

腸疾患時の肝臓および小腸における
薬物代謝機能変動に関する研究

2014

医療薬学

河内 正二

目次

略語表	
緒論	1
本論	6
第1章 潰瘍性大腸炎モデルの肝臓および小腸における CYP3A と P-gp の発現 変動による薬物動態への影響	6
序論	6
第1節 DSS 誘発潰瘍性大腸炎モデルの作成および評価	8
第2節 潰瘍性大腸炎モデルマウスの大腸、小腸および肝臓における 炎症性マーカーの mRNA 発現量の変化	14
第3節 潰瘍性大腸炎モデルマウスの小腸上部および肝臓における CYP3A および P-gp の発現量の変化	19
第4節 潰瘍性大腸炎モデルマウスにおける胆汁分泌の変動	28
第5節 潰瘍性大腸炎モデルマウス的小腸および肝臓における 核内受容体の mRNA およびタンパク質発現量の変化	34
第6節 潰瘍性大腸炎モデルマウスにおける CsA の血中濃度変化	42
第7節 考察	45
第8節 小括	49

第2章 NSAIDs 誘発小腸粘膜障害モデルの肝臓および小腸における	
CYP と P-gp の発現変動ならびに薬物吸収への影響.....	50
序論	50
第1節 INM 誘発小腸粘膜障害モデルの作成および評価.....	52
第2節 INM 誘発小腸粘膜障害モデルラットにおける肝機能の評価.....	58
第3節 INM 誘発小腸粘膜障害モデルラットの小腸および肝臓における CYP および <i>mdr1a</i> の mRNA 発現量の変化.....	62
第4節 INM 誘発小腸粘膜障害モデルラットでの VCM の 血漿中濃度変化	67
第5節 考察	72
第6節 小括	76
総括	77
謝辞	80
参考文献	81

略語表

A/G ratio:	albumin globulin ratio
ABC:	adenosine triphosphate binding cassette
ALP:	alkaline phosphatase
ALT:	alanine aminotransferase
AST:	aspartate aminotransferase
ATP:	adenosine triphosphate
AUC:	area under the concentration-time curve
Bsep:	bile salt export pump
BUN:	blood urea nitrogen
CAR:	constitutive androstane receptor
cDNA:	complementary deoxyribonucleic acid
COX:	cyclooxygenase
CsA:	cyclosporine A
Ct:	threshold cycle
CYP:	cytochrome P450
DAI:	disease activity index
dNTPs:	deoxyribonucleotide triphosphates
DSS:	dextran sulfate sodium
EMIT:	enzyme multiplied immunoassay technique
FXR:	farnesoid X receptor
HE:	hematoxylin-eosin
HPLC:	high-performance liquid chromatography
HRP:	horseradish peroxidase
HTAB:	hexadecyl-trimethyl-ammonium bromide
IL:	interleukin
INM:	indomethacin
iNOS:	inducible nitric oxide synthase
MDR:	multidrug resistance

Mdr2:	multidrug resistance 2
MPO:	myeloperoxidase
mRNA:	messenger ribonucleic acid
Mrp2:	multidrug resistance-associated protein 2
N.S.:	not significant
NP-40:	Nonidet [®] P-40
NSAIDs:	non-steroidal anti-inflammatory drugs
Ntcp:	sodium taurocholate cotransporting polypeptide
Ost:	organic solute transporter
OTC:	over the counter
PCR:	polymerase chain reaction
PGE ₂ :	prostaglandin E ₂
P-gp:	P-glycoprotein
PVDF:	polyvinylidene difluoride
PXR:	pregnane X receptor
RNA:	ribonucleic acid
RNase:	ribonuclease
RT-PCR:	reverse transcription-polymerase chain reaction
RXR α :	retinoid X receptor α
S.D.:	standard deviation
S.E.:	standard error
SDS:	sodium dodecyl sulfate
SIU:	small intestine ulcer
SLC:	solute ligand carrier
TBS:	tris-buffered saline
TBS-T:	TBS containing 0.5% Tween 20
TEMED:	<i>N,N,N',N'</i> -tetramethylethylenediamine
TNF- α :	tumor necrosis factor- α
Tris	tris (hydroxymethyl) aminomethane
UV:	ultraviolet

VCM: vancomycin

緒論

薬物代謝は主に肝臓において様々な薬物代謝酵素によって行われ、その大部分に薬物代謝の第 I 相反応における酸化還元反応を担う cytochrome P450 (CYP) が関与している。CYP が関わる相互作用は、酵素阻害と酵素誘導に分類され、その大半は前者である。CYP の酵素学的特徴として、他の酵素と比較して基質特異性が低いことが挙げられる。そのため、複数の基質が同時に存在する場合には代謝過程が競合し、お互いの代謝が阻害されて薬物相互作用が生じる。現在、ヒトにおける薬物代謝に関与する主要な CYP 分子種として Table 1 に示す 10 種類が知られている^{1,2)}。

Table 1. Characteristics of the major human cytochrome P450 that are involved in drug metabolism

CYP分子種	肝臓での全CYP発 現量に占める割合 (%)	薬物代謝への寄与率 (%)	代謝の個人差 (倍)	遺伝的多型 (数)
CYP1A2	>10	4	40	36
CYP2A6	<10	2	30	70
CYP2B6	<5	2	50	54
CYP2C8	<5	10	20	16
CYP2C9	>15	25	—	41
CYP2C19	<5	2	<100	31
CYP2D6	<5	30	>1000	123
CYP2E1	<15	2	20	13
CYP3A4	>35	50	20	40
CYP3A5	<8	—	>100	24

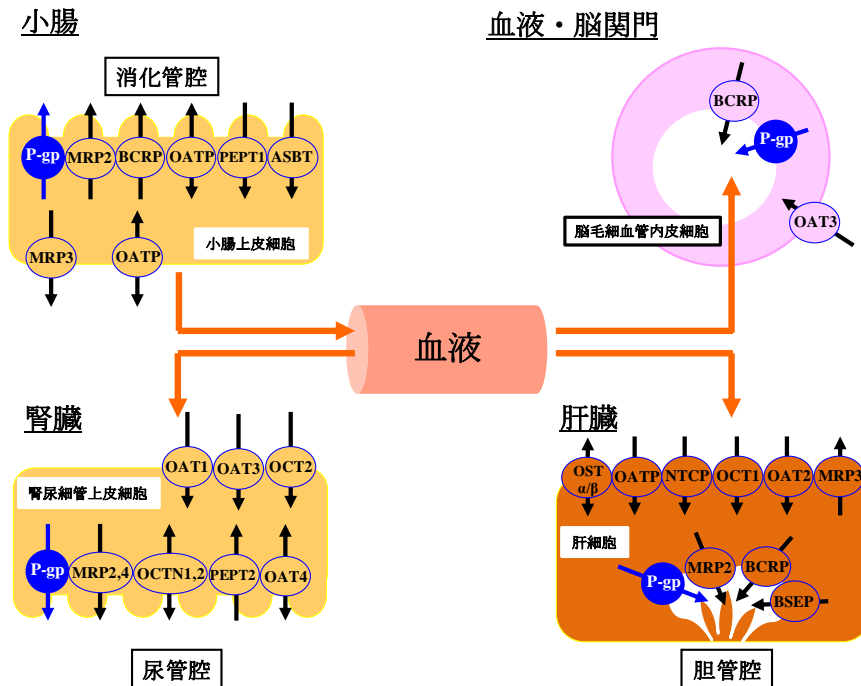
参考文献 2) を一部改変し引用

CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 および CYP3A4 は、肝臓における発現量、薬物に対する代謝寄与率および個体差（遺伝子多型）から判断して、特に重要な分子種である。CYP2C19 および CYP2D6 は、いずれも肝臓での発現量は 5%以下と少ないが、日本人において酵素活性が低下した変異型遺伝子の出現頻度がそれぞれ 20%（CYP2C19*2）および 40%（CYP2D6*10）と高く、临床上において薬物の効果や副作用に対する個体差が大きな問題となる。CYP3A4 は薬物代謝のおよそ 50%に関与し、かつ肝臓での発現量が 35%以上と最も高い。また近年、小腸上皮細胞においてその発現が確認され³⁾、小腸における発現量もすべての CYP 発現量の 70%を占めることが明らかとなっている。このことから、薬物代謝には肝臓に加えて小腸での吸収過程における代謝も重要な役割を担っていると考えられている⁴⁾。Tsunoda ら⁵⁾は、健康成人に CYP3A4 の基質薬物であるミダゾラムとその阻害薬であるケトコナゾールを併用した場合の血中濃度-時間曲線下面積（area under the concentration-time curve: AUC）の変動に関して報告している。その結果、併用時のミダゾラムの AUC は単独投与時と比較した場合、静脈内投与および経口投与でそれぞれ 5 倍および 16 倍に上昇しており、小腸での薬物代謝の重要性が示唆されている。

薬物は各臓器の細胞内への流入および細胞外への排出時に細胞膜を透過する必要がある。脂溶性が高く、極性が低い薬物は、受動的に細胞膜を透過できる。一方、水溶性で極性が高い薬物の場合、受動的な透過は難しく、細胞膜通過を促進する膜タンパク質、すなわちトランスポーターの関与が必要となる。薬物のトランスポーターを介した細胞膜透過機構は、透過する薬物自身の濃度差のみを駆動力として利用する促進拡散と透過する薬物以外の外的エネルギーを利用することにより、濃度勾配に逆らった輸送を可能にする能動輸送に分類される。さらに、能動輸送は、供給されるエネルギーによって一次性能動輸送（adenosine triphosphate（ATP）の加水分解エネルギーを駆動力として利用）と二次性能動輸送（一次性能動輸送によって形成されたナトリウムイオン等の濃度勾配に従った輸送と共役した輸送）に分類される⁶⁾。

現在、一次性能動輸送型のトランスポーターは、ATP binding cassette（ABC）トランスポーター群として 7 ファミリーに分類されている。一方、促進拡散型および二次性能動輸送型のトランスポーターを含む solute ligand carrier（SLC）

トランスポーター群は、およそ 50 ファミリーに分けられている。両者でおよそ 60 ファミリー、400 種類程度のトランスポーターの存在が確認され、多くが薬物の体内動態に関与することが指摘されている⁶⁻⁸⁾ (Fig. 1)。



参考文献 6-8)を一部改変して引用

Fig. 1. The major transporters expressed in human small intestine, liver, kidney, and brain.

SLC transporters

- Apical sodium/bile acid co-transporter (ASBT)
- Organic anion transporter 1, 2, 3, and 4 (OAT1, OAT2, OAT3, and OAT4)
- Organic anion transporting polypeptide (OATP)
- Organic cation transporter 1 and 2 (OCT1 and OCT2)
- Organic cation/carnitine transporter 1 and 2 (OCTN1 and OCTN2)
- Organic solute transporter α/β (OST α/β)
- Peptide transporter 1 and 2 (PEPT1 and PEPT2)
- Sodium taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP)

ABC transporters

- Bile salt export pump (BSEP)
- Breast cancer resistance protein (BCRP)
- Multidrug resistance-associated protein 2, 3, and 4 (MRP2, MRP3, and MRP4)
- P-glycoprotein (P-gp; MDR1)

薬物トランスポーターのなかで最も研究が行われているものに、ABC トランスポーター群に属する ABCB1 (P-glycoprotein: P-gp) がある。P-gp は、もともと癌細胞の多剤耐性に関わるタンパク質として発見され⁹⁾、それをコードする遺伝子は、薬剤耐性機序に由来して multidrug resistance 1 (MDR1) 遺伝子と呼ばれ、第7染色体長腕に存在している。MDR1 は、12回の膜貫通領域と2つのATP結合領域を有し、ATPの加水分解エネルギーを利用し各種薬物を細胞内から細胞外へ排出する。その後の研究により、P-gp は多剤耐性癌細胞だけでなく、小腸、肝臓、腎臓および血液脳関門などの多くの正常細胞にも発現し、生体内から薬物を排出する方向に働くトランスポーターとして重要な役割を担っていることが明らかとなった⁶⁻⁸⁾ (Fig. 1)。P-gp の基質認識性は広く、抗癌剤のみならずジゴキシン (強心配糖体)、タクロリムス、シクロスポリン (cyclosporine A: CsA) (免疫抑制薬)、ステロイド類など構造的に脂溶性化合物を輸送する⁸⁾。従って、P-gp の基質と基質あるいは阻害薬や誘導薬が同時に存在する場合には、基質薬物の血漿中濃度の変動を伴い、临床上重要な薬物相互作用を生じることが報告されている¹⁰⁾。

薬物代謝酵素の CYP3A および薬物トランスポーターの P-gp は、ともに肝臓および十二指腸、空腸といった小腸に発現が認められる。また、両者は類似の基質特異性を持つことから、連携して薬物の代謝および排泄過程に関与する可能性が考えられている¹¹⁾ (Fig. 2)。実際、臓器移植患者におけるタクロリムスおよび CsA の体内動態には、肝臓および小腸での CYP3A および P-gp の協調的な作用が関与していることが報告されている¹²⁾。

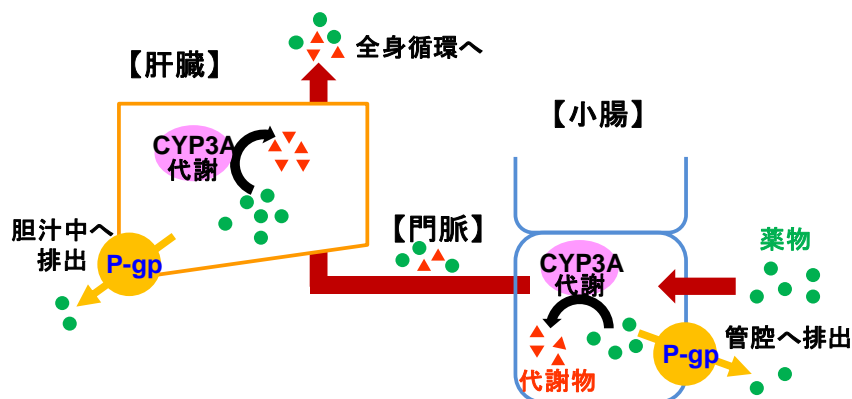


Fig. 2. A scheme of functional interaction between CYP3A4 and P-gp in small intestine and liver.

通常、薬物は様々な疾患を有する患者に投与される。一般的に、病態時では薬物代謝能は低下するとされている。従って、薬物治療を実施する際、病態と薬物代謝との関連について理解しておくことは非常に重要となる。特に、薬物代謝において中心的な役割を担っている肝臓の機能が障害を受ける疾患では、薬物の体内動態に大きな影響を及ぼす。肝機能障害時における CYP 酵素活性には、分子種間に差異が見られることが明らかとなっており、CYP2C19>CYP3A4、CYP1A2>CYP2D6>CYP2E1 の順に活性が低下することが報告されている^{6,13)}。なかでも臨床上重要な分子種である CYP2C19、CYP2D6 および CYP3A4 の機能低下は問題となる。実際に、慢性肝炎や肝硬変患者では、その重症度に応じて CYP3A4 および CYP1A2 の基質薬物であるリドカインの代謝が低下することが報告されている¹⁴⁾。さらに、Mayo ら¹⁵⁾は、関節リウマチ患者に CYP3A4 および P-gp の基質薬物であるベラパミルを投与した場合の薬物動態変動に関して検討し、健常成人と比較して関節リウマチ患者では、ベラパミルの AUC がおよそ 3 倍に上昇することを明らかにしている。すなわち、肝疾患以外にも炎症が基礎にある病態では、CYP および P-gp の機能変化が生じることで薬物の体内動態に影響する可能性が考えられる。

ところで、腸管は食餌抗原や腸内細菌に絶えず曝されている特殊な臓器であり、生体防御機能を維持するために重要な役割を担う一方で、薬物の代謝および排泄過程において、肝臓と腸肝循環を介して機能的に密接に関わっている。すなわち、腸管が障害を受けた場合には、腸管および肝臓での薬物代謝および排泄過程に変動が生じる可能性が考えられる。しかし、腸管疾患と薬物の体内動態の関連については十分な検討がなされていない。

そこで著者は、難治性の慢性腸管炎症を主体とし、肝胆道系に合併症を有することが知られる潰瘍性大腸炎（第 1 章）および薬剤性小腸障害として注目されている非ステロイド性抗炎症薬（non-steroidal anti-inflammatory drugs: NSAIDs）起因性小腸粘膜障害（第 2 章）に注目し、腸疾患における小腸と肝臓の機能低下に起因する薬物代謝および薬物動態の変動、ならびにその調節機構の解明を目指して研究を実施した。

本論

第1章 潰瘍性大腸炎モデルの肝臓および小腸における CYP3A と P-gp の発現変動による薬物動態への影響

序論

潰瘍性大腸炎は、主として粘膜を侵し、しばしばびらんや潰瘍を形成する大腸の原因不明のびまん性非特異性炎症である。わが国の罹患率や有病率は欧米に比べて低率ではあるが、1970年以降急激に増加している。発症年齢のピークは男性で20～24歳、女性で25～29歳にみられ、若年者から高齢者まで発症する。男女比は1:1で性差はみられない。病因は、遺伝的因子および環境因子（ウイルスや細菌感染、腸内細菌叢の変化、食餌性抗原など）が複雑に関与する免疫系の異常反応と考えられているが、その詳細は不明である¹⁶⁾。

近年、細胞内への生体異物の侵入を制御する役割を担うトランスポーターと潰瘍性大腸炎の発症との関連が注目されており、原因遺伝子の解明が行われている¹⁷⁾。なかでもMDR1遺伝子に関する報告が数多くなされており、複数の遺伝子多型が潰瘍性大腸炎の発症リスクを高めることが示唆されている^{18,19)}。実験動物では、*mdr1a*^{-/-}マウスが潰瘍性大腸炎に類似した大腸炎を自然発症することが明らかにされている²⁰⁾。また、潰瘍性大腸炎患者の大腸では、P-gpのmRNAおよびタンパク質発現量が健常人と比べ低下していることが報告されており^{21,22)}、潰瘍性大腸炎の病態を反映するデキストラン硫酸ナトリウム（dextran sulfate sodium: DSS）誘発マウス大腸炎モデルでも同様に、大腸でのP-gpのmRNAおよびタンパク質発現量の低下が認められる^{23,24)}。すなわち、P-gpの機能低下による大腸粘膜での免疫調節の異常が潰瘍性大腸炎の発症および病態に深く関与している可能性が考えられる。

潰瘍性大腸炎は、炎症部位が基本的には大腸に限局されるため、前述の通り炎症部におけるP-gpの役割に関する報告は数多くなされているが、薬物代謝および排泄過程で重要な肝臓および小腸での発現量の変化について詳細に検討した報告はなされていない。最近、Herrlingerら²⁵⁾はMDR1遺伝子多型と潰瘍性大腸炎患者におけるタクロリムスの治療効果との関連を報告しており、小腸に

における P-gp の機能変動が影響する可能性が示唆されている。また、潰瘍性大腸炎は消化管病変以外に関節炎、虹彩炎、皮膚症状および肝胆膵系疾患などの腸管外の病変を伴うことが少なくない。肝胆膵系では、脂肪肝、胆石症、高アマミラーゼ血症、膵炎および原発性硬化性胆管炎などの疾患が合併することが明らかになっている²⁶⁻²⁸⁾。実際、潰瘍性大腸炎患者において肝代謝型薬物の血漿中濃度の上昇が認められることが報告されている²⁹⁾。

以上の知見より、潰瘍性大腸炎では肝臓および小腸での薬物代謝および排泄過程に機能変動が生じ、薬物治療に影響する可能性が考えられる。そこで著者は、潰瘍性大腸炎モデル動物を構築し（第1節）、小腸および肝臓での CYP3A および P-gp の機能変化に影響する因子の探索を行った（第2節および第4節）。また、小腸および肝臓での CYP3A および P-gp の mRNA およびタンパク質発現量の変化ならびにその調節機構に関して検討した（第3節および第5節）。さらに、CYP3A および P-gp の基質、且つ臨床上的治療薬である CsA の血中濃度を評価し、薬物動態への影響を検討した（第6節）。

第 1 節 DSS 誘発潰瘍性大腸炎モデルの作成および評価

DSS 誘発大腸炎モデルは、大腸粘膜のびらんや潰瘍形成、体重減少、血便、下痢および大腸粘膜内への炎症性細胞浸潤などヒトの潰瘍性大腸炎に類似した病態を反映する実験モデルとして汎用されている³⁰⁻³²⁾。

そこで、本節では C57BL/6Jcl 系雄性マウスを用いて、大腸粘膜のびらんや潰瘍形成、体重および便の性状、大腸の全長および炎症性細胞の浸潤を指標に DSS 誘発潰瘍性大腸炎モデルの構築をおこなった。

第 1 項 実験材料および試薬調製方法

1-1. 使用動物

C57BL/6Jcl 系マウス（雄性、6 週齢）は日本クレア株式会社から購入した。このマウスを動物実験施設において、室温 $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55\pm 10\%$ の条件下、12 時間の明暗サイクル（明期：午前 7 時 - 午後 7 時）で 1 週間予備飼育し、疾病の有無や健康状態を確認して実験に使用した。飼料は CE-2（日本クレア株式会社）を、飲水は濾過機を通した上水道水をいずれもマウスに自由摂取させた。

1-2. 実験材料

- 1) DSS [MP Biomedicals, molecular weight; 36,000–50,000 Da]
- 2) *o*-dianisidine hydrochloride [SIGMA-ALDRICH]
- 3) Hexadecyl-trimethyl-ammonium bromide (HTAB) [和光純薬工業株式会社]
- 4) リン酸二水素カリウム (KH_2PO_4) [ナカライテスク株式会社]
- 5) リン酸水素二カリウム (K_2HPO_4) [ナカライテスク株式会社]
- 6) 30% H_2O_2 [三徳化学工業株式会社]
- 7) タンパク質定量キット：Pierce[®] BCA Protein Assay kit [Thermo Fisher Scientific]
- 8) Peroxidase (Horseradish peroxidase Type2) [SIGMA-ALDRICH]
- 9) ホルムアルデヒド [ナカライテスク株式会社]
- 10) 1% エオシン Y 液 [武藤化学株式会社]

- 11) ジエチルエーテル [和光純薬工業株式会社]
- 12) パラフィン：パソプレップ®568 [和光純薬工業株式会社]
- 13) マイヤーヘマトキシリン溶液 [和光純薬工業株式会社]
- 14) 標本封入剤：マウントクイック [大道産業株式会社]

その他の試薬はナカライテスク株式会社または和光純薬工業株式会社より購入した。

1-3. 試薬調製方法

1-3-1. 5%DSS 溶液

DSS を 5% となるように滅菌水で溶解した。

1-3-2. MPO 活性の測定

- 1) 100 mM リン酸緩衝液 (pH 6.0)
KH₂PO₄ および K₂HPO₄ は超純水で溶解し、それぞれ 100 mM 溶液を調製した。100 mM K₂HPO₄ 溶液に 100 mM KH₂PO₄ を加え、pH 6.0 に調整した。
- 2) 10 mM リン酸緩衝液 (pH 6.0)
100 mM リン酸緩衝液 (pH 6.0) を超純水で 10 倍希釈して調製した。
- 3) 抽出用 buffer
100 mM リン酸緩衝液 (pH 6.0) を超純水で 2 倍希釈した。これに、HTAB を 0.5% となるように溶解した。
- 4) ペルオキシダーゼ標準溶液
Peroxidase 1 mg を超純水 1 mL で溶解して 1 mg/mL 溶液を調製した。これを抽出用 buffer で希釈し、0.25 µg/mL 溶液とした。
- 5) 過酸化水素・ジアニシジン反応液
o-dianisidine hydrochloride を 10 mM リン酸緩衝液 (pH 6.0) で溶解して 2 mM 溶液を調製した。30% H₂O₂ は超純水で 100 倍に希釈して 8.8 M 溶液を調製した。2 mM *o*-dianisidine hydrochloride 溶液 12.5 µL と 8.8 M H₂O₂ 溶液 2.5 mL を混合し、過酸化水素・ジアニシジン反応液 (1 : 200) を調製した。この反応液を 8.8 M H₂O₂ 溶液を用いて希釈率 2 倍で段階希釈し、1 : 400 から 1 : 3200 の過酸化水素・ジアニシジン反応液を調製した。

