

## 糖尿病モデルラットにおけるシクロスポリンAの腸管吸収

吉田 忠弘<sup>a</sup>, 村田 亮<sup>a</sup>, 鈴木 進<sup>b</sup>, 岡 芳知<sup>b</sup>, 伊藤 邦郎<sup>a</sup>, 田中 頼久<sup>\*a</sup>

東北薬科大学第一薬剤学教室<sup>a</sup>

東北大学大学院医学系研究科分子代謝病態学分野<sup>b</sup>

### Intestinal Absorption of Cyclosporin A in Diabetic Model Rats

Tadahiro YOSHIDA<sup>a</sup>, Ryo MURATA<sup>a</sup>, Susumu SUZUKI<sup>b</sup>, Yoshitomo OKA<sup>b</sup>,  
Kunio ITOH<sup>a</sup> and Yori-hisa TANAKA<sup>\*a</sup>

(Received November 22, 2004)

Cyclosporin A (CyA), an immunosuppressant drug, is widely used in the treatment of kidney transplantation in severe diabetic patients. The drug has a clinical problem because of its variable oral bioavailability between patients and even within the same patient. We investigated the effects of diabetic disease models on the absorption of CyA from three parts of small intestine in streptozotocin-induced diabetic (STZ) rats and non-obese spontaneous Goto-Kakizaki (GK) rats. The intestinal absorption rate evaluated by the in situ loop method showed that the remaining rate in the loop was higher in both diabetic model rats, especially in the ileum of STZ rats, than that in control rats. The increased remaining rate was markedly depressed by the addition of verapamil, a well-known specific inhibitor of P-glycoprotein (P-gp). Western blot analysis using monoclonal antibody against P-gp, C219, was carried out. An increased P-gp expression in the intestines was shown in the two diabetic model rats compared with the control rats, being in good agreement with the in situ absorption data.

These results suggested the possibility of decreased intestinal absorption of CyA due to the increased expression of P-gp in the diabetic disease.

**Key words** — intestinal absorption; P-gp; diabetes; streptozotocine; GK rat; cyclosporin A

一般に、脂溶性の薬物は小腸粘膜からpH分配仮説に従い単純拡散により吸収される。しかし、近年、小腸上皮細胞に種々の輸送担体が存在し薬物の小腸吸収に関わっていることが報告されている。これらの中には、吸収とは逆に細胞内物質を細胞外に排出するP-糖タンパク質 (P-gp) や multidrug resistance-associated protein (MRP) などの輸送担体も含まれており、薬物体内動態の観点から重要視されている。

臓器移植の際に用いられる免疫抑制薬のシクロスポリンA (CyA) は経口投与後、小腸上部か

ら吸収されるが<sup>1-3)</sup>、その脂溶性の高さにもかかわらずバイオアベイラビリティが低く<sup>4)</sup>、それに加え患者間でのバイオアベイラビリティの変動が大きく臨床問題となっている<sup>5)</sup>。その原因として小腸の長さ、即ち表面積との相関性を検討した報告もあるが<sup>6)</sup>、最近では、腸管吸収過程でのP-gpの関与が報告されている<sup>5,7,8)</sup>。

そこで本研究ではCyAの腸管吸収過程に対する糖尿病態の影響を1型糖尿病モデルとしてストレプトゾトシン (STZ) 誘導型糖尿病ラット、2型糖尿病モデルとしてGoto-Kakizaki (GK) ラッ

トを用い, 種々検討した.

## 材料および方法

### 1. 試薬類

CyAおよびシクロスポリンD (CyD) はノバルティスファーマ株式会社より供与されたものを用い, STZおよびベラパミルはシグマ社から購入した. その他の試薬および溶媒は市販特級品を用いた. 抗ヒトP-gp抗体であるC219はDAKO JAPAN社から, ECF Western Blotting KitはAmersham Biosciences社から購入したものを用いた.

### 2. 実験動物

8週齢Wistar系雄性ラットは日本エスエルシーより購入した. 日内変動を考慮し温度 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ , 湿度 $55 \pm 5\%$ , 照度サイクル12時間(明期; 7:00~19:00)の環境にて飼育し, 固形飼料のCE-2(日本クレア社)と飲料水は自由に与え, 15~18時間絶食後実験に用いた.

