

末期腎不全患者血清由来成分による
有機アニオン輸送ポリペプチド 1B1 を介した
イリノテカン活性代謝物 SN-38 の肝取り込み抑制作用に関する研究

2017 年度

京都薬科大学 課程博士学位論文

【薬学】臨床薬学

勝部 友理恵

本論文は以下の報告の内容を総括したものである。なお、論文の転載については出版社より許可を得ている。

1. Yurie Katsube, Masayuki Tsujimoto, Hiroyoshi Koide, Megumi Ochiai, Ayako Hojyo, Kaori Ogawa, Kengo Kambara, Nao Torii, Daisuke Shima, Taku Furukubo, Satoshi Izumi, Tomoyuki Yamakawa, Tetsuya Minegaki, Kohshi Nishiguchi. Cooperative inhibitory effects of uremic toxins and other serum components on OATP1B1-mediated transport of SN-38. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2017**, 79, 783–789. [第 1 章, 第 2 章]

目次

序論.....	1
第1章 OATP1B1 機能に及ぼす末期腎不全患者血清の影響.....	7
第1節 緒言.....	7
第2節 方法.....	8
1. 試薬及び実験材料.....	8
2. 細胞及び細胞培養液.....	8
3. OATP1B1 安定発現 HEK 293 細胞の作製.....	9
4. OATP1B1 安定発現細胞のクローニング.....	9
5. HEK/OATP1B1 細胞における OATP1B1 mRNA 発現解析.....	10
6. コラーゲンコート法.....	11
7. 細胞培養.....	12
8. 血清.....	12
9. 血清残渣含有反応溶液の調製.....	12
10. 取り込み実験に用いた緩衝液.....	13
11. SN-38 の取り込み実験.....	13
12. SN-38 の定量.....	14
13. アルブミン含有反応溶液中のタンパク非結合型 SN-38 濃度測定.....	14
14. OATP1B1 活性の評価.....	15
15. 速度論解析.....	16
16. 統計処理.....	16
17. 倫理的配慮.....	16
第3節 結果.....	17
1. HEK/OATP1B1 細胞における OATP1B1 の mRNA 発現量.....	17
2. OATP1B1 安定発現細胞における OATP1B1 を介した SN-38 の取り込みの評価.....	18
3. OATP1B1 機能に及ぼす健常者及び末期腎不全患者血清残渣の影響.....	21
4. OATP1B1 機能に及ぼすアルブミン含有末期腎不全患者血清残渣の影響.....	22
5. アルブミン含有末期腎不全患者血清残渣による OATP1B1 阻害の速度論的解析.....	23
第4節 考察.....	25
第5節 小括.....	28
第2章 血清中の内因性成分及び尿毒症物質が OATP1B1 機能に及ぼす影響.....	29

第1節 緒言	29
第2節 方法	31
1. 試薬及び実験材料	31
2. 血清残渣及びろ過血清残渣含有反応溶液の調製の作成	31
3. 細胞培養	32
4. 取り込み実験に用いた緩衝液	32
5. SN-38 の取り込み実験	33
6. SN-38 定量	33
7. アルブミン含有反応溶液中のタンパク非結合型 SN-38 濃度測定	33
8. OATP1B1 活性の評価	34
9. OATP1B1 を介した SN-38 の取り込みに及ぼす尿毒症物質の影響評価	35
10. 統計処理	35
11. 倫理的配慮	35
第3節 結果	36
1. SN-38 の取り込み速度に及ぼす尿毒症物質の影響	36
2. アルブミン非存在下における SN-38 の取り込み速度に及ぼす 4 種混合尿毒症物質 の影響	38
3. アルブミン存在下における SN-38 の取り込みクリアランスに及ぼす尿毒症物質の 影響	39
4. SN-38 のヒト血清アルブミン結合率に及ぼす尿毒症物質の影響	40
5. SN-38 の取り込みクリアランスに及ぼす血清残渣及び尿毒症物質の影響	41
6. SN-38 の取り込みクリアランスに及ぼすろ過血清残渣の影響	42
第4節 考察	43
第5節 小括	46
総括	47
謝辞	48
引用文献	49

略語集

ANOVA	: 分散分析 (analysis of variance)
AUC	: 血中濃度-時間曲線下面積 (area under the drug concentration-time curve)
CES	: カルボキシルエステラーゼ (carboxylesterase)
C_{\max}	: 最高血中濃度 (maximum concentration)
CKD	: 慢性腎不全 (chronic kidney disease)
CL_{OATP1B1}	: OATP1B1 取り込みクリアランス (uptake clearance by OATP1B1)
[Cu]	: タンパク非結合型濃度 (unbound concentration)
CLcr	: クレアチニンクリアランス (creatinine clearance)
CMPF	: 3-カルボキシ-4-メチル-5-プロピル-2-フランプロパン酸 (3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropionic acid)
CYP	: シトクロム P450 (cytochrome P450)
eGFR	: 推定糸球体濾過速度 (estimate glomerular filtration rate)
GFR	: 糸球体濾過速度 (glomerular filtration rate)
DMSO	: ジメチルスルホキシド (dimethyl sulfoxide)
G418	: ジェネティシン (geneticin)
HA	: 馬尿酸 (hippuric acid)
HEK	: ヒト胎児由来腎臓 (human embryonic kidney)
HSA	: ヒト血清アルブミン (human serum albumin)
HPLC	: 高速液体クロマトグラフィー (high performance liquid chromatography)
IAA	: インドール-3-酢酸 (indole-3-acetic acid)
IRES	: mRNA 内部リボソーム進入部位 (internal ribosomal entry site)
IS	: 3-インドキシル硫酸 (3-indoxyl sulfuric acid)
K_m	: ミカエリス定数 (michaelis constant)
NMWL	: 公称分画分子量 (nominal molecular weight limit)
MULTI	: 非線形最小二乗法プログラム (a nonlinear least squares program)
NSR	: 健常者血清残渣 (normal serum residue)
OATP	: 有機アニオン輸送ポリペプチド (organic anion transporting polypeptide)
PBS	: リン酸緩衝生理食塩液 (phosphate buffered saline)
P_{dif}	: 非特異的クリアランス (non-specific uptake clearance)