第 2 項 実験方法および統計学的処理

2-1. DSS による大腸炎の誘発

動物は無作為にコントロール群と DSS 群に割り付け、コントロール群および DSS 群にはそれぞれ滅菌水および 5%DSS 水溶液を 7 日間自由摂取させた。大腸炎の程度は、既報^{33,34)}に従い DSS 摂取期間中に観察した体重および便の性状（下痢および出血）より算出した disease activity index (DAI) (Table 2) により評価した。

Table 2. DAI scoring

Score*	Weight loss	Stool consistency	Blood in the stool
0	None	Normal	Normal
1	1%–5%		
2	5%–10%	Loose stools	Slight bleeding
3	10%–15%		
4	> 15%	Watery diarrhea	Gross bleeding

*DAI は 3 つのパラメーターのスコアの合計により算出した。

2-2. 大腸の全長および Hematoxylin-Eosin (HE) 染色による組織学的評価

滅菌水あるいは 5%DSS 摂取開始後 3、5 および 7 日目、エーテル麻酔下にマウスから大腸を摘出し、小腸盲腸移行部から肛門までを大腸の全長として定規で測定した。その後、大腸組織を 10% 中性緩衝ホルムアルデヒド液に浸して固定し、パラフィンで包埋した後、ミクロトームを用いて厚さ 7 μm のパラフィン切片を作製した。作製したパラフィン切片をキシレンおよびエタノールに浸してパラフィンを除去し、マイヤーヘマトキシリン溶液に 3 分間、エオシン溶液に 2 分間順に浸して染色した。その後エタノールおよびキシレンを用いて脱水処理し、封入剤を用いて封入した。

2-3. Myeloperoxidase (MPO) 活性の測定

滅菌水あるいは 5%DSS 摂取開始後 7 日目、エーテル麻酔下にマウスから大腸を摘出した。摘出した大腸を腸間膜に沿って切開し、氷冷した生理食塩液で洗浄後、重量を測定した。大腸粘膜内の MPO 活性は、既報に準じて測定した^{35,36)}。すなわち、組織重量 50 mg あたり抽出用 buffer を 1 mL 加え、ガラスホモジナイザーにより均質化した。均質化した溶液は凍結、融解を計 3 回繰り返した後、350 × g、10 分間、4°C で遠心分離した。遠心分離後、得られた上清を測定サンプルとして使用した。

96 well プレート上でサンプル 5 μL および 10 mM リン酸緩衝液 (pH 6.0) 95 μL を混和し、さらに過酸化水素・ジアニシジン反応液 (1 : 200) 50 μL を添加した後、吸収波長 450 nm における吸光度変化をマイクロプレートリーダー

(Multiskan Ascent, Thermo Fisher Scientific) にて測定した。検量線は、0.25 μg/mL ペルオキシダーゼ標準液 100 μL に、種々の濃度に調製した過酸化水素・ジアニシジン反応液 (1 : 200、1 : 400、1 : 800、1 : 1600 および 1 : 3200) 50 μL を加えた際の吸光度変化を測定することにより作成した。MPO 活性は、BCA protein assay Kit を用いて測定したサンプル中のタンパク質量により補正して算出した。

2-4. 統計学的処理

全てのデータは、一群 5–6 匹から得られた値の平均 ± 標準誤差で表示した。統計学的解析は SPSS version 20.0 (IBM) を使用し、Student's t-test あるいは Mann-Whitney U-test を用い、いずれも $p < 0.05$ の場合に有意であると判定した。

第 3 項 結果

DSS 群では、DSS 摂取開始後 3 日目より体重減少および血便が認められ、下痢は摂取開始後 4 日目から観察された。その結果、DSS 群はコントロール群と比較して DSS 摂取開始後 3 日目より DAI スコアの有意な上昇を示した (Fig. 3A)。大腸の全長は DSS 摂取により短縮し、摂取開始後 5 日目および 7 日目では DSS 群で著明な短縮が認められ、粘膜炎症の存在が明らかとなった (Fig. 3B)。摂取開始後 7 日目、DSS 群では炎症性細胞浸潤の指標となる MPO 活性がコントロール群に比べおよそ 4 倍上昇し、HE 染色による組織学的評価により大腸粘膜の変性および損傷が認められた (Fig. 3C、3D)。これらの結果から、C57BL/6J 雄性マウスに 5% DSS 水溶液を 7 日間飲水させることで実験的大腸炎モデルを構築できることを確認した。

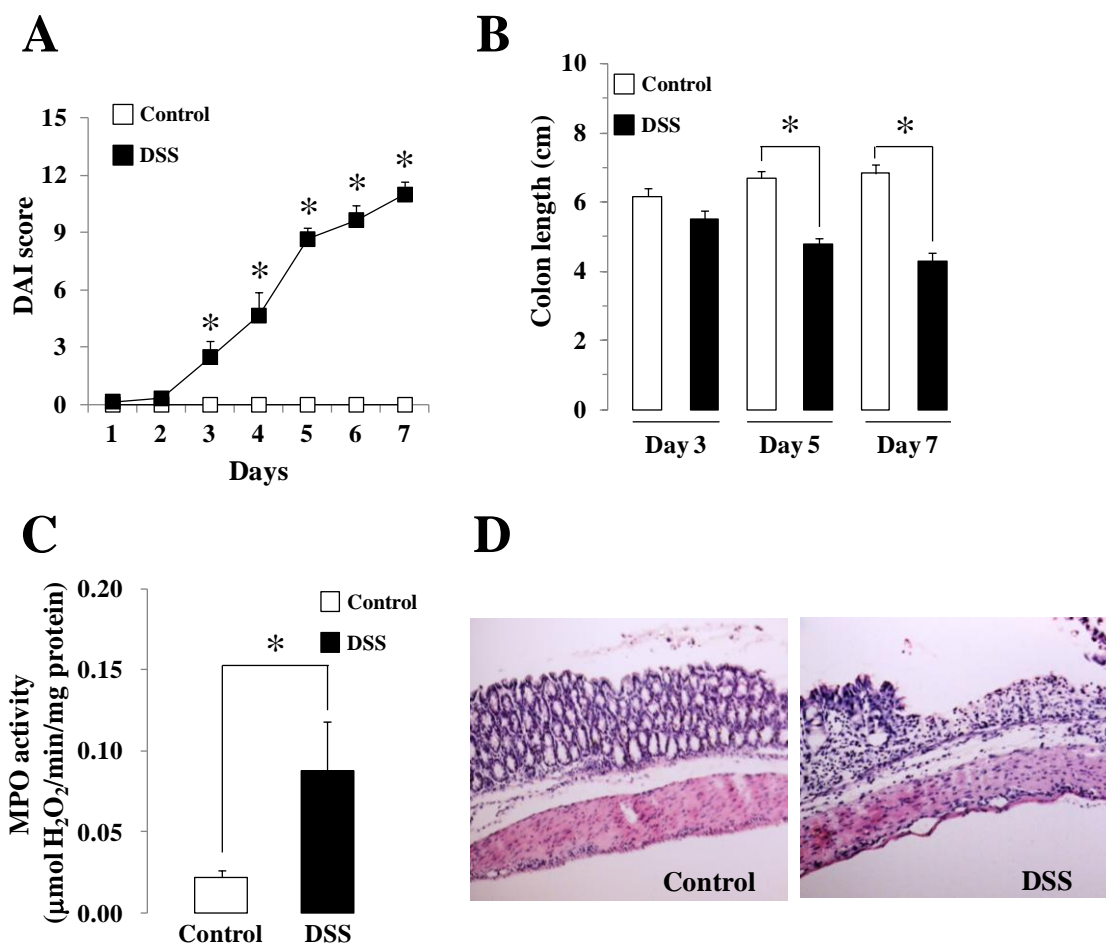


Fig. 3. Changes in DAI score (A), colon length (B), MPO activity (C), and histological evaluation (D) during DSS-induced colitis. Experimental colitis was induced by feeding animals 5% DSS in drinking water for 7 days. Histological evaluation was performed using hematoxylin and eosin staining (magnification, 100 \times), and representative histological images are shown (D). Data are presented as the mean values \pm S.E. for 5–6 mice per group. The significance of differences was evaluated using Student's t-test or Mann-Whitney U-test (*, $p < 0.05$ versus control).

第2節 潰瘍性大腸炎モデルマウスの大腸、小腸および肝臓 における炎症性マーカーの mRNA 発現量の変化

第1節では、DSS 誘発潰瘍性大腸炎モデルマウスを構築した。そこで本節では、経時的かつ組織ごとの炎症反応を明らかにすることを目的として、DSS 摂取開始後 3、5 および 7 日目に、マウスから大腸、肝臓および小腸を摘出し、それぞれの組織における炎症性マーカー (tumor necrosis factor (TNF) - α 、interleukin (IL) -1 β 、IL-6、cyclooxygenase (COX) -2 および inducible nitric oxide synthase (iNOS)) の mRNA 発現量を検討した。

第1項 実験材料および試薬調製方法

1-1. 使用動物

本章第1節と同様の方法で作成した DSS 誘発潰瘍性大腸炎モデルマウスを使用した。

1-2. 実験材料

- 1) RNA 安定化液 : RNA lator[®] Solution [Applied Biosystems]
- 2) RNA 抽出用キット : RNeasy[®] Mini Kit [QIAGEN]
- 3) 逆転写反応キット : Rever Tra Ace[®] qPCR RT kit [TOYOBO]
- 4) Real-time PCR キット : THUNDERBIRD[™] SYBR[®] qPCR Mix [TOYOBO]
- 5) RNase Free Water [タカラバイオ株式会社]
- 6) PCR 用 primer [ライフテクノロジーズジャパン株式会社に合成依頼]

第 2 項 実験方法および統計学的処理

2-1. 大腸、小腸および肝臓からの全 RNA の抽出

滅菌水あるいは 5%DSS 摂取開始後 3、5 および 7 日目、エーテル麻酔下にマウスから大腸、小腸および肝臓を摘出した。さらに、小腸は部位ごとの特異性を検討するため、既報³⁷⁾を参考に幽門部から回腸末端部までを 3 等分して小腸上部、小腸中部および小腸下部とした。摘出した組織は氷冷した生理食塩液で洗浄後、重量を測定した。その後、RNA 分解を防ぐため、組織重量の 10 倍量の RNA lator[®] Solution 中に保存した。全 RNA は、各組織から RNeasy[®] Mini Kit を用いて添付されたプロトコールに従って抽出した。全 RNA の濃度および純度は ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies) で測定し、全 RNA 濃度が 200 ng/μL となるように RNase Free Water で希釈して以下の実験に使用した。

2-2. 逆転写反応による cDNA の合成

逆転写反応は ReverTraAce[®] qPCR RT Kit を用いて行った。200 ng/μL に調製した全 RNA を 65°C で 5 分間加熱後、氷上で急冷した。全 RNA 8 μL に Kit 付属の 5×RT Buffer (Reaction Buffer、MgCl₂ および dNTPs) 4 μL、Enzyme Mix (ReverTraAce[®] および RNase inhibitor) 1 μL、Primer Mix (Random Primer および Oligo (dt) Primer) 1 μL を加え、RNase Free Water で全量を 20 μL とした。これをサーマルサイクラー (ASTEC) で 37°C 15 分、98°C 5 分で逆転写反応を行い、cDNA を調製した。

2-3. Real-time PCR 法による目的遺伝子の cDNA 定量

逆転写反応により得られた cDNA 2 μL に THUNDERBIRD[™] SYBR[®] qPCR Mix 12.5 μL、目的遺伝子増幅用 primer (上流 primer と下流 primer の混合液) 1.5 μL を加え、RNase Free Water で全量を 25 μL とした。これを Thermal Cycler Dice[®] Real Time System Single (TaKaRa) で 95°C 60 秒加熱後、95°C 15 秒、60°C 45 秒の反応を 40 サイクル行い、DNA を増幅した。なお、内在性コントロール遺伝子として β-actin を用い、β-actin および目的遺伝子の増幅用 primer は既報をもとに作製した (Table 3)。目的遺伝子の mRNA 発現量は目的遺伝子と β-actin の threshold cycle (Ct) 値の差をもとに比較相対定量した³⁸⁾。

Table 3. Primer sequences used in this study

Gene	Forward sequence (5'-3')	Reverse sequence (5'-3')	References
TNF- α	CCACCACGCTCTTCTGTCTAC	AGGGTCTGGGCCATAGAACT	39)
IL-1 β	CAACCAACAAGTGATATTCTCCATG	GATCCACACTCTCCAGCTGCA	40)
IL-6	CTGGAGTCACAGAAGGAGTGG	GGTTTGCCGAGTAGATCTCAA	41)
COX-2	GAAGTCTTTGGTCTGGTGCCTG	GTCTGCTGGTTTGGAATAGTTGC	42)
iNOS	CAGCTGGGCTGTACAAACCTT	CATTGGAAGTGAAGCGTTTCG	43)
β -actin	AGAGGGAAATCGTGCGTGAC	CAATAGTGATGACCTGGCCGT	43)

2-4. 統計学的処理

目的遺伝子の mRNA 発現量は、コントロール群を 1 として、DSS 群のそれを相対比で示し、一群 4–9 匹から得られた値の平均±標準誤差で表示した。統計学的解析は SPSS version 20.0 (IBM) を使用し、Student's t-test を用いて $p < 0.05$ の場合に有意であると判定した。

第3項 結果

DSS 群の大腸では、コントロール群と比較して DSS 摂取開始後 3 日目より TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、COX-2、iNOS の mRNA 発現量の有意な上昇が認められた。この反応は DSS 摂取開始後 5 日目に最大に達し、7 日目では低下する傾向にあった (Fig. 4A)。肝臓では、TNF- α の発現量の有意な上昇が DSS 摂取開始後 3 日目および 5 日目に認められ、IL-6 の mRNA 発現量は、3 日目および 7 日目において有意な上昇が見られた。IL-1 β の mRNA 発現上昇は 3 日目から認められ、7 日目まで持続した。DSS 摂取開始後 7 日目の肝臓において、これらの炎症性マーカーの発現量はコントロール群と比較しておよそ 2.1–3.5 倍有意に上昇していた (Fig. 4B)。

小腸上部および小腸中部では、DSS 摂取開始後 5 日目まで炎症性マーカーの上昇は認められなかった (Fig. 4C、4D)。7 日目の小腸上部および小腸中部において、iNOS の mRNA 発現量が上昇し、小腸上部においては有意差を認めた (Fig. 4C、4D)。一方、小腸下部では、DSS 摂取期間を通じてコントロール群と比較して炎症性マーカーの mRNA 発現量に変化は見られなかった (Fig. 4E)。

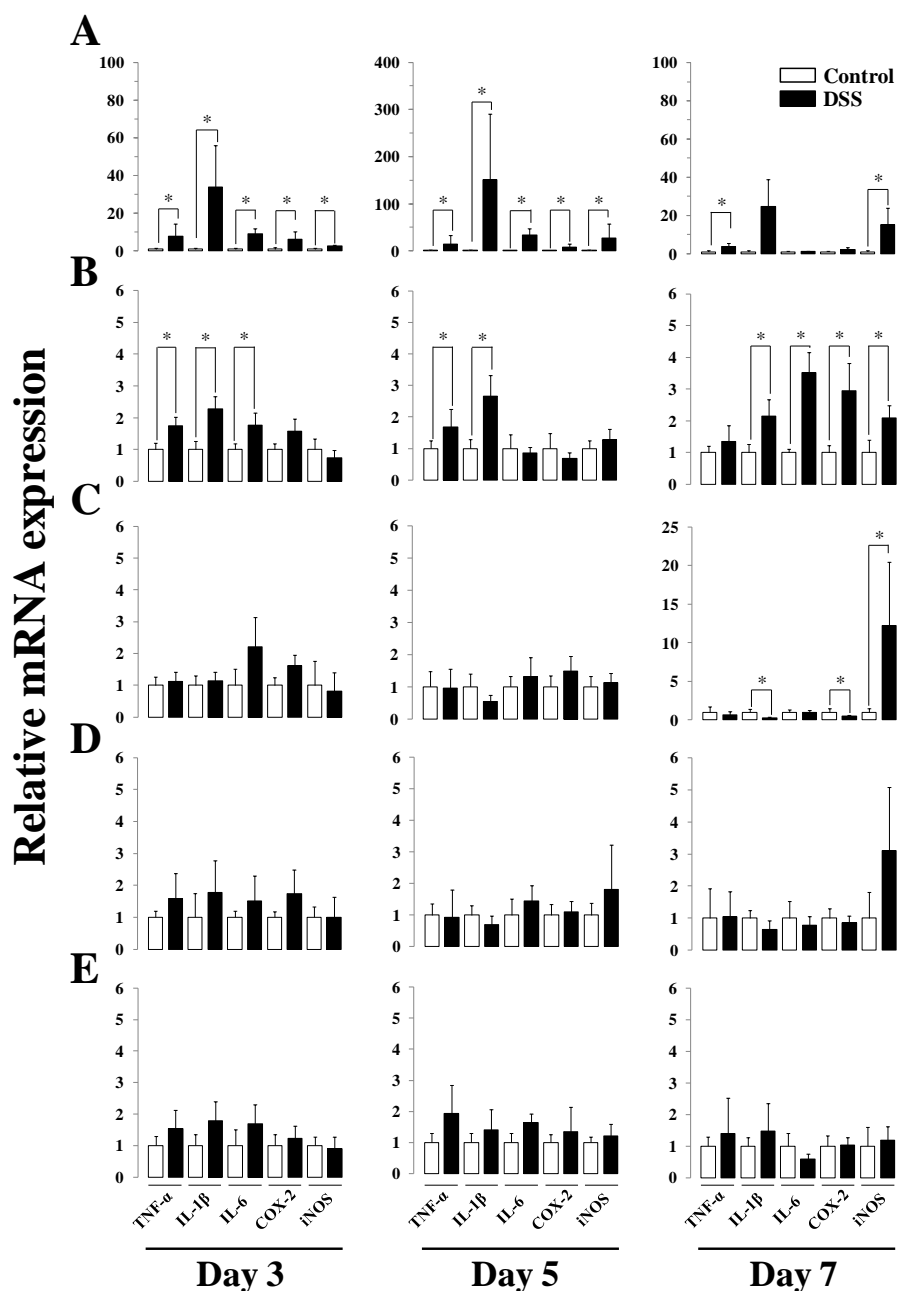


Fig. 4. Expression of inflammatory marker mRNAs in the colon, liver, and small intestines in mice with DSS-induced colitis. Total RNA was extracted from the colon (A), liver (B), and 3 sections of the small intestine: upper (C), middle (D), and lower (E). Expression levels of inflammatory markers mRNAs were determined by real-time PCR. The reported mRNA levels represent the ratio of DSS-treated versus control (control = 1). Data are presented as the mean values \pm S.E. for 4–9 mice per group. White columns represent expression in control mice, and black columns represent expression in DSS-treated mice. *Significantly different from the control at $p < 0.05$.

第 3 節 潰瘍性大腸炎モデルマウスの小腸上部および肝臓 における CYP3A および P-gp の発現量の変化

DSS 誘発潰瘍性大腸炎モデルマウスの肝臓では、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、COX-2 および iNOS の mRNA 発現量が上昇した。一方、小腸上部では iNOS の mRNA 発現上昇ならびに IL-1 β および COX-2 の mRNA の発現量の低下が認められた (第 2 節)。

そこで本節では、炎症性マーカーの発現上昇が認められた肝臓および小腸上部において薬物代謝および排泄過程の中心的役割を担う CYP3A および P-gp に着目し、これらの mRNA およびタンパク質発現量の変化を明らかにする目的で検討を行った。

第 1 項 実験材料および試薬調製方法

1-1. 使用動物

本章第 1 節と同様の方法で作成した DSS 誘発潰瘍性大腸炎モデルマウスを使用した。

1-2. 実験材料

- 1) PCR 用 primer [ライフテクノロジーズジャパン株式会社に合成依頼]
- 2) プロテアーゼ阻害剤カクテル [ナカライテスク株式会社]
- 3) 40% アクリルアミド/ビス混合液 (37.5 : 1) [ナカライテスク株式会社]
- 4) 分離ゲル調製用緩衝液 (4 倍濃縮) [ナカライテスク株式会社]
- 5) 濃縮ゲル調製用緩衝液 (4 倍濃縮) [ナカライテスク株式会社]
- 6) ペルオキシソニ硫酸アンモニウム溶液 [和光純薬工業株式会社]
- 7) N,N,N,N-テトラメチルエチレンジアミン (TEMED) [ナカライテスク株式会社]
- 8) プレステインドタンパク質マーカー [ナカライテスク株式会社]
- 9) Magic MarkTM XP Western Protein Standard [Invitrogen]
- 10) Western blot 用 PVDF 製メンブラン : Clear Blot Membrane-P plus [ATTO]
- 11) ブロッキング buffer : Ezfast Blot [ATTO]

- 12) Polyoxyethylene Sorbitan Monolaurate (Tween-20) [ナカライテスク株式会社]
- 13) Can Get Signal[®] Immunoreaction Enhancer Solution [TOYOBO]
- 14) β -actin (13E5) Rabbit mAb [Cell Signaling]
- 15) Anti-P-glycoprotein Mouse mAb (C219) [Calbiochem]
- 16) Anti-CYP3A goat polyclonal Ab (L-14) [SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY]
- 17) ECL Anti-Rabbit IgG, Horseradish Peroxidase-Linked Species-Specific Whole Antibody [GE Healthcare]
- 18) ECL Anti-Mouse IgG, Horseradish Peroxidase-Linked Species-Specific Whole Antibody [GE Healthcare]
- 19) Donkey Anti-goat IgG-HRP [SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY]
- 20) ECL Prime blocking agent [GE Healthcare]
- 21) Chemi-Lumi One Super [ナカライテスク株式会社]

その他の試薬は本章第 2 節第 1 項 1-2 と同様のものを使用した。

1-3. 試薬調製方法

- 1) ミクロソーム画分用ホモジネート緩衝液
10 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.2)、1.15%KCl となるように超純水に溶解し、プロテアーゼ阻害剤カクテルを 1%となるように添加した。
- 2) 膜画分用ホモジネート緩衝液
50 mM Tris-HCl (pH 7.4)、250 mM sucrose となるように超純水に溶解し、プロテアーゼ阻害剤カクテルを 1%となるように添加した。
- 3) 膜画分懸濁用緩衝液
50 mM Tris-HCl (pH 7.4)、50 mM mannitol となるように超純水に溶解し、プロテアーゼ阻害剤カクテルを 1%となるように添加した。
- 4) 10 \times SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) 緩衝液
250 mM Tris、19.2 M glycine、1%SDS になるように超純水で 1 L に調製した。使用時に超純水で 10 倍希釈して用いた (1 \times SDS-PAGE 用緩衝液)。
- 5) 20 \times TBS 溶液
200 mM Tris、2 M NaCl になるように超純水で溶解し、1 L とした。

6) TBS-T 溶液

20×TBS 溶液を超純水で 20 倍に希釈し、0.5%となるように Tween-20 を添加した。

7) 1×EzFast Blot 溶液

EzFast Blot 溶液を超純水で 10 倍希釈して使用した。

8) 4×サンプル緩衝液

1 M Tris-HCl (pH 6.8) 2 mL、2- mercaptoethanol 2.4 mL、glycerol 4 mL を混合し、SDS 0.8 g、bromophenol blue 0.16 g を加え、超純水で 10 mL になるように調製した。

