

氏名	嶋田 努
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	博甲第717号
学位授与の日付	平成17年3月22日
学位授与の要件	課程博士(学位規則第4条第1項)
学位授与の題目	移植医療において起こりうる免疫抑制剤の薬物間相互作用機序の解明
論文審査委員(主査)	辻 彰(自然科学研究科・教授)
論文審査委員(副査)	宮本 謙一(医学部附属病院・教授), 横川 弘一(医学部附属病院・助教授), 松下 良(自然科学研究科・助教授), 加藤 将夫(自然科学研究科・助教授)

学位論文要旨

<Abstract>

Cyclosporin A and tacrolimus are used to prevent allograft rejection in immunosuppressive therapy for transplantation. We sometimes experienced some intra-individual and inter-individual pharmacokinetic variabilities of these drugs. One possible cause of the variability may be the drug-drug interaction, because many drugs are administered concomitantly to the patients. In this study, I tried to clarify the mechanisms of changes in the blood concentrations of these immunosuppressants, and I have found that dexamethasone, cyclophosphamide and levothyroxine increased the expression of *mdr1* and *CYP3A* mRNAs and of the corresponding proteins, which affect the pharmacokinetics of cyclosporin A and tacrolimus, such as increase in the CL_{tot} and reduction of the bioavailability. Within 2 weeks after the final treatment with steroid or anticancer drug, the levels of *mdr1* and *CYP3A* mRNAs and the drug pharmacokinetics recovered to the normal levels, as observed in clinic. In experiments using *mdr1a/1b(-/-)* mice and the corresponding normal control mice, the pharmacokinetics of cyclosporin A was controlled in major part by *CYP3A* in normal conditions, but greatly influenced by intestinal P-glycoprotein induced by steroid. Further, I found an interaction between cyclosporin A and Cremophor EL, the surfactant vehicle of cyclosporin A. Cyclosporin A adsorbed on the inner surface of blood vessels and on the surface of red blood cells was released by Cremophor EL. Moreover, it might be possible to break the correlation between concentration and pharmacological effect of cyclosporin A, because Cremophor EL reduced the tissue-plasma concentration ratio of the drug. These laboratory findings about drug-drug interactions have important clinical implications.

〈緒言〉

近年、臨床医学の進歩に伴い、造血幹細胞や臓器移植が頻繁に行われるようになり、さらに、免疫抑制剤であるcyclosporin Aあるいはtacrolimusの開発に伴いその臨床成績が格段に向上した。しかし、両薬剤はその目標治療域が極めて狭く、また、個体間、個人間でバラツキが多いため投与量をコントロールするのが難しい。予測濃度に血中濃度をコントロールするのが難しい原因として、胆汁流速や肝機能の変化、下痢や食事の影響の他に、移植時には数多くの併用薬を使用するため様々な薬物間相互作用が生じていることが考えられている。そのため、臨床では、患者個々にcyclosporin Aやtacrolimusの濃度をモニタリングしながら、投与量を決定し慎重な投与設計を行っている。

金沢大学医学部附属病院（以下、本院）においても造血幹細胞および臓器移植の患者において、免疫抑制剤であるcyclosporin Aやtacrolimusの血中濃度推移が予測推移に従わない症例がいくつか挙げられている。そこで本研究では、これら実際の症例が薬物間相互作用によるものと考え、その起因機序の解明を目的とした。

〈遺伝子発現の誘導に伴う薬物間相互作用〉

症例.1

肝移植後の患者で、tacrolimusのトラフ血中濃度は、以前は8-12 ng/mLと安定していたにも関わらず、methylprednisoloneの3日間のパルス療法の開始により、徐々に低下し、一時2.8 ng/mLにまで低下した。しかしその後、tacrolimusの投与量の変化がないにもかかわらず徐々に回復し、10日後には元のレベルにまで回復していた。

Methylprednisoloneより力価の強いdexamethasoneを用いた。Dexamethasoneの低投与量(1 mg/kg)および高投与量(75 mg/kg)をラットに連日腹腔内投与すると、低投与量処置群で投与期間依存的に肝臓および小腸でP-glycoproteinの発現を遺伝子レベル、蛋白レベルで誘導した。Dexamethasone高投与量処置群では投与期間依存的に肝臓および小腸のP-glycoproteinだけでなくCYP3A2の発現を遺伝子レベル、蛋白レベルで誘導した。Cyclosporin AやtacrolimusはP-glycoproteinやCYP3A2の基質であることはよく知られている。そこで、dexamethasone処置による両薬物の体内動態への影響を検討した。Dexamethasone低投与量処置群のcyclosporin Aやtacrolimusの体内動態は、静脈内投与群ではコントロールに比べ変化がなかったが、経口投与群はdexamethasone投与期間依存的にAUCの低下および、バイオアベイラビリティの低下が見られた。このことは、小腸上皮細胞のP-glycoproteinの発現誘導によって腸管からの吸収低下を示唆した。一方、dexamethasone高投与量処置群では、経口投与時のAUCの低下のみならず、さらに静脈内投与群で全身クリアランスも、投与期間依存的に上昇がみられた。このことは、副腎皮質ステロイドによってP-glycoproteinだけで