STZラット: STZを0.05 Mクエン酸緩衝液(pH 4.5)に溶解させ, 8週齢Wistar系雄性ラットに70 mg/kgの用量で腹腔内投与し, 1週間飼育の後に1型糖尿病モデルラットとして実験に使用した.

GKラット: 自然発症糖尿病モデルであるGKラットは東北大学大学院医学研究科分子代謝病態学分野より供与された生後8週齢雄性のものを, 1週間飼育の後に2型糖尿病モデルラットとして実験に使用した.

対照群ラット: 対照には同週齢のWistar系雄性ラットを用いた.

### 3. 血糖値の測定

グルテストE・グルテストセンサー(京都第一科学)を用いて, 尾静脈より採取した血液の血糖値を測定した.

### 4. *In situ*ループ法による腸管吸収

*In situ*ループ腸管吸収実験はSaitohら<sup>9)</sup>の方法に準じて行った. 実験に際して約1時間の絶

水を行った後, ラットをペントバルビタール(50 mg/kg, i.p.)麻酔下開腹し, 胆管を結紮した後, 小腸内を0.9% NaCl 10 mLで洗浄した. ループは約10 cmで作成し, 幽門部から約1 cmおよび約20 cm下部, 回盲接合部から約15 cm上部より開始する部位をそれぞれ「十二指腸部」, 「空腸部」, 「回腸部」とした. ループ内にCyA(5  $\mu\text{M}$ )を含むTyrode's緩衝液(137 mM NaCl, 3 mM KCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.4 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3.6 mM NaHCO<sub>3</sub>, 6 mM D-glucose, pH 7.4) 1 mLを注入し, 15分経過後にループを切除し, ループ内の緩衝液を回収した. ループ内を緩衝液で洗浄し, ループ内の緩衝液と洗浄した緩衝液を合せ全量を10 mLとした後, その1.25 mLを管腔内残存量の測定試料とした. また, スライドガラスで粘膜をかきとり0.9% NaClで全量を10 mLとし, ホモジナイズした後, その1.8 mLを小腸粘膜試料とした. 阻害実験においては, ループ内注入試料にベラパミル(1 mM)を溶解させ同様の操作を行った.

### 5. 高速液体クロマトグラフィー(HPLC)によるCyAの測定

小腸各部位のループ内および粘膜中に残存するCyAは, 内標準物質にCyDを用い, Chart 1およびChart 2の方法に従い抽出した. HPLCによるCyAの定量は, カラムにYMC-Pack Pro C18(4.6 mm I.D.  $\times$  250 mm, YMC)を用い, 75°Cの恒温槽内で, 溶離液として70%アセトニトリルを流速1.0 mL/minで流し, 紫外部205 nmの吸光度を測定することにより行った.

### 6. 小腸粗膜画分の調製

試料の調製はDemeuleらの方法<sup>10)</sup>に準じて行った. ラットを断頭後開腹し, 幽門部から回盲接合部までを摘出した. 腸管内を冷0.9% NaCl 20 mLで洗浄し, 腸管を前述同様の部位にわけ, 冷250 mM sucrose含有10 mM HEPES-Tris緩衝液(pH 7.4)でホモジナイズした後, 3,000  $\times$  gで10分間遠心分離した. その上清を33,000  $\times$  gで30分間遠心分離し得られる沈渣を粗膜画分とした. 粗膜画分を50 mM mannitol含有20 mM



HEPES-Tris緩衝液 (pH 7.5) で再懸濁させタンパク濃度を 4 mg/mL に調整したものを Western blot 用試料とした。

なお, 小腸粗膜画分のタンパク濃度はウシ血清アルブミンを検量線用標準物質とし Protein Quantification Kit-Rapid (株式会社同仁化学研究所) を用い測定した。

