らかにした報告はこれ以外にない。そのため、肥満状態における小腸の P-gp 発現制御機構については今後より詳細な検討を行う必要があるといえる。

第4章 総括

本研究では、肥満状態における免疫抑制剤 cyclosporine A および tacrolimus の薬物動態変動要因を明らかにすることを目的として、小腸および肝臓の機能的変化を中心に両薬剤の薬物動態変動との関連性について検討し、解析を行った。以下に総括を示す。

1. Cyclosporine A C/D 比と BMI 値の間に相関性はみられなかった。
2. 肥満患者で低体重患者や標準体重患者と比べ tacrolimus C/D 比が有意に上昇した ($p < 0.05$)。
3. Tacrolimus C/D 比と BMI 値に有意な正の相関がみられた ($r = 0.2665$; $p = 0.008$)。
4. Tacrolimus 投与後の血中濃度は、正常群と比較して肥満群で高く推移した。また、経口投与後の血中濃度は同様に肥満群で高く推移し、その差はより顕著であった。
5. Zucker ラット肥満群では正常群と比較して、tacrolimus の CL_{tot} は低下した。
6. Zucker ラット肥満群では正常群と比較して、tacrolimus の V_{dss} は低下した。
7. Zucker ラット肥満群では正常群と比較して、tacrolimus の F は上昇した。
8. Zucker ラット肥満群では正常群と比較して、肝臓の Cyp3a2 のタンパク発現レベルは低下したが、P-gp のタンパク発現レベルに差は認められなかった。
9. Zucker ラット肥満群では正常群と比較して、小腸上部、中部、下部の P-gp のタンパク発現レベルは低下したが、Cyp3a2 のタンパク発現レベルに差は認められなかった。
10. Zucker ラット肥満群では正常群と比較して、肝臓の Cyp3a2 の mRNA 発現レベル

は低下したが、P-gp の mRNA 発現レベルに差は認められなかった。

11. Zucker ラット肥満群では正常群と比較して、小腸上部、中部、下部の P-gp および Cyp3a2 の mRNA 発現レベルに差は認められなかった。

本研究の結果、肥満病態時には免疫抑制剤 tacrolimus のバイオアベイラビリティが上昇し、全身クリアランスが低下することが明らかとなった。肥満モデル動物を用いた検討から、その要因の一つとして肝臓および小腸の薬物代謝酵素およびトランスポーターの発現レベル変動が寄与する可能性が示唆された。今日、医療の個別化の重要性に対する認識が高まりつつあるが、医療者が薬物療法における適切な投与量設定を行うことは、疾患に対する治療効果の向上および副作用回避に大変重要であり、患者の QOL に大きく貢献することができると考えられる。また、肥満患者における tacrolimus の分布容積の変動を明らかにすることにより、移植医療時における初期投与量設計に反映できる可能性がある。よって、ヒトの肥満状態における薬物動態変動をさらに明らかにしていくことで、より患者個々に最適な投与設計法が確立されることが期待できる。

第5章 実験の部

1. 実験試薬, 機器および実験動物

1-1. 実験試薬, キット

Gen Elute™ Mammalian Total RNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich Japan Inc., Tokyo)
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA)

Platinum® PCR SuperMix (Invitrogen Life Technologies Japan Ltd., Tokyo)

Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega KK., Tokyo)

Agarose S 錠 (NIPPON GENE Co., Ltd., Tokyo)

Low DNA Mass Ladder (Invitrogen Life Technologies Japan Ltd., Tokyo)

EASY Dilution (Takara Bio Inc., Shiga)

PCR 用各種 Primer (Invitrogen Life Technologies Japan Ltd., Tokyo)

THUNDERBIRD™ SYBR® qPCR Mix (Toyobo Co., Ltd., Osaka)

Methanol (HPLC 用) (Wako Pure Chemical industries, Ltd., Osaka)

Prograf® Injection solution 5.0 mg/mL (Astellas Pharmaceutical Inc., Tokyo)

ノボ・ヘパリン注5千単位/5 mL (Mochida Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo)

Pentobarbital (Nacalai Tesque, Inc., Kyoto, 26427-14)

Diethyl ether (Nacalai Tesque, Inc., Kyoto, 15401-74)

Pierce® BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific K.K., Kanagawa)

RNA later (Life Technologies Japan Ltd, Tokyo)

Pretease inhibitor cocktail (EDTA free) (Nacalai Tesque, Inc., Kyoto)

Sample buffer solution (2ME+) (×4) (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka)

その他, 上記以外の試薬は全て市販試薬特級を使用した。

1-2. 使用機器

MINIMO KM21L8 (Minitor Co., Ltd., Tokyo)

NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Products, Wilmington, DE, USA)
RNeasy mini kit (QIAGEN, Hilden, Germany)
Gene Amp® PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA)
Mx3005P® Real-Time QPCR System (Stratagene, Tokyo)
ダウンス型ホモジナイザー Type A, Type B (7 mL) (Kontes Glass Co., Vineland, N.J.)
高速冷却遠心機 MX301 (Tomy Seiko Co., LTD., Tokyo)
恒温槽 ALB-301 (Agc Techno Glass Co., LTD., Chiba)
電子天秤 AUX220 (Shimadzu Co., Kyoto)
ハイスピード冷却遠心機 7820 (久保田商事株式会社, 群馬)
KS-5200C (久保田商事株式会社, 群馬)
超遠心機 Optima TL Ultracentrifuge (Beckman Co., Tolyo)
マイクロプレートリーダー (Labsystems Multiskan® BICHROMATIC, 大日本住友株式会社, 大阪)
Thermal cycler (PTC-200, MJ-research, Tokyo)
UV-Transilluminator (AB-1500, ATTO, Tokyo)
pH メーター : HM-25R (東亜ディーケーケー株式会社, 東京)

1-3. その他

テルモシリンジ 1 mL, 5 mL ツベルクリン用 (Terumo Co., Tokyo)
テルモ注射針 25 G, 26 G (Terumo Co., Tokyo)
経口ゾンデ (株式会社 夏目製作所, 東京)
ヘマトクリット採血管 (Terumo Co., Tokyo)

1-4. 実験動物

雄性 Zucker ラット 9 週齢 (日本 SLC 株式会社, 浜松) を購入し、実験に使用した。実験開始まで自由飲水・自由摂食下で飼育した。

また、動物実験は本学動物実験規程および宝町キャンパス動物実験倫理指針に基づき、「動物の愛護及び管理に関する法律」、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」を遵守して行った。

2. 実験方法

2-1. 体重および臓器重量の測定

体重は実験開始時（9週齢）より終了時（18週齢）まで、1週間ごとに測定した。雄性 Zucker ラットより速やかに肝臓、腎臓、精巣脂肪および小腸を採取し、組織重量の測定を行った。小腸組織として幽門部から盲腸直前を採取し、3等分した。上から、上部、中部、下部とし直ちに組織重量を測定した。また、肝臓、腎臓、小腸は液体窒素で凍結後、 -80°C で保存した。また、それらの一部は、RNA抽出用サンプルとして RNA later 処置後、液体窒素で凍結し、 -80°C で保存した。