$[S]$: 反応薬物濃度 (substrate concentration)
SN-38G	: SN-38 グルクロン酸抱合体 (SN-38 glucronide)
$T_{1/2}$: 消失半減期 (elimination half-life)
UGT	: UDP-グルクロノシルトランスフェラーゼ (UDP-glucuronosyl transferase)
V_{max}	: 最大反応速度 (maximum velocity)
V_{max}/K_m	: 固有クリアランス (intrinsic clearance)

序論

慢性腎不全 (CKD) は、加齢による生理学的な機能低下に加えて、急性腎不全からの移行や耐糖能異常、高血圧、脂質異常症などの生活習慣病による腎内微小血行動態変化や血管内皮障害を成因とする。経年的かつ不可逆的な糸球体や尿細管の障害が進行することにより腎機能が顕著に低下すると末期腎不全に移行し、維持透析あるいは腎移植などの腎代替療法を余儀なくされる¹⁾。全世界の CKD の有病率は全人口の 8-16% と推計され、2015 年における我が国の CKD の有病率及び罹患率は、それぞれ世界第 3 位及び第 2 位と上位に位置している^{2,3)}。本邦では、Stage 3 以上の CKD 患者の有病率が、超高齢社会を背景に、成年人口の 13% (8 人に 1 人) であり、数多くの末期腎不全患者予備軍を抱えている⁴⁾。日本透析医学会が行った統計調査では、日本における透析患者数は年々増加しており^{5,6)}、末期腎不全患者数は増加の一途を辿ることが予想される (Figure 1-1)。

CKD は、高血圧を合併しやすく心筋梗塞や脳卒中などの心血管系疾患の危険因子であることが知られており、CKD 患者では CKD 進行防止及び合併症の治療を目的として様々な薬物治療が行われる。腎機能低下患者への薬物投与設計は、細心の注意が必要である。具体的には、投与薬物またはその活性代謝物の体外への排泄に占める糸球体濾過や尿細管分泌の寄与率が高い薬物は、腎機能の低下に応じて減量あるいは投与間隔の延長が必要である。多くの医療施設において、腎機能は血清クレアチニン濃度から推算されるクレアチニンクリアランス (CLcr) または推定糸球体濾過速度 (eGFR) により評価されている。しかしながら、これらの推定値は体格⁷⁾、心不全^{8,9)} や糖尿病¹⁰⁾ などの合併症の影響を受けるため、高齢者や長期臥床に伴う筋肉量の低下、心不全や糖尿病を合併しやすい腎機能低下患者では、患者集団ごとに最適な腎機能評価法を選択する必要がある。さらに、クレアチニンの一部は、腎臓以外における排泄経路を有することが報告され¹¹⁾、腎機能が顕著に低下している末期腎不全患者では、血清クレアチニンの測定値に腎外経路が与える影響が大きくなる。したがって、腎排泄型薬剤の投与設計を行う場合、末期腎不全患者では、より慎重な腎機能評価法の選択や解釈が要求される。

多くの医療従事者は添付文書を参考に用量調節をするものの、添付文書中に腎機能低下時における具体的な用量が記載されていない薬物も多い¹²⁾。腎機能に応じた適切な用量調節の方法論に、1973 年頃に提唱された薬物の尿中未変化体排泄率及び CLcr から算出する Giusti-Hayton 式¹³⁾ が知られている。Giusti-Hayton 式は、ネフロン中のすべての部位は同じように機能低下するというインタクトネフロン仮説に基づいている^{14,15)}。しかしながら、いくつかの腎障害モデル動物において、腎障害の原因に応じた糸球体機能

及び尿細管分泌機能の低下度合いが相違するとの報告がなされており¹⁶⁻¹⁹⁾、インタクトネフロン仮説は必ずしも常に成り立つものではないことが見出されている。また、2017年に報告されたシステマティックレビューでは、腎排泄型薬物の腎クリアランスは糸球体濾過速度 (GFR) で必ずしも正確に予測できないこと、その原因が CKD 進行に伴う GFR と尿細管分泌の低下度合いの乖離にあることが示唆されており、GFR のみならず尿細管分泌能を定量的に評価できるバイオマーカーの必要性が指摘されている²⁰⁾。このように、末期腎不全患者では、既存の投与設計理論を用いても腎排泄型薬物の投与が困難となる場合が存在している。