## 7. Western blot による P 糖タンパク質の検出

小腸粗膜画分試料に同量の SDS 処理液 (第一化学薬品株式会社) を加え 96 °C, 5 分間熱処理した後, タンパク 5  $\mu$ g を含む試料溶液を負荷し SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) を行った。装置は全自動電気泳動システム PhastSystem (Amersham Biosciences 社), ゲルは PhastGel Gradient 4-15 (Amersham Biosciences 社), 緩衝液は SDS Buffer Strips (Amersham Biosciences 社) を用いた。泳動後, プロテイング装置に PhastTransfer (Amersham Biosciences 社), 緩衝液に Towbin 緩衝液 (25 mM Tris, 192 mM glycine, 15% MeOH, pH 8.3) を用い, PVDF 膜 (第一化学薬品株式会社) に転写し, 5% membrane blocking agent で室温にて 1 時間ブロッキング反応を行った。続いて, 一次抗体 C219 (0.5  $\mu$ g/mL) を室温で 1 時間, 二次抗体 (1:600) を室温で 1 時間, 三次抗体 (1:2500) を室温で 1 時間反応させた後, キット添付の ECF substrate を室温で 20 分間反応させ生成する反応物の蛍光を FLA-3000G (富士写真フィルム株式会社) を用い励起波長 473 nm, 受光フィルタ Y520 で測定した。ブロッキングおよび抗体反応用緩衝液に PBS-T (137 mM NaCl, 8.10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.68 mM KCl, 1.47 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.1% Tween-20) を用いた。また, 分子量マーカーとして, myosin (220,000),  $\alpha$ -2-macroglobulin (170,000),  $\beta$ -galactosidase (116,000), transferrin (76,000), glutamate dehydrogenase (53,000) を含む HMW Calibration Kit (Amersham Biosciences 社) を用いた。

## 8. 統計処理

実験結果は平均値  $\pm$  標準誤差で示した。統計

的有意差は分散分析処理後, Student's t-test により行い,  $P < 0.05$  を有意差として示した。

## 結 果

### 1. CyA 測定法の検討

管腔内および粘膜中に残存する CyA を HPLC で測定するにあたり, 抽出法の検討を行った。管腔内および粘膜試料には CyA および内標準物質の CyD とピークが重なる物質が存在しており, 除タンパク操作のみでは除去が不可能であった。そこで, 0.1N NaOH 塩基性下 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> を用いて抽出したところ, 管腔内試料の妨害ピークは除去された。しかし, 粘膜試料については同操作による妨害ピークの除去は不十分であったため, Takada らの方法<sup>11)</sup> を参考にさらに検討を加えた。粘膜試料のホモジネート溶液を遠心分離して得られる上清を 10N HCl および n-Hexane 存在下 MeOH で抽出し, その後この MeOH 層を 10N NaOH 塩基性下 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> で振とう抽出したところ, 粘膜由来の妨害ピークは除去された。この抽出操作において CyA の n-Hexane 層への移行はほとんどなく, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> による良好な抽出性が確認された。このようにして調製した試料の液体クロマトグラムを Fig.1 に示す。

### 2. 糖尿病モデルラットの体重および血糖値

実験に使用した 9 週齢のラット各群の体重および血糖値を Table 1 に示す。対照群と糖尿病モデル群を比較すると, 体重においては STZ 群では約 30g の減少を, GK 群では約 60g の増加を示し, 共に有意であった。血糖値においては STZ 群では約 470% の, GK 群では約 180% の有意な上昇が認められた。このような STZ 群における重度及び GK 群における軽度の血糖値の上昇は, 従来の報告と一致するものであった。

### 4. CyA の腸管吸収過程に及ぼす糖尿病の影響

5  $\mu$ M の CyA 溶液をラットの十二指腸, 空腸および回腸ループに注入 15 分経過後に測定した管腔内残存率を Table 2 に示す。STZ 群においては対照群と比較して全ての部位で管腔内残存率の

