

氏名	おかのぼる 岡村昇
学位(専攻分野)	博士(薬学)
学位記番号	薬博第330号
学位授与の日付	平成5年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	薬学研究科薬学専攻
学位論文題目	強心配糖体ジゴキシンの腎排泄機構に関する研究

論文調査委員 (主査) 教授 堀了平 教授 橋田充 教授 川寄敏祐

論文内容の要旨

強心配糖体ジゴキシンはうっ血性心不全、心房細動等の治療に、臨床上繁用されているが、治療域は狭く中毒域では重篤な副作用を引き起こすことから、薬物血中濃度モニタリングに基づく投与設計の必要な代表的薬物である。主たる消失経路は腎排泄であり、糸球体濾過に加えて尿細管分泌、再吸収の寄与が知られているが、その分子機構は不明であった。また、キニジン、ベラパミル等と併用した場合、ジゴキシンの腎クリアランスが低下し、血中濃度が上昇することが臨床上問題となるが、これらの相互作用機構も不明であった。そこで著者は摘出灌流腎及び培養細胞系を用いて、ジゴキシンの腎排泄機構並びに薬物相互作用機構の解明を試みた。その結果、腎尿管刷毛縁膜に存在するP-糖蛋白質を介した機構を明らかにすることができたので以上三章に分けて論述する。

第1章 摘出灌流腎によるジゴキシンの腎排泄機構の解析

まず、臓器レベルで腎排泄機構の解明を試みる目的で、摘出腎灌流法を適用した。本法の利点は、他臓器の影響を除くことができる、灌流液組成を自由に設定できる、臓器レベルの現象を追うことができる、さらに尿細管分泌における血液から細胞内への移行と細胞内から管腔への移行を分離して評価できる等が挙げられる。灌流腎での検討の結果、ジゴキシンは尿細管において分泌されること、腎臓の薬物輸送系として知られる有機カチオン、有機アニオン輸送系とは異なるエネルギー依存的なシステムで分泌されること、ジゴキシンの作用点である Na^+ 、 K^+ -ATPaseは分泌に関与しないことが明らかとなった。また、抗不整脈剤キニジン、ベラパミルは濃度依存的にジゴキシンの細胞内から管腔への移行過程を阻害した。これらの特徴は癌細胞の多剤耐性に関わる輸送系P-糖蛋白質の性質に類似している。そこでP-糖蛋白質の典型的な基質や阻害剤の影響を検討したところ、ジゴキシン分泌は顕著に低下した。従って、ジゴキシンは正常腎臓に存在するP-糖蛋白質により分泌されること、キニジン、ベラパミルはP-糖蛋白質を阻害することによりジゴキシン腎排泄を低下させることが強く示唆された。

第2章 経細胞輸送評価系の確立とジゴキシンの輸送機構の解明

P-糖蛋白質は多剤耐性を獲得した癌細胞に過剰に発現していることが発見され、種々の抗癌剤を細胞外に能動的に排出することが知られている。その輸送はATP加水分解によるエネルギーが必要であること、キニジン、ベラパミルにより阻害されること、さらにP-糖蛋白質は腎臓では近位尿細管上皮細胞刷子縁膜に存在することが知られている。本章では、ジゴキシンのP-糖蛋白質により輸送されることを培養細胞系を用いて証明した。即ち、P-糖蛋白質をコードするヒト副腎由来の*MDR1* cDNAを含むプラスミドを培養腎上皮細胞 LLC-PK₁ に導入し、頂側膜（刷子縁膜に相当）側に選択的にP-糖蛋白質を過剰発現させた。この遺伝子導入細胞を多孔性ポリカーボネート膜上に単層培養することにより、経細胞輸送評価系を構成した。まずこの系の有用性を検討するために、P-糖蛋白質の内因性基質として候補に挙げられている種々のステロイドホルモンについてその輸送を測定したところ、コルチゾール、アルドステロン、デキサメサゾン輸送することが明らかとなり、P-糖蛋白質による輸送の解析系として有用であることが示された。

次に、ジゴキシンの経細胞輸送を検討したところ、P-糖蛋白質の発現量に応じて側底膜側から頂側膜側への輸送、即ち分泌方向の輸送が亢進し、P-糖蛋白質の典型的な基質や阻害剤で阻害された。またあらかじめ細胞内に取り込ませたジゴキシンの細胞からの排出を検討したところ、頂側膜側への排出が側底膜側への排出より顕著であり、キニジンにより頂側膜側への排出のみが阻害された。従って、ジゴキシンはP-糖蛋白質を介する輸送機構により、分泌されることが明らかとなった。