末期腎不全患者において、肝消失型薬物は、その消失に腎排泄経路の寄与が小さいことから減量の必要性はほとんどないと考えられてきた。しかしながら、小腸や肝臓などの腎臓以外からの薬物消失経路 (腎外クリアランス) の変動が報告されている。末期腎不全患者における腎外クリアランスの変動の可能性は、1960 年代に報告され²¹⁾、現在に至るまで数多くの症例報告や総説に取り上げられてきた。その数は年々増加し、2003 年から 2014 年までの間に報告された 7 遍の総説の中で、少なくとも 115 種類の薬物において、腎外クリアランスの変動が認められている²²⁻²⁸⁾ (Figure 1-1)。

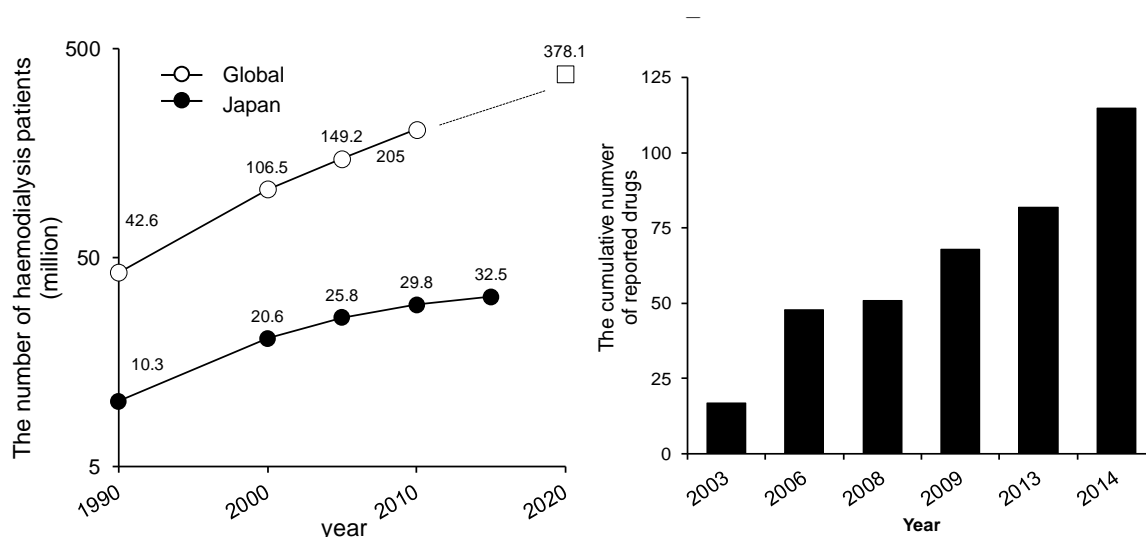


Figure 1-1. Increase of the number of hemodialysis patients and drugs with variation on non-renal clearances

A) the number of hemodialysis patients in global (open circle) or in Japan (closed circle), Open square represents estimate of number of patients receiving renal replacement therapy in 2020. Ref: (2), (3), (5), B) the number of hemodialysis patients, Ref: (22-28).

例えば、末期腎不全患者において、ワルファリンの血中 S 体/R 体濃度比は、腎機能正常者の 1.49 倍を示すこと²⁹⁾、すなわち CYP2C9 で代謝される S 体の血中濃度が CYP3A4 など他の CYP 分子種で代謝される R 体の血中濃度と比べて上昇することが報告されている。また、国際標準比プロトロンビン時間の目標域内を維持するのに必要なワルファリンの用量は、腎機能の低下時では減量することが必要であると示されている³⁰⁾。これらの事実は、末期腎不全患者において CYP2C9 機能が低下している可能性を示唆している。また、末期腎不全患者では、尿中未変化体排泄率が 1-4% であり、CYP1A2 基質薬物であるプロプラノロールのバイオアベイラビリティ (F) は 68% 増大し、これは初回通過効果の低下に起因すると考えられている^{31,32)}。一方で、血中からの消失に CYP がほとんど寄与していないフェキソフェナジンなどにおいても経口投与後の腎外クリアランスの変動が報告されており^{33,34)}、末期腎不全患者における腎外クリアランスの変動が代謝酵素の機能変動に留まらないものと考えられる。

山田ら³⁵⁾ は、全身吸収性のある医薬品 976 成分のインタビューフォームを調査することにより、重度腎機能低下患者における血中濃度-時間曲線下面積 (AUC) 上昇比と尿中未変化体排泄率の記載が得られた 70 成分のうち、腎排泄の寄与を考慮しても 25% 程度の薬物において、腎外クリアランスの低下を考慮しなければ合理的に血中濃度上昇を説明できないと報告している。Zang らも同様に、添付文書情報をもとに、腎機能低下患者において 25% の肝消失型薬物の AUC が上昇することを報告している²⁵⁾。腎外クリアランス変動を示す文献が数多く存在するが、特定の代謝酵素分子種の基質薬で血中濃度は一律に上昇せず^{25,35,36)}、腎外クリアランス変動に対する責任分子及び詳細な分子機構の解明は未だ明らかとなっていない。このことは、末期腎不全患者における肝消失型薬物の腎外クリアランス変動を考慮した薬物投与設計には至っていない要因のひとつであり、腎外クリアランスの責任分子を同定する必要がある。