増加傾向が観察され、特に回腸部で有意なものとなった。GK群においては対照群と比較して有意な影響は観察されなかった。

5. CyAの腸管吸収過程に及ぼすP糖タンパク質阻害剤の影響

代表的なP-gp阻害剤として1 mMベラパミルを5  $\mu$ M CyAと同時注入した。STZラット群及びGKラット群の小腸各部位に注入15分後に測定した管腔内残存率をFig.2に示す。ベラパミル共存下、対照群では影響が観察されなかった。しかし、両糖尿病モデルラット群においてベラ

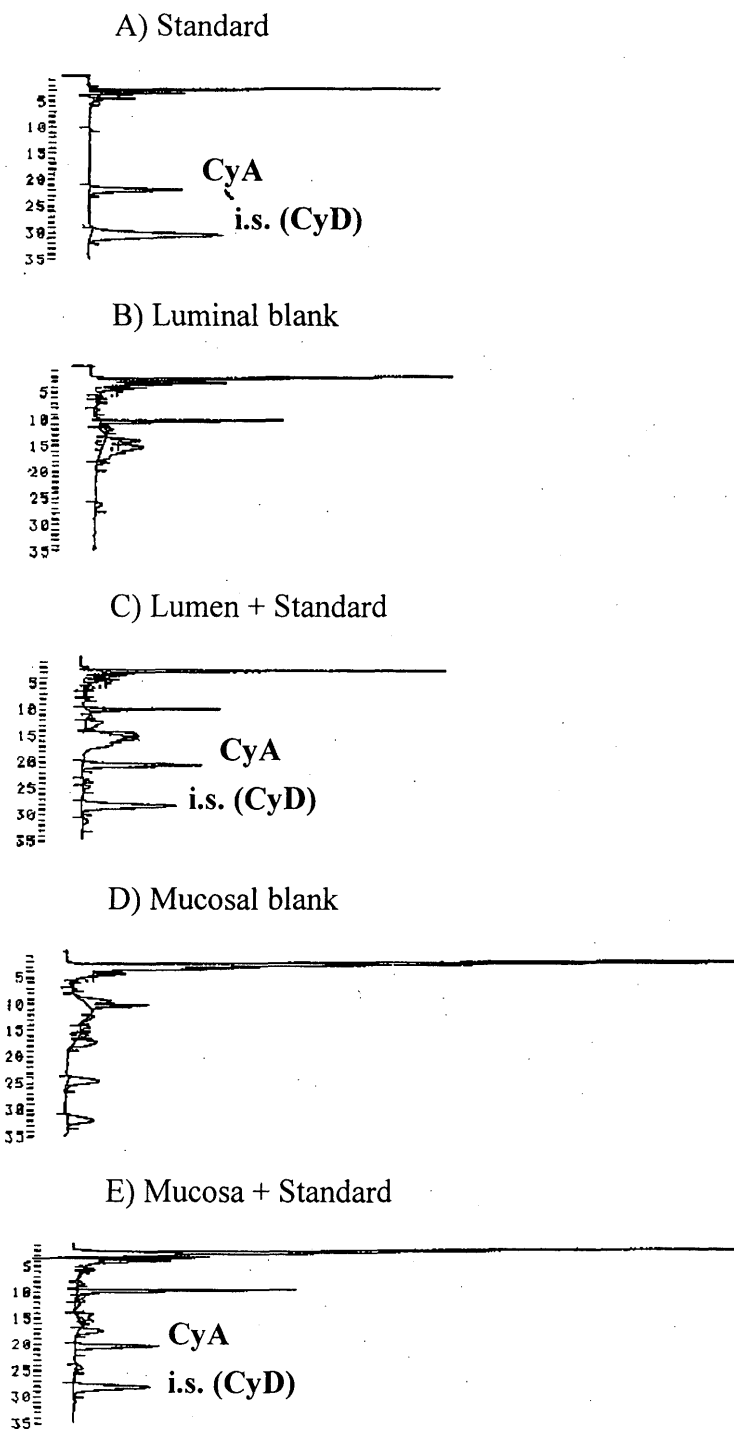


Fig. 1. HPLC chromatograms of CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> extracts of luminal and mucosal samples

Table 1. Effect of diabetes on body weights and blood glucose levels

	Body weight (g)	Blood glucose level (mg/dL)
Control	193.4 ± 2.6	7.14 ± 1.8
STZ	162.8 ± 6.3***	336.5 ± 22.7***
GK	252.4 ± 4.3***	126.1 ± 6.8***

Each value represents the mean ± S.E. of eight rats. \*\*\*P<0.005, significantly different from control group.