2-2. ラット血清中の生化学的パラメーターの測定

16時間の絶食後、18週齢 Zucker ラットに Pentobarbital Sodium 溶液 (30 mg/kg) を腹腔内投与し、ヘマトクリット毛細管を用いて、眼窩静脈叢から採血を行った。 4°C 、12,000 rpm、10分で血液サンプルを遠心分離し、血清を得た。サンプルは -80°C で保存した。血清中の Total-cholesterol、Triglyceride、ALT、AST、BUN はオリエンタル酵母株式会社にて解析を行った。

2-3. Real-time PCR

2-3-1. 組織からの Total RNA の抽出

肝臓および小腸各部位の total RNA 抽出には、Gen Elute™ Mammalian Total RNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich Japan inc., Tokyo) を用いた。1.5 mL のサンプルチューブに -80°C で凍結させた組織を約 40 mg 量り取り、Lysis Solution/2-ME Mixture 500 μL を添加し、MINIMO KM21L8 (Minitor Co., Ltd., Tokyo) により、組織片が見えなくなるまでホモジナイズした。ホモジナイズした組織を Gen Elute Filtration Column に入れ、12,000 g、 4°C で2分間遠心し、濾過したライセートに、70%エタノール 500 μL を添加し、ピペッティングにより混和した。ライセート/エタノール混合液の半量を Gen Elute Binding Column に入れ、12,000 g、 4°C で15秒間遠心し、濾液を捨てた後、残りの半量に同様の操作を行った。Wash solution 1 500 μL を Gen Elute Binding Column に入れ、12,000 g、 4°C で15秒間遠

心し、Gen Elute Binding Column を新しい 2 mL Collection Tube に移し替え Wash solution 2 (エタノール含有) 500 μ L を入れ、12,000 g、4 $^{\circ}$ C で 15 秒間遠心を行い、さらに Wash solution 2 (エタノール含有) 500 μ L で 12,000 g、4 $^{\circ}$ C で 2-4 分間遠心し、洗浄を行った。Gen Elute Binding Column を新しい 2 mL Collection Tube に移し替え、Elute solution 50 μ L を添加し、12,000 g、4 $^{\circ}$ C で 1 分間遠心し、total RNA を抽出した。抽出した RNA は測定を行うまで -80 $^{\circ}$ C で保存した。

2-3-2. Total RNA 濃度の測定

NanoDrop[®] ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Products, Wilmington, DE, USA) を用いて、total RNA 濃度を測定した。波長 260 nm、係数 40 で以下の式より total RNA 濃度を求めた。

$$\text{total RNA (ng/}\mu\text{L)} = \text{OD}_{260} \times 40$$

2-3-3. cDNA への逆転写反応

逆転写反応には、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を使用した。2-3-1. の total RNA を希釈し、total RNA 量を 0.25 μ g、逆転写反応ボリュームを 20 μ L、逆転写反応後の cDNA 濃度を 12.5 ng/ μ L として逆転写反応を行った。装置は Gene Amp[®] PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA) を使用した (逆転写反応条件: 25 $^{\circ}$ C 10 分、37 $^{\circ}$ C 120 分、85 $^{\circ}$ C 5 秒、4 $^{\circ}$ C ∞)。

2-3-4. 検量線の作成

Platinum[®] PCR SuperMix (Invitrogen Life Technologies Japan Ltd., Tokyo) を用いて、2-3-3. の cDNA の増幅を行った。装置には、Gene Amp[®] PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA) を使用した (PCR 条件: 94 $^{\circ}$ C 2 分の加熱後、denature 94 $^{\circ}$ C 15 秒、anneal 60 $^{\circ}$ C 15 秒、extend 72 $^{\circ}$ C 30 秒のステップを 30 サイクル)。

DNA 断片精製には、Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega KK, Tokyo) を用いた。上記の PCR 産物を、2%アガロースゲル (アガロース S 錠, NIPPON GENE Co., Ltd., Tokyo) にて電気泳動 (TAE バッファー使用) し、目的のバンドを切り取った。その後、Membrane Binding Solution をゲルスライス 10 mg に対して 10 μ L 添加してボルテックスし、65 $^{\circ}$ C で 15 分間インキュベートしゲルを完全に溶解させた。Collection Tube に SV Minicolumn を挿入し、調製したゲル

溶解液を添加して室温で1分間インキュベートし、SV Minicolumn assembly を16,000 g で1分間遠心し、Collection Tube 内の液体を除去した。Membrane Wash Solution (95%エタノール添加済み) 700 μL を添加し、SV Minicolumn assembly を16,000 g で1分間遠心、Collection Tube 内の液体を除去した。Membrane Wash Solution (95%エタノール添加済み) 500 μL を再度添加し、16,000 g、5分間遠心した。SV Minicolumn を新しい1.5 mL 遠心チューブに移し、Nuclease-Free Water 50 μL を添加し、1分間室温でインキュベート、さらに16,000 g で1分間遠心した。遠心チューブ内に溶出されたDNA断片を -30°C で保存した。

上記で精製したDNA溶液の濃度($\text{ng}/\mu\text{L}$)は、Low DNA Mass Ladder (Invitrogen Life Technologies Japan Ltd., Tokyo) を使用し、2.5%アガロースゲル(アガロースS錠, NIPPON GENE Co., Ltd., Tokyo)にて電気泳動し測定した。DNA溶液の濃度($\text{ng}/\mu\text{L}$)からコピー数を算出し、EASY Dilution (Takara Bio Inc., Shiga)を加えて 1×10^7 , 1×10^6 , 1×10^5 , 1×10^4 , 1×10^3 , 1×10^2 , 1×10^1 (copy/ μL)の希釈系列を作り、Real-time PCRの検量線とした。使用時まで -30°C で保存した。

2-3-5. Real-time PCR

使用した forward primer および reverse primer の配列を次ページに示した。Primer は全て Invitrogen Life Technologies Japan Ltd., Tokyo より購入した。

Real-time PCR には、THUNDERBIRD™ SYBR® qPCR Mix (Toyobo Co., Ltd., Osaka) を用いた。DEPC treated water 2.6 μL に THUNDERBIRD™ SYBR® qPCR Mix 10 μL 、および各遺伝子に対する10 μM forward primer 1 μL および10 μM reverse primer 1 μL 、5 \times ROX 0.4 μL を加えた混合液15 μL を96 well plate に添加し、さらに各 well に2-3-3.で合成したcDNAサンプルにDEPC treated water 230 μL を加え1 $\text{ng}/\mu\text{L}$ の濃度としたcDNAサンプルを5 μL ずつ加えた。cDNAの増幅・検出はMx3005P® Real-Time QPCR System (Stratagene, Tokyo)にて行った(PCR条件: 95°C 10分の加熱後, denature 95°C 30秒, anneal/extend 60°C 1分のステップを40サイクル)。なお、内部標準遺伝子のbeta-actinのmRNA発現レベルにより補正を行った。

Table 6. Specific primers used for real-time PCR.