なく CYP3A2 の発現誘導によっても遺伝子誘導型の薬物間相互作用がocこりうることを示した。

また、dexamethasone による P-glycoprotein や CYP3A2 の誘導は dexamethasone の休薬により徐々に回復し、約 2 週間でコントロールレベルに回復した。また、それに伴い、変化していた tacrolimus の体内動態もコントロールレベルに回復した。これらの結果は、症例 1 の tacrolimus の血中濃度変化と一致するものであった。

さらに、*mdr1a/1b(-/-)* マウスおよび正常の *wild-type* マウスを用いて、P-glycoprotein が cyclosporin A の体内動態にどの程度の寄与を示すか検討した。両マウスの無処置群間での cyclosporin A の体内動態を比較すると、静脈内投与時では差がなく、また、経口投与での AUC は *wild-type* マウスに比べ *mdr1a/1b(-/-)* マウスで大きく、バイオアベイラビリティのわずかな上昇が見られたがこの変化は小さく、正常な状態では、腸管、肝臓および腎臓等の P-glycoprotein の寄与は小さいものと考えられた。一方、dexamethasone (1 または 75 mg/kg/day, i.p., 4 times) 処置により P-glycoprotein や CYP3A2 の発現を誘導させると *wild-type* マウスおよび *mdr1a/1b(-/-)* マウスにおいて、静脈内投与後の cyclosporin A の CL_{tot} は dexamethasone 投与量依存的に上昇したが、両群間で差は見られなかった。このことから、肝臓および腎臓等の P-glycoprotein の誘導は cyclosporin A の体内動態には大きな影響を与えないことが示唆された。一方、dexamethasone 高投与処置によって *wild-type* マウスでは、バイオアベイラビリティが約半分に低下し、*mdr1a/1b(-/-)* マウスはほとんど変化しなかった。このことは、小腸での P-glycoprotein 発現は、cyclosporin A の体内動態に大きく寄与していることを示唆している。

症例.2

造血幹細胞移植の前処置薬物治療を行った後、投与された cyclosporin A のトラフ値は投与設計上の推定値より低い推移をしめし、長期間安定しなかった。

造血幹細胞移植の前処置治療として、悪性細胞の根絶ために cytarabine および cyclophosphamide の抗がん剤が投与されている。そこで、本院で用いられているプロトコールに従って両薬物の cyclosporin A の体内動態におよぼす影響を検討した。Cytarabine (120 mg/kg, i.v., 2 times) 投与群では肝臓での P-glycoprotein および CYP3A2 の発現に変動はなく、また、cyclosporin A の体内動態にも変化がなかった。一方、cyclophosphamide (60 mg/kg, i.v., 2 times) 処置群および cytarabine (120 mg/kg, i.v., 2 times) + cyclophosphamide (60 mg/kg, i.v., 2 times) 併用群では肝臓での P-glycoprotein および CYP3A2 の発現が遺伝子レベルで誘導され、cyclosporin A の AUC の低下および全身クリアランスの上昇が見られた。また、cyclophosphamide 処置により誘導していた P-glycoprotein や CYP3A2 の発現は cyclophosphamide の休薬 2 週間後にはコントロールレベルに回復し、それに伴い cyclosporin A の体内動態も回復した。以上より、Cyclosporin A 投与初期の段階

で予測より血中濃度が低下していた原因は、前処置されている cyclophosphamide による肝臓の P-glycoprotein および CYP3A2 の発現誘導によるものと考えられた。

症例.3

長期甲状腺薬 Thyradin[®]を服用している患者において cyclosporin A のトラフ値は、非服用患者と比較して有意に低いものであった。

Levothyroxine (8 ug/kg/day, p.o., 3 weeks) 処置により肝臓では P-glycoprotein および CYP3A2 の発現誘導はみられなかった。一方、小腸では正常時に P-glycoprotein の発現程度が低い十二指腸、空腸の順に誘導しており、正常時に最も強く P-glycoprotein を発現している回腸ではほとんど誘導されてなかった。小腸の CYP3A2 の発現は、いずれの部位においても変化はなかった。また、levothyroxine 処置により静脈内投与後の cyclosporin A の体内動態には変化はなかった。しかし、小腸の P-glycoprotein の誘導により、cyclosporin A の経口投与後の AUC やバイオアベイラビリティの低下が見られた。このことにより、誘導を受けた小腸の P-glycoprotein は cyclosporin A の体内動態に大きな影響をおよぼすことが示唆された。