一方、末期腎不全患者におけるがん罹患率は健常人に比べ 1.4 倍高く、死亡率は 1.9 倍高い³⁷⁾。また、透析技術や薬物療法の向上による末期腎不全患者の高齢化を反映して、末期腎不全患者の悪性腫瘍による年間死亡者数は年々増加している⁵⁾。抗がん薬は殺細胞性作用を有することから治療域が狭く、わずかな血中濃度の変動によって重篤な有害事象が発現して、死亡の転帰に至る可能性が考えられることから、末期腎不全患者における腎外クリアランス変動の機序を明らかにすることは喫緊の課題であると考えられる。

抗がん薬のひとつであるイリノテカン[®]は、肝代謝型薬物であり、静脈内投与後に肝細胞内に取り込まれ肝臓のカルボキシルエステラーゼ (CES) によって、強力なトポイソメ

ラーゼ I 阻害作用を持つ SN-38 に速やかに代謝活性化された後に全身循環に移行する³⁸⁾。血中の SN-38 は、肝細胞に取り込まれた後、UDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT) 1A1 によってグルクロン酸抱合化を受けて不活化され、投与量の 90% 以上が肝臓から胆汁中に排泄される³⁸⁾。SN-38 は、血漿タンパク結合率が 92–96% と非常に高く³⁹⁾、血液透析によってほとんど除去されない⁴⁰⁾。すなわち、イリノテカンとは、腎機能低下に伴う薬物動態の変動は生じないと考えられるため、透析患者における用量調節は不要とされている。しかしながら、腎機能正常患者と比較して、末期腎不全患者における SN-38 の最高血中濃度は 4 倍高値を示し、全身クリアランスは 30% 低下すること⁴¹⁾、また、消失半減期は顕著に延長することが報告されている⁴²⁾。さらに、腎機能の低下に伴い、イリノテカンの重篤な有害事象である好中球減少症及び遅発性下痢の悪化が報告されている^{43, 44)}。したがって、末期腎不全患者では SN-38 の肝臓からの消失能が低下している可能性が考えられる。

有機アニオン輸送ポリペプチド (OATP) は、solute carrier class に属し、solute organic anion transporter (SLCO) に分類される⁴⁵⁾、12 回膜貫通型の取り込みトランスポーターである。1994 年にラット肝細胞膜上に SLCO family の存在が確認され⁴⁶⁾、1999 年から 2000 年にかけて、ヒト肝細胞及び肝細胞類洞側膜上から単離及び同定された^{47–50)} (Figure 1-2)。OATP1B1 は、幅広い基質認識性を有しアニオン性薬物や内因性物質である胆汁酸、ビリルビンやステロイドホルモン並びに老廃物を、Na 非依存的かつ pH 感受性の膜電位依存的に⁵¹⁾ 肝細胞内への輸送に関与している。近年、OATP1B1 は、疾患、薬物動態における個人差⁵²⁾及び人種差^{53, 54)}、薬物間相互作用⁵⁵⁾との関連を示す報告が増えつつあり、OATP1B1 の臨床上的重要性が明らかにされている。

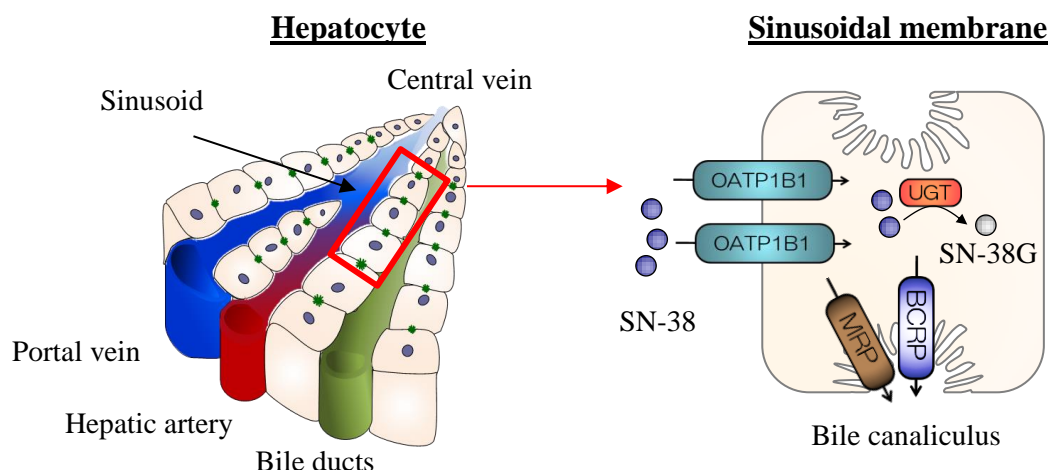


Figure 1-2. Hepatic uptake of SN-38 via OATP1B1 on sinusoidal membrane of hepatocyte