第 2 項 実験方法および統計学的処理

2-1. 小腸上部および肝臓からの全 RNA の抽出

本章第 2 節第 2 項 2-1 と同様に操作した。

2-2. 逆転写反応による cDNA の合成

本章第 2 節第 2 項 2-2 と同様に操作した。

2-3. Real-time PCR 法による目的遺伝子の cDNA 定量

本章第 2 節第 2 項 2-3 と同様に操作した。CYP3A および P-gp の遺伝子として、CYP3A11 (ヒト CYP3A4 と相同性が高いマウス CYP3A 遺伝子) および *mdr1a* (マウス P-gp 遺伝子) を使用した。なお、 β -actin および目的遺伝子の増幅用 primer は既報をもとに作製した (Table 4)。

Table 4. Primer sequences used in this study

Gene	Forward sequence (5'-3')	Reverse sequence (5'-3')	References
CYP3A11	GGATGAGATCGATGAGGCTCTG	CAGGTATTCCATCTCCATCACAGT	44)
<i>mdr1a</i>	GTGGGGGACAGAAACAGAGA	GAACGGTAGACAAGCGATGAG	45)
β -actin	AGAGGGAAATCGTGCGTGAC	CAATAGTGATGACCTGGCCGT	43)

2-4. ミクロソーム画分および膜画分の調製

滅菌水あるいは5%DSS摂取開始後3、5および7日目、エーテル麻酔下にマウスから小腸上部および肝臓を摘出した。摘出した組織は氷冷した生理食塩液で洗浄後、重量を測定した。小腸上部および肝臓のミクロソーム画分の調製は、組織重量1gあたりミクロソーム画分用ホモジネート緩衝液を4mLを加え、氷冷しながらガラスホモジナイザーにより均質化した。均質化した溶液は10,000×g、20分間、4°Cで遠心分離し、上清を超遠心用チューブに回収した。得られた上清は105,000×g、60分間、4°Cで遠心分離後に上清を除去し、ペレットに100mMリン酸緩衝液(pH7.4)を加えて懸濁したものをミクロソーム画分とした。

小腸上部の膜画分の調製は既報に準じて行った²³⁾。すなわち、組織重量1gあたり膜画分用ホモジネート緩衝液を6mLを加え、氷冷しながらガラスホモジナイザーにより均質化した。均質化した溶液は3,000×g、10分間、4°Cで遠心分離し、上清をチューブに回収した。得られた上清は15,000×g、30分間、4°Cで遠心分離後に上清を除去し、ペレットに懸濁用緩衝液を加えて懸濁したものを膜画分とした。ミクロソーム画分溶液および膜画分溶液中のタンパク質量は、BCA protein assay Kitを用いて測定し、使用時まで-80°Cで保存した。

2-5. ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (SDS-PAGE)

ミクロソーム画分溶液および膜画分溶液のタンパク質量をそれぞれ100μgおよび115.5μgに調整し、これらの溶液24.7μLに4×サンプル緩衝液を8.3μL加えて混和し、100°C、5分間加熱後、氷冷して電気泳動用サンプルとした。

6%–10%アクリルアミドゲルを1×SDS-PAGE用緩衝液を満たした泳動槽

(ATTO)に固定し、調製した電気泳動用サンプルを添加(ミクロソーム画分:10μL、膜画分:20μL)し、ゲル1枚当たり20mAの一定電流で80分間電気泳動した。また、タンパク質の分子量を確認するため、同時にタンパク質分子量マーカーであるプレステインドタンパク質マーカーおよびMagic Mark™ XP Western Protein Standardをそれぞれ泳動した。

2-6. Western blot 法

電気泳動終了後、ゲルを泳動装置から取り出し、1×EzFast Blot 溶液中で 5 分間振盪した。PVDF メンブレンはメタノール中で 30 秒間振盪した後、1×EzFast Blot 中で 30 分間以上振盪した。転写装置 (ATTO) にあらかじめ 1×EzFast Blot に浸しておいたブロッキング用濾紙 (ATTO) 3 枚を乗せ、その上に PVDF メンブレンを置き、その上にゲルを乗せた。さらにブロッキング用濾紙 3 枚を乗せ、ゲル 1 枚当たり 100 mA の一定電流で 60 分間通電した。転写終了後、PVDF メンブレンを TBS-T 溶液で 5 分間、3 回振盪しながら洗浄した。その後、1% ECL Prime blocking agent 含有 TBS-T 溶液内に浸し、ブロッキングを行った。ブロッキング終了後、PVDF メンブレンを TBS-T 溶液で 5 分間、3 回振盪しながら洗浄し、Can Get Signal[®] Immunoreaction Enhancer Solution で希釈した抗体を用いて以下の条件で抗体反応を実施した (Table 5)。抗体反応後、PVDF メンブレンを TBS-T 溶液で 5 分間、3 回振盪しながら洗浄した。その後、PVDF メンブレンを Chemi-Lumi One Super に浸して HRP による化学発光反応を Image Quant LAS 4000 (GE Healthcare Bioscience) を用いて検出した。発光強度は Image Quant LAS 4000 (GE Healthcare Bioscience) を用いて数値化し、CYP3A および P-gp の β -actin に対する比をそれぞれの発現量として定量化した。

Table 5. The conditions of the antibody reaction in this study

	Primary antibody	Secondary antibody
β -actin	Rabbit monoclonal (1:1000) 1 h at room temperature	Anti-Rabbit IgG (1:10000) 1 h at room temperature
CYP3A	Goat polyclonal (1:350) over night at 4°C	Anti- Goat IgG (1:5000) 1 h at room temperature
P-gp	Mouse monoclonal (1:100) over night at 4°C	Anti-Mouse IgG (1:10000) 1 h at room temperature

2-7. 統計学的処理

目的遺伝子の mRNA 発現量は、コントロール群を 1 として、DSS 群のそれを相対比で示し、データは一群 4-5 匹から得られた値の平均±標準誤差で表示した。CYP3A および P-gp のタンパク質発現量は、 β -actin に対する比をそれぞれの発現量として定量化した。DSS 群における CYP3A および P-gp のタンパク質発現量は、コントロール群に対する相対比とし、データは一群 4 匹から得られた値の平均値±標準誤差として表示した。統計学的解析は SPSS version 20.0 (IBM) を使用し、Student's t-test を用いて $p < 0.05$ の場合に有意であると判定した。

第 3 項 結果

DSS 群の肝臓では、摂取開始後 3 日目にコントロール群に比べ CYP3A11 の mRNA 発現量が 65.0% 低下した。その後、CYP3A11 の発現量は経日的に減少し、7 日目では 96.0% 低下した (Fig. 5A)。mdr1a の発現量には両群間で差は認められなかった (Fig. 5A)。同様に、DSS 群では CYP3A のタンパク質発現が低下し、摂取開始後 5 日目および 7 日目ではコントロール群に比べ、それぞれ 60.0% および 62.7% 低下した (Fig. 6A)。

小腸上部では、摂取開始後 5 日目まで両群間に CYP3A11 および mdr1a の mRNA 発現量に違いは認められず、7 日目においてのみコントロール群に比べて DSS 群では CYP3A11 および mdr1a の mRNA 発現量がそれぞれ 94.0% および 53.0% 低下した (Fig. 5B)。さらに、DSS 群ではコントロール群に比べ DSS 摂取開始後 7 日目において、CYP3A および P-gp のタンパク質発現量はそれぞれ 47.3% および 61.1% 低下した (Fig. 6B)。

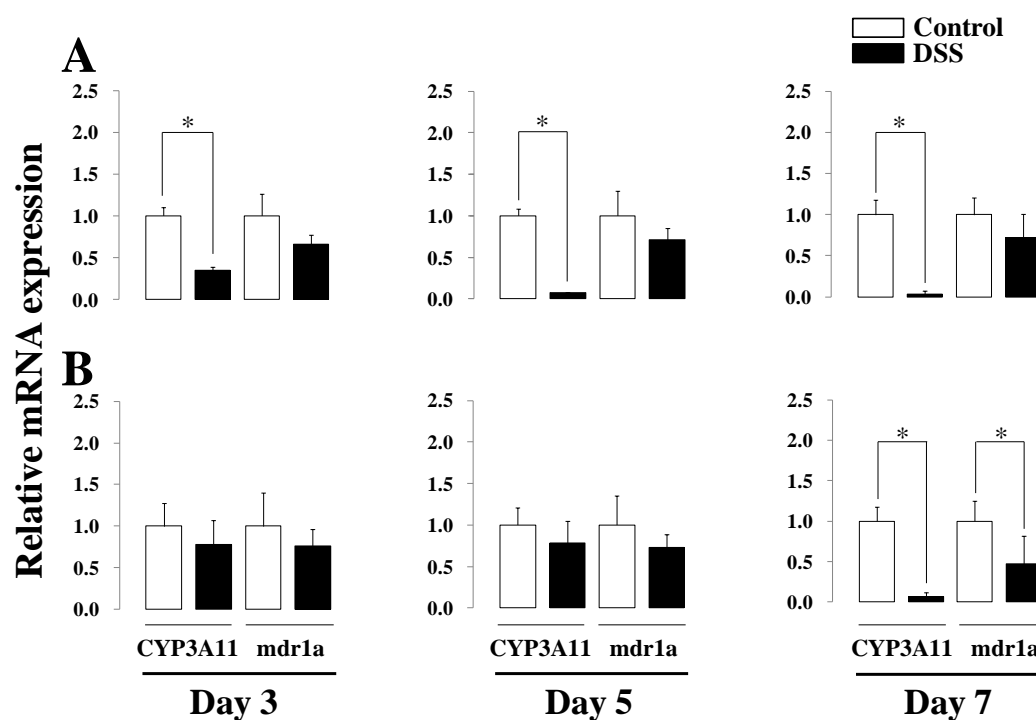


Fig. 5. Decreased expression of CYP3A11 and mdr1a mRNAs in the liver and upper small intestine of mice with DSS-induced colitis. Animals were sacrificed on days 3, 5, and 7 during administration of DSS or water. Total RNA was extracted from the liver (A) and upper small intestine (B). Expression levels of CYP3A11 and mdr1a mRNAs were determined by real-time PCR. The reported mRNA levels represent the ratio of DSS-treated versus control (control = 1). Data are presented as the mean values \pm S.E. for 4–5 mice per group. White columns represent expression in control mice, and black columns represent expression in DSS-treated mice. *Significantly different from the control at $p < 0.05$.

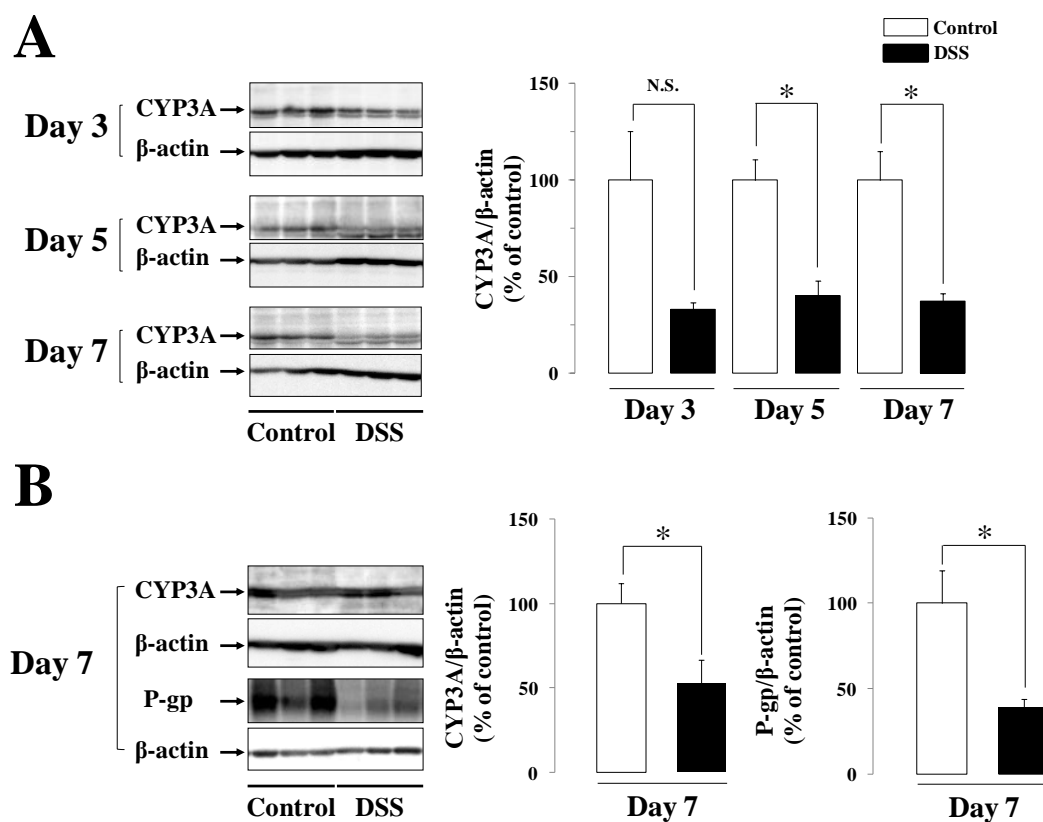


Fig. 6. Down-regulation of CYP3A and P-gp in the liver and upper small intestine of mice with DSS-induced colitis. Hepatic CYP3A protein levels were examined on days 3, 5, and 7 during administration of DSS or water (A). In the upper small intestine, CYP3A and P-gp protein levels were analyzed on day 7 after DSS treatment (B). The protein levels of CYP3A (55 kDa) and P-gp (170 kDa) were determined by western blotting. Densitometric quantification of CYP3A and P-gp was performed, and expression values were normalized to those of β -actin (45 kDa) as a loading control. Representative blots of four independent experiments are shown. Data are presented as the mean values \pm S.E. for 4-5 mice per group. White columns represent expression in control mice, and black columns represent expression in DSS-treated mice. *Significantly different from the control at $p < 0.05$. N. S.: not significant.

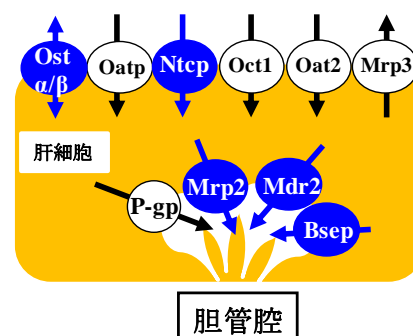
第4節 潰瘍性大腸炎モデルマウスにおける胆汁分泌の変動

DSS 誘発潰瘍性大腸炎モデルマウスにおいて、大腸では摂取開始後3日目から TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、COX-2 および iNOS の mRNA 発現量が上昇し、肝臓でも類似の反応が認められた (第2節)。さらに、肝臓では CYP3A の mRNA およびタンパク質の発現量が低下していた (第3節)。一方、小腸上部では摂取開始後7日目に iNOS の mRNA 発現量の上昇、CYP3A と P-gp の mRNA およびタンパク質の発現量の低下が認められた (第2節および第3節)。つまり小腸上部では、大腸や肝臓とは異なる機序で炎症反応が生じている可能性が考えられる。

肝臓と小腸は胆汁分泌を介して密接に関係している。そこで著者は、炎症による肝機能低下により胆汁排泄が変化し、その結果小腸に炎症反応が波及するのではないかという仮説をたて、胆汁輸送に着目した。肝細胞に発現する胆汁輸送に関連するトランスポーターは、血液から肝細胞内への取り込みと肝細胞内から胆汁中への排泄に関わる2つに大別され、それぞれ胆汁の主成分である胆汁酸、リン脂質およびビリルビンの輸送を担っている (Fig. 7)。マウスにおいて前者には sodium taurocholate cotransporting polypeptide (Ntcp) および organic solute transporter (Ost) α/β があり、後者としては bile salt export pump (Bsep)、multidrug resistance 2 (Mdr2) および multidrug resistance-associated protein 2 (Mrp2) が知られている⁴⁶⁻⁴⁸⁾。

本節では、これらトランスポーターの mRNA 発現量を検討し、さらにそれらの機能評価を行うために血清および小腸管腔内の胆汁酸とリン脂質の濃度を測定した。

トランスポーター	肝細胞での局在	主な基質
Bsep	毛細胆管側膜	bile acid
Mrp2	毛細胆管側膜	bilirubin
Mdr2	毛細胆管側膜	phospholipids
Ntcp	側底膜	bile acid
Ost α/β	側底膜	bile acid



本節での検討対象を青色で表示
参考文献 8, 46-48)を一部改変して引用

Fig. 7. Localization and substrate of the major hepatobiliary transporters in mouse liver.

第 1 項 実験材料および試薬調製方法

1-1. 使用動物

本章第 1 節と同様の方法で作成した DSS 誘発潰瘍性大腸炎モデルマウスを使用した。

1-2. 実験材料

- 1) Total Bile Acid Assay [コスモ・バイオ株式会社]
- 2) リン脂質 C-テストワコー [和光純薬工業株式会社]
- 3) PCR 用 primer [ライフテクノロジーズジャパン株式会社に合成依頼]

その他の試薬は本章第 2 節第 1 項 1-2 と同様のものを使用した。

第 2 項 実験方法および統計学的処理

2-1. 肝臓からの全 RNA の抽出

本章第 2 節第 2 項 2-1 と同様に操作した。

2-2. 逆転写反応による cDNA の合成

本章第 2 節第 2 項 2-2 と同様に操作した。

2-3. Real-time PCR 法による目的遺伝子の cDNA 定量

本章第 2 節第 2 項 2-3 と同様に操作した。なお、 β -actin および目的遺伝子の増幅用 primer は既報をもとに作製した (Table 6)。

Table 6. Primer sequences used in this study

Gene	Forward sequence (5'-3')	Reverse sequence (5'-3')	References
Bsep	CAATGTTTCAGTTCCTCCGTTCA	TCTCTTTGGTGTGTGCCCCATA	49)
Mdr2	CTTCCTTCAGGGCTTCACGTT	ACCAGCTCATGTCCTGCCTTAG	49)
Mrp2	ACTATCGCACACAGGCTGCAC	GGGACCCATATTGGACAGCA	49)
Ntcp	ACTGGCTTCCTGATGGGCTAC	GAGTTGGACGTTTTGGAATCCT	49)
Ost α	GTCTCAAGTGATGAACTGCCA	TTGAGTGCTGAGTCCAGGTC	48)
Ost β	GTATTTTCGTGCAGAAGATGCG	TTTCTGTTTGCCAGGATGCTC	48)
β -actin	AGAGGGAAATCGTGCGTGAC	CAATAGTGATGACCTGGCCGT	43)

2-4. 血清中のAST、ALT、胆汁酸および総ビリルビン濃度の測定

滅菌水あるいは5%DSS摂取開始後7日目、エーテル麻酔下にマウス下大静脈から採血した。採取した血液は、 $3,500 \times g$ 、5分間、室温で遠心分離し、血清をチューブに回収した。得られた血清中のAST、ALT、胆汁酸および総ビリルビン濃度は、三菱化学メディエンス株式会社に測定を依頼した。

2-5. 小腸管腔内の胆汁酸およびリン脂質の濃度測定

小腸管腔内に分泌された胆汁は、滅菌水および5%DSS水溶液摂取開始後3、5および7日目に小腸上部を摘出し、その管腔内を生理食塩液（大塚製薬）1mlで洗浄することで回収した。この胆汁中の胆汁酸濃度およびリン脂質濃度は、Total Bile Acid Assayおよびリン脂質C-テストワコーをそれぞれ用いて測定した。

2-6. 統計学的処理

目的遺伝子のmRNA発現量は、コントロール群を1として、DSS群のそれを相対比で示し、データは一群4–8匹から得られた値の平均±標準誤差で表示した。AST、ALT、胆汁酸、総ビリルビンおよびリン脂質の濃度は、一群3–4匹から得られた値の平均±標準偏差で表示した。統計学的解析はSPSS version 20.0（IBM）を使用し、Student's t-testを用いて $p < 0.05$ の場合に有意であると判定した。

第3項 結果

3-1. DSS 誘発潰瘍性大腸炎モデルにおける肝胆汁輸送関連トランスポーターの mRNA 発現量の変化

DSS 摂取後の肝胆汁輸送関連トランスポーターの mRNA 発現量の経時的変化を Fig. 8 に示す。DSS 群では、コントロール群と比較して Bsep および Mdr2 の mRNA 発現量の有意な低下が摂取開始後 5 日目から認められ、Mrp2 の発現量は、3 日目および 7 日目において有意な低下が見られた。DSS 摂取開始後 7 日目では、Bsep、Mdr2、Mrp2 および Ntcp の mRNA 発現量はコントロールのそれと比べ 54.0%–71.0% 低下していた。一方、Osta/ β の発現量は DSS 摂取期間を通じて有意な変化は見られなかった。

3-2. 血清中の AST、ALT、胆汁酸および総ビリルビンの濃度変化

DSS 群の血清中 AST および ALT 濃度は、コントロール群と比較して約 2 倍に上昇していた。一方、胆汁酸および総ビリルビンの血清中濃度は、DSS 群とコントロール群において有意な違いは認められなかった (Table 7)。

3-3. 小腸管腔内の胆汁酸およびリン脂質の濃度変化

DSS 摂取開始後 3、5 および 7 日目の小腸上部管腔内の胆汁酸およびリン脂質の濃度は、コントロール群と比較していずれも低下する傾向を示し、摂取開始後 5 日目のリン脂質濃度は DSS 群において有意な低下が認められた。一方、胆汁酸/リン脂質の濃度比率は、DSS 摂取により増加する傾向にあり、5 日目では DSS 群で有意な増加を認めた (Table 8)。

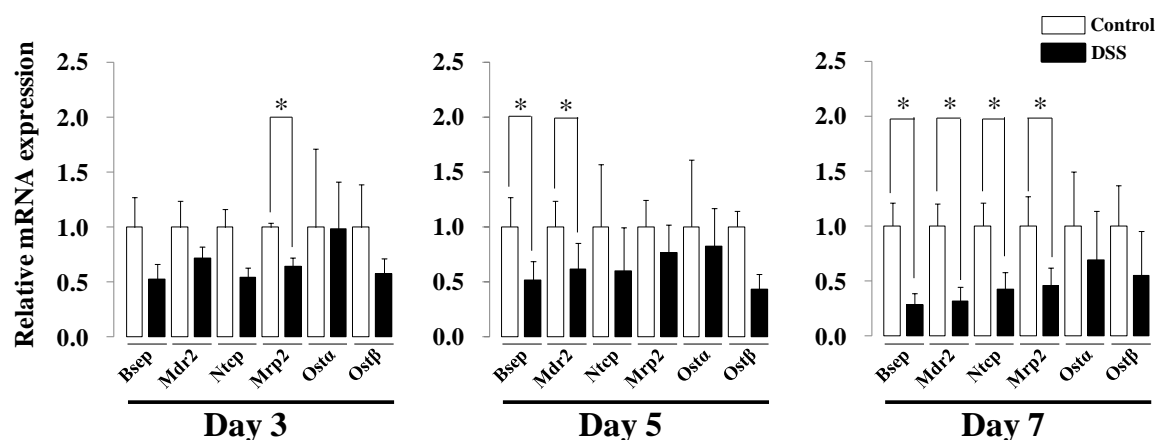


Fig. 8. Decreased expressions of hepatobiliary transporter mRNAs in mice with DSS-induced colitis. After 3, 5, and 7 days of treatment with DSS or water, total RNA was extracted from the livers of mice. Expression levels of Bsep, Mdr2, Mrp2, Ntcp, and Ost α/β mRNAs were determined by real-time PCR. The reported mRNA levels represent the ratio of DSS-treated versus control (control = 1). Data are presented as the mean values \pm S.E. for 4–8 mice per group. White columns represent expression in control mice, and black columns represent expression in DSS-treated mice. *Significantly different from the control at $p < 0.05$.