Gene	Gene number	Sequence (5'→3')	Products (bp)	GC (%)	T _m (°C)
Beta-actin (Actb)	NM_031144	Forward: TGAGCGCAAGTACTCTGTGTGGAT	129	50	59.9
		Reverse: TAGAAGCATTGCGGTGCACGATG		50	59.9
Cyp3a2	NM_153312.2	Forward: GAGTTGGCAAGGTCTGTGATGG	182	55	60
		Reverse: CAAATAGAATTACCACAATAGTTCACCTTTACATC		56	59
Mdr1a (Abcb1a)	NM_133401.1	Forward: TGAAGTGTGACCATGCGAGATGTAAATA	156	38	60
		Reverse: GTCTCTGAAGACTCTAAAATGGACTAATG		37	60
Mdr1b (Abcb1b)	NM_012623.2	Forward: CCAGGAGAGAAGACTTAGTTCG	157	50	59
		Reverse: GGCAAACACTGGTTGTATGCAC		50	59

Table 6. Specific primers used for real-time PCR. (Continued)

Gene	Gene number	Sequence (5'→3')	Products (bp)	GC (%)	T _m (°C)
TNF α	NM_012675.3	Forward: GGCCACCACGCTCTTCTGTCTA	112	59	53
		Reverse: TGGGCTACGGGCTTGTCCTC		62	53
IL-1 β	NM_031512.2	Forward: AAAAGCGGTTTGTCTTCAAC	153	40	43
		Reverse: GGAATAGTGCAGCCATCTTT		45	45
iNos	NM_012611.3	Forward: CCAGAGCAGTACAAGCTCAC	224	55	49
		Reverse: CCACAACCTCGCTCCAAGATC		55	49

2-4. Western blotting

2-4-1. 肝マイクロソームの調製

Homogenize buffer (0.1 M Tris Cl / 0.1 M KCl / 1 mM EDTA, pH 7.4 by HCl) 3 mL 中に-80°Cで凍結させた肝組織を約 1 g 量り取り、Dounce 型ホモジナイザーを用いてホモジナイズした。ライセートを 9,000 g, 4°Cで 15 分間遠心し、上清 S9 分画を分取した。超遠心機を用いて S9 分画を 105,000 g, 4°Cで 90 分間遠心し、沈殿を Homogenize buffer 中で再度ホモジナイズし、105,000 g, 4°Cで 60 分間遠心した。得られた沈殿を TGE buffer (10 mM Tris Cl / 20% Glycerol / 1 mM EDTA, pH 7.4 by HCl) 1.25 mL 中で再びホモジナイズしたライセートを肝マイクロソーム溶液とした。肝マイクロソーム溶液は使用時まで-80°Cで保存した。

2-4-2. 小腸膜マイクロソームの調製

McCullagh らの方法を参考にして調製を行った (112)。小腸内を生理食塩水で洗浄後、筋層を剥がないように、上皮細胞だけを氷冷したガラス板の上でスライドガラスを使ってかきとったものを使用した。上皮細胞 (約 60 mg) を 2 ml の Buffer A に入れ、ウルトラターラックスの目盛を Max に合わせ、15 秒、2 回 homogenize した。ウルトラターラックスから 2 ml の Buffer A を使い homogenate を 15 ml ファルコンチューブに移した。Buffer B 3 ml を加え、軽く混ぜ、15 分間氷上で冷やした。超遠心機を用いて、230,000 g, 4°C、75 分遠心後、上清をデカントで捨て、ペレットを Buffer C 1~2 ml で洗浄した。同様にして homogenize したら、再び 230,000 g, 4°C、75 分の遠心を行った。ペレットは 600 µl の Buffer C で再び溶かし、チップ型ソニケーターで homogenize した。200 µl の 16% SDS を加え、サンプルを氷から離し、タッチミキサーにかけた後、室温で 1,100g、20 分又は 8,000g、3 分で遠心した。上清はタンパク定量用と Western blotting 用に小分けして-80°Cで保存した (113)。

2-4-3. タンパク定量およびサンプル調製

Total protein 抽出液中のタンパク濃度の測定には、Pierce® BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific K.K., Kanagawa) を用いた。テストプレートのウェルに total protein 抽出液 1 µL および精製水 4 µL を加え、Reagent A 200 µL および Reagent B 4 µL を添加した。テストプレートを 37°Cで 30 分間インキュベートし、室温まで冷ました後、Multiskan® BICHROMATIC plate reader を用いて、波長 580

nm の吸光度を測定した。Albmin Standard (3.0 mg/mL) を精製水で希釈し、0, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5 (mg/mL) の希釈液を標準液として使用した。標準液は各濃度 5 μ L ずつアプライし、得られたサンプル濃度を 5 倍することで total protein 抽出液中のタンパク濃度とした。Total protein 抽出液に 16% SDS および Sample buffer solution (2ME+) ($\times 4$) (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka) を加え、2 μ g/ μ L となるように TGE buffer を添加して濃度調整し、95°C で 3 分間インキュベートした。調製サンプルは、使用時まで -80°C で保存した。

2-4-4. 7.5% ポリアクリルアミドゲルの作成

SDS-PAGE 用のガラス板、コームの水気を完全に切るため Methanol で拭いた。分離ゲル用 buffer (0.75 M Tris Cl pH 8.8/0.2% SDS) を調製後、10% APS 60 μ L、TEMED 5 μ L 加え、気泡が起らないように混和して、セットしてあったガラス板に静かに流し込み最後にシリンジで水飽和 butanol を重層した。ゲルが固まった後 (水飽和 butanol とゲル溶液の境目がはっきり見える)、水飽和 butanol を取り除くため蒸留水で洗浄した。水気を拭き取った後、濃縮ゲル溶液 (3% acrylamide/0.125 M Tris Cl pH 6.8/0.1% SDS) に 10% APS 60 μ L、TEMED 5 μ L 加えて、先に作った分離ゲルの上に静かに流し込んだ。コームを差し込み、完全に固まるまで室温で放置した後に使用した。

2-4-5. Western blotting

7.5% ポリアクリルアミドゲルで電気泳動 (40 mA, 90 min) した。泳動後 immobilonTM transfer membranes (MILLIPORE, USA) に転写 (60 V, 180 min) し、Blocking buffer (5% Skim milk in PBS-T) を用いてブロッキングし、1 次抗体および 2 次抗体と反応させ、Lumi GLO Reagent and Peroxide (Cell Signaling, USA) を用いて発色し、LAS-4000 mini を用いて検出した。なお抗体は以下のものを使用した。beta-Actin (13E5) Rabbit mAb、Anti-rabbit IgG HRP-linked Antibody (Cell Signaling, USA) ; CYP3A2 rabbit pAb (Enzo Life Science, USA)