OATP1B1 をコードする *SLCO1B1* 遺伝子上にはアミノ酸置換を伴う複数の一塩基多型が存在する。特に、日本人において比較的頻度が高く、輸送活性の著しい低下⁵⁶⁾を引き起こす 521T>C (Val174Ala) 変異と 388A>G (Asn130Asp) 変異をホモにもつ *SLCO1B1**15 アレル保因者では⁵⁷⁾、SN-38 の全身曝露量の増大^{58,59)} 及び、消失半減期の延長⁶⁰⁾ がそれぞれ報告されている。*SLCO1B1**15 アレル保因者では、SN-38 の副作用である重篤な好中球減少症の発症頻度増大が報告されている⁶¹⁾。したがって、SN-38 の消失過程において、OATP1B1 が大きく寄与していることは明らかである。

イリノテカンのみならず、体内からの消失に OATP1B1 が関与する他の薬物においても、末期腎不全患者における薬物動態の変動が報告されている (Table 1-1)。さらに、Tan ら^{36, 62)} は、先行研究の文献値及び静的モデルを用いて、末期腎不全患者における CYP や OATP1B1 基質薬物の腎外クリアランスに及ぼす腎機能低下の影響を検討している。その結果、末期腎不全患者において、CYP3A4 や CYP1A2 では腎外クリアランスの変動は差が認められない一方で、OATP1B1 基質薬物は顕著なクリアランスの低下を認めている。したがって、末期腎不全患者では、OATP1B1 機能が低下することにより、SN-38 の肝取り込み過程に遅延を生じている可能性が考えられる。

Table 1-1. Pharmacokinetics of OATP1B1 substrates in patients with end-stage renal disease

	F (%)	Dose as intact drug in urine (%)	Metabolic pathway	Transporter	Sever renal failure (vs normal renal function)	Ref
Cerivastatin	60	None	CYP2C8		AUC 1.16-fold	C _{max} 1.3-fold (63)
			CYP3A4		AUC 1.38-fold	T _{1/2} 1.21 -fold (64)
Ezetimib			CYP3A4		AUC 1.6-fold	(65)
Erythromycin	35	5.0	CYP3A4	P-gp	EBT 0.72-fold	(66)
Fexofenadine	30	11.5	None	P-gp	AUC 2.84-fold	T _{1/2} 1.35-fold (33)
Atorvastatin	12.2	1.2 ^{a)}	CYP3A4	P-gp	AUC 1.74-3.78 -fold	T _{1/2} 1.14-1.64 -fold (67)
					Metabolite CL[M] ratio b) 0.21-0.24-fold	
Rosuvastatin	29	5.5	Slightly < 10% CYP2C9/2C19	P-gp	AUC 3-fold	(68)
Pravastatin	19.1	11-12	None	P-gp/MRP2		(69)
					C _{max} 1.68-fold	(63)
Imatinib	98.3	3-5	CYP3A4	BCRP/MRP	AUC 1.76-fold	(70)
Repaglinide	62.5	None	CYP2C8		AUC 1.75-fold	T _{1/2} 1.7-fold (71)
			CYP3A4		AUC 2.7-fold ^{c)}	(72)
					AUC 3.7-fold ^{d)}	
Simeprevir	46-62	< 1	Less contribution < 20% CYP3A	P-gp MRP/BCRP	AUC 1.62-fold	(73)

a) Measured as ¹⁴C radioactivity, b) [Metabolic clearance ratio]/[T_{1/2} of metabolite ratio],

Metabolic clearance = [AUC metabolite]/[ACU unchange]

c) CKD patients, d) end-stage renal disease

AUC: area under the drug concentration-time curve, CYP: cytochrome P450, BCRP: breast cancer resistant protein, F: bioavailability, MRP: multi drug resistant protein, T_{1/2}: elimination half-life

そこで本研究では、末期腎不全患者における SN-38 消失遅延機序の解明を目的として、OATP1B1 機能に及ぼす血清中蓄積成分の影響を網羅的に解析することにより責任分子の特定を目指した。第 1 章では、OATP1B1 安定発現細胞及び維持透析患者のプール血清を用いて、OATP1B1 を介した SN-38 の取り込みに及ぼす末期腎不全患者血清の影響を評価した。第 2 章では、OATP1B1 機能に影響する末期腎不全患者血清中の成分の特定を試みた。

以下、得られた結果を 2 章にわたり論述する。

第1章 OATP1B1 機能に及ぼす末期腎不全患者血清の影響

第1節 緒言

腎臓は、薬物などの異物のみならず、内因性成分や窒素代謝産物などの老廃物の排泄経路としても機能している。末期腎不全患者では、老廃物の蓄積や全身性の代謝異常が惹起され、腎機能正常時にほとんど血中に存在しない有害成分に全身が曝露される。