Table 7. The concentrations of AST, ALT, bile acid, and total bilirubin in serum

Biochemical parameters	Control	DSS
AST (U/L)	96.3 \pm 22.3	186.7 \pm 16.8*
ALT(U/L)	24.7 \pm 5.7	50.7 \pm 11.4*
Bile acid (μ mol/L)	2.27 \pm 0.12	1.93 \pm 0.24
Total bilirubin (mg/dL)	<0.1	<0.1

Data are presented as the mean values \pm S.D. for 3–4 mice per group. *Significantly different from the control at $p < 0.05$.

Table 8. The concentrations of bile acid and phospholipids in upper small intestinal lumen

	Day 3		Day 5		Day 7	
	Control	DSS	Control	DSS	Control	DSS
Bile acid ($\mu\text{mol/L}$)	104.5 \pm 8.4	89.1 \pm 8.5	150.7 \pm 6.8	122.5 \pm 18.1	93.7 \pm 6.2	62.0 \pm 27.3
Phospholipids ($\mu\text{mol/L}$)	1804.0 \pm 646.6	1040.3 \pm 170.5	2340.0 \pm 218.0	915.5 \pm 137.5*	2849.8 \pm 369.8	1885.0 \pm 1193.5
Bile acid / phospholipid ratio	0.067 \pm 0.029	0.087 \pm 0.010	0.065 \pm 0.008	0.134 \pm 0.002*	0.034 \pm 0.006	0.055 \pm 0.042

Data are presented as the mean values \pm S.D. for 3–4 mice per group. *Significantly different from the control at $p < 0.05$

第 5 節 潰瘍性大腸炎モデルマウスの小腸および肝臓における核内受容体の mRNA およびタンパク質発現量の変化

本章第 3 節において、DSS 誘発潰瘍性大腸炎モデルマウスの肝臓では CYP3A の mRNA およびタンパク質発現量が低下し、小腸上部では CYP3A および P-gp の mRNA およびタンパク質発現量の低下が認められた。

また、本章第 4 節では DSS 群の肝臓において肝胆汁輸送関連トランスポーターである Bsep、Mdr2、Mrp2 および Ntcp の mRNA 発現量が低下していることを明らかにした。

CYP3A、P-gp、Bsep および Mrp2 の転写調節には、核内受容体である pregnane X receptor (PXR)、constitutive androstane receptor (CAR) および farnesoid X receptor (FXR) が関与することが明らかとなっている^{47,50,51)}。通常、PXR、CAR および FXR は細胞質に存在しており、リガンドと結合することで核内へ移行し、retinoid X receptor α (RXR α) とヘテロ二量体を形成することで標的遺伝子の転写が行われる⁴⁷⁾ (Table 9)。

そこで本節では、肝臓および小腸上部における CYP3A、P-gp、Bsep および Mrp2 の mRNA の発現低下の機序を明らかにするために、PXR、CAR、FXR および RXR α の mRNA およびタンパク質発現量の変化を検討した。

Table 9. Transcription factors and their target genes

Transcription factors	Dimer with	Target genes
PXR	RXR α	Mdr1, Mrp2, CYP3A
CAR	RXR α	Mrp2
FXR	RXR α	Bsep, Mrp2

参考文献 47)を一部改変して引用

第1項 実験材料および試薬調製方法

1-1. 使用動物

本章第1節と同様の方法で作成したDSS誘発潰瘍性大腸炎モデルマウスを使用した。

1-2. 実験材料

- 1) PCR用 primer [ライフテクノロジーズジャパン株式会社に合成依頼]
- 2) Nonidet[®] P-40 (NP-40) [ナカライテスク株式会社]
- 3) 2NA (EDTA 2Na) [DOJINDO]
- 4) Anti-PXR goat polyclonal Ab (R-14) [SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY]
- 5) Anti-FXR goat polyclonal Ab (Q-20) [SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY]
- 6) Anti-Histone H3 goat polyclonal Ab (C-16) [SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY]
- 7) Donkey Anti-goat IgG-HRP [SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY]

その他の試薬は本章第2節第1項1-2および本章第3節第1項1-2と同様のものを使用した。

1-3. 試薬調製方法

1) 細胞膜破砕用緩衝液

10 mM Tris-HCl (pH 7.4)、10 mM KCl、1.5 mM MgCl₂、0.1% NP-40 となるように超純水に溶解し、プロテアーゼ阻害剤カクテルを1%となるように添加した。

2) 核抽出用緩衝液

20 mM Tris-HCl (pH 7.4)、500 mM NaCl、1.5 mM MgCl₂、0.2 mM EDTA、20% glycerin となるように超純水に溶解し、プロテアーゼ阻害剤カクテルを1%となるように添加した。

第 2 項 実験方法および統計学的処理

2-1. 小腸上部および肝臓からの全 RNA の抽出

本章第 2 節第 2 項 2-1 と同様に操作した。

2-2. 逆転写反応による cDNA の合成

本章第 2 節第 2 項 2-2 と同様に操作した。

2-3. Real-time PCR 法による目的遺伝子の cDNA 定量

本章第 2 節第 2 項 2-3 と同様に操作した。なお、 β -actin および目的遺伝子の増幅用 primer は既報をもとに作製した (Table 10)。

Table 10. Primer sequences used in this study

Gene	Forward sequence (5'-3')	Reverse sequence (5'-3')	References
PXR	GATGGAGGTCTTCAAATCTGCC	GGCCCTTCTGAAAAACCCCT	52)
CAR	CAGGGTTCCAGTACGAGTTTTTG	AGGCTCCTGGAGATGCAGTC	53)
FXR	GGAACTCCGGACATTCAAC	GTGTCCATCACTGCACATC	49)
RXR α	CGGAACAGCGCTCACAGT	AGCTCCGTCTTGTCCATCTG	54)
β -actin	AGAGGGAAATCGTGCGTGAC	CAATAGTGATGACCTGGCCGT	43)

2-4. 細胞質画分および核画分の調製

滅菌水あるいは 5%DSS 摂取開始後 7 日目、エーテル麻酔下にマウスから小腸上部および肝臓を摘出した。摘出した組織は氷冷した生理食塩液で洗浄後、重量を測定した。細胞質画分の調製は、組織重量 1 g あたり細胞膜破碎用緩衝液を 4 mL を加え、氷冷しながらガラスホモジナイザーにより均質化した。均質化した溶液を氷中で 10 分間静置した後、 $2,000 \times g$ 、10 分間、 4°C で遠心分離し、上清を細胞質画分として回収した。余分な上清を除去し、ペレットに細胞膜破碎用緩衝液 500 μL を加えて懸濁後、 $2,000 \times g$ 、10 分間、 4°C で遠心分離し、上清を除去した。この操作を計 3 回繰り返した後、得られたペレットに核抽出用緩衝液を加え懸濁し、氷中で 30 分間静置した。その後、十分に攪拌を行い、 $13,000 \times g$ 、20 分間、 4°C で遠心分離し、上清を核画分として回収した。細胞質画分溶液および核画分溶液中のタンパク質量は、BCA protein assay Kit を用いて測定し、使用時まで -80°C で保存した。

2-5. ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (SDS-PAGE)

細胞質画分溶液および核画分溶液のタンパク質量をそれぞれ 100 μg に調整し、これらの溶液 24.7 μL に 4 \times sample buffer を 8.3 μL 加えて混和し、 100°C 、5 分間加熱後、氷冷して電気泳動用サンプルとした。8%–15%アクリルアミドゲルを 1 \times SDS-PAGE 用緩衝液を満たした泳動槽 (ATTO) に固定し、調製した電気泳動用サンプルを添加 (細胞質画分 : 10 μL 、核画分 : 10 μL) し、ゲル 1 枚当たり 20 mA の一定電流で 80 分間電気泳動した。また、タンパク質の分子量を確認するため、同時にタンパク質分子量マーカーであるプレステインドタンパク質マーカーおよび Magic MarkTM XP Western Protein Standard をそれぞれ泳動した。

2-6. Western blot 法

本章第 3 節第 2 項 2-6 と同様に操作した。なお、抗体反応は以下の条件で実施した (Table 11)。細胞質画分および核画分の内部標準として、 β -actin および Histone H3 を用い、発光強度は Image Quant LAS 4000 (GE Healthcare Bioscience) を用いて定量化した。

Table 11. The conditions of the antibody reaction in this study

	Primary antibody	Secondary antibody
PXR (cytosolic)	Goat polyclonal (1:500) 1 h at room temperature	Anti- Goat IgG (1:5000) 1 h at room temperature
PXR (nuclear)	Goat polyclonal (1:500) 1 h at room temperature	Anti- Goat IgG (1:5000) 1 h at room temperature
FXR (cytosolic)	Goat polyclonal (1:500) 1 h at room temperature	Anti- Goat IgG (1:5000) 1 h at room temperature
FXR (nuclear)	Goat polyclonal (1:500) over night at 4°C	Anti- Goat IgG (1:5000) 1 h at room temperature
β -actin	Rabbit monoclonal (1:1000) 1 h at room temperature	Anti-Rabbit IgG (1:10000) 1 h at room temperature
Histone H3	Goat polyclonal (1:500) 1 h at room temperature	Anti- Goat IgG (1:10000) 1 h at room temperature

2-7. 統計学的処理

目的遺伝子の mRNA 発現量は、コントロール群を 1 として、DSS 群のそれを相対比で示し、データは一群 7-9 匹から得られた値の平均±標準誤差で表示した。PXR および FXR のタンパク質発現量は、 β -actin あるいは Histone H3 に対する比をそれぞれの発現量として定量化した。DSS 群における PXR および FXR のタンパク質発現量は、コントロール群に対する相対比とし、データは一群 3-4 匹から得られた値の平均値±標準誤差として表示した。統計学的解析は SPSS version 20.0 (IBM) を使用し、Student's t-test を用いて $p < 0.05$ の場合に有意であると判定した。

第3項 結果

DSS 群の肝臓では、PXR および FXR の mRNA 発現量はコントロール群に比べてそれぞれ 49.0% および 71.0% 低下し、統計学的に有意差が認められた。CAR および RXR α の mRNA 発現量は両群間に差は認められなかった (Fig. 9A)。一方、小腸上部では、コントロール群と DSS 群間でこれらの核内受容体の mRNA 発現量に違いは見られなかった (Fig. 9B)。

次に、肝臓において mRNA 発現量の低下が認められた PXR および FXR の細胞質および核内におけるタンパク質発現量を検討した。細胞質における PXR および FXR のタンパク質発現量は、DSS 群とコントロール群で違いは認められなかった (Fig. 10)。一方、核内でのタンパク質発現量は、DSS 群において PXR および FXR とともに減少が観察され、それぞれコントロール群と比較して 76.6% および 77.8% 低下していた (Fig. 10)。

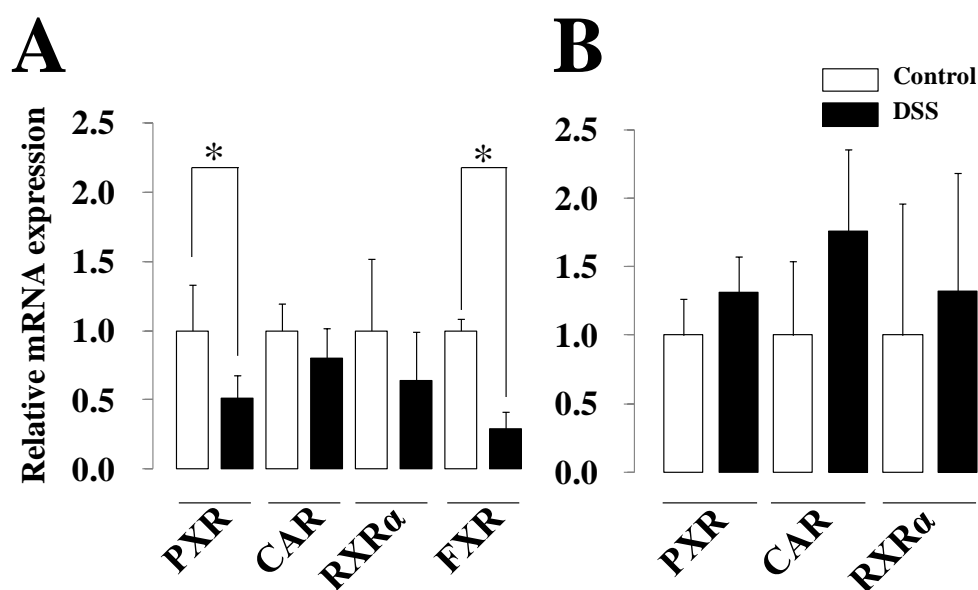


Fig. 9. Changes in the expression of nuclear receptor mRNAs in the liver and upper small intestine of mice with DSS-induced colitis. Total RNA was extracted from the liver (A) and upper small intestine (B) on day 7 during treatment with DSS or water. Expression levels of PXR, CAR, RXR α , and FXR mRNAs were determined by real-time PCR. The reported mRNA levels represent the ratio of DSS-treated versus control (control = 1). Data are presented as the mean values \pm S.E. for 7–9 mice per group. White columns represent expression in control mice, and black columns represent expression in DSS-treated mice. *Significantly different from the control at $p < 0.05$.

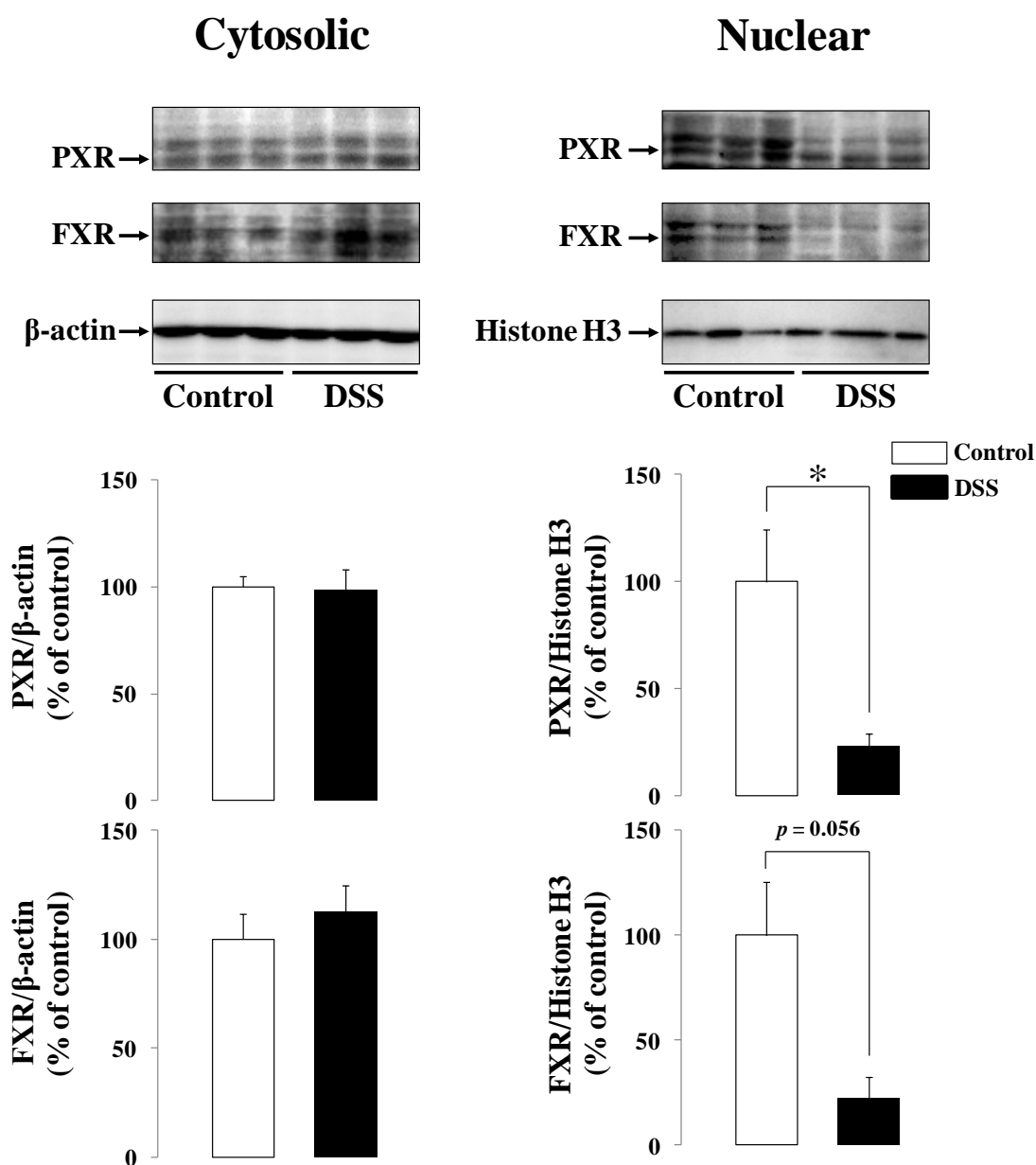


Fig.10. Changes in cytosolic and nuclear levels of nuclear receptor in the liver of mice with DSS-induced colitis. In the liver, cytosolic or nuclear protein extracts were determined by western blotting for PXR (50 kDa) and FXR (69 kDa). Densitometric quantification of PXR and FXR was performed, and expression values were normalized to those of β -actin (45 kDa) or histone H3 (15 kDa) as a loading control. Data are presented as the mean values \pm S.E. for 3–4 mice per group. White columns represent expression in control mice, and black columns represent expression in DSS-treated mice. *Significantly different from the control at $p < 0.05$.

第 6 節 潰瘍性大腸炎モデルマウスにおける CsA の血中濃度変化

本章第 3 節では、DSS 摂取開始後 7 日目において、肝臓では CYP3A の mRNA およびタンパク質発現量が低下し、小腸上部では CYP3A および P-gp の mRNA およびタンパク質発現量が低下していることを明らかにした。

本節では CYP3A および P-gp の基質、且つ潰瘍性大腸炎の臨床上的治療薬である CsA を用い、これらの因子の発現低下が薬物動態へ及ぼす直接的な影響を評価することを目的とした。マウスでは、CsA の血中濃度は投与後 60 分後に最大に達することが報告されており⁵⁵⁾、著者らも予備検討において同様の結果を得た。

そこで、潰瘍性大腸炎モデルマウスにおいて小腸および肝臓を通過して循環血液中に移行する吸収過程での CsA の血中濃度変化を検討した。

第 1 項 実験材料および試薬調製方法

1-1. 使用動物

本章第 1 節と同様の方法で作成した DSS 誘発潰瘍性大腸炎モデルマウスを使用した。

1-2. 実験材料

- 1) ネオーラル[®]内用液 10% (シクロスポリン, CsA) [ノバルティスファーマ]
- 2) Emit[®]2000 Cyclosporine Specific Assay [SIEMENS]
- 3) Emit[®]2000 Cyclosporine Specific Calibrators [SIEMENS]
- 4) 測定用前処理液 : Emit[®]2000 Cyclosporine Pretreatment Reagent [SIEMENS]

1-3. 試薬調製方法

- 1) 1 mg/mL CsA 溶液

ネオーラル[®]内用液 10% を超純水で 1000 倍に希釈して 0.1 mg/mL 溶液を調製した。

第 2 項 実験方法および統計学的処理

2-1. 全血中の CsA 濃度測定

DSS または滅菌水の摂取開始後 7 日目、非絶食下のマウスに 0.1 mg/mL の CsA 溶液を 10 mL/kg の用量で経口投与した。エーテル麻酔下に CsA 投与 30 分および 60 分後に、下大静脈より全血を採取した。全血 100 μ L に測定用前処理液 300 μ L を加えて十分に混和した後、室温で 2 分間静置した。その後、10,000 \times g、4 分間、室温で遠心分離し、上清中の CsA 濃度を Viva-E analyzer (Siemens Healthcare Diagnostics) および Emit[®]2000 Cyclosporine Specific Assay を用いて enzyme multiplied immunoassay technique (EMIT) 法により測定した。

2-2. 統計学的処理

データは、一群 3 匹から得られた値の平均 \pm 標準偏差で表示した。統計学的解析は SPSS version 20.0 (IBM) を使用し、Student's t-test を用いて $p < 0.05$ の場合に有意であると判定した。

第 3 項 結果

DSS 群ではコントロール群に比べ、投与後 30 分および 60 分における CsA の血中濃度は増加していた。投与 60 分後の血中濃度は、コントロール群および DSS 群でそれぞれ 57.6 ± 10.4 ng/mL および 102.5 ± 12.8 ng/mL であり、DSS 群において CsA の血中濃度の有意な増加が認められた (Fig. 11)。

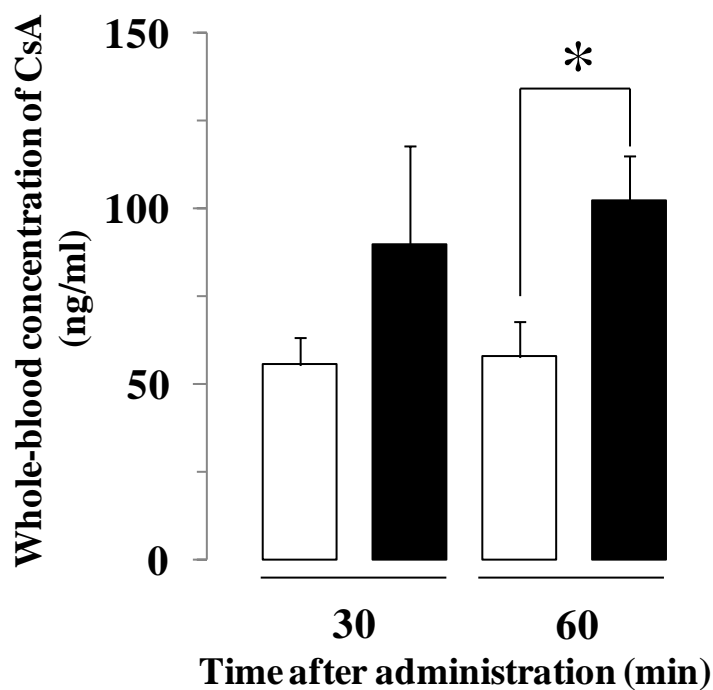


Fig. 11. Changes in the whole-blood concentration of CsA in mice with DSS-induced colitis. CsA was orally administered at a dose of 1 mg/kg on day 7 during treatment with DSS or water. Blood samples were collected at 30 and 60 min after the administration of CsA. Data are presented as the mean values \pm S.D. for 3 mice per group. White columns are shown as control mice, and black columns are shown as DSS-treated mice. *Significantly different from the control at $p < 0.05$.