2-5. Tacrolimus の薬物動態

2-5-1. Tacrolimus 急速静脈内投与

プログラフ注射液 5 mg/mL (Astellas Pharmaceutical Inc, Tokyo) を生理食塩水

で希釈し、1 mg/mL の注射用溶液を調製した。Pentobarbital Sodium 溶液 (30 mg/mL) を 1 mL/kg 腹腔内投与して麻酔をし、左側頸静脈から 10 秒間で急速静注した。26G 付き 1 mL 用シリンジを用いて、右側頸静脈から経時的に採血し、あらかじめヘパリンを処理したチューブにとった。採血は、投与後 5, 10, 20, 30, 60, 120, 180, 360, 720, 1440 分の計 10 点で行った。得られた血液サンプルは、測定まで -80°C で保存した。

2-5-2. Tacrolimus 経口投与

プログラフ注射液 5 mg/mL (Astellas Pharmaceutical Inc, Tokyo) を生理食塩水で希釈し、3.2 mg/mL の注射用溶液を調製した。Pentobarbital Sodium 溶液 (30 mg/mL) を 1 mL/kg 腹腔内投与して麻酔をし、経口ゾンデを用いて 30 秒間で経口投与した。26G 付き 1 mL 用シリンジを用いて、右側頸静脈から経時的に採血し、あらかじめヘパリンを処理したチューブにとった。採血は、投与後 5, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240, 360, 720, 1440 分の計 12 点で行った。得られた血液サンプルは、測定まで -80°C で保存した。

2-5-3. Tacrolimus の定量

Dimension® clinical chemistry system (Siemens Japan K.K., Tokyo) のタクロリムスキットにより、tacrolimus の定量を行った。定量には、Dimension Xpand plus-HM (Siemens Japan K.K., Tokyo) を用いた。定量範囲は 1.2 ng/mL から 30 ng/mL であり、必要に応じて希釈して測定を行った。Tacrolimus の代謝物の 1 つである M-1 との交差性は 15% であり、その他の代謝物との交差性は 5% 以下である。

2-5-4. 薬物動態パラメーターの算出

$AUC_{0 \rightarrow \infty}$, MRT および $t_{1/2}$ のパラメーターについては、Napp version software (114) を用いて、モーメント解析により算出した。Tacrolimus の血中濃度推移を片対数プロットし、末端消失相の最低 3 プロットを回帰分析することにより k_e を求めた。静注および経口投与後の $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ は台形近似法によって求め、測定点のない投与後 1440 分以降は C_{1440}/k_e を外挿した。 CL_{tot} , CL_{tot}/F , $V_{d_{ss}}$, $V_{d_{ss}}/F$, F については以下の式で算出した。

$$CL_{tot} = \frac{\text{Dose, i. v.}}{AUC_{0 \rightarrow \infty}}$$

$$CL_{tot}/F = \frac{\text{Dose, p. o.}}{AUC_{0-\infty}}$$

$$Vd_{ss} = MRT_{i.v.} \times CL_{tot}$$

$$F = \frac{AUC_{0-\infty}/D}{[AUC_{iv}/D_{iv}]}$$

($[AUC_{iv}/D_{iv}]$: 静脈内投与の項で算出した fentanyl の $AUC_{0-\infty}$ を, 静脈内投与量で除した値の各群の平均値)

2-6. ヒトを対象とした retrospective 調査研究

2-6-1. 対象症例

BMI の変動にともなう cyclosporine A および tacrolimus の薬物動態変動を retrospective に検討するにあたり、対象を以下のように設定した。

対象：血液検査で cyclosporine A および tacrolimus の血中濃度が測定されていた症例

期間：2006 年 4 月から 2011 年 3 月までの 5 年間

除外基準：ステロイドパルス療法施行中の症例、15 歳未満の症例、重篤な肝機能障害を呈している症例 (AST 値または ALT 値が 100 以上)、以下の併用薬を投与されている症例

Cyclosporine A: Itraconazole, Fluconazole, Voriconazole, Clarithromycin, Erythromycin, Allopurinol, Phenobarbital

Tacrolimus: Itraconazole, Fluconazole, Voriconazole, Clarithromycin, Erythromycin, Carbamazepine, Nifedipine

2-6-2. 調査方法

Retrospective 調査研究を実施するにあたり、事前に金沢大学医学倫理委員会における審査を受け、承認を得た (承認番号: 1135)。

金沢大学附属病院電子カルテシステム (MegaOak HR, NEC, Tokyo) を用いて患者情報を抽出した。抽出した項目は、年齢、性別、体重、身長、肝機能値 (AST 値、ALT 値)、cyclosporine A および tacrolimus の血中濃度測定値、cyclosporine A および tacrolimus 投与量とした。

BMI 値は、(体重 (kg) / (身長 (m))²) より算出した。また、cyclosporine

A および tacrolimus の C/D 比は (血中 trough 濃度 (ng/mL) / 投与量 (mg/kg body weight/day)) または (血中 trough 濃度 (ng/mL) / 投与量 (mg/day)) より算出した。

2-7. 統計処理

データの統計処理として Excel および GraphPad Prism 5J (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) を用い、2 群間の場合は Unpaired Student's t-test、3 群以上の間の場合は One-way analysis of variance (ANOVA) および Dunnett の方法による事後検定を行い、危険率が 5 %未満である場合を有意であるとした。

参考論文

本研究の内容は、以下の学術雑誌に公表した。

Kazuki Sawamoto, Tran T. Huong, Natsumi Sugimoto, Yuka Mizutani, Yoshimichi Sai,
Ken-ichi Miyamoto.

Mechanisms of lower maintenance dose of tacrolimus in obese patients.

Drug Metabolism and Pharmacokinetics, (2014) in press.