プロプラノロールは、CYP1A2 及び CYP2D6 により代謝される薬物であり、維持透析患者において血中濃度が顕著に増大することが報告されている^{31, 32)}。硝酸ウラニルにより誘発された急性腎障害モデルラットにおいて、摘出肝灌流実験によるプロプラノロールの代謝クリアランスは低下し、正常ラットの血液を再灌流することで正常ラットと同等まで回復することが報告されている⁷⁴⁾。また、同一の腎不全モデルラットから得られた肝ミクロソームによるプロプラノロールの代謝は変動しないことが報告されている⁷⁵⁾。すなわち、腎不全モデルラットにおいて、プロプラノロールの肝クリアランスは低下し、その原因は、血清中に蓄積した成分であると考えられる。また、維持透析患者血清中に含有される成分は、ラットあるいはヒト遊離肝細胞内へのサイロキシン⁷⁶⁾ やジゴキシン⁷⁷⁾ の取り込みをそれぞれ低下させることが報告されている。これらの報告内では肝取り込み低下に関わる責任分子の同定までに至っていないものの、サイロキシンは OATP1A2 及び OATP1B3^{78, 79)} の基質であることから、OATP1B1 の基質薬物においても、肝取り込みを直接的に阻害する成分が末期腎不全患者血清中に蓄積している可能性が考えられる。

そこで、本研究では、OATP1B1 安定発現細胞及び維持透析患者から得られたプール血清を用いて、OATP1B1 機能に及ぼす末期腎不全患者血清の影響を検討した。

第2節 方法

1. 試薬及び実験材料

カンプトテシン、SN-38 及び酪酸ナトリウムは、東京化成工業株式会社 (Tokyo, Japan) より購入した。ジェネティシン (G418) 及びヒト血清アルブミンは、ナカライテスク株式会社 (Kyoto, Japan) よりそれぞれ購入した。Lipofectamine™ 2000 Regent (Lipofectamine) 及び Opti-MEM® I Reduced-Serum Medium (Opti-MEM) は Life Technologies (Carlsbad, CA, USA) より、ウシ真皮由来 I 型コラーゲンは、新田ゼラチン株式会社 (Osaka, Japan) よりそれぞれ購入した。Vivaspin®-2 (30,000 公称分画分子量 (NMWL) Hydrosart®) は、Sartorius Stedim Biotech (Darmstadt, HE, Germany) から購入した。その他の試薬は、いずれも試薬特級もしくは高速液体クロマトグラフ (HPLC) 用の規格のものを使用した。

2. 細胞及び細胞培養液

ヒト胎児由来腎臓 (HEK) 293 細胞は、ヒューマンサイエンス研究資源バンク (Tokyo, Japan) より購入した。細胞培養液は、ウシ胎児血清 (終濃度 10%, Lot No. AXM56561 Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)、ペニシリン-ストレプトマイシン溶液 (PS-mix: 終濃度ペニシリン 100 U/mL, ストレプトマイシン 100 µg/mL, Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA)、非必須アミノ酸溶液 (NEAA: 終濃度 0.1 mM, Invitrogen Co.) 及び G418 (終濃度 0.72 mM) を添加した Dulbecco's modified Eagle's medium (D-MEM, Invitrogen Co.)を用いた。mRNA 内部リボソーム進入部位 (IRES) 及びネオマイシン (G418) 耐性遺伝子を挿入したプラスミドベクターは (pIRESneo3) 並びに pIRESneo3 に *SLCO1B1* 配列を導入したプラスミドベクター (pIRES-OATP1B1) はタカラバイオ株式会社 (Kusatsu, Japan) より購入した。

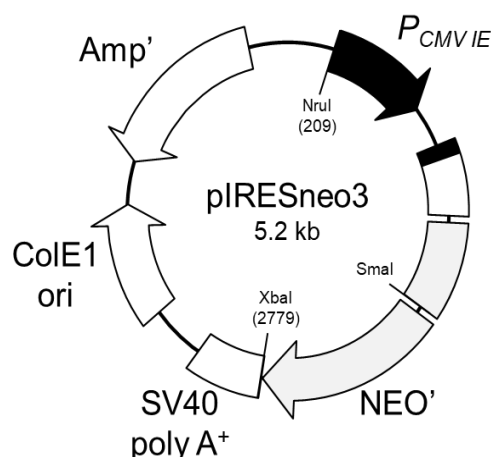


Figure 1-3. pIRESneo3 Vector Map and Multiple Cloning Site (MCS)
The vector map was obtained Clontech

3. OATP1B1 安定発現 HEK 293 細胞の作製

6 穴細胞培養プレート (培養面積 9.6 cm²) に HEK293 細胞を 1.0×10⁶ cells/well の細胞密度で播種し、37°C、5%CO₂ 下にて 24 時間培養し、*SLCO1B1* 形質導入に用いた。Opti-MEM に pIRES-OATP1B1 もしくは pIRESneo3 (0.016 g/L) を加えた溶液に、Opti-MEM により 25 倍希釈した Lipofectamine を等量混合し、室温で 20 分間静置した。その混合液に 3 倍量の PS-mix 非含有細胞培養液を加え、形質導入用細胞培養液とした。6 穴細胞培養プレートに培養した細胞を、PS-mix 非含有細胞培養液で 2 回洗浄し、形質導入用細胞培養液を 2 mL 添加後、37°C、5%CO₂ 条件下にてさらに 24 時間培養した。リン酸緩衝性生理食塩水 (PBS (-): 137 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.5 mM KH₂PO₄, 8.1 mM Na₂HPO₄) により 2 回洗浄後、トリプシン-EDTA 1 mL により剥離し、各穴に PS-mix 非含有細胞培養液を 4 mL ずつ添加し、150×g の条件下で 6 分間遠心分離することで細胞を回収した。得られた細胞懸濁液は、6 穴細胞培養プレートに 2.0×10⁵ cells/well の細胞密度で播種し、37°C、5%CO₂ 条件下にて 24 時間培養後、OATP1B1 安定発現細胞のクローニングに用いた。