第7節 考察

本章では、炎症性腸疾患時の肝臓および小腸における薬物代謝酵素と薬物トランスポーターの発現変化ならびにその調節機構、さらに薬物動態への影響を解明することを目的とした。そこで著者は、DSS 誘発潰瘍性大腸炎モデルマウスを用いて、肝臓および小腸における CYP3A および P-gp の発現変化とそれに影響を及ぼす因子の探索を実施し、さらに両因子の基質であり臨床上的治療薬でもある CsA の血中濃度変化を検討した。

DSS 誘発潰瘍性大腸炎モデルでは、大腸粘膜へのびらんや潰瘍形成、炎症性細胞の浸潤と炎症性サイトカインの上昇、下痢、血便および体重減少など、ヒトにおける潰瘍性大腸炎の病態を反映することが報告されている³⁰⁻³²⁾。本研究においても、マウスに 5%DSS 水溶液を 7 日間飲水させることにより DAI スコアの上昇および大腸粘膜への炎症性細胞浸潤を認めた。さらに、DSS 群の大腸において TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、COX-2 および iNOS の mRNA 発現が上昇し、既報通り実験的大腸炎モデルが構築できることを確認した。

DSS 群の大腸では摂取開始後 3 日目より、コントロール群と比較して TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、COX-2、iNOS の mRNA 発現量の有意な上昇が認められ、この反応は 5 日目に最大に達した。また、肝臓においても同様に、3 日目より TNF- α 、IL-1 β および IL-6 の mRNA 発現量の上昇が認められた。このように大腸と肝臓では、DSS 摂取後に上昇する炎症性マーカーの種類と上昇時期が類似していた。さらに、DSS 群では血清中の AST および ALT 濃度の上昇が見られた。潰瘍性大腸炎患者では、門脈を介して腸内細菌由来成分が大腸から肝臓へ移行することが報告されており^{56,57)}、門脈血清中のエンドトキシンおよび IL-6 の濃度上昇が大腸炎モデル動物で確認されている^{58,59)}。すなわち、DSS 誘発潰瘍性大腸炎モデルでは、病巣部である大腸から門脈を介して肝臓に腸内細菌由来成分のエンドトキシンおよび炎症性サイトカインが移行し、肝臓での炎症反応が惹起された可能性が考えられる。

一方小腸では、DSS 摂取開始後 7 日目に小腸上部において iNOS の mRNA 発現上昇のみが認められた。DSS は負の電荷を有する高分子化合物であり、小腸からは殆んど吸収されないことが知られている⁶⁰⁾。さらに、DSS により誘発さ

れる大腸炎は、DSSの大腸粘膜への直接的な障害により引き起こされることが報告されている³⁰⁾。本研究では、DSS摂取開始後7日目の小腸上部を除き、小腸において炎症性マーカーの発現変化は見られなかった。つまり、小腸上部でのiNOSの発現上昇は、少なくともDSSによる直接的な影響ではない可能性を示している。

肝胆道系と小腸は、胆管と門脈を介した胆汁成分の分泌と再吸収を担う腸肝循環によって密接に関連している。そこで著者は、DSS摂取により誘発される肝障害が胆汁排泄に影響を及ぼし、その結果小腸上部に炎症反応が波及すると考え検討を行った。DSS群では、摂取開始後3日目または5日目から胆汁の主成分である胆汁酸、リン脂質およびビリルビンの輸送を担うBsep、Mdr2およびMrp2のmRNA発現の減少および小腸上部内のリン脂質の濃度低下が認められた。これらの変化は、肝臓での炎症性マーカーの発現上昇と同時期に生じており、TNF- α 、IL-1 β およびIL-6がBsep、Mdr2、Mrp2およびNtcpのmRNA発現を低下させるという報告とも一致している⁶¹⁻⁶³⁾。胆汁酸は、胆汁成分として小腸上部から小腸管腔内に分泌され、通常はリン脂質とミセルを形成して存在している。しかし、このミセル形成に異常が生じた場合、胆汁酸の界面活性作用による組織障害が引き起こされることが知られている^{64,65)}。本研究では、DSS群の小腸上部において胆汁酸/リン脂質の濃度比率の増大が認められた。すなわち、DSS誘発潰瘍性大腸炎モデルマウスでは、胆汁酸とリン脂質の濃度比率に変化が生じ、これが小腸上部における二次的な炎症反応を引き起こしている可能性が考えられた。一方、血清中の胆汁酸および総ビリルビンの濃度は、DSS群とコントロール群間に違いはなく、Bsep、Mdr2およびMrp2の発現低下は、小腸内への胆汁排泄の低下という局所的な障害を反映するもので、胆汁鬱滞などの全身性の機能障害にまでは至っていないことが明らかとなった。

炎症マーカーの発現上昇が認められた肝臓および小腸上部において、CYP3A、P-gpのmRNAおよびタンパク質発現量を検討した。肝臓では、DSS摂取開始後3日目あるいは5日目からCYP3AのmRNAおよびタンパク質発現量の有意な低下が見られ、小腸上部では、7日目においてCYP3AおよびP-gpのmRNAおよびタンパク質発現量の低下が認められた。また、肝臓および小腸上部でのCYP3AおよびP-gpの発現低下は、それぞれの部位での炎症性マーカーの発現

上昇時期と一致していた。

CYP3A、P-gp、Bsep および Mrp2 の転写調節には、核内受容体である PXR、CAR、FXR および RXR α が重要な役割を担っていることが知られている^{50,51)}。炎症時には、サイトカインがこれらの核内受容体の核内でのタンパク質発現量や核細胞質間移行に影響を及ぼすことが報告されている^{63,66,67)}。DSS 群の肝臓では、PXR および FXR の mRNA 発現低下が見られた。さらに、PXR および FXR のタンパク質発現量は DSS 群とコントロール群において細胞質では違いが認められなかったが、核内では DSS 群においてタンパク質発現量の低下が認められた。すなわち、本研究結果からは CYP3A、Bsep および Mrp2 の発現低下は、PXR および FXR の核内でのタンパク質発現量の低下に起因すると考えられ、その機序には肝臓で発現上昇が認められた TNF- α 、IL-6 および IL-1 β が関与する可能性が示唆された。

小腸上部では、DSS 摂取開始後 7 日目に CYP3A および P-gp の発現量の低下が認められたが、PXR、CAR および RXR α の mRNA 発現量はコントロール群と比較して変化は認められなかった。これより、肝臓と小腸では CYP3A および P-gp の発現調節機序が異なる可能性が考えられた。また、DSS 群の小腸上部では、CYP3A および P-gp の発現低下と iNOS の mRNA 発現上昇の時期が一致していた。iNOS 由来の nitric oxide (NO) は活性酸素との反応により細胞傷害性を有するペルオキシナイトライト (ONOO⁻) などの活性窒素種を産生する。これまでに、CYP2B および P-gp のタンパク質の分解は、活性窒素種による直接的な作用により促進されることが報告されている^{68,69)}。つまり、肝臓と小腸上部では、CYP3A および P-gp の発現調節機序が異なり、それは各部位で発現が認められる炎症性マーカーの違いに起因している可能性が考えられた。今後は、炎症性刺激に伴う CYP3A および P-gp の発現低下機序に関して、培養細胞を用いたより詳細な検討が必要であると思われる。

CYP3A および P-gp の発現低下が薬物動態へ及ぼす直接的な影響を評価するため、これらの基質で、且つ潰瘍性大腸炎の臨床上的治療薬である CsA の血中濃度を検討した。DSS 群では、コントロール群と比べ投与 60 分後の CsA の血中濃度は有意に高値を示した。一般的に、CsA の生物学的利用能は肝臓および小腸に発現する CYP3A および P-gp により主に調節されていることがよく知ら

れている^{70,71)}。本研究では、DSS 摂取開始後 7 日目において、肝臓では CYP3A の発現が低下し、小腸上部では CYP3A および P-gp の発現低下が認められている。すなわち、これらの結果は肝臓および小腸上部での CYP3A および P-gp の活性低下が CsA の代謝と排泄過程に影響を及ぼし、CsA の血中濃度が上昇したことを示唆している。本研究では、投与後 60 分までの CsA の吸収過程における血中濃度を評価した。今後は、本モデルにおける CsA のより詳細な薬物動態変動を明らかにするため、投与後 60 分以降の消失過程における CsA の血中濃度を評価する必要があると思われる。

以上、DSS 誘発潰瘍性大腸炎モデルマウスでは、大腸での炎症が肝臓および小腸上部に二次的に波及し、炎症性マーカーの発現上昇と関連して CYP3A および P-gp の発現低下が認められることを明らかにした。さらに、その結果として CsA の薬物動態が変動する可能性を見出した。本研究結果は潰瘍性大腸炎における CsA の臨床使用に有用な情報を提供するものと考えられる。

第8節 小括

DSS 誘発潰瘍性大腸炎モデルマウスを構築し、肝臓および小腸への炎症反応の波及と薬物代謝機能変動の解明を試み、以下の結果を得た。

1. 肝臓では DSS 摂取開始後 3 日目より TNF- α 、IL-1 β および IL-6 の mRNA 発現量の上昇が認められた。7 日目では、炎症性マーカーの発現に加えて血清中の AST および ALT 濃度の上昇が観察された。
2. 小腸上部では、DSS 摂取開始後 7 日目に iNOS の mRNA 発現の上昇が認められた。
3. 肝臓では DSS 摂取開始後 3 日目から CYP3A の mRNA およびタンパク質発現量の低下が認められた。
4. 小腸上部では、DSS 摂取開始後 7 日目に CYP3A および P-gp の mRNA とタンパク質発現量の低下が認められた。
5. 肝臓から小腸へ炎症が波及する要因として、Bsep、Mdr2 および Mrp2 の発現減少による小腸内での胆汁酸およびリン脂質の濃度変化が関与する可能性を見出した。
6. 肝臓での CYP3A、Bsep および Mrp2 の発現低下は、核内受容体である PXR および FXR の核内でのタンパク質発現量の低下に起因する可能性を見出した。
7. CYP3A および P-gp の基質である CsA の経口投与後の血中濃度上昇を明らかにした。

第2章 NSAIDs 誘発小腸粘膜障害モデルの肝臓および小腸における CYP と P-gp の発現変動ならびに薬物吸収への影響

序論

NSAIDs は、解熱鎮痛効果を期待して関節リウマチ、変形性関節症、頭痛および腰痛などの様々な疾患に用いられる最も汎用されている薬剤の一つである。我が国では、超高齢社会の進行や OTC (over the counter) 薬としての普及により、NSAIDs 使用量の増加が予想されている。

NSAIDs による抗炎症作用は、COX 阻害作用に基づく炎症部位での prostaglandin E₂ (PGE₂) 産生抑制により発揮される⁷²⁾。しかし、同時に PGE₂ は消化管粘膜の恒常性を維持する重要な役割を担っており、NSAIDs の副作用として、びらん、潰瘍、出血および狭窄など重篤な消化管粘膜障害が引き起こされる。これまで、NSAIDs による消化管粘膜障害は胃および十二指腸潰瘍などの上部消化管障害が臨床および基礎的研究の対象として注目されてきた。一方、NSAIDs の下部消化管、特に小腸への影響に関しては簡便な検査方法がないために明らかにされてこなかった。近年、カプセル型内視鏡やバルーン小腸内視鏡の普及により、小腸においてもびらんや潰瘍が認められ、その発生頻度は 68–75% と上部消化管と同様に高率であることが明らかとなった⁷³⁾。また、NSAIDs による小腸粘膜障害は、上部消化管とは異なり酸分泌抑制剤では効果が期待できないために、新たな治療薬の開発が望まれている⁷⁴⁾。

NSAIDs による小腸粘膜障害は、口側の小腸上部よりも空腸および回腸に好発する⁷⁵⁾。その発症要因としては、粘膜中の PGE₂ 産生低下による小腸運動の亢進ならびに粘液分泌の低下により、腸内細菌の粘膜内侵入に伴い遊離される炎症性サイトカインや NO など炎症性メディエーターによる粘膜障害への関与が指摘されている^{76,77)}。

これまでに、TNF- α 、IL-6 および IL-1 β などの炎症性サイトカインが CYP および P-gp の mRNA およびタンパク質発現に影響することが数多く報告されている^{63,66)}。つまり、NSAIDs 誘発小腸粘膜障害では、障害部位での炎症反応により小腸での CYP および P-gp の発現に影響が生じている可能性が考えられる。しかし、NSAIDs による小腸粘膜障害が薬物の小腸での吸収、代謝および排泄に及ぼ

す影響に関してはほとんど報告されていない。

そこで著者は、インドメタシン (indomethacin: INM) 誘発小腸粘膜障害モデル動物を構築し (第1節)、小腸での CYP および P-gp の mRNA 発現量の変化に関して検討を行った (第3節)。また、DSS 誘発潰瘍性大腸炎モデルと同様に INM 誘発小腸粘膜障害モデルにおいても肝臓に二次的に炎症反応が波及するかどうかを評価するため、炎症性マーカーの mRNA 発現量の検討および血液生化学検査を実施した。さらに、肝臓における CYP および P-gp の mRNA 発現量の変化についても評価した (第2節および第3節)。小腸は、薬物代謝過程に加えて薬物吸収においても重要な役割を担っており、小腸粘膜障害による影響が懸念される。つまり、小腸粘膜障害による粘膜バリア機能の破綻は、薬物の予期しない吸収をもたらす可能性がある。そこで、消化管から吸収されないバンコマイシン塩酸塩 (vancomycin: VCM) の血漿中濃度を測定することで、薬物吸収への影響について検討を行った (第4節)。

第1節 INM 誘発小腸粘膜障害モデルの作成および評価

実験動物モデルでは、INM および diclofenac をラットに投与することで、ヒトの場合と同様に空腸および回腸に粘膜障害が惹起されることが報告されている^{78,79)}。また、INM 誘発ラット小腸粘膜障害モデルは、内因性 PGE₂ の産生低下による小腸運動亢進、粘液分泌低下、腸内細菌および好中球の粘膜内浸潤などの粘膜防御機能の脆弱化により粘膜障害を発症することから、ヒトでの病態を反映した実験モデルとして汎用されている^{80,81)}。

そこで、本節では Sprague-Dawley 系雄性ラットに INM を皮下投与し、小腸粘膜障害面積および炎症性マーカーの mRNA 発現量を検討することで、INM 誘発小腸粘膜障害モデルの構築を行った。

第1項 実験材料および試薬調製方法

1-1. 使用動物

Sprague-Dawley ラット（雄性、6 週齢）は日本クレア株式会社から購入した。このラットを動物実験施設において、室温 24±1℃、湿度 55±10% の条件下、12 時間の明暗サイクル（明期：午前 7 時 - 午後 7 時）で 1 週間予備飼育し、疾病の有無や健康状態を確認して実験に使用した。飼料は CE-2（日本クレア株式会社）を、飲水は濾過機を通した上水道水をいずれもラットに自由摂取させた。

1-2. 実験材料

- 1) Indomethacin [Sigma-Aldrich]
- 2) Polyoxyethylene Sorbitan Monooleate (Tween-80) [ナカライテスク株式会社]
- 3) 大塚生理食塩液 [大塚製薬]
- 4) Evans Blue [ナカライテスク株式会社]
- 5) RNA 安定化液：RNA lator[®] Solution [Applied Biosystems]
- 6) RNA 抽出用キット：RNeasy[®] Mini Kit [QIAGEN]
- 7) 逆転写反応キット：Rever Tra Ace[®] qPCR RT kit [TOYOBO]
- 8) Real-time PCR キット：THUNDERBIRD[™] SYBR[®] qPCR Mix [TOYOBO]

9) RNase Free Water [タカラバイオ株式会社]

10) PCR 用 primer [ライフテクノロジーズジャパン株式会社に合成依頼]

1-3. 試薬調製方法

1-3-1. 10 mg/5 mL INM 懸濁液

INM に Tween-80 を 20 μ L 加え、乳鉢で研磨した。その後、生理食塩液を少量ずつ加えて十分に混合して 10 mg/5 mL 溶液を調製した。

1-3-2. 1%Evans Blue 溶液

Evans Blue を超純水で 1%となるように溶解した。

第2項 実験方法および統計学的処理

2-1. INM による小腸潰瘍 (small intestine ulcer: SIU) の誘発

動物は無作為にコントロール群と INM 投与群に割り付け、小腸潰瘍は 10 mg/5 mL の INM 懸濁液を 5 mL/kg の用量で皮下投与することで惹起した。コントロール群には溶媒を投与した。INM 投与 24 時間後、エーテル麻酔下にラットに 1%Evans Blue 1 mL を大腿静脈より投与し、30 分後に第1章第2節第2項 2-1 と同様に胃幽門部から回腸末端部までを 3 等分して小腸上部、小腸中部および小腸下部を摘出した。摘出した腸管は 2% 中性緩衝ホルムアルデヒド液に浸して固定した。その後、それぞれの小腸組織を腸間膜の対側で切開し、実体顕微鏡下に潰瘍面積 (mm^2) を測定した。

2-2. 小腸からの全 RNA の抽出

前項と同様に、コントロール群および INM 群から、小腸上部、小腸中部および小腸下部の 3 つの部位を採取した。さらに、INM 群の各小腸部からは実体顕微鏡下で潰瘍部 (SIU) と非潰瘍部 (Non-SIU) に分けて組織を採取した。摘出した組織は氷冷した生理食塩液で洗浄後、重量を測定した。その後、RNA 分解を防ぐため、組織重量の 10 倍量の RNA lator[®] Solution 中に保存した。全 RNA は、各組織から RNeasy[®] Mini Kit を用いて添付されたプロトコールに従って抽出した。全 RNA の濃度および純度は ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop

Technologies)で測定し、全 RNA 濃度が 200 ng/ μ L となるように RNase Free Water で希釈して以下の実験に使用した。

2-3. 逆転写反応による cDNA の合成

第 1 章第 2 節第 2 項 2-2 と同様に操作した。

2-4. Real-time PCR 法による目的遺伝子の cDNA 定量

第 1 章第 2 節第 2 項 2-3 と同様に操作した。なお、 β -actin および目的遺伝子の増幅用 primer は既報をもとに作製した (Table 12)。

Table 12. Primer sequences used in this study

Gene	Forward sequence (5'-3')	Reverse sequence (5'-3')	References
iNOS	CAGGTGCTATTCCCAGCCCAACA	CATTCTGTGCAGTCCCAGTGAGGAA	82)
IL-1 β	CACCTCTCAAGCAGAGCACAG	GGGTTCCATGGTGAAGTCAAC	83)
IL-6	TCCTACCCCAACTTCCAATGCTC	TTGGATGGTCTTGGTCCTTAGCC	83)
TNF- α	AAATGGGCTCCCTCTCATCAGTTC	TCTGCTTGGTGGTTTGCTACGAC	83)
β -actin	GGTCCACACCCGCCACCAGTT	ACCCATACCCACCATCACACCCTG	82)

2-5. 統計学的処理

潰瘍面積は、一群 5-6 匹から得られた値の平均 \pm 標準誤差で表示した。目的遺伝子の mRNA 発現量は、コントロール群の小腸上部での発現量の平均値を 1 として相対比で示し、一群 6-11 匹から得られた個々の値とその平均値で表示した。統計学的解析は SPSS version 21.0 (IBM) を使用し、Tukey-Kramer test を用いて多重比較検定を行い、 $p < 0.05$ の場合に有意であると判定した。

第3項 結果

INM 投与群では、Evans Blue で濃く染色される粘膜障害が小腸全長で観察された (Fig. 12A)。小腸上部、小腸中部および小腸下部における潰瘍面積は、それぞれ 22.2 ± 5.1 、 18.5 ± 3.7 および $77.7 \pm 16.6 \text{ mm}^2$ であり、小腸下部では小腸上部および小腸中部と比較して潰瘍面積の有意な増加が認められた (Fig. 12B)。小腸下部の iNOS の mRNA 発現量は、潰瘍部では非潰瘍部と比較して有意な上昇を認めた。また、潰瘍部における iNOS の mRNA 発現量を比較したところ、小腸下部での発現量が最も高く、小腸上部との間に統計学的な有意差を認めた (Fig. 12C)。

小腸下部の潰瘍部における mRNA 発現量は、TNF- α は非潰瘍部に比べ上昇し、IL-1 β と IL-6 は非潰瘍部およびコントロールと比較して上昇を認めた (Fig. 13)。潰瘍部におけるこれらのサイトカインの mRNA 発現量を比較したところ、小腸上部、小腸中部、小腸下部の順に発現量が上昇する傾向にあり、IL-1 β では小腸上部および小腸中部と比較して小腸下部における発現量の有意な増加が認められた (Fig. 13)。コントロール群では、各小腸部位での TNF- α および IL-1 β の mRNA 発現量に違いは認められなかった (Fig. 13)。一方、コントロール群の小腸下部における IL-6 の mRNA 発現量は、小腸上部に比べて有意に低下していた (Fig. 13)。

これらの結果から、Sprague-Dawley 系雄性ラットに INM を皮下投与することにより、既報通り実験的小腸粘膜障害モデルが構築できることを確認した。

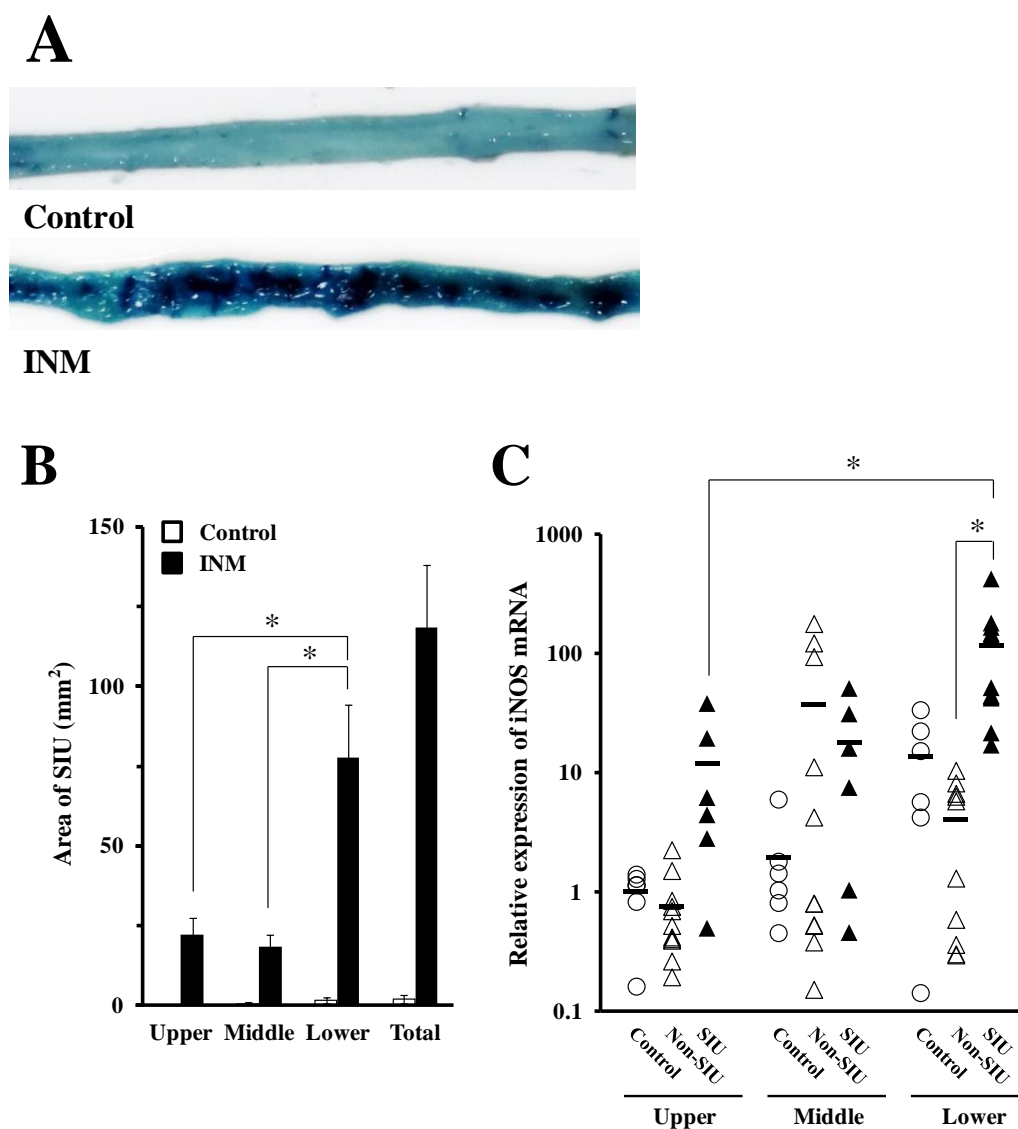


Fig. 12. Gross appearance of SIU(A), area of SIU (B) and intestinal expression of iNOS mRNA (C) in rats with INM-induced SIU. Animals were sacrificed 24 h after INM administration. (A) Gross appearance of SIU induced by INM. (B) Areas of SIU were microscopically assessed in control and INM-treated rats (open and closed columns, respectively). Data are presented as the mean values \pm S.E. for 5–6 rats per group. (C) Total RNA was extracted from the small intestine. The expression level of mRNA for iNOS was determined by real-time PCR. The data for mRNA expression in samples is expressed as the ratio to the mean value for iNOS mRNA in the upper intestine of the control group. Points represent individual data for control (open circle), non-SIU (open triangle), and SIU (closed triangle) groups, and bars represent the mean for 6–11 rats per group. * $p < 0.05$, statistically significant.