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始多大なるご指導、御鞭撻を賜りました金沢大学大学院自然科学研究科分子作用学講座・附属病院薬剤部 宮本 謙一 教授、崔 吉道 准教授に深甚なる謝意を表しますとともに、厚く御礼申し上げます。

また、本研究の遂行にあたり、多くの御助言と御鞭撻を賜りました金沢大学大学院自然科学研究科分子作用学講座 石崎 純子 准教授に謹んで感謝の意を表しますとともに、厚く御礼申し上げます。

さらに、本研究を遂行する上で共同実験者として多大なる御助言、御協力頂きました Tran T. Huong 修士、杉本 奈津美 学士、水谷 友香さんに厚く感謝致します。

また、犠牲となった実験動物に感謝するとともに冥福を祈ります。

公私にわたり温かい御指導、御助言、御協力頂きました金沢大学附属病院薬剤部研究室の皆様ならびに同薬剤部職員の皆様に深く感謝致します。

最後になりましたが、本研究を遂行する上でよき理解者となり、多大なる御支援を頂きました両親および家族に深く感謝いたします。

引用文献

- 1) World Health Organization: Obesity and Overweight. URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/> [Accessed 2013.9.4] (2013)
- 2) Ministry of Health, Labour and Welfare: National Health and Nutrition Survey (2011)
- 3) Wang YC, McPherson K, Marsh T, Gortmaker SL, and Brown M (2011) Health and economic burden of the projected obesity trends in the USA and the UK. *Lancet* **378**:815-825.
- 4) Bauer LA, Edwards WA, Dellinger EP, and Simonowitz DA (1983) Influence of weight on aminoglycoside pharmacokinetics in normal weight and morbidly obese patients. *Eur J Clin Pharmacol* **24**:643-647.
- 5) Blouin RA, Brouwer KL, Record KE, Griffen WO Jr, Plezia PM, and John W (1985) Amikacin pharmacokinetics in morbidly obese patients undergoing gastric-bypass surgery. *Clin Pharm* **4**:70-72.
- 6) Schwartz SN, Pazin GJ, Lyon JA, Ho M, and Pasculle AW (1978) A controlled investigation of the pharmacokinetics of gentamicin and tobramycin in obese subjects. *J Infect Dis* **138**:499-505.
- 7) Abernethy DR, Greenblatt DJ, Divoll M, Harmatz JS, and Shader RI (1981) Alterations in drug distribution and clearance due to obesity. *J Pharmacol Exp Ther* **217**:681-685.
- 8) Abernethy DR, Greenblatt DJ, Divoll M, and Shader RI (1982) Prolongation of drug half-life due to obesity: studies of desmethyldiazepam (clorazepate). *J Pharm Sci* **71**:942-944.
- 9) Abernethy DR, Greenblatt DJ, Divoll M, and Shader RI (1983) Prolonged accumulation of diazepam in obesity. *J Clin Pharmacol* **23**:369-376.
- 10) Abernethy DR, Greenblatt DJ, and Smith TW (1981) Digoxin disposition in obesity: clinical pharmacokinetic investigation. *Am Heart J* **102**:740-744.
- 11) Cheng PY, and Morgan ET (2001) Hepatic cytochrome P450 regulation in disease states. *Curr Drug Metab* **2**:165-183.
- 12) Yoshinari K, Takagi S, Yoshimasa T, Sugatani J, and Miwa M (2006) Hepatic CYP3A expression is attenuated in obese mice fed a high-fat diet. *Pharm Res* **23**:1188-1200.
- 13) Lam JL, Jiang Y, Zhang T, Zhang EY, and Smith, BJ (2010) Expression and functional analysis of hepatic cytochromes P450, nuclear receptors, and

- membrane transporters in 10- and 25-week-old db/db mice. *Drug Metab Dispos* **38**:2252-2258.
- 14) More VR, and Slitt AL (2011) Alteration of hepatic but not renal transporter expression in diet-induced obese mice. *Drug Metab Dispos* **39**:992-999.
 - 15) Kotlyar M, and Carson SW (1999) Effects of obesity on the cytochrome P450 enzyme system. *Int J Clin Pharmacol Ther* **37**:8-19.
 - 16) O'Shea D, Davis SN, Kim RB, and Wilkinson GR (1994) Effect of fasting and obesity in humans on the 6-hydroxylation of chlorzoxazone: a putative probe of CYP2E1 activity. *Clin Pharmacol Ther* **56**:359-367.
 - 17) Emery MG, Fisher JM, Chien JY, Kharasch ED, Dellinger EP, Kowdley KV, and Thummel KE (2003) CYP2E1 activity before and after weight loss in morbidly obese subjects with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* **38**:428-435.
 - 18) Sanderink GJ, Le Liboux A, Jariwala N, Harding N, Ozoux ML, Shukla U, Montay G, Boutouyrie B, and Miro A (2002) The pharmacokinetics and pharmacodynamics of enoxaparin in obese volunteers. *Clin Pharmacol Ther* **72**:308-318.
 - 19) Clauson PG, and Linde B (1995) Absorption of rapid-acting insulin in obese and nonobese NIDDM patients. *Diabetes Care* **18**:986-991.
 - 20) Greenblatt DJ, Abernethy DR, Locniskar A, Harmatz JS, Limjuco RA, and Shader RI (1984) Effect of age, gender, and obesity on midazolam kinetics. *Anesthesiology* **61**:27-35.
 - 21) Bowman SL, Hudson SA, Simpson G, Munro JF, and Clements JA (1986) A comparison of the pharmacokinetics of propranolol in obese and normal volunteers. *Br J Clin Pharmacol* **21**:529-532.
 - 22) Jain R, Chung SM, Jain L, Khurana M, Lau SW, and Lee JE, Vaidyanathan J, Zadezensky I, Choe S, and Sahajwalla CG (2011) Implications of obesity for drug therapy: limitations and challenges. *Clin Pharmacol Ther* **90**:77-89.
 - 23) Blouin RA, and Warren GW (1999) Pharmacokinetic considerations in obesity. *J Pharm Sci* **88**:1-7.
 - 24) Anastasio P, Spitali L, Frangiosa A, Molino D, Stellato D, Cirillo E, Pollastro RM, Capodicasa L, Sepe J, and Federico P, et al. (2000) Glomerular filtration rate in severely overweight normotensive humans. *Am J Kidney Dis* **35**:1144-1148.
 - 25) Henegar JR, Bigler SA, Henegar LK, Tyagi SC, and Hall JE (2001) Functional and structural changes in the kidney in the early stages of obesity. *J Am Soc Nephrol* **12**:1211-1217.