4. OATP1B1 安定発現細胞のクローニング

OATP1B1 安定発現細胞のクローニングは、第 1 章 3 節で得た細胞について、1.44 mM G418 を含有した細胞培養液で 37°C、5%CO₂ 条件下にて 2 週間継代培養した。その後、96 穴細胞培養プレート (培養面積 0.32 cm²) に 0.5 cells/100 μL/well の細胞密度で播種し、37°C、5%CO₂ 気流下にて 22 日間培養した。単離した細胞のコロニーを 24 穴細胞培養プレート、60 mm 培養皿を経て 100 mm 培養皿に順次スケールアップした。pIRES-OATP1B1

もしくは pIRESnro を形質導入して樹立した細胞をそれぞれ HEK/OATP1B1 及び HEK/Mock 細胞と命名した。

5. HEK/OATP1B1 細胞における OATP1B1 mRNA 発現解析

5-1. スピнкаラム法による全 RNA の抽出

HEK/OATP1B1 及び HEK/Mock 細胞を 6 穴細胞培養プレート (培養面積 9.6 cm^2) に $2.0 \times 10^5\text{ cells/mL}$ の細胞密度で播種し、7 日間培養した細胞から全 RNA を抽出した。全 RNA は、GenElute™ Mammalian Total Miniprep Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を用いてスピнкаラム法により抽出した。まず、細胞を剥離した後回収し、lysis solution (1% 2-メルカプトエタノール含有) を $500\text{ }\mu\text{L}$ 添加後攪拌し、細胞を溶解した。得られた細胞溶解液を GenElute™ Filtration Column に移し、 $11,300 \times g$ で 2 分間遠心分離した。得られたホモジネートに二酸化ジエチル処理済み 70 %エタノール $500\text{ }\mu\text{L}$ を加えて混合後、GenElute™ Nucleic Acid Binding Column に移し、 $11,300 \times g$ で 30 秒間遠心分離することで RNA をカラムに吸着させた。残りの細胞溶解液 $500\text{ }\mu\text{L}$ 中の RNA も同じカラムに同様の操作により吸着させた。カラムに吸着した RNA は、wash solution 1 を $500\text{ }\mu\text{L}$ 加え、 $11,300 \times g$ で 30 秒間遠心分離することにより洗浄した。カラムを新しいマイクロチューブに移し、wash solution 2 を $500\text{ }\mu\text{L}$ 加え、 $11,300 \times g$ で 30 秒間遠心分離した後、さらに wash solution 2 を $500\text{ }\mu\text{L}$ 加え、 $11,300 \times g$ で 2 分間遠心分離した。マイクロチューブを交換後、elution solution $50\text{ }\mu\text{L}$ を添加し、 $11,300 \times g$ で 1 分間遠心分離することによりカラムから全 RNA を溶出させた。RNA 濃度 ($\mu\text{g/mL}$) は、RNA 溶液の吸光度 (A_{260}) を Smart Spec™ 3000 (BIO-RAD, Hercules, CA, USA) で測定し、 $\text{RNA 濃度 } (\mu\text{g/mL}) = A_{260} \times 40$ にて算出した。また、同時に 280 nm における吸光度も測定することにより、核酸の純度を確認した。なお、核酸の純度 (A_{260}/A_{280}) が 1.6 以上の RNA 溶液を RNase-free water で $300\text{ }\mu\text{g/mL}$ になるように希釈し、以下の実験まで -80°C で冷凍保存した。

5-2. 逆転写反応

逆転写反応は、Rever Tra Ace® qPCR RT Kit (TOYOBO, Osaka, Japan) を用いて行った。まず、逆転写反応による cDNA の合成は i-Cycler (BIO-RAD) を用いて、反応溶液の全量を $30\text{ }\mu\text{L}$ (Nuclease-free Water $19.5\text{ }\mu\text{L}$ 、 $5\times\text{RT buffer}$ $6\text{ }\mu\text{L}$ 、RT Enzyme Mix $1.5\text{ }\mu\text{L}$ 、RNA サンプル $3\text{ }\mu\text{L}$) とし、逆転写反応 (37°C 、15 分間)、逆転写酵素の不活化 (98°C 、5 分間)、冷却 (4°C) の条件下にて順次行った。

5-3. リアルタイム PCR

リアルタイム PCR は、7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, CA, USA) を用いて、反応溶液の全量を 20 μ L [滅菌蒸留水 7.16 μ L, THUNDERBIRDTMSYBR[®] qPCR Mix (TOYOBO) 10 μ L, 10 μ M センスプライマー 0.4 μ L, 10 μ M アンチセンスプライマー 0.4 μ L, 50 \times ROX reference dye (TOYOBO) 0.04 μ L, 逆転写反応後の検体 2 μ L] とし、初期熱変性 (95 $^{\circ}$ C, 1 分間)、PCR 反応 [(95 $^{\circ}$ C, 10 秒間、60 $^{\circ}$ C, 30 秒間) \times 45 サイクル]、融解曲線分布 (95 $^{\circ}$ C, 15 秒間) の条件下で行った。なお、PCR 反応に用いた特異的オリゴヌクレオチドプライマーは、株式会社ジーンデザイン (Ibaraki, Japan) にて合成されたものを使用し、その塩基配列⁴⁸⁾を以下に示す。