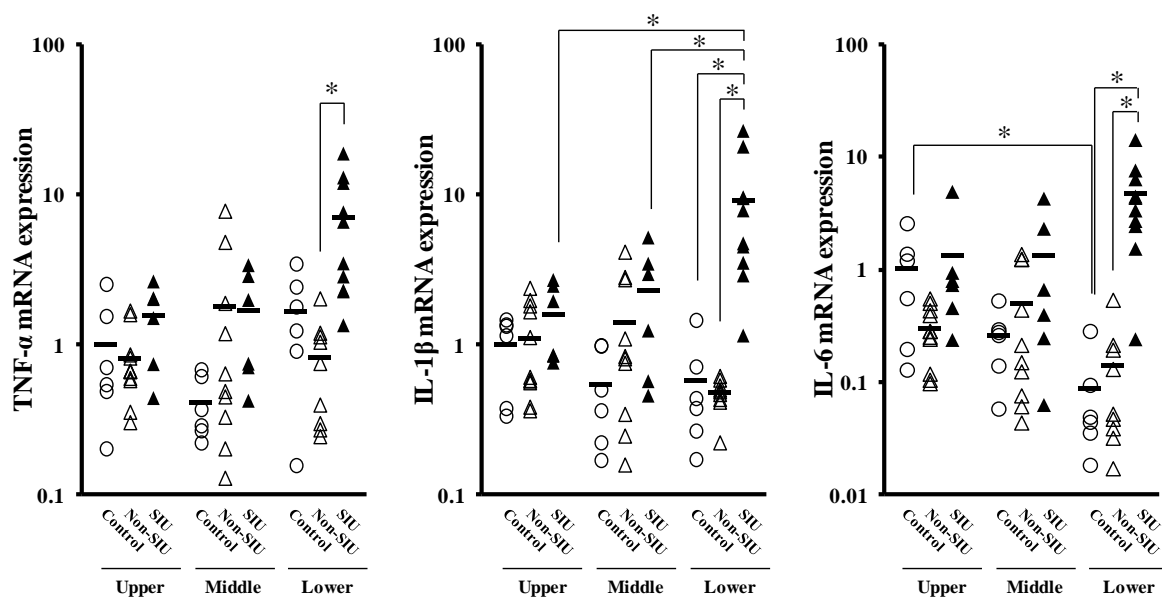


Fig. 13. Changes in mRNA expression of TNF- α , IL-1 β , and IL-6 in the small intestine of rats with INM-induced SIU. Animals were sacrificed 24 h after INM administration. Total RNA was extracted from the upper, middle, and lower small intestine. Expression levels of mRNAs for TNF- α , IL-1 β and IL-6 were determined by real-time PCR. The data for mRNA expression in samples for non-SIU and SIU groups (open and closed triangles, respectively) are expressed as the ratio to the mean value for each target gene in the upper intestine of the control group (open circle). Points represent individual data, and bars represent the mean for 6–11 rats per group. * $p < 0.05$, statistically significant.

第 2 節 INM 誘発小腸粘膜障害モデルラットにおける 肝機能の評価

第 1 節では、INM の皮下投与により、小腸潰瘍の形成および潰瘍部での炎症性マーカーの発現上昇が認められることを明らかにした。

そこで本節では、小腸粘膜障害モデルラットにおいて、肝臓に二次的に炎症反応が波及するかどうかを明らかにする目的で、肝臓における炎症性マーカーの mRNA 発現量を検討し、血清生化学検査により肝機能の評価した。

第 1 項 実験材料および試薬調製方法

1-1. 使用動物

本章第 1 節と同様の方法で作成した INM 誘発小腸粘膜障害モデルラットを使用した。

1-2. 実験材料

PCR 用 primer [ライフテクノロジーズジャパン株式会社に合成依頼]
その他の試薬は本章第 1 節第 1 項 1-2 と同様のものを使用した。

第 2 項 実験方法および統計学的処理

2-1. 肝臓からの全 RNA の抽出

溶媒あるいは 10 mg/kg INM を皮下投与 24 時間後、エーテル麻酔下にラットから肝臓を摘出した。摘出した肝臓は氷冷した生理食塩液で洗浄後、重量を測定した。その後、RNA 分解を防ぐため、組織重量の 10 倍量の RNA lator[®] Solution 中に保存した。全 RNA は、各組織から RNeasy[®] Mini Kit を用いて添付されたプロトコールに従って抽出した。全 RNA の濃度および純度は ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies) で測定し、全 RNA 濃度が 200 ng/μL となるように RNase Free Water で希釈して以下の実験に使用した。

2-2. 逆転写反応による cDNA の合成

第1章第2節第2項2-2と同様に操作した。

2-3. Real-time PCR 法による目的遺伝子の cDNA 定量

第1章第2節第2項2-3と同様に操作した。なお、 β -actin および目的遺伝子の増幅用 primer は第2章第1節第2項2-4と同じものを使用した。

2-4. 血清中の生化学的パラメーターの測定

溶媒あるいは 10 mg/kg INM を皮下投与 24 時間後、エーテル麻酔下にラット下大静脈から採血した。採取した血液は、 $3,500 \times g$ 、5 分間、室温で遠心分離し、血清をチューブに回収した。得られた血清中の総蛋白、アルブミン、AST、ALT、alkaline phosphatase (ALP) および総ビリルビンの濃度および albumin globulin ratio (A/G ratio) は、三菱化学メディエンス株式会社に測定を依頼した。

2-5. 統計学的処理

目的遺伝子の mRNA 発現量は、コントロール群の TNF- α の mRNA 発現量の平均値を 1 として相対比で示し、一群 6-11 匹から得られた個々の値とその平均値で表示した。血清中の生化学的パラメーターは、一群 5-6 匹から得られた値の平均 \pm 標準偏差で表示した。統計学的解析は SPSS version 21.0 (IBM) を使用し、Student's t-test を用いて $p < 0.05$ の場合に有意であると判定した。

第3項 結果

INM 投与群では、iNOS および TNF- α の mRNA 発現量はそれぞれ 5.5 および 4.4 倍にコントロール群と比較して増加していた。一方、IL-1 β および IL-6 の mRNA 発現量は両群間で違いは認められなかった (Fig. 14)。

血清中の総蛋白、アルブミン、A/G ratio、AST、ALT および ALP の濃度は、INM 投与群ではコントロール群と比較し有意に低下していた。一方、総ビリルビンの血清中濃度は、INM 投与群とコントロール群において有意な違いは認められなかった (Table 13)。

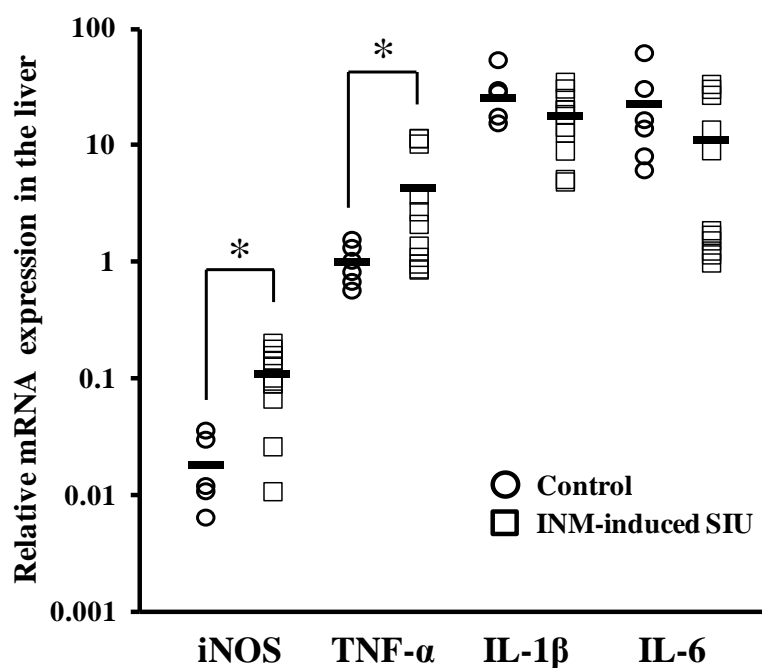


Fig. 14. Changes in mRNA expression of iNOS, TNF- α , IL-1 β , and IL-6 in the liver of rats with INM-induced SIU. Animals were sacrificed 24 h after INM administration. Total RNA was extracted from the liver. Expression levels of mRNAs for iNOS, TNF- α , IL-1 β , and IL-6 were determined by real-time PCR. Data for mRNA expression in samples from the SIU group are expressed as the ratio to the mean value for TNF- α mRNA in the liver of the control group. Points represent individual data for the control group (open circle, N=6) and INM-induced SIU group (open square, N=11), and bars represent the mean for each group. * $p < 0.05$, statistically significant.

Table 13. Biochemical data of control and INM-induced SIU rats

	Control (N=5)	INM-induced SIU (N=6)
Total protein (g/dL)	4.86 ± 0.09	3.65 ± 0.24*
Albumin (g/dL)	3.40 ± 0.12	2.05 ± 0.14*
A/G ratio	2.34 ± 0.17	1.30 ± 0.06*
AST (IU/L)	74.2 ± 4.5	53.7 ± 7.4*
ALT (IU/L)	35.2 ± 4.2	25.3 ± 4.2*
ALP (IU/L)	1150 ± 154	418 ± 24*
Total bilirubin (mg/dL)	<0.1	<0.1

Data are presented as the mean values ± S.D. for 5–6 rats per group. * $p < 0.05$, significant difference from control group.

第3節 INM 誘発小腸粘膜障害モデルラットの腸および肝臓における CYP および *mdr1a* の mRNA 発現量の変化

INM 誘発小腸粘膜障害モデルラットでは、小腸全長に潰瘍が惹起され、小腸下部の潰瘍部では炎症性マーカーの mRNA 発現量の上昇が認められた（第1節）。また、INM 投与群の肝臓では、iNOS および TNF- α の mRNA 発現量の上昇および血清中の肝機能マーカーの低下が観察された（第2節）。第1章で示されたように、腸管および肝臓の炎症は薬物代謝にも影響を及ぼす可能性がある。

そこで本節では、小腸および肝臓での薬物代謝および排泄過程で中心的な役割を担う CYP および P-gp の mRNA 発現量の変化を明らかにする目的で検討を行った。

第1項 実験材料および試薬調製方法

1-1. 使用動物

本章第1節と同様の方法で作成した INM 誘発小腸粘膜障害モデルラットを使用した。

1-2. 実験材料

PCR 用 primer [ライフテクノロジーズジャパン株式会社に合成依頼]
その他の試薬は本章第1節第1項 1-2 と同様のものを使用した。

第2項 実験方法および統計学的処理

2-1. 小腸および肝臓からの全 RNA の抽出

本章第1節第2項 2-2 および本章第2節第2項 2-1 と同様に操作した。

2-2. 逆転写反応による cDNA の合成

第1章第2節第2項 2-2 と同様に操作した。

2-3. Real-time PCR 法による目的遺伝子の cDNA 定量

第1章第2節第2項2-3と同様に操作した。なお、 β -actin および目的遺伝子の増幅用 primer は既報をもとに作製した (Table 14)。

Table 14. Primer sequences used in this study

Gene	Forward sequence (5'-3')	Reverse sequence (5'-3')	References
CYP1A1	GCTGAGGCTCAACTGTCTTCCA	GGCTTTGCAAGGACAAGGAGA	84)
CYP1A2	ACGTGAGCAAAGAGGCTAACCA	ATTAGCCACCGATTCCACCAC	84)
CYP2B1	CAAGGAGAGTGGCATTGGAAAA	AGGCCATTCCCAACAGAGAACTG	84)
CYP2C11	CGCACGGAGCTGTTTTTGT	GCAAATGGCCAAATCCACTG	84)
CYP2D2	GCAAAGTCTTCCCAAGCTCA	GGAAGGCATCAGTCATGTCTCG	84)
CYP2E1	GGTTTTCCCTAAGCATTCTCCG	GGTCTTTTTGAGCTCCTCCACC	84)
CYP3A1	GCCTTTTTTTGGCACTGTGCT	GCATTTGACCATCAAACAACCC	84)
CYP3A9	TATCACATGGACCAGAAACC	CCACAGAAAACAACCTTGAC	85)
mdr1a	AGGCAATGGCAACATTTTTTGGTGG	GATAAGCAGAAAAGCTGCACCCATG	86)
β -actin	GGTCCACACCCGCCACCAGTT	ACCCATACCCACCATCACACCCTG	82)

2-4. 統計学的処理

小腸における mRNA 発現量は、それぞれの目的遺伝子のコントロール群の小腸上部での発現量の平均値を 1 として相対比で示し、一群 5-6 匹から得られた個々の値とその平均値で表示した。一方、肝臓における mRNA 発現量は、コントロール群の CYP1A2 の mRNA 発現量の平均値を 1 として相対比で示し、一群 5-6 匹から得られた個々の値とその平均値で表示した。統計学的解析は SPSS version 21.0 (IBM) を使用し、2 群間の比較は Student's t-test を用いた。また、多重比較では、Tukey-Kramer test を用い、いずれも $p < 0.05$ の場合に有意であると判定した。

第3項 結果

コントロール群において、小腸部位ごとの CYP の mRNA 発現量を比較したところ、いずれも小腸下部、小腸中部、小腸上部の順に発現量が上昇し、小腸上部と小腸下部ではすべての CYP において発現量に有意差が認められた (Fig. 15)。対照的に、*mdr1a* の発現量は小腸下部において最も高い傾向が認められた (小腸上部 vs 小腸下部、 $p = 0.0503$)。INM 投与群の非潰瘍部および潰瘍部における CYP1A1 および CYP3A9 の発現量は、小腸上部と比較して小腸下部において有意な低下が認められ、対照的に *mdr1a* では小腸下部で小腸上部よりも発現量が高かった (Fig. 15)。すなわち、非潰瘍部・潰瘍部における CYP および *mdr1a* の mRNA 発現は、コントロール群と同様の傾向を示した。また、非潰瘍部・潰瘍部における CYP および *mdr1a* の発現量をコントロール群と比較したところ、小腸上部の CYP2D2 の mRNA 発現量が潰瘍部でコントロール群と比べて有意な低下を示した以外は、コントロール群と非潰瘍部・潰瘍部での CYP および *mdr1a* の mRNA 発現に違いは認められなかった (Fig. 15)。

INM 投与群の肝臓では、CYP2C11、CYP2E1 および CYP3A1 の mRNA 発現量は、コントロール群に比較していずれも有意に低下した (Fig. 16)。CYP1A2、CYP2B1、CYP3A9 および *mdr1a* の発現量は、INM 投与群でそれぞれ 18.9%、63.2%、52.3% および 34.4% 低下したが、統計学的な差は認められなかった (Fig. 16)。

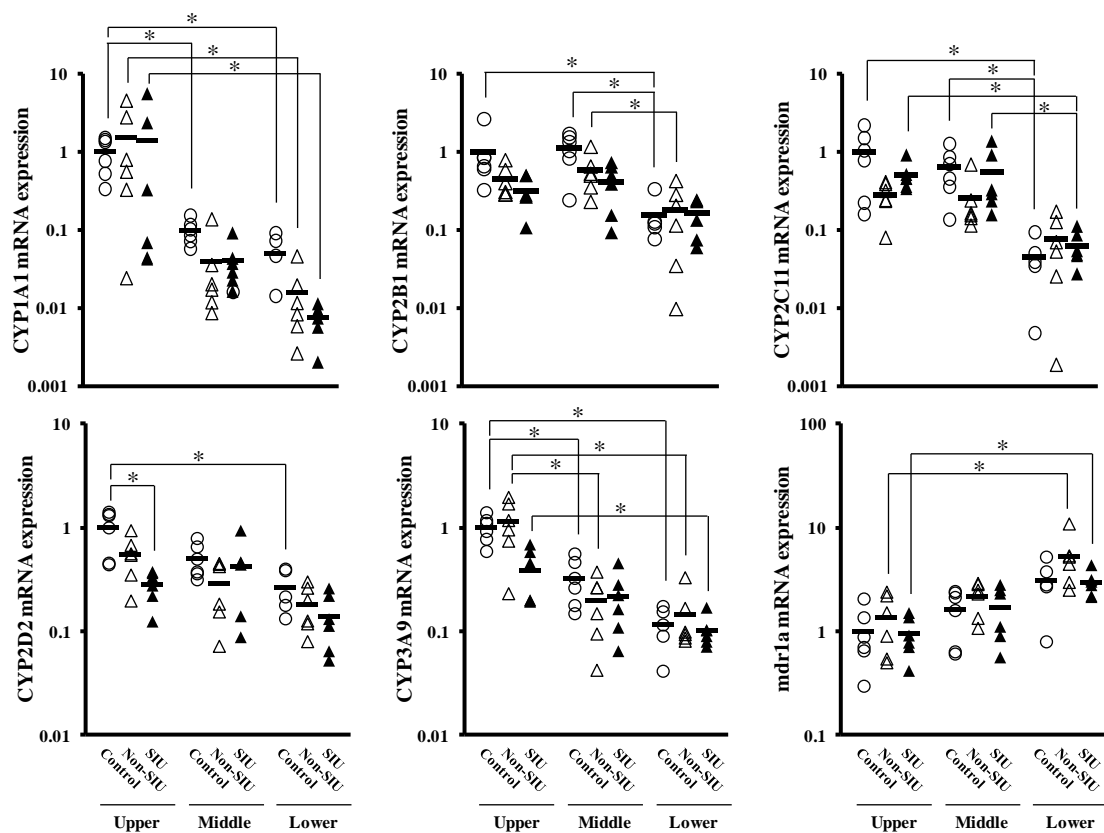


Fig. 15. Changes in CYP and *mdr1a* mRNA expression in the small intestine of rats with INM-induced SIU. Animals were sacrificed 24 h after INM administration. Total RNA was extracted from the upper, middle and lower small intestine. Expression levels of CYP and *mdr1a* mRNA were determined by real-time PCR. The data for mRNA expression in samples for the non-SIU and SIU groups (open and closed triangles, respectively) are expressed as the ratio to the mean value for each target gene in the upper intestine of the control group (open circle). Points represent individual data, and bars represent the mean for 5–6 rats per group. * $p < 0.05$, statistically significant.

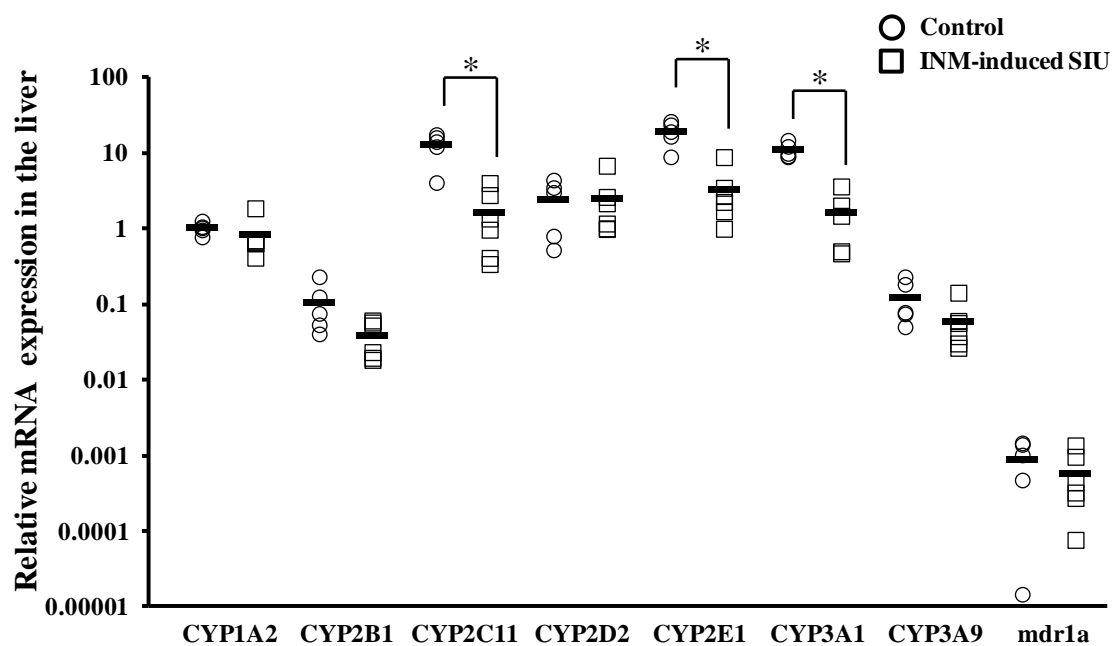


Fig. 16. Changes in CYP and mdr1a mRNA expression in the liver of rats with INM-induced SIU. Animals were sacrificed 24 h after INM administration. Total RNA was extracted from the liver. Expression levels of CYP and mdr1a mRNA were determined by real-time PCR. The data for mRNA expression in samples for the SIU group are expressed as the ratio to the mean value for CYP1A2 mRNA in the liver of the control group. Points represent individual data for the control group (open circle, N=5) and INM-induced SIU group (open square, N=6), and bars represent the mean for each group. * $p < 0.05$, statistically significant.