- 26) Nowack R, Raum E, Blum W, and Ritz E (1992) Renal hemodynamics in recent-onset type II diabetes. *Am J Kidney Dis* **20**:342-347.
- 27) Opar A (2011) Mysteries about drug metabolism in the obese weigh on doctors. *Nat Med* **17**:1158.
- 28) Borel JF, Feurer C, Gubler HU, and Stähelin H (1976) Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent. *Agents Actions* **6**:468-475.
- 29) Borel JF, Feurer C, Magnée C, and Stähelin H (1977) Effects of the new anti-lymphocytic peptide cyclosporin A in animals. *Immunology* **32**:1017-1025.
- 30) Tanaka H, Kuroda A, Marusawa H, Hashimoto M, Hatanaka H, Kino T, Goto T, and Okuhara M (1987) Physicochemical properties of FK-506, a novel immunosuppressant isolated from *Streptomyces tsukubaensis*. *Transplant Proc* **19(5 Suppl 6)**:11-16.
- 31) Mattila PS, Ullman KS, Fiering S, Emmel EA, McCutcheon M, Crabtree GR, and Herzenberg LA (1990) The actions of cyclosporin A and FK506 suggest a novel step in the activation of T lymphocytes. *EMBO J* **9**:4425-4433.
- 32) Lin CS, Boltz RC, Siekierka JJ, and Sigal NH (1991) FK-506 and cyclosporin A inhibit highly similar signal transduction pathways in human T lymphocytes. *Cell Immunol* **133**:269-284.
- 33) Bierer BE, Mattila PS, Standaert RF, Herzenberg LA, Burakoff SJ, Crabtree G, and Schreiber SL (1990) Two distinct signal transmission pathways in T lymphocytes are inhibited by complexes formed between an immunophilin and either FK506 or rapamycin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**:9231-9235.
- 34) Tocci MJ, Matkovich DA, Collier KA, Kwok P, Dumont F, Lin S, Degudicibus S, Siekierka JJ, Chin J, and Hutchinson NI (1989) The immunosuppressant FK506 selectively inhibits expression of early T cell activation genes. *J Immunol* **143**:718-726.
- 35) Harding MW, Galat A, Uehling DE, and Schreiber SL (1989) A receptor for the immunosuppressant FK506 is a cis-trans peptidyl-prolyl isomerase. *Nature* **341**:758-760.
- 36) Siekierka JJ, Hung SH, Poe M, Lin CS, and Sigal NH (1989) A cytosolic binding protein for the immunosuppressant FK506 has peptidyl-prolyl isomerase activity but is distinct from cyclophilin. *Nature* **341**:755-757.
- 37) Emmel EA, Verweij CL, Durand DB, Higgins KM, Lacy E, and Crabtree GR (1989) Cyclosporin A specifically inhibits function of nuclear proteins involved in T cell activation. *Science* **246**:1617-1620.
- 38) Flanagan WM, Corthésy B, Bram RJ, and Crabtree GR (1991) Nuclear

- association of a T-cell transcription factor blocked by FK-506 and cyclosporin A. *Nature* **352**:803-807.
- 39) Handschumacher RE, Harding MW, Rice J, Drugge RJ, and Speicher DW (1984) Cyclophilin: a specific cytosolic binding protein for cyclosporin A. *Science* **226**:544-547.
 - 40) Tropschug M, Barthelmess IB, and Neupert W (1989) Sensitivity to cyclosporin A is mediated by cyclophilin in *Neurospora crassa* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **342**:953-955.
 - 41) Takahashi N, Hayano T, and Suzuki M (1989) Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase is the cyclosporin A-binding protein cyclophilin. *Nature* **337**:473-475.
 - 42) Fischer G, Wittmann-Liebold B, Lang K, Kiefhaber T, and Schmid FX (1989) Cyclophilin and peptidyl-prolyl cis-trans isomerase are probably identical proteins. *Nature* **337**:476-478.
 - 43) Maurer G (1985) Metabolism of cyclosporine. *Transplant Proc* **17(4 Suppl 1)**:19-26.
 - 44) Niederberger W, LeMaire M, Maure G, Nussburmer K, and Wagner O (1983) Distribution and binding of cyclosporine in blood and tissues. *Transplant Proc* **15**:2419-2421.
 - 45) Ptachcinski RJ, Venkataramanan R, Rosenthal JT, Burckart GJ, Taylor RJ, and Hakala TR (1985) Cyclosporine kinetics in renal transplantation. *Clin Pharmacol Ther* **38**:296-300
 - 46) Sattler M, Guengerich FP, Yun CH, Christians U, and Sewing KF (1992) Cytochrome P-450 3A enzymes are responsible for biotransformation of FK506 and rapamycin in man and rat. *Drug Metab Dispos* **20**:753-761.
 - 47) Venkataramanan R, Jain A, Warty VS, Abu-Elmagd K, Alessiani M, Lever J, Krajak A, Flowers J, Mehta S, and Zuckerman S, et al. (1991) Pharmacokinetics of FK 506 in transplant patients. *Transplant Proc* **23**:2736-2740.
 - 48) Nagase K, Iwasaki K, Nozaki K, and Noda K (1994) Distribution and protein binding of FK506, a potent immunosuppressive macrolide lactone, in human blood and its uptake by erythrocytes. *J Pharm Pharmacol* **46**:113-117.
 - 49) Jusko WJ, Piekoszewski W, Klintmalm GB, Shaefer MS, Hebert MF, Piergies AA, Lee CC, Schechter P, and Mekki QA (1995) Pharmacokinetics of tacrolimus in liver transplant patients. *Clin Pharmacol Ther* **57**:281-290.
 - 50) Gruber SA, Hewitt JM, Sorenson AL, Barber DL, Bowers L, Rynders G, Arrazola L, Matas AJ, Rosenberg ME, and Canafax DM (1994) Pharmacokinetics of FK506 after intravenous and oral administration in patients

- awaiting renal transplantation. *J Clin Pharmacol* **34**:859-864.
- 51) Tamai I, and Safa AR (1990) Competitive interaction of cyclosporins with the Vinca alkaloid-binding site of P-glycoprotein in multidrug-resistant cells. *J Biol Chem* **265**:16509-16513.
 - 52) Goldberg H, Ling V, Wong PY, and Skorecki K (1988) Reduced cyclosporin accumulation in multidrug-resistant cells. *Biochem Biophys Res Commun* **152**:552-558.
 - 53) Saeki T, Ueda K, Tanigawara Y, Hori R, and Komano T (1993) Human P-glycoprotein transports cyclosporin A and FK506. *J Biol Chem* **268**:6077-6080.
 - 54) Venkataramanan R, Swaminathan A, Prasad T, Jain A, Zuckerman S, Warty V, McMichael J, Lever J, Burckart G, and Starzl T (1995) Clinical pharmacokinetics of tacrolimus. *Clin Pharmacokinet* **29**:404-430.
 - 55) Ptachcinski RJ, Venkataramanan R, and Burckart GJ (1986) Clinical pharmacokinetics of cyclosporin. *Clin Pharmacokinet* **11**:107-132.
 - 56) Japanese FK 506 Study Group (1991) Japanese study of FK 506 on kidney transplantation: the benefit of monitoring the whole blood FK 506 concentration. *Transplant Proc* **23**:3085-3088.
 - 57) Kahan BD (1985) Individualization of cyclosporine therapy using pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters. *Transplantation* **40**:457-476.
 - 58) Hortal L, Fernández A, Losada A, Lorenzo M, Baamonde E, Plaza C, Gallego R, Vega N, and Palop L (2001) Study of the cyclosporine concentration at 2 hours in stable renal transplant patients and relation to body mass index. *Transplant Proc* **33**:3110-3111.
 - 59) Rodrigo E, de Cos MA, Sánchez B, Ruiz JC, Piñera C, Fernández-Fresnedo G, Palomar R, Pérez-Ceballos MA, Cotorruelo JG, and Zubimendi JA, et al. (2005) High initial blood levels of tacrolimus in overweight renal transplant recipients. *Transplant Proc* **37**:1453-1454.
 - 60) Keys A, Fidanza F, Karvonen MJ, Kimura N, and Taylor HL (1972) *Indices of relative weight and obesity J Chronic Dis* **25**:329-343.
 - 61) World Health Organization: BMI classification. URL: http://apps.who.int/bmi/index.jsp?introPage=intro_3.html [Accessed 2013.10.28] (2013)
 - 62) Abernethy DR, Greenblatt DJ, Divoll M, Smith RB, and Shader RI (1984) The influence of obesity on the pharmacokinetics of oral alprazolam and triazolam. *Clin Pharmacokinet* **9**:177-183.