第3章 ジゴキシン腎排泄に対する薬物相互作用予測システムの確立

ジゴキシンは併用される薬物が多く、それらによって体内動態が変動することが少なくない。主たる消失経路は腎排泄であることから、腎排泄における相互作用機構の解明並びに予測は、有効かつ安全な投与設計を行う上で重要な課題となってくる。著者は、前章で確立した経細胞輸送評価系を応用した尿細管分泌における薬物相互作用予測システムの確立を目指し、利尿剤スピロラクトン、免疫抑制剤シクロスポリンAとの相互作用を検討した。

スピロラクトンは、ジゴキシン腎クリアランスを低下させ、血中濃度を上昇させることが臨床問題となるが、相互作用機構は不明であった。本経細胞輸送評価系を応用し検討したところ、スピロラクトンは、ジゴキシンの経細胞輸送を低下させ、かつ³H標識アジドピンによるP-糖蛋白質の光アフィニティラベリングを阻害した。また、摘出腎灌流法を用い、ジゴキシン分泌に対するスピロラクトンの影響を検討したところ、顕著に分泌を阻害した。従って、スピロラクトンはP-糖蛋白質による輸送を阻害することにより、ジゴキシン腎排泄を低下させることが明らかとなった。

シクロスポリンAは免疫抑制のみならず、多剤耐性の克服に期待されていることから、ジゴキシンとの相互作用の可能性が考えられる。そこで、P-糖蛋白質を介したジゴキシン経細胞輸送に対するシクロスポリンAの影響を検討したところ、その輸送を強く阻害した。さらに、摘出灌流腎でもジゴキシン分泌を強く阻害した。従って、シクロスポリンAもP-糖蛋白質阻害によりジゴキシン分泌を低下させることが明らかとなった。以上、経細胞輸送評価系で予測した現象が臓器レベル、臨床レベルでも起こること

が示され、この系は薬物相互作用予測システムとして有用であることが確かめられた。

以上著者は、ジゴキシンの腎排泄機構並びに薬物相互作用機構を多角的に検討した結果、癌細胞の多剤耐性に関わる輸送系 P-糖蛋白質を介する機構を明らかにした。さらにジゴキシンの腎排泄における薬物相互作用を予測できる実験系を確立することにも成功した。これらは、ジゴキシンの投与設計を行う上で重要な情報を与えるものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

強心配糖体ジゴキシンは临床上に多用されているが、治療域は狭く中毒域では重篤な副作用を引き起こすことから、個別化投与設計の必要な代表的薬物である。主たる消失経路は腎排泄であるが、その分子機構のみならず、临床上重要なキニジン、ベラパミル等との相互作用機構も不明であった。本論文は、腎灌流法並びに分子生物学的手法を用いて、ジゴキシンの腎排泄機構および薬物相互作用機構を解明したもので、得られた成果は以下の通りである。

まず、摘出灌流腎を用いて臓器レベルでの解明を試みた結果、有機カチオン、アニオン輸送系とは異なるエネルギー依存的な機構で分泌されることが明らかとなった。また、キニジン、ベラパミルはジゴキシンの刷子縁膜透過過程を阻害し、さらに抗癌剤の多剤耐性に関わる輸送系 P-糖蛋白質の基質や阻害剤によってもその分泌は阻害された。

次に、P-糖蛋白質をコードする MDRI cDNA を培養腎上皮細胞 LLC-PK₁ に導入し、P-糖蛋白質を過剰に発現させた細胞での経細胞輸送を測定したところ、分泌方向の輸送が亢進した。さらにその方向選択的な輸送は P-糖蛋白質の基質や阻害剤で低下した。

これらの結果より、ジゴキシンは正常腎臓に存在する P-糖蛋白質により分泌されることが、キニジン、ベラパミルは P-糖蛋白質を阻害することによりジゴキシンの腎排泄を阻害することが明らかとなった。同様の機構による相互作用は、利尿剤スピロラクトン、免疫抑制剤シクロスポリンにも認められ、両薬剤はジゴキシンの腎排泄を低下させることが明らかとなった。著者の確立した経細胞輸送評価系は臓器レベル、臨床レベルでの薬物相互作用を系統的に予測する上で有用なシステムと考える。

以上の研究は、有効かつ安全な薬物療法の確立に貢献するところ大であり、医療薬理学の発展に寄与するものと考えられる。よって、本論文は博士（薬学）の学位論文として価値あるものと認める。

更に、平成5年3月8日論文内容とそれに関連した試問を行った結果、優秀と認定した。