第4節 INM 誘発小腸粘膜障害モデルラットでの VCM の 血漿中濃度変化

第3節では、小腸粘膜障害モデルラットの小腸および肝臓での CYP および P-gp の mRNA 発現量を検討し、小腸ではなく肝臓において CYP の発現量が低下することを明らかにした。

小腸は、薬物の代謝に加えて吸収においても重要な役割を担っている。INM 誘発小腸粘膜障害モデルラットでは、小腸全長に潰瘍が惹起されることから粘膜障害に伴う薬物吸収の変化により、薬物動態に影響が及ぶ可能性が考えられる。

そこで本節では、難吸収性、かつ CYP による代謝を受けない腎排泄型薬物である VCM を用い、十二指腸内投与後の血漿中濃度を指標に潰瘍形成に伴う薬物吸収の変化を評価した。さらに、VCM の体内動態に対する腎機能の影響を評価するため、静脈内投与後の血漿中濃度の測定および生化学検査を実施した。

第1項 実験材料および試薬調製方法

1-1. 使用動物

本章第1節と同様の方法で作成した INM 誘発小腸粘膜障害モデルラットを使用した。

1-2. 実験材料

- 1) ソムノペンチル® (ペントバルビタール) [共立製薬]
- 2) 塩酸バンコマイシン散 0.5 「MEEK」 (VCM) [Meiji Seika ファルマ]
- 3) ヘパリンナトリウム [ナカライテスク株式会社]
- 4) 大塚生理食塩液 [大塚製薬]

1-3. 試薬調製方法

- 1) 20 mg/mL VCM 溶液（静脈内投与）
塩酸バンコマイシン散 0.5「MEEK」を生理食塩液で溶解して 20 mg/mL 溶液を調製した。
- 2) 250 mg/mL VCM 溶液（十二指腸内投与）
塩酸バンコマイシン散 0.5「MEEK」を生理食塩液で溶解して 250 mg/mL 溶液を調製した。

第2項 実験方法および統計学的処理

2-1. 血清中の生化学的パラメーターの測定

溶媒あるいは 10 mg/kg INM を皮下投与 24 時間後、エーテル麻酔下にラット下大静脈から採血した。採取した血液は、 $3,500 \times g$ 、5 分間、室温で遠心分離し、血清をチューブに回収した。得られた血清中のクレアチニンおよび blood urea nitrogen (BUN) 値は、三菱化学メディエンス株式会社に測定を依頼した。

2-2. VCM の静脈内および十二指腸内投与と血液サンプルの採取

溶媒あるいは 10 mg/kg INM を皮下投与 24 時間後、コントロール群および INM 投与群のラットにペントバルビタールを 40 mg/kg の用量で腹腔内投与し麻酔を施した。VCM を静脈内投与する場合、ラットの大腿静脈にヘパリンナトリウム (10 U/mL) を満たしたカニューレを挿入した。ラットに 20 mg/mL の VCM 溶液を 1 mL/kg の用量で大腿静脈に挿入したカニューレより静脈内に投与し、投与 2、5、15、30、45、60、90 および 120 分後に頸静脈より採血した。なお、VCM 投与前に大腿静脈に挿入したカニューレから採血を行いブランクとして使用した。

一方、VCM を十二指腸内投与する場合、麻酔下に腹部を切開し十二指腸を露出させ、胃体部より幽門部を介して 26G 注射針を用いて 250 mg/mL の VCM 溶液を 2 mL/kg の用量で十二指腸内に投与した。投与後、切開した腹部を縫合した。サンプルは、VCM の投与前および投与後 10、20、30、45、60、90 および 120 分に頸静脈より採血した。

採取した血液はヘパリン処置したチューブに移し、 $9,000 \times g$ 、10 分間、室温

で遠心分離し、血漿を採取した。採取した血漿は使用時まで-80°Cで保存した。

2-3. VCMの血漿中濃度の定量

血漿中のVCM濃度は高速液体クロマトグラフィー (high-performance liquid chromatography: HPLC) により定量した。血漿 120 μL に 60%過塩素酸 10 μL を加えて混和することで除タンパク処置を行い、6,000 $\times g$ 、10 分間、4°Cで遠心分離し、その上清 50 μL を HPLC 測定用試料とした。HPLC には、LC-10A (島津製作所)、分析カラム Nucleosil 120 C₁₈ (5 μm , 150 \times 4.6 mm i.d., Chemco Scientific)、UV 検出器 SPD-10AV (島津製作所) を用いた。HPLC の測定条件は、移動相 50 mM リン酸アンモニウム緩衝液 (pH 4.0) : アセトニトリル=97 : 3、流速 1.0 mL/min、カラム温度 40°C、検出波長は 220 nm とした。本条件での VCM の保持時間は 20.5 分であった。VCM の血漿中濃度は、VCM の標準品のピーク面積から算出した検量線により定量した。なお、定量限界は 0.1 $\mu\text{g/mL}$ であった。

2-4. 統計学的処理

VCM の静脈内投与後の血漿中濃度推移は、一群 3 匹から得られた値の平均 \pm 標準偏差で表示した。十二指腸内投与後の場合には、個体ごとに VCM の血漿中濃度推移を表示した。血清中の生化学的パラメーターは、一群 5-6 匹から得られた値の平均 \pm 標準偏差で表示した。統計学的解析は SPSS version 21.0 (IBM) を使用し、Student's t-test を用いて $p < 0.05$ の場合に有意であると判定した。

第3項 結果

コントロール群および INM 投与群では、VCM の静脈内投与後の血漿中濃度推移に統計学的な違いは認められず (Fig. 17A)、その際の血中濃度-時間曲線下面積 (area under the concentration-time curve: AUC_{0-120}) は、それぞれ $3380 \pm 752 \mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{mL}$ および $2940 \pm 594 \mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{mL}$ であった。また、腎機能の指標である血清クレアチニンおよび BUN 値は、コントロール群と INM 投与群間において差は認められなかった (Table 15)。

一方、VCM を十二指腸内投与した場合、INM 投与群の 5 匹中 3 匹で血液中に VCM が検出された。このうち 2 匹では、VCM の血中濃度は経時的に増加する傾向にあり、残り 1 匹は一過性の上昇に留まった (Fig. 17B)。VCM の血漿中濃度の最高値は、投与後 120 分の $4.8 \mu\text{g}/\text{mL}$ であり、血漿中濃度が測定できた 3 例から算出した AUC_{0-120} は、それぞれ 14.7、305.4 および $362.0 \mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{mL}$ であった。対照的に、コントロール群では全ての個体で血液中に VCM は検出されなかった (Fig. 17B)。

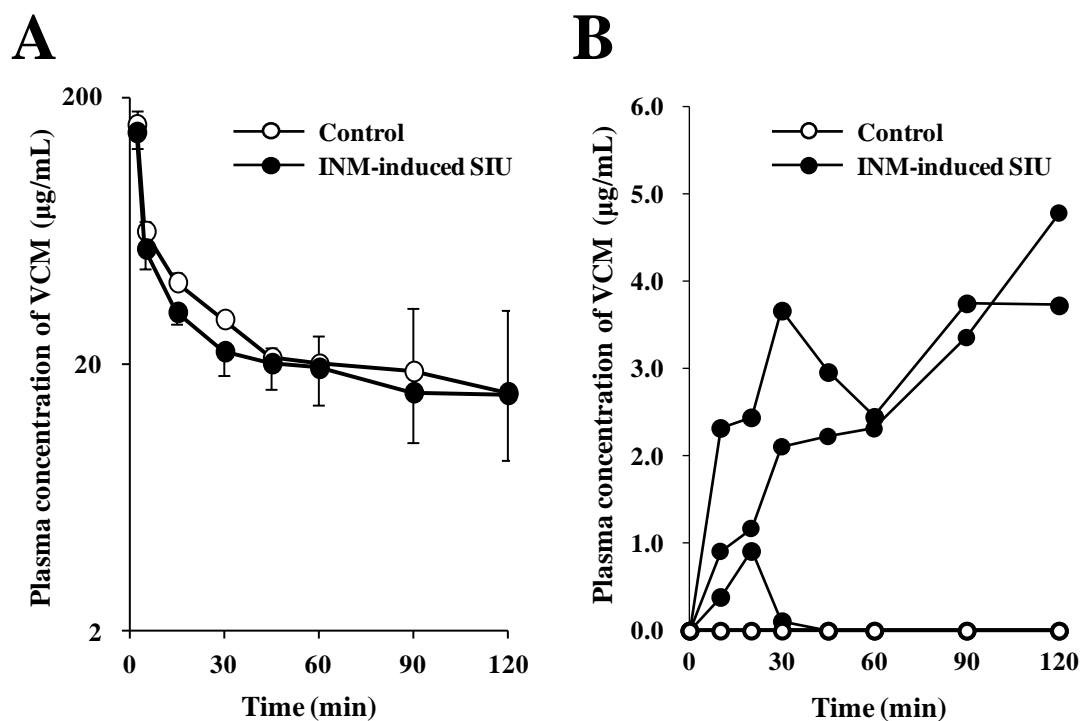


Fig. 17. Plasma concentration-time profile of VCM in rats with INM-induced SIU. The studies after single intravenous or intraduodenal administration of VCM were conducted in rats 24 h after the INM administration. (A) VCM was administered intravenously at a dose of 20 mg/kg body weight. Each point represents the mean \pm S.D. of control (open circles) and SIU (closed circles) rats (N=3 each). (B) VCM was administered intraduodenally at a dose of 500 mg/kg body weight. The plasma concentration-time profiles of VCM was described for each individual rat in control (open symbols, N=4) and INM-induced SIU (closed symbols, N=5) groups.

Table 15. Biochemical data of rats with INM-induced SIU

	Control (N=5)	INM-induced SIU (N=6)
Serum creatinine (mg/dL)	0.78 \pm 0.08	0.72 \pm 0.13
BUN (mg/dL)	14.8 \pm 1.5	16.3 \pm 4.8

Data are presented as the mean values \pm S.D. for 5–6 rats per group.

第5節 考察

本章では、NSAIDsによる小腸粘膜障害が薬物の吸収、代謝および排泄に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。そこで著者は、INM誘発小腸粘膜障害モデルラットを用いて、小腸および肝臓でのCYPおよびP-gpの遺伝子発現の変化を検討した。さらに、難吸収性薬物であるVCMの血漿中濃度を指標として、潰瘍形成に伴う小腸粘膜の透過性亢進による薬物吸収への影響を評価した。

ラットを用いた実験動物モデルでは、INM投与24時間後に空腸および回腸に多数の出血性の粘膜障害が発生することが報告されている^{80,87)}。このような粘膜障害が空腸および回腸に見られる現象は、NSAIDs服用患者の小腸においても観察される^{75,88)}。本研究においても、ラットにINMを10mg/kgの用量で皮下投与することにより、24時間後に小腸下部に著明な潰瘍面積の増大が観察され、実験的小腸粘膜障害モデルが構築できることを確認した^{80,81,89,90)}。

NSAIDsによる小腸粘膜障害の発生機序は、重炭酸分泌や粘液分泌の減少ならびに小腸運動の亢進による粘膜防御機能の脆弱化により、腸内細菌の粘膜内侵入および腸内細菌から遊離される炎症性因子が傷害的に作用するためと考えられている^{76,77,91-93)}。実際にNSAIDs服用患者では、プロトンポンプ阻害薬(PPI)の服用により小腸粘膜障害が増悪することが報告されており、その要因としてPPIの酸分泌抑制作用による腸内細菌叢の変化が指摘されている^{94,95)}。腸内細菌から遊離されるリポ多糖(LPS)により誘導されるiNOS由来のNOは、小腸粘膜に対する傷害因子として重要な役割を担うことが報告されている^{90,91)}。本研究では、iNOSおよび炎症性サイトカインのmRNA発現量は小腸下部の潰瘍部において最も高く、非潰瘍部あるいはコントロール群と比較して有意な上昇が認められた。また、潰瘍部におけるこれらのmRNA発現量は、小腸上部、小腸中部、小腸下部の順に発現量が上昇する傾向にあった。この結果は、各小腸部位で認められる潰瘍形成の程度と相関するものであった。

INM投与群の肝臓では、コントロール群と比較してiNOSおよびTNF- α のmRNA発現量の有意な上昇が認められた。さらに、INM投与群では血清中の総蛋白およびアルブミン濃度、A/G比の低下が観察され肝機能の低下が認められ

た。一般的に、濃度上昇が肝機能障害の指標とされる AST および ALT については、本研究では低下が認められたが、これは肝臓での蛋白合成能の低下に基づくものと推察される。小腸粘膜障害モデル動物において、門脈血清中の NO 代謝物 ($\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$) 濃度が上昇し⁹⁶⁾、血清アルブミン値の低下⁹⁷⁾や胆汁排泄機能の低下⁹⁶⁾など肝機能の低下が確認されている。さらに、INM 誘発小腸粘膜障害モデルラットでは、肝臓への腸内細菌移行が認められ、抗菌薬処置によってこの移行が抑制されることが報告されている⁹⁸⁾。すなわち、INM 誘発小腸粘膜障害モデルでは、小腸粘膜障害に伴う粘膜バリア機能の低下により、小腸潰瘍部から門脈を介して肝臓に炎症性物質が移行し、肝機能低下を引き起こした可能性が考えられる。

NSAIDs は、医療用医薬品としてだけでなく、OTC 薬としても広く使用されている。そのため、NSAIDs を使用する患者背景は複雑で、実際には様々な薬物と併用して使用されている可能性が考えられる。従って、NSAIDs による小腸粘膜障害によって小腸および肝臓での薬物の代謝や排泄機能に変動が生じた場合、多くの薬物の体内動態に影響を及ぼすことが考えられる。そこで本研究では、薬物代謝への広範囲に及ぶ影響を評価するために、小腸および肝臓に発現する主要な複数の CYP 分子種の遺伝子発現量を検討した。小腸上部の CYP2D2 の mRNA 発現量は、潰瘍部でコントロール群と比べて有意な低下を示した。しかし、それ以外の CYP および *mdr1a* の潰瘍部における mRNA 発現量は、非潰瘍部およびコントロール群と比較して有意差が認められなかった。対照的に、肝臓では、INM 投与群において CYP2C11、CYP2E1 および CYP3A1 の mRNA 発現量がコントロール群に比べ有意に低下していた。これらの分子種は、本研究の検討対象とした CYP のなかでも肝臓での発現量が相対的に高い分子種である。ヒトにおいて CYP2C、CYP2E および CYP3A は肝臓での CYP 発現量のそれぞれ約 25%、9% および 40% を占め、様々な薬物の代謝に関与していることが知られている⁹⁹⁾。また、肝機能障害時における CYP 活性の変動には分子種間に差異が見られることが明らかとなっており、CYP2C、CYP2E および CYP3A はその酵素活性が低下することが報告されている^{6,13)}。一方、肝臓での CYP2D2 の発現量は、小腸潰瘍部とは異なり低下は認められなかった。CYP2D2 分子種は、イミプラミンやアミトリプチリンなどの三環系抗うつ薬、パロキセ

チンやフルオキセチンなどの選択的セロトニン再取込み阻害薬など数多くの薬物の代謝に関与しており、臨床において重要な薬物代謝酵素の一つである。ヒトの肝臓での CYP2D 分子種の発現量は、小腸に比べておよそ 40 倍高いことが報告されており¹⁰⁰⁾、CYP2D 分子種の発現低下が小腸でのみ認められる場合、薬物代謝に対する影響は小さいと考えられる。今回の検討から、INM による小腸粘膜障害は、小腸よりも肝臓において CYP の mRNA 発現に影響を及ぼす可能性が示された。今後は、肝臓での mRNA 発現量の低下が認められた CYP 分子種のタンパク質発現量や酵素活性の検討を行い、薬物代謝に及ぼす影響に関して機能的に評価する必要があると思われる。

小腸は、薬物の代謝に加えて、小腸粘膜を介した薬物吸収においても重要な役割を担っている。INM 誘発小腸粘膜障害モデルラットでは小腸全長に潰瘍が惹起される。そのため小腸粘膜のバリア機能が破綻し、粘膜を介した薬物吸収に影響が及ぶ可能性が考えられる。そこで、消化管から吸収されない VCM の静脈および十二指腸内投与後の血漿中濃度を検討し、潰瘍形成に伴う小腸粘膜の透過性亢進による薬物吸収への影響を評価した。本研究において INM 投与群では、VCM の十二指腸内投与により 5 匹中 3 匹で血液中に VCM が検出されたが、コントロール群では検出されなかった。一方、静脈内投与後の VCM の血漿中濃度推移は、INM 投与群とコントロール群で違いは認められなかった。VCM は、肝臓では代謝を受けず、主に腎臓から排泄されることが知られている^{101, 102)}。本研究では、INM 投与群において腎機能の指標である血清クレアチニンおよび BUN 値の低下は観察されなかった。すなわち、INM 群では潰瘍形成による小腸粘膜の透過性亢進により、小腸での VCM の吸収が促進された結果、血液中に VCM が検出されたと考えられる。また、十二指腸内投与後に INM 群で観察された VCM の経時的な濃度上昇は、腎臓でのクリアランスの低下を反映したのではなく、小腸で持続的に VCM の吸収が行われている可能性を示している。

以上のように、INM 誘発小腸粘膜障害モデルラットでは、小腸粘膜障害に伴う薬物吸収の増大および肝臓での CYP の mRNA 発現低下により、薬物の生物学的利用能が変動する可能性が示唆された。特に、前者の小腸における薬物吸収の増大は、多くの薬物で起こり得る可能性がある。これまで、NSAIDs によ

る小腸粘膜障害の機序について多くの検討がなされてきたが、小腸粘膜障害に伴う薬物の体内動態の変化については十分に配慮されてこなかった。本研究結果は、NSAIDs 起因性小腸粘膜障害時の薬物の体内動態に関して重要な情報を提供するものと考えられる。

第6節 小括

INM 誘発小腸粘膜障害モデルラットを構築し、小腸および肝臓での CYP および P-gp の発現量の変化ならびに粘膜障害に伴う小腸での薬物吸収に関して検討を行い、以下の結果を得た。

1. INM 投与群では、粘膜障害が小腸全長で観察された。特に、小腸下部では小腸上部および小腸中部と比べて潰瘍面積の有意な増大が認められた。
2. 小腸下部の潰瘍部では、非潰瘍部およびコントロール群と比較して iNOS、TNF- α 、IL-1 β および IL-6 の mRNA 発現の上昇が認められた。
3. INM 投与群の肝臓では、iNOS および TNF- α の mRNA 発現の有意な上昇が認められた。
4. 血清中の総蛋白、アルブミン、A/G 比、AST、ALT および ALP 値は、INM 投与群でコントロール群に比べ有意に低下していた。一方、血清クレアチニンおよび BUN 値は両群間で違いは認められなかった。
5. 小腸上部において CYP2D2 の mRNA 発現量が潰瘍部でコントロール群と比較して有意な低下を示した以外、潰瘍部における CYP および *mdr1a* の mRNA 発現量は非潰瘍部およびコントロール群と比較して違いは認められなかった。
6. INM 投与群の肝臓では、CYP2C11、CYP2E1 および CYP3A1 の mRNA 発現量はコントロール群と比較して有意な低下が認められた。
7. VCM を十二指腸内に投与した場合、コントロール群では血液中に VCM は検出されなかったが、INM 投与群では 5 匹中 3 匹で VCM が血液中に検出された。

総括

本研究では、大腸および小腸を病変の主座とする代表的な疾患である潰瘍性大腸炎および NSAIDs 起因性小腸粘膜障害のモデル動物を用い、小腸と肝臓における薬物代謝酵素と薬物トランスポーターの発現変動とその調節機構ならびに薬物動態の変化について解明を試み、以下の知見を得た。

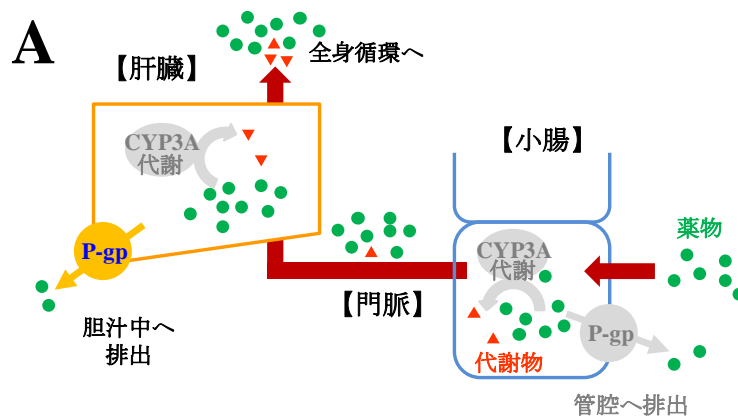
1. 潰瘍性大腸炎モデルの肝臓および小腸における CYP3A および P-gp の発現変動による薬物動態への影響

DSS 誘発潰瘍性大腸炎モデルマウスでは、肝臓および小腸上部において炎症性マーカーの mRNA 発現量の増加および肝機能障害の指標である AST および ALT 値の上昇が認められ、大腸での炎症が肝臓および小腸上部に二次的に波及する可能性を明らかにした。肝臓から小腸へ炎症が波及する要因として、肝臓での胆汁排泄機能の低下による胆汁の組成変化が関与する可能性が考えられた。また、大腸の炎症に伴って肝臓および小腸上部で CYP3A および P-gp の mRNA およびタンパク質発現量の低下が認められ、これらの基質である CsA の経口投与後の血中濃度が上昇することを明らかにした。

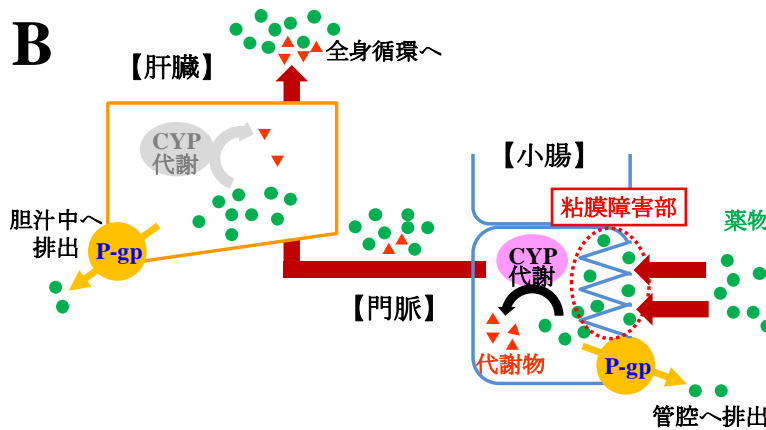
2. NSAIDs 誘発小腸粘膜障害モデルの肝臓および小腸における CYP と P-gp の発現変動ならびに薬物吸収への影響

INM 誘発小腸粘膜障害モデルラットでは、粘膜障害が小腸全長で観察され、特に小腸下部では炎症性マーカーの mRNA 発現量の増加ならびに潰瘍面積の著明な増大が認められた。小腸粘膜障害に伴う小腸潰瘍部での CYP および *mdr1a* の mRNA 発現量の変化は、CYP2D2 で有意な低下を示した以外は認められなかった。一方、小腸粘膜障害に伴って肝臓では、CYP2C11、CYP2E1 および CYP3A1 の mRNA 発現量の減少が認められ、さらに血清中の総蛋白およびアルブミン濃度の低下から肝機能低下が示唆された。また、難吸収性薬物である VCM の十二指腸内投与後、血液中に VCM が検出されたことから、小腸粘膜障害による消化管吸収の変化を明らかにした。

潰瘍性大腸炎および NSAIDs 起因性小腸粘膜障害のモデル動物を用いた本研究では、肝臓での CYP 発現量の低下が共通して認められた (Fig. 18A、18B)。また、前者では、小腸への二次的な炎症反応の波及に伴い CYP3A および P-gp の発現量が低下し (Fig. 18A)、後者では小腸粘膜障害による消化管吸収の変化が認められた (Fig. 18B)。つまり、腸の広汎な炎症を有する腸疾患では、小腸での薬物吸収の増大および肝臓での CYP 発現低下により薬物の生物学的利用能が変動する可能性が示唆された。



DSS 誘発潰瘍性大腸炎モデルでは、肝臓の CYP3A 発現低下および小腸上部での CYP3A と P-gp の発現低下により薬物の全身循環への移行が増大する。



INM 誘発小腸粘膜障害モデルでは、小腸粘膜障害に伴う薬物吸収の増大および肝臓での CYP の発現低下により薬物の全身循環への移行が増大する。

Fig. 18. Change mechanism of the bioavailability of the drugs in mouse with DSS-induced colitis or rat with INM-induced SIU.