このように、dexamethasone や levothyroxine による遺伝子誘導は CYP3A2 よりも P-glycoprotein の方が誘導されやすく、また、生体内で平常時に発現している小腸上皮細胞の P-glycoprotein は、経口投与された薬物の吸収には大きな関与を示さないが、dexamethasone や levothyroxine などの薬物により誘導を受けると薬物のバイオアベイラビリティに大きく影響を与えることがわかった。このことから小腸上皮細胞の P-glycoprotein は、外来刺激による生体防御システムとして重要な働きを持っており、肝臓および小腸の CYP3A の発現誘導とともに遺伝子発現誘導型の薬物間相互作用の要因となることが示された。

〈薬物溶解剤による薬物間相互作用〉

Cyclosporin A の注射用溶解剤 Cremophor EL (CrEL) 自体が cyclosporin A と相互作用を起こすことを示した。

CrEL は、cyclosporin A 以外にも paclitaxel や miconazole などの脂溶性の高い難溶性薬物の溶解剤として繁用されている。種々の CrEL の濃度で溶解した cyclosporin A を静脈内投与すると、CrEL の濃度依存的に全血液・血漿中濃度が上昇し、分布容積の低下が見られた。また、このときの組織-血液間分配係数は CrEL により低下した。また、cyclosporin A 静脈内投与 30 min 後に CrEL および CrEL で溶解されている他の市販製剤を静脈内追加投与すると、cyclosporin A の全血液・血漿中濃度ともに一過性に上昇したあと、コントロール群と平行に低下した。一方、cyclosporin A 投与後に採取した血液を、CrEL 溶媒で洗浄すると、CrEL の濃度依存的に、血球に吸着した cyclosporin A が遊離し、再溶出

されることが確認された。また、動脈血管内皮細胞壁に吸着した cyclosporin A は、洗浄液の CrEL の濃度に依存して再溶出することが確認できた。

以上のことより、吸着性の高い cyclosporin A は静脈内投与後速やかに赤血球細胞膜や血管内皮細胞壁などに吸着するが、CrEL 濃度が高い場合や、CrEL を追加投与することによって再度血液中に溶出され、見かけ上血液中濃度が上昇することが示された。また、この場合、見かけ上の血液濃度上昇は実際の組織内濃度には反映しないことから、血中濃度と薬理効果の関係に注意する必要があることが示唆された。同様な現象は etoposide や docetaxel などの注射用溶解剤として使用されている Polysorbate 80 でも弱いながら起こることも示した。

〈総括〉

臨床現場では、多様化する薬物治療に伴って遺伝子発現の変動を伴うものや薬物溶解剤によるものなど薬物間相互作用が生ずることが予測された。そのため、薬物治療の際には、使用する薬物や溶解剤の性質を考慮した上で、処方し、また薬物治療管理をしていかなければならない。本研究は重要な薬物間相互作用に関する機序を解明したものであり、このような研究レベルでの薬物間相互作用を臨床に還元することは重要である。

学位論文審査結果の要旨

造血幹細胞移植や臓器移植の際に免疫抑制薬である cyclosporin A (CyA) や tacrolimus (FK) が用いられているが、血中濃度が患者間のみならず同一患者においてもバラツキが大きく、また、薬物間相互作用を起こしやすいため血中濃度のコントロールが難しい薬物である。本研究は、金沢大学医学部附属病院において経験したこれらの薬物の血中濃度動態が変化した症例を中心に、動物実験によって薬物間相互作用の機序の解明を試みたものであり、以下のような成果をあげた。

1. ステロイドパルス療法、造血幹細胞移植時の抗がん剤前処置や甲状腺ホルモンの長期投与によって、CyA や FK の体内動態が大きく変動する原因は、ステロイド、cyclophosphamide および levothyroxine によって肝臓や小腸で P-glycoprotein や CYP3A が誘導された結果、全身クリアランスの上昇やバイオアベイラビリティの低下が起こることを示した。また、この P-glycoprotein や CYP3A の発現レベルは併用薬の投与中止により 2 週間ほどで投与以前のレベルに回復し、薬物の体内動態も正常に回復することを示した。

2. *mdr1a/1b* (-/-) マウスおよび wild-type マウスを用いて、CyA の体内動態に P-glycoprotein がどの程度寄与しているかについて検討したところ、生理的状态では CyA の体内動態に対する P-glycoprotein の寄与は小さいが、小腸で P-glycoprotein が誘導された場合、CyA の吸収は著しく影響を受けることを明らかにした。

3. CyA 注射剤中溶解補助剤として用いられている Cremophor EL が血管内皮細胞壁や赤血球膜に吸着した CyA を血液内に再溶出させることにより体内動態を変動させ、また、組織-血漿間分配率を低下させることにより薬物の見かけの血中濃度と薬理効果の相関性を破綻させる可能性を示唆した。

以上のように、臨床現場では、多様な薬物間相互作用が起こっており、本研究では移植医療などに繁用される免疫抑制剤を中心とした薬物間相互作用の臨床例を示し、その機序を動物実験により解明した。このような知見は今後の適正な薬物療法に大いに貢献するものと認められるため、本論文を博士(薬学)論文に値すると評価した。