Table 2. Effect of diabetes on cyclosporin A absorption from each intestinal loop

	Remaining percent		
	Duodenum	Jejunum	Ileum
Control	34.1 ± 1.9	44.5 ± 5.1	39.5 ± 3.2
STZ	43.6 ± 4.4	58.3 ± 6.2	61.7 ± 6.6*
GK	36.9 ± 5.1	49.0 ± 3.0	42.0 ± 7.7

One mL Tyrode's buffer containing 5 μM cyclosporin A (pH 7.4) was injected into a 10-cm loop. Fluid in loop was collected 15 min after administration. Each value represents the mean ± S.E. of four rats. \*P<0.05, significantly different from control group.

パミルによる管腔内残存率の有意な低下が観察された。一方、GKラットの回腸部を用いた場合には管腔内残存率の有意な低下は確認されなかった。

#### 6. 糖尿病モデルラットの小腸におけるP-gp発現量

P-gpに対するモノクローナル抗体C219を用い、糖尿病モデルラットの腸各部位におけるP-gp発現量をWestern blot法により検討した結果をFig.3に示す。糖尿病モデルラット群ではC219と交差するバンドが対照群よりも濃く観察された。特にGKラットでは十二指腸部、空腸部、回腸部いずれにおいても対照群と比較しP-gpの発現量の増加が確認された。

#### 考 察

糖尿病合併症の一つである腎症は患者の予後を左右する疾患であり、末期では透析や腎移植といった治療が必要となる。腎移植の際に用いられる薬剤に免疫抑制薬のCyAがある。この薬剤は患者間で、また、同一患者内においても著

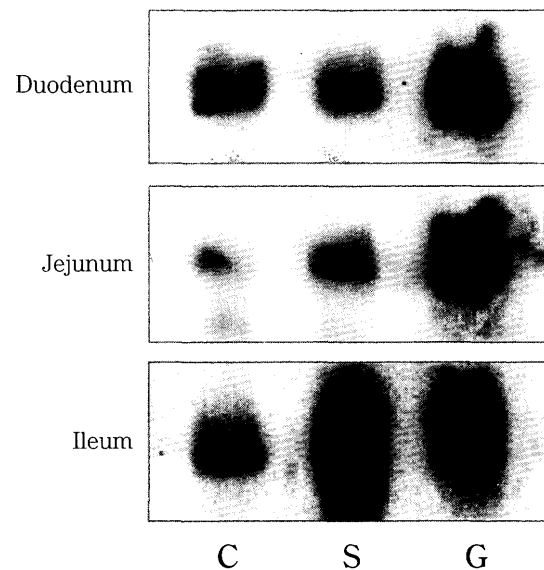


Fig. 3. Western blot analysis of P-glycoprotein in intestine of control and diabetic rats  
C: control rat, S: STZ rat, G: GK rat.

しい体内動態の変動が観察され臨床上問題となっている<sup>13-15)</sup>。その主たる要因として、糖尿病態がCyAの体内動態に種々影響を及ぼしていることが考えられている。