- 63) Dunn TE, Ludwig EA, Slaughter RL, Camara DS, and Jusko WJ (1991) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of methylprednisolone in obesity. *Clin Pharmacol Ther* **49**:536-549.
- 64) Hunt CM, Westerkam WR, Stave GM, and Wilson JA (1992) Hepatic cytochrome P-4503A (CYP3A) activity in the elderly. *Mech Ageing Dev* **64**:189-199.
- 65) Caraco Y, Zylber-Katz E, Berry EM, and Levy M (1992) Significant weight reduction in obese subjects enhances carbamazepine elimination. *Clin Pharmacol Ther* **51**:501-506.
- 66) Ulvestad M, Skottheim IB, Jakobsen GS, Bremer S, Molden E, Asberg A, Hjelmesæth J, Andersson TB, Sandbu R, and Christensen H (2013) Impact of OATP1B1, MDR1, and CYP3A4 expression in liver and intestine on interpatient pharmacokinetic variability of atorvastatin in obese subjects. *Clin Pharmacol Ther* **93**:275-282.
- 67) Lee JY, Hahn HJ, Son IJ, Suh KS, Yi NJ, Oh JM, and Shin WG (2006) Factors affecting the apparent clearance of tacrolimus in Korean adult liver transplant recipients. *Pharmacotherapy* **26**:1069-1077.
- 68) Li L, Li CJ, Zheng L, Zhang YJ, Jiang HX, Si-Tu B, and Li ZH (2011) Tacrolimus dosing in Chinese renal transplant recipients: a population-based pharmacogenetics study. *Eur J Clin Pharmacol* **67**:787-795.
- 69) Li D, Lu W, Zhu JY, Gao J, Lou YQ, and Zhang GL (2007) Population pharmacokinetics of tacrolimus and CYP3A5, MDR1 and IL-10 polymorphisms in adult liver transplant patients. *J Clin Pharm Ther* **32**:505-515.
- 70) Press RR, Ploeger BA, den Hartigh J, van der Straaten T, van Pelt J, Danhof M, de Fijter JW, and Guchelaar HJ (2009) Explaining variability in tacrolimus pharmacokinetics to optimize early exposure in adult kidney transplant recipients. *Ther Drug Monit* **31**:187-197.
- 71) Shi XJ, Geng F, Jiao Z, Cui XY, Qiu XY, and Zhong MK (2011) Association of ABCB1, CYP3A4*18B and CYP3A5*3 genotypes with the pharmacokinetics of tacrolimus in healthy Chinese subjects: a population pharmacokinetic analysis. *J Clin Pharm Ther* **36**:614-624.
- 72) Shiraga T, Matsuda H, Nagase K, Iwasaki K, Noda K, Yamazaki H, Shimada T, and Funae Y (1994) Metabolism of FK506, a potent immunosuppressive agent, by cytochrome P450 3A enzymes in rat, dog and human liver microsomes. *Biochem Pharmacol* **47**:727-735.
- 73) Hebert MF (1997) Contributions of hepatic and intestinal metabolism and

- P-glycoprotein to cyclosporine and tacrolimus oral drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* **27**:201-214.
- 74) Yoshinari K (2006) Roles of nuclear receptors in the gene expression of drug-metabolizing enzymes under various physiological conditions. *Yakugaku zasshi* **126**:343-348
 - 75) Romi G, Omoluabi O, Gandhi A, Shah P, Strohacker K, Carpenter KC, McFarlin B, and Guo T (2011) Role of high-fat diet in regulation of gene expression of drug metabolizing enzymes and transporters. *Life Sciences* **89**:57-64.
 - 76) Osabe M, Sugatani J, Fukuyama T, Ikushiro S, Ikari A, and Miwa M (2008) Expression of hepatic UDP-glucuronosyltransferase 1A1 and 1A6 correlated with increased expression of the nuclear constitutive androstane receptor and peroxisome proliferator-activated receptor α in male rats fed a high-fat and high-sucrose diet. *Drug metab Dispos* **36**:294-302.
 - 77) Isabelle L, Horsmans Y, Desager JP, Delzenne N, and Geubel AP (1998) Reduction in hepatic cytochrome P-450 is correlated to the degree of liver fat content in animal models of steatosis in the absence of inflammation. *J Hepatol* **28**:410-416.
 - 78) Khemawoot P, Yokogawa K, Shimada T, and Miyamoto K (2007) Obesity-induced increase of CYP2E1 activity and its effect on disposition kinetics of chlorzoxazone in Zucker rats. *Biochem Pharmacol* **73**:155-162
 - 79) Ghose R, Omoluabi O, Gandhi A, Shah P, Strohacker K, Carpenter KC, McFarlin B, and Guo T (2011) Role of high-fat diet in regulation of gene expression of drug metabolizing enzymes and transporters. *Life Sci* **89**:57-64.
 - 80) Sugatani J, Sadamitsu S, Kurosawa M, Ikushiro S, Sakaki T, Ikari A, and Miwa M (2010) Nutritional status affects fluvastatin-induced hepatotoxicity and myopathy in rats. *Drug Metab Dispos* **38**:1655-1664.
 - 81) Sugioka N, Haraya K, Fukushima K, Ito Y, and Takada K (2009) Effects of obesity induced by high-fat diet on the pharmacokinetics of nelfinavir, a HIV protease inhibitor, in laboratory rats. *Biopharm Drug Dispos* **30**:532-541.
 - 82) Fukushima K, Yoshida K, Ito Y, Takada, K. and Sugioka N (2011) Effects of obesity induced by high-fat diet on the pharmacokinetics of cyclosporine A in rats. *Biomed Prev Nutr* **1**:195-201.
 - 83) Flechner SM, Kolbeinsson ME, Tam J, and Lum B (1989) The impact of body weight on cyclosporine pharmacokinetics in renal transplant recipients. *Transplantation* **47**:806-810.
 - 84) Chua SC Jr, White DW, Wu-Peng XS, Liu SM, Okada, N, Kershaw EE, Chung