現在、潰瘍性大腸炎のなかでもステロイド抵抗性の重症例に対しては、免疫抑制剤である CsA およびタクロリムスが使用されている。これらの薬物は体内動態の個体差が大きく、使用時に治療薬物モニタリングが必要となる薬物である。その要因として、両薬物が小腸および肝臓に発現する CYP3A および P-gp の共通の基質であり、病態に伴って薬物代謝および排泄に影響を受けることが考えられている。本研究結果から、潰瘍性大腸炎患者に CsA およびタクロリムスを使用する場合、その血中濃度変化に注意して投与量を設定する必要性が示唆された。

NSAIDs は、我が国で最も汎用されている薬物の一つであり、医療用としてだけでなく OTC 薬としても普及してきた。NSAIDs を使用する患者は高齢者が多く、その患者背景は複雑化している。本研究結果から、NSAIDs 起因性の小腸粘膜障害では、小腸粘膜バリアの破綻および肝臓での CYP の遺伝子発現量の低下によって薬物の血中濃度が変動する可能性が考えられた。高齢者は複数の薬剤を服用していることが多く、腎機能の低下に伴い薬物の排泄能も低下している。NSAIDs 投与によって予期せぬ副作用や薬物相互作用をきたす可能性もあり、安全な薬物療法を実施する上で十分な注意が必要と思われた。

以上、今回の研究成果は腸疾患時における薬物治療に関して意義ある情報を提供するものと考えられる。

謝辞

稿を終えるにあたり、本研究に対し、終始御懇切な御指導ならびにご鞭撻を賜りました医療薬学講座 水野成人教授に心より感謝致します。

本研究論文審査にあたり、有益な御助言と御指導を賜りました薬剤学講座 岩川精吾教授、臨床薬学講座 江本憲昭教授、微生物化学講座 小西守周准教授に深謝致します。

本研究に対し、幾多の貴重な御意見と御協力を賜りました医療薬学講座 棚橋俊仁准教授ならびに姫路獨協大学 薬学部 薬剤学研究室 中村任教授に深く感謝致します。

本研究を行うにあたり、多大な御協力と御理解を賜りました兵庫県立がんセンター 消化器内科 三木生也博士、神戸大学大学院医学研究科 消化器内科学分野 近藤靖之博士、井上潤博士に心より感謝致します。

本研究の VCM の血漿中濃度測定に際し、御協力と御助言を賜りました京都薬科大学 代謝分析学分野 安井裕之教授、西川千香子さんに深く感謝致します。

本研究の機会を与えて下さいました薬学臨床教育センター 濱口常男教授ならびに同センターの諸先生方、近畿大学 薬学部 医療薬剤学分野 小竹武教授に心より感謝致します。

本研究を行うにあたり、温かい励ましを賜りました京都薬科大学 薬物治療学分野 竹内孝治名誉教授、加藤伸一教授、天ヶ瀬紀久子講師に深謝致します。

本研究に対し、終始実験に御協力頂きました医療薬学講座 上野佳学士、後藤真奈美学士、古川直樹学士、室井綾香学士、山根光永学士、菊池貴大君、杉本有香さん、高嶋梨恵さん、原田瑞穂さん、平山侑季さん、古館弘基君、加藤愛梨さん、金祥平君、中島左起さん、山岡玲菜さん、山本彩乃さんをはじめとする医療薬学講座の諸氏に心より感謝致します。

最後に、様々な面で研究生活を支えてくれた家族に深く感謝致します。

参考文献

- 1) Williams JA, Hyland R, Jones BC, Smith DA, Hurst S, Goosen TC, et al. Drug-drug interactions for UDP-glucuronosyltransferase substrates: a pharmacokinetic explanation for typically observed low exposure (AUC_i/AUC) ratios. *Drug Metab Dispos.* 2004;32:1201-1208.
- 2) Nagata K. Drug metabolism catalyzed by cytochrome P-450. *Nihon Yakurigaku Zasshi.* 2009;134:146-148.
- 3) Hall SD, Thummel KE, Watkins PB, Lown KS, Benet LZ, Paine MF, et al. Molecular and physical mechanisms of first-pass extraction. *Drug Metab Dispos.* 1999;27:161-166.
- 4) Mizuma T. Kinetic impact of presystemic intestinal metabolism on drug absorption: experiment and data analysis for the prediction of in vivo absorption from in vitro data. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2002;17:496-506.
- 5) Tsunoda SM, Velez RL, von Moltke LL, Greenblatt DJ. Differentiation of intestinal and hepatic cytochrome P450 3A activity with use of midazolam as an in vivo probe: effect of ketoconazole. *Clin Pharmacol Ther.* 1999;66:461-471.
- 6) 加藤隆一, 山添康, 横井毅. 薬物代謝学 第3版. 2010:pp.89-100, 151.
- 7) Giacomini KM, Huang SM, Tweedie DJ, Benet LZ, Brouwer KL, Chu X, et al. Membrane transporters in drug development. *Nat Rev Drug Discov.* 2010;9:215-236.
- 8) Mizuno N, Niwa T. Drug transporter studies in drug discovery and development. *Nihon Yakurigaku Zasshi.* 2005;125:200-206.
- 9) Juliano RL, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta.* 1976;455:152-162.
- 10) Mizuno N, Sugiyama Y. Drug transporters: their role and importance in the selection and development of new drugs. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2002;17:93-108.

- 11) van Waterschoot RA, Schinkel AH. A critical analysis of the interplay between cytochrome P450 3A and P-glycoprotein: recent insights from knockout and transgenic mice. *Pharmacol Rev.* 2011;63:390-410.
- 12) Masuda S, Inui K. An up-date review on individualized dosage adjustment of calcineurin inhibitors in organ transplant patients. *Pharmacol Ther.* 2006;112:184-198.
- 13) Frye RF, Zgheib NK, Matzke GR, Chaves-Gnecco D, Rabinovitz M, Shaikh OS, et al. Liver disease selectively modulates cytochrome P450--mediated metabolism. *Clin Pharmacol Ther.* 2006;80:235-245.
- 14) Shiffman ML, Luketic VA, Sanyal AJ, Thompson EB. Use of hepatic lidocaine metabolism to monitor patients with chronic liver disease. *Ther Drug Monit.* 1996;18:372-377.
- 15) Mayo PR, Skeith K, Russell AS, Jamali F. Decreased dromotropic response to verapamil despite pronounced increased drug concentration in rheumatoid arthritis. *Br J Clin Pharmacol.* 2000;50:605-613.
- 16) NPO 法人日本炎症性腸疾患協会編. 潰瘍性大腸炎の診療ガイド 第2版. 文光堂. 2011:pp.6-22.
- 17) Asano K, Matsushita T, Umeno J, Hosono N, Takahashi A, Kawaguchi T, et al. A genome-wide association study identifies three new susceptibility loci for ulcerative colitis in the Japanese population. *Nat Genet.* 2009;41:1325-1329.
- 18) Annese V, Valvano MR, Palmieri O, Latiano A, Bossa F, Andriulli A. Multidrug resistance 1 gene in inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *World J Gastroenterol.* 2006;12:3636-3644.
- 19) Huebner C, Browning BL, Petermann I, Han DY, Philpott M, Barclay M, et al. Genetic analysis of MDR1 and inflammatory bowel disease reveals protective effect of heterozygous variants for ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis.* 2009;15:1784-1793.
- 20) Wilk JN, Billsborough J, Viney JL. The *mdr1a*^{-/-} mouse model of spontaneous colitis: a relevant and appropriate animal model to study inflammatory bowel disease. *Immunologic Research.* 2005;31:151-159.

- 21) Englund G, Jacobson A, Rorsman F, Artursson P, Kindmark A, Rönnblom A. Efflux transporters in ulcerative colitis: decreased expression of BCRP (ABCG2) and Pgp (ABCB1). *Inflamm Bowel Dis.* 2007;13:291-297.
- 22) Blokzijl H, Vander Borgh S, Bok LI, Libbrecht L, Geuken M, van den Heuvel FA, et al. Decreased P-glycoprotein (P-gp/MDR1) expression in inflamed human intestinal epithelium is independent of PXR protein levels. *Inflamm Bowel Dis.* 2007;13:710-720.
- 23) Iizasa H, Genda N, Kitano T, Tomita M, Nishihara K, Hayashi M, et al. Altered expression and function of P-glycoprotein in dextran sodium sulfate-induced colitis in mice. *J Pharm Sci.* 2003;92:569-576.
- 24) Buyse M, Radeva G, Bado A, Farinotti R. Intestinal inflammation induces adaptation of P-glycoprotein expression and activity. *Biochem Pharmacol.* 2005;69:1745-1754.
- 25) Herrlinger KR, Koc H, Winter S, Teml A, Stange EF, Fellermann K, et al. ABCB1 single-nucleotide polymorphisms determine tacrolimus response in patients with ulcerative colitis. *Clin Pharmacol Ther.* 2011;89:422-428.
- 26) Kimmelstein P, Large HL, Vemner HD. Liver damage in ulcerative colitis. *Am J Pathol.* 1952;28:259-279.
- 27) Broomé U, Glaumann H, Hellers G, Nilsson B, Sörstad J, Hultcrantz R. Liver disease in ulcerative colitis: an epidemiological and follow up study in the county of Stockholm. *Gut.* 1994;35:84-89.
- 28) Memon MI, Memon B, Memon MA. Hepatobiliary manifestations of inflammatory bowel disease. *HPB Surg.* 2000;11:363-371.
- 29) Norlander B, Gotthard R, Ström M. Pharmacokinetics of a 5-aminosalicylic acid enteric-coated tablet in patients with Crohn's disease or ulcerative colitis and in healthy volunteers. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 1990;4:497-505.
- 30) Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, Ohkusa T, Inagaki Y, Nakaya R. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology.* 1990;98:694-702.
- 31) Gaudio E, Taddei G, Vetuschi A, Sferra R, Frieri G, Ricciardi G, et al. Dextran

- sulfate sodium (DSS) colitis in rats: clinical, structural, and ultrastructural aspects. *Dig Dis Sci.* 1999;44:1458-1475.
- 32) Reed KL, Fruin AB, Gower AC, Gonzales KD, Stucchi AF, Andry CD, et al. NF-kappaB activation precedes increases in mRNA encoding neurokinin-1 receptor, proinflammatory cytokines, and adhesion molecules in dextran sulfate sodium-induced colitis in rats. *Dig Dis Sci.* 2005;50:2366-2378.
- 33) Cooper HS, Murthy SN, Shah RS, Sedergran DJ. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Lab Invest.* 1993;69:238-249.
- 34) Yoshihara K, Yajima T, Kubo C, Yoshikai Y. Role of interleukin 15 in colitis induced by dextran sulfate sodium in mice. *Gut.* 2006;55:334-341.
- 35) Krawisz JE, Sharon P, Stenson WF. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models. *Gastroenterology.* 1984;87:1344-1350.
- 36) Okayama M, Hayashi S, Aoi Y, Nishio H, Kato S, Takeuchi K. Aggravation by selective COX-1 and COX-2 inhibitors of dextran sulfate sodium (DSS)-induced colon lesions in rats. *Dig Dis Sci.* 2007;52:2095-2103.
- 37) Uno S, Kawase A, Tsuji A, Tanino T, Iwaki M. Decreased intestinal CYP3A and P-glycoprotein activities in rats with adjuvant arthritis. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2007;22:313-321.
- 38) Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) method. *Methods.* 2001;25:402-408.
- 39) Baluk P, Yao LC, Feng J, Romano T, Jung SS, Schreiter JL, et al. TNF-alpha drives remodeling of blood vessels and lymphatics in sustained airway inflammation in mice. *J Clin Invest.* 2009;119:2954-2964.
- 40) Guma M, Ronacher L, Liu-Bryan R, Takai S, Karin M, Corr M. Caspase 1-independent activation of interleukin-1beta in neutrophil-predominant inflammation. *Arthritis Rheum.* 2009;60:3642-3650.
- 41) Tanaka K, Namba T, Arai Y, Fujimoto M, Adachi H, Sobue G, et al. Genetic evidence for a protective role for heat shock factor 1 and heat shock protein 70 against colitis. *J Biol Chem.* 2007;282:23240-23252.

- 42) Tao JY, Zheng GH, Zhao L, Wu JG, Zhang XY, Zhang SL, et al. Anti-inflammatory effects of ethyl acetate fraction from *Melilotus suaveolens* Ledeb on LPS-stimulated RAW 264.7 cells. *J Ethnopharmacol.* 2009;123:97-105.
- 43) Overbergh L, Valckx D, Waer M, Mathieu C. Quantification of murine cytokine mRNAs using real time quantitative reverse transcriptase PCR. *Cytokine.* 1999;11:305-312.
- 44) Richardson TA, Morgan ET. Hepatic cytochrome P450 gene regulation during endotoxin-induced inflammation in nuclear receptor knockout mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005;314:703-709.
- 45) Saksena S, Goyal S, Raheja G, Singh V, Akhtar M, Nazir TM, et al. Upregulation of P-glycoprotein by probiotics in intestinal epithelial cells and in the dextran sulfate sodium model of colitis in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2011;300:G1115-1123.
- 46) Trauner M, Boyer JL. Bile salt transporters: molecular characterization, function, and regulation. *Physiol Rev.* 2003;83:633-671.
- 47) Faber KN, Müller M, Jansen PL. Drug transport proteins in the liver. *Adv Drug Deliv Rev.* 2003;55:107-124.
- 48) Zollner G, Wagner M, Moustafa T, Fickert P, Silbert D, Gumhold J, et al. Coordinated induction of bile acid detoxification and alternative elimination in mice: role of FXR-regulated organic solute transporter-alpha/beta in the adaptive response to bile acids. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2006;290:G923-G932.
- 49) Wang R, Lam P, Liu L, Forrest D, Yousef IM, Mignault D, et al. Severe cholestasis induced by cholic acid feeding in knockout mice of sister of P-glycoprotein. *Hepatology.* 2003;38:1489-1499.
- 50) Cervený L, Svecova L, Anzenbacherova E, Vrzal R, Staud F, Dvorak Z, et al. Valproic acid induces CYP3A4 and MDR1 gene expression by activation of constitutive androstane receptor and pregnane X receptor pathways. *Drug Metab Dispos.* 2007;35:1032-1041.
- 51) Li H, Wang H. Activation of xenobiotic receptors: driving into the nucleus. *Expert*

- Opin Drug Metab Toxicol. 2010;6:409-426.
- 52) Toda T, Ohi K, Kudo T, Yoshida T, Ikarashi N, Ito K, et al. Ciprofloxacin suppresses Cyp3a in mouse liver by reducing lithocholic acid-producing intestinal flora. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2009;24:201-208.
- 53) Lee CH, Ito Y, Yanagiba Y, Yamanoshita O, Kim H, Zhang SY, et al. Pyrene-induced CYP1A2 and SULT1A1 may be regulated by CAR and not by AhR. *Toxicology.* 2007;238:147-156.
- 54) Jahnel J, Fickert P, Langner C, Högenauer C, Silbert D, Gumhold J, et al. Impact of experimental colitis on hepatobiliary transporter expression and bile duct injury in mice. *Liver Int.* 2009;29:1316-1325.
- 55) Lee YJ, Chung SJ, Shim CK. Limited role of P-glycoprotein in the intestinal absorption of cyclosporin A. *Biol Pharm Bull.* 2005;28:760-763.
- 56) Brooke BN, Slaney G. Portal bacteraemia in ulcerative colitis. *Lancet.* 1958;1:1206-1207.
- 57) Eade MN, Brook BN. Portal bacteraemia in cases of ulcerative colitis submitted to colectomy. *Lancet.* 1969;1:1008-1009.
- 58) Masubuchi Y, Horie T. Endotoxin-mediated disturbance of hepatic cytochrome P450 function and development of endotoxin tolerance in the rat model of dextran sulfate sodium-induced experimental colitis. *Drug Metab Dispos.* 2004;32:437-441.
- 59) Masubuchi Y, Enoki K, Horie T. Down-regulation of hepatic cytochrome P450 enzymes in rats with trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis. *Drug Metab Dispos.* 2008;36:597-603.
- 60) Lorentsen KJ, Hendrix CW, Collins JM, Kornhauser DM, Petty BG, Klecker RW, et al. Dextran sulfate is poorly absorbed after oral administration. *Ann Intern Med.* 1989;111:561-566.
- 61) Hartmann G, Kim H, Piquette-Miller M. Regulation of the hepatic multidrug resistance gene expression by endotoxin and inflammatory cytokines in mice. *Int Immunopharmacol.* 2001;1:189-199.
- 62) Hartmann G, Cheung AK, Piquette-Miller M. Inflammatory cytokines, but not bile

- acids, regulate expression of murine hepatic anion transporters in endotoxemia. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002;303:273-281.
- 63) Geier A, Dietrich CG, Voigt S, Ananthanarayanan M, Lammert F, Schmitz A, et al. Cytokine-dependent regulation of hepatic organic anion transporter gene transactivators in mouse liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2005;289:G831-G841.
- 64) Geuken E, Visser D, Kuipers F, Blokzijl H, Leuvenink HG, de Jong KP, et al. Rapid increase of bile salt secretion is associated with bile duct injury after human liver transplantation. *J Hepatol.* 2004;41:1017-1025.
- 65) Hofmann AF. The continuing importance of bile acids in liver and intestinal disease. *Arch Intern Med.* 1999;159:2647-2658.
- 66) Kalitsky-Szirtes J, Shayeganpour A, Brocks DR, Piquette-Miller M. Suppression of drug-metabolizing enzymes and efflux transporters in the intestine of endotoxin-treated rats. *Drug Metab Dispos.* 2004;32:20-27.
- 67) Gu X, Ke S, Liu D, Sheng T, Thomas PE, Rabson AB, et al. Role of NF-kappaB in regulation of PXR-mediated gene expression: a mechanism for the suppression of cytochrome P-450 3A4 by proinflammatory agents. *J Biol Chem.* 2006;281:17882-17889.
- 68) Lee CM, Kim BY, Li L, Morgan ET. Nitric oxide-dependent proteasomal degradation of cytochrome P450 2B proteins. *J Biol Chem.* 2008;283:889-898.
- 69) Nawa A, Fujita-Hamabe W, Tokuyama S. Involvement of ubiquitination in the decrease of intestinal P-glycoprotein in a streptozotocin-induced diabetic mouse model. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2012;27:548-552.
- 70) Jin M, Shimada T, Yokogawa K, Nomura M, Kato Y, Tsuji A, et al. Contributions of intestinal P-glycoprotein and CYP3A to oral bioavailability of cyclosporin A in mice treated with or without dexamethasone. *Int J Pharm.* 2006;309:81-86.
- 71) Lown KS, Mayo RR, Leichtman AB, Hsiao HL, Turgeon DK, Schmiedlin-Ren P, et al. Role of intestinal P-glycoprotein (mdr1) in interpatient variation in the oral bioavailability of cyclosporine. *Clin Pharmacol Ther.* 1997;62:248-260.

- 72) Vane JR. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol.* 1971;231:232-235.
- 73) Maiden L, Thjodleifsson B, Theodors A, Gonzalez J, Bjarnason I. A quantitative analysis of NSAID-induced small bowel pathology by capsule enteroscopy. *Gastroenterology.* 2005;128:1172-1178.
- 74) Wallace JL. Mechanisms, prevention and clinical implications of nonsteroidal anti-inflammatory drug-enteropathy. *World J Gastroenterol.* 2013;19:1861-1876.
- 75) Fujimori S, Gudis K, Takahashi Y, Seo T, Yamada Y, Ehara A, et al. Distribution of small intestinal mucosal injuries as a result of NSAID administration. *Eur J Clin Invest.* 2010;40:504-510.
- 76) Arakawa T, Watanabe T, Tanigawa T, Tominaga K, Otani K, Nadatani Y, et al. Small intestinal injury caused by NSAIDs/aspirin: finding new from old. *Curr Med Chem.* 2012;19:77-81.
- 77) Boelsterli UA, Redinbo MR, Saitta KS. Multiple NSAID-induced hits injure the small intestine: underlying mechanisms and novel strategies. *Toxicol Sci.* 2013;131:654-667.
- 78) Tanaka A, Hase S, Miyazawa T, Ohno R, Takeuchi K. Role of cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 inhibition in nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced intestinal damage in rats: relation to various pathogenic events. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002;303:1248-1254.
- 79) Reuter BK, Davies NM, Wallace JL. Nonsteroidal anti-inflammatory drug enteropathy in rats: role of permeability, bacteria, and enterohepatic circulation. *Gastroenterology.* 1997;112:109-117.
- 80) Konaka A, Kato S, Tanaka A, Kunikata T, Korolkiewicz R, Takeuchi K. Roles of enterobacteria, nitric oxide and neutrophil in pathogenesis of indomethacin-induced small intestinal lesions in rats. *Pharmacol Res.* 1999;40:517-524.
- 81) Takeuchi K, Tanaka A, Kato S, Amagase K, Satoh H. Roles of COX inhibition in pathogenesis of NSAID-induced small intestinal damage. *Clin Chim Acta.* 2010;411:459-466.

- 82) Petersson J, Schreiber O, Steege A, Patzak A, Hellsten A, Phillipson M, et al. eNOS involved in colitis-induced mucosal blood flow increase. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2007;293:G1281-1287.
- 83) Peinnequin A, Mouret C, Birot O, Alonso A, Mathieu J, Clarençon D, et al. Rat pro-inflammatory cytokine and cytokine related mRNA quantification by real-time polymerase chain reaction using SYBR green. *BMC Immunol*. 2004;5:3.
- 84) Kawase A, Fujii A, Negoro M, Akai R, Ishikubo M, Komura H, et al. Differences in cytochrome P450 and nuclear receptor mRNA levels in liver and small intestines between SD and DA rats. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2008;23:196-206.
- 85) Ikemura K, Inoue K, Mizutani H, Oka H, Iwamoto T, Okuda M. An antioxidant Trolox restores decreased oral absorption of cyclosporine A after liver ischemia-reperfusion through distinct mechanisms between CYP3A and P-glycoprotein in the small intestine. *Eur J Pharmacol*. 2012;690:192-201.
- 86) Eyal S, Lamb JG, Smith-Yockman M, Yagen B, Fibach E, Altschuler Y, et al. The antiepileptic and anticancer agent, valproic acid, induces P-glycoprotein in human tumour cell lines and in rat liver. *Br J Pharmacol*. 2006;149:250-260.
- 87) Tanaka A, Hase S, Miyazawa T, Takeuchi K. Up-regulation of cyclooxygenase-2 by inhibition of cyclooxygenase-1: a key to nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced intestinal damage. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002;300:754-761.
- 88) Morris AJ, MacKenzie JF. Small-bowel enteroscopy and NSAID ulceration. *Lancet*. 1991;337:1550.
- 89) Tanaka A, Kunikata T, Mizoguchi H, Kato S, Takeuchi K. Dual action of nitric oxide in pathogenesis of indomethacin-induced small intestinal ulceration in rats. *J Physiol Pharmacol*. 1999;50:405-417.
- 90) Takeuchi K, Hatazawa R, Tanigami M, Tanaka A, Ohno R, Yokota A. Role of endogenous nitric oxide (NO) and NO synthases in healing of indomethacin-induced intestinal ulcers in rats. *Life Sci*. 2007;80:329-336.
- 91) Takeuchi K, Kato S, Amagase K. Prostaglandin EP receptors involved in modulating gastrointestinal mucosal integrity. *J Pharmacol Sci*. 2010;114:248-261.

- 92) Ishida T, Nishiumi S, Tanahashi T, Yamasaki A, Yamazaki A, Akashi T, et al. Linoleoyl ethanolamide reduces lipopolysaccharide-induced inflammation in macrophages and ameliorates 2,4-dinitrofluorobenzene-induced contact dermatitis in mice. *Eur J Pharmacol.* 2013;699:6-13.
- 93) Ishida T, Miki I, Tanahashi T, Yagi S, Kondo Y, Inoue J, et al. Effect of 18 β -glycyrrhetic acid and hydroxypropyl γ -cyclodextrin complex on indomethacin-induced small intestinal injury in mice. *Eur J Pharmacol.* 2013;714:125-131.
- 94) Wallace JL, Syer S, Denou E, de Palma G, Vong L, McKnight W, et al. Proton pump inhibitors exacerbate NSAID-induced small intestinal injury by inducing dysbiosis. *Gastroenterology.* 2011;141:1314-1322.
- 95) Whittle BJ. Mechanisms underlying intestinal injury induced by anti-inflammatory COX inhibitors. *Eur J Pharmacol.* 2004;500:427-439.
- 96) Fujiyama N, Shitara Y, Ito K, Masubuchi Y, Horie T. Down-regulation of hepatic transporters for BSP in rats with indomethacin-induced intestinal injury. *Biol Pharm Bull.* 2007;30:556-561.
- 97) Cervinková Z, Radvaková D, Kohout P. Liver response to indomethacin-induced intestinal injury. *Acta Medica (Hradec Kralove).* 2002;45:13-18.
- 98) Yamada T, Deitch E, Specian RD, Perry MA, Sartor RB, Grisham MB. Mechanisms of acute and chronic intestinal inflammation induced by indomethacin. *Inflammation.* 1993;17:641-662.
- 99) Paine MF, Hart HL, Ludington SS, Haining RL, Rettie AE, Zeldin DC. The human intestinal cytochrome P450 "pie". *Drug Metab Dispos.* 2006;34:880-886.
- 100) de Waziers I, Cugnenc PH, Yang CS, Leroux JP, Beaune PH. Cytochrome P 450 isoenzymes, epoxide hydrolase and glutathione transferases in rat and human hepatic and extrahepatic tissues. *J Pharmacol Exp Ther.* 1990;253:387-394.
- 101) Matzke GR, Zhanel GG, Guay DR. Clinical pharmacokinetics of vancomycin. *Clin Pharmacokinet.* 1986;11:257-282.
- 102) Nakamura T, Takano M, Yasuhara M, Inui K. In-vivo clearance study of vancomycin in rats. *J Pharm Pharmacol.* 1996;48:1197-1200.