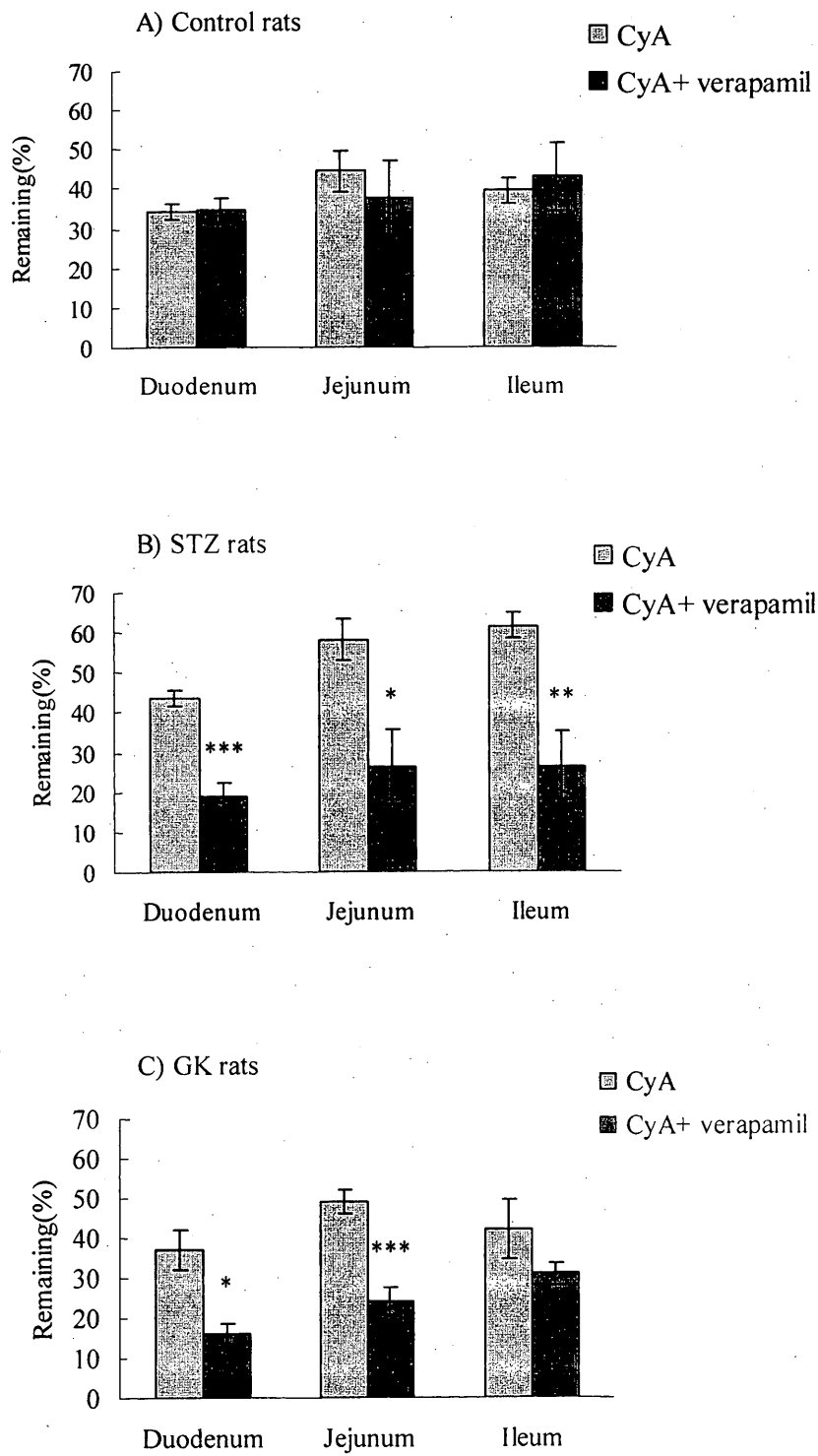


Fig. 2. Effect of Verapamil, a P-glycoprotein inhibitor on cyclosporin A absorption from intestinal loop of rat. Each column represents the mean  $\pm$  S.E. of four rats.

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.005$ , significantly different from group without verapamil.

本研究では、1型糖尿病モデルとしてストレプトゾトシン誘発糖尿病ラット (STZラット)、2型糖尿病モデルとして自然発症糖尿病ラット (GKラット) を用い、CyAの腸管吸収過程に及ぼす糖尿病態の影響を *in situ* ループ法およびWestern blot法により検討した。