- WK, Power-Kehoe L, Chua M, and Tartaglia LA *et al.* (1996) Phenotype of fatty due to Gln269Pro mutation in the leptin receptor (Lepr). *Diabetes* **45**:1141-1143.
- 85) Phillips MS, Liu Q, Hammond HA, Dugan V, Hey PJ, Caskey CJ, and Hess JF (1996) Leptin receptor missense mutation in the fatty Zucker rat. *Nat Genet* **13**:18-19.
- 86) Iwasaki K, Shiraga T, Matsuda H, Teramura Y, Kawamura A, Hata T, Ninomiya S, and Esumi Y (1998) Absorption, distribution, metabolism and excretion of tacrolimus (FK506) in the rat. *薬物動態* **13**:259-265.
- 87) Zahir H, McCaughan G, Gleeson M, Nand RA and McLachlan AJ (2004) Factors affecting variability in distribution of tacrolimus in liver transplant recipients. *Br J Clin Pharmacol* **57**:298-309.
- 88) Nagase K, Iwasaki K, Nozaki K, and Noda K (1994) Distribution and protein binding of FK506, a potent immunosuppressive macrolide lactone, in human blood and its uptake by erythrocytes. *J Pharm Pharmacol* **46**:113-117.
- 89) Rao GM, and Morghom LO (1984) Erythrocyte count and hemoglobin levels in diabetic women. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* **52**:272-275.
- 90) Rao GM, and Morghom LO (1986) Effect of obesity on erythrocyte count and hemoglobin levels in Libyan diabetic patients. *Clin Physiol Biochem* **4**:277-280.
- 91) Simmons D (2010) Increased red cell count in diabetes and pre-diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* **90**:e50-53.
- 92) Zaluzny L, Farrell GC, and Murray M (1990) Effect of genetic obesity and experimental diabetes on hepatic microsomal mixed function oxidase activities. *J Gastroenterol Hepatol* **5**:256-263.
- 93) Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, and Ferrante AW Jr. (2003) Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* **112**:1796-1808.
- 94) Wellen KE, and Hotamisligil GS (2003) Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *J Clin Invest* **112**:1785-1788.
- 95) Di Gregorio GB, Yao-Borengasser A, Rasouli N, Varma V, Lu T, Miles LM, Ranganathan G, Peterson CA, McGehee RE, and Kern PA (2005) Expression of CD68 and macrophage chemoattractant protein-1 genes in human adipose and muscle tissues: association with cytokine expression, insulin resistance, and reduction by pioglitazone. *Diabetes* **54**:2305-2313.
- 96) Ding S, Chi MM, Scull BP, Rigby R, Schwerbrock NM, Magness S, Jobin C, and Lund PK (2010) High-fat diet: bacteria interactions promote intestinal inflammation which precedes and correlates with obesity and insulin resistance in

- mouse. *PLoS One* **5**:e12191.
- 97) Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, and Spiegelman BM (1995) Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- α in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* **95**:2409-2415.
- 98) Kern PA, Saghizadeh M, Ong JM, Bosch RJ, Deem R, and Simsolo RB (1995) The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase. *J Clin Invest* **95**:2111-2119.
- 99) Fried SK, Bunkin DA, and Greenberg AS (1998) Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. *J Clin Endocrinol Metab* **83**:847-850.
- 100) Engeli S, Janke J, Gorzelniak K, Böhnke J, Ghose N, Lindschau C, Luft FC, and Sharma AM (2004) Regulation of the nitric oxide system in human adipose tissue. *J Lipid Res* **45**:1640-1648.
- 101) Hotamisligil GS, Shargill NS, and Spiegelman BM (1993) Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* **259**:87-91.
- 102) Fried SK, Bunkin DA, and Greenberg AS (1998) Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. *J Clin Endocrinol Metab* **83**:847-850.
- 103) Perreault M, and Marette A (2001) Targeted disruption of inducible nitric oxide synthase protects against obesity-linked insulin resistance in muscle. *Nat Med* **7**:1138-1143.
- 104) de La Serre CB, Ellis CL, Lee J, Hartman AL, Rutledge JC, and Raybould HE (2010) Propensity to high-fat diet-induced obesity in rats is associated with changes in the gut microbiota and gut inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **299**:G440-448.
- 105) Pendyala S, and Natarajan V (2010) Redox regulation of Nox proteins. *Respir Physiol Neurobiol* **174**:265-271.
- 106) Pendyala S, Neff LM, Suarez-Farinas M, and Holt PR (2011) Diet-induced weight loss reduces colorectal inflammation: implications for colorectal carcinogenesis. *Am J Clin Nutr* **93**:234-242.
- 107) de Wit NJ, Bosch-Vermeulen H, de Groot PJ, Hooiveld GJ, Bromhaar MM, Jansen J, Müller M, and van der Meer R (2008) The role of the small intestine in the development of dietary fat-induced obesity and insulin resistance in C57BL/6J mice. *BMC Med Genomics* **1**:14.

- 108) Blokzijl H, Vander Borgh S, Bok LI, Libbrecht L, Geuken M, van den Heuvel FA, Dijkstra G, Roskams TA, Moshage H and Jansen PL, et al. (2007) Decreased P-glycoprotein (P-gp/MDR1) expression in inflamed human intestinal epithelium is independent of PXR protein levels. *Inflamm Bowel Dis* **13**:710-720.
- 109) Nawa A, Fujita Hamabe W, and Tokuyama S (2010) Inducible nitric oxide synthase-mediated decrease of intestinal P-glycoprotein expression under streptozotocin-induced diabetic conditions. *Life Sci* **86**:402-409.
- 110) Belliard AM, Lacour B, Farinotti R, and Leroy C (2004) Effect of tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma on intestinal P-glycoprotein expression, activity, and localization in Caco-2 cells. *J Pharm Sci* **93**:1524-1536.
- 111) Nawa A, Fujita-Hamabe W, and Tokuyama S (2012) Involvement of ubiquitination in the decrease of intestinal P-glycoprotein in a streptozotocin-induced diabetic mouse model. *Drug Metab Pharmacokinet* **27**:548-552.
- 112) McCullagh KJ, Poole RC, Halestrap AP, O'Brien M, and Bonen A (1996) Role of the lactate transporter (MCT1) in skeletal muscles. *Am J Physiol* **271(1 Pt 1)**:E143-150.
- 113) Higashi K, Tanaka C, Imanishi K, Sawamoto K, Horikawa T, Ohkawa H, Matsushita R, Sai Y, and Miyamoto K (2013) Influence of long-term enteral nutrition on pharmacokinetics of digoxin in rats. *Drug Metab Pharmacokinet* **28**:44-52.
- 114) Hisaka A, and Sugiyama Y (1998) Analysis of nonlinear and nonsteady state hepatic extraction with the dispersion model using the finite difference method. *J Pharmacokinet Biopharm* **26**:495-519.