*in situ* ループ法により糖尿病モデル群のCyAの管腔内残存率は対照群と比較し増加傾向がみられ、特にSTZ群の回腸部において有意に増加した。CyAはP-gpの基質であることが知られており<sup>7,16)</sup>、そのP-gpは小腸上部に比べ下部で多く発現していることが、ローダミン123の排出活性<sup>17)</sup>、Western blot法によるタンパクレベル<sup>18)</sup> およびmRNA発現量<sup>19-21)</sup>、mdr1a(-/-) ノックアウトマウスにおけるジゴキシンやバクリタキセルの腸管吸収性の野生種との比較<sup>18)</sup> などの実験で明らかにされている。今回の我々の実験においても同様の結果が得られており、糖尿病モデルラットではP-gpの発現量が増加しCyAの腸管吸収が低下していることが推察された。しかしながら、CyAの吸収抑制の程度はSTZラットで大きく、GKラットではわずかというように異なっていた。このことは糖尿病のタイプによりCyAの吸収抑制の程度が異なることを示しており、1型および2型糖尿病ではCyAの吸収に関して異なる機構が存在していることが示唆された。

P-gpの阻害剤であるベラパミルにより、糖尿病モデル群において管腔内残存率の有意な低下が観察されたが、対照群では認められなかった。この原因の一つとして、P-gpには2つの分子種 (mdr1a, 1b) が知られており、mdr1a, 1bの関わり方の違いが考えられる。ラット小腸にはmdr1aが多く発現しているのに対し、mdr1bは少ない<sup>16)</sup>。また、mdr1aとmdr1bは生体外異物や生体内物質による誘導に違いが見られること<sup>8,19,22)</sup>、さらに薬物に対する親和性や阻害剤による影響が異なることが報告されている<sup>23-26)</sup>。以上の知見を考え合わせ、対照群ではベラパミルと相互作用を示さないmdr1aが主にCyAの排出に関与するのに対して、糖尿病モデルラットではベラパミルと相互作用するmdr1bが主に誘導を受け、CyAの排出に関係し、糖尿病態モデルでの

みベラパミルによる阻害が見られたのではないかと推察される。また、2型糖尿病モデルであるGKラットでは十二指腸及び空腸でベラパミルによる管腔内残存率の低下が見られたが、回腸では有意な差は確認されなかった。この原因として2型糖尿病モデルラットでは十二指腸、空腸ではベラパミルと相互作用を示すmdr1bが誘導され、回腸ではmdr1aが誘導されたためではないかと考えられた。これらのことから、糖尿病態により誘導されているmdr分子種の同定、他のP-gpの基質あるいは阻害剤の影響などについてさらなる検討が必要と考える。

ヒト、ラット、マウスP-gpを認識することが知られている抗ヒトP-gpマウスモノクローナル抗体C219<sup>15,27)</sup>を用い、糖尿病モデルラット小腸におけるP-gp発現量を検討した。Western blotの結果、両糖尿病モデルラット群ともに小腸各部位でのP-gp発現量は対照群よりも増加しており、CyAの管腔内残存率増大の結果が裏付けられた。

以上の結果より、糖尿病態では小腸のP-gpの発現が増加しているためにCyAの吸収が低下していることが明らかとなった。また、ベラパミル共存下で糖尿病モデル群ではCyAの管腔内残存率の低下が観察されるのに対し、対照群では変動が観察されなかったことより、糖尿病態に陥ることでP-gpもしくは小腸部位の機能的な変化が現れる可能性があること<sup>28)</sup>、そして、非糖尿病態ではみられない薬物動態学的相互作用が起こりうる可能性が推察された。

## REFERENCES

- 1) Drewe, J., Beglinger, C., Kissel, T., *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **33**, 39-43 (1992).
- 2) Tarr, B.D., Yalkowsky, S.H., *Pharm. Res.*, **6**, 40-43 (1989).
- 3) Sawchuk, R.J., Awni, W.M., *J. Pharm. Sci.*, **75**, 1151-1156 (1986).
- 4) Ogino, Y., Kobayashi, E., Kita, J., Fujimura, A., Kogure, H., *Transplant. Proc.*, **31**, 2659-2660 (1999).



- 5) Hebert, M.F., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **27**, 201-214 (1997).
- 6) Whittington, P.F., Emond, J.C., Whittington, S.H., Broelsch, C.E., Baker, A.L., *N.Engl. J. Med.*, **322**, 733-738 (1990).
- 7) Yokogawa, K., Shimada, T., Higashi, Y., Itoh, Y., Masue, T., Ishizaki, J., Asahi, M., Miyamoto, K., *Biochem. Pharmacol.*, **63**, 777-783 (2002).
- 8) Lown, K.S., Mayo, R.R., Leichtman, A.B., Hsiao, H.L., Turgeon, D.K., Schmiedlin-Ren, P., Brown, M.B., Guo, W., Rossi, S.J., Benet, L.Z., Watkins, P.B., *Clin. Pharmacol. Ther.*, **62**, 248-260 (1997).
- 9) Saitoh, H., Hatakeyama, M., Eguchi, O., Oda, M., Takada, M., *J. Pharm. Sci.*, **87**, 73-75 (1998).
- 10) Demeule, M., Jodoin, J., Beaulieu, E., Brossard, M., Beliveau, R., *FEBS Lett.*, **442**, 208-214 (1999).
- 11) Takada, K., Shibata, N., Yoshimura, H., Yoshikawa, H., Muranishi, S., *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, **48**, 369-380 (1985).
- 12) Lindholm, A., Henricsson, S., Lind, M., Dahlqvist, R., *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **34**, 461-464 (1988).
- 13) Lemairn, M., Fahr, A., Maurer, G., *Transplant. Proc.*, **22**, 1110-1112 (1990).
- 14) Fahr, A., *Clin. Pharmacokinet.*, **24**, 472-495 (1993).
- 15) Saeki, T., Ueda, K., Tanigawa, Y., Hori, R., Komano, T., *J. Biol. Chem.*, **268**, 6077-6080 (1993).
- 16) Zhang, Y., Benet, Z.L., *Clin. Pharmacokinet.*, **40**, 159-168 (2001).
- 17) Yumoto, R., Murakami, T., Sanemasa, M., Nasu, R., Nagai, J., Takano, M., *Drug Metab. Dispos.*, **29**, 145-151 (2001).
- 18) Stephens, R.H., Tanianis-Hughes, J., Higgs, N.B., Humphrey, M., Warhurst, G., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **303**, 1095-1101 (2002).
- 19) Brady, J.M., Cherrington, N.J., Hartley, D.P., Buist, S.C., Li, N., Klaassen, C.D., *Drug Metab. Dispos.*, **30**, 838-844 (2002).
- 20) Stephens, R.H., O'Neil, C. A., Warhurst, A., Carlson, G.L., Rowland, M., Warhurst, G., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **296**, 584-591 (2001).
- 21) Fojo, A.T., Ueda, K., Slamon, D.J., Poplack, D.G., Gottesman, M.M., Pastan, I., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **84**, 265-269 (1987).
- 22) Hartmann, G., Kim, H., Piquette-Miller, M., *Int. Immunopharmacol.*, **1**, 189-199 (2001).
- 23) Westerhoff, H.V., Riethorst, A., Jongsma, A.P., *Eur. J. Biochem.*, **267**, 5355-5368 (2000).
- 24) Matsuzaki, J., Yamamoto, C., Miyama, T., Takanaga, H., Matsuo, H., Ishizuka, H., Kawahara, Y., Kuwano, M., Naito, M., Tsuruo, T., Sawada, Y., *Biopharm. Drug Dispos.*, **20**, 85-90 (1999).
- 25) Tang-Wai, D.F., Kajiji, S., DiCapua, F., de Graaf, D., Roninson, I.B., Gros, P., *Biochemistry*, **34**, 32-39 (1995).
- 26) Yang, C.P., Cohen, D., Greenberger, L.M., Hsu, S.I., Horwita, S.B., *J. Biol. Chem.*, **265**, 10282-10288 (1990).
- 27) Georges, E., Bradley, G., Garipey, J., Ling, V., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **87**, 152-156 (1990).
- 28) Dong, M., Ladaviere, L., Penin, F., Deleage, G., Baggetto, L.G., *Biochim. Biophys. Acta*, **1371**, 317-334 (1998).