OATP1B1 (PCR 産物: 246 bp)

センスプライマー: 5'-TGG GAA TTG GAG GTG TTT TG-3'

アンチセンスプライマー: 5'-AACA AGT GGA TAA GGT CGA TGT TGA-3'

β_2 M (PCR 産物: 133 bp)

センスプライマー: 5'-CTC GCG CTA CTC TCT CTT TC-3'

アンチセンスプライマー: 5'-CGG ATG GAT GAA ACC CAG AC-3'

また、得られた実験値は、SYBR[®] Green I の蛍光強度を基に C_T 値として算出した。なお、目的遺伝子の発現量は、 $2^{-\Delta C_T}$ として表し、 ΔC_T は次式 (1-1) を用いて算出した。

$$\Delta C_T = \Delta C_{T \text{ OATP1B1}} - \Delta C_{T \beta_2M} \quad \text{式 (1-1)}$$

ここで、 $C_{T \text{ OATP1B1}}$ 及び $C_{T \beta_2M}$ は、それぞれ目的遺伝子及び内標準遺伝子 (β_2 M) の C_T 値を表す。

6. コラーゲンコート法

取り込み実験に用いる 24 穴細胞培養プレートは、事前に細胞接着と伸展の促進を目的として、24 穴細胞培養プレートに濾過滅菌済 5 mM 酢酸を用いて希釈したウシ真皮由来 I 型コラーゲンを処置した。各穴にコラーゲン (3 mg/mL) を 0.5 mL 添加し、30 分間静置後、コラーゲン溶液を吸引除去した。その後少なくとも 30 分間以上風乾させ、0.5 mL の滅菌済 PBS (-) で 3 回洗浄し細胞播種に用いた。

7. 細胞培養

HEK/OATP1B1 及び HEK/Mock 細胞はコラーゲン処置済 24 穴細胞培養プレートに 5.5×10^4 cells/well の細胞密度で、37°C、5%CO₂ 条件下にて 3 日間培養した。その後、OATP1B1 の転写活性を安定化させる目的でヒストン脱アセチル化酵素阻害薬である酪酸ナトリウム (終濃度 5 mM) 含有細胞培養液に交換し、さらに 24 時間培養したものを実験に用いた⁸⁰⁾。

8. 血清

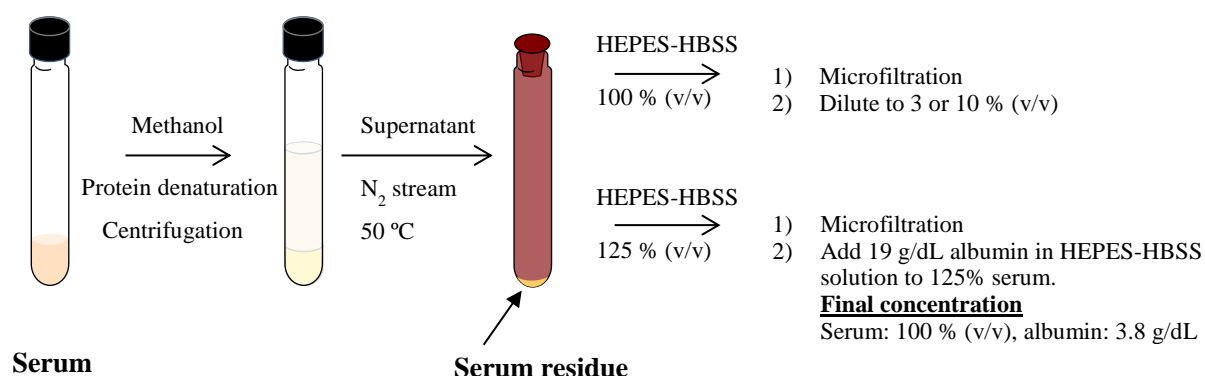
健常者血清は、プール血清を Merck Millipore Ltd. (Darmstadt, HE, Germany) より購入した。末期腎不全患者血清は、仁真会白鷺病院 (Osaka, Japan) にて透析直前の維持透析患者から提供を受け、400 名以上の患者のプール血清として実験に用いた。すなわち、日常診療のために採血された維持透析患者の採血スピッツ管中の残余血清検体は、ろ紙を通過させることにより凝固したフィブリン分子を除去した後に、単一容器に回収してプール血清とした。プール血清は、取り込み実験に使用するまで -80°C で凍結保存した。

9. 血清残渣含有反応溶液の調製

本研究では、既報に従い⁸¹⁾、健常者プール血清及び末期腎不全患者プール血清をそれぞれ血清の 3 倍量のメタノールで除タンパク処理した健常者血清試料及び末期腎不全患者血清試料を用いた。すなわち、各血清をメタノールにより除タンパクした後、窒素気流下 50°C で乾固して得られた血清残渣に HEPES 含有 Hank's Balanced Salt Solution 溶液 (HEPES-HBSS: 137 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.3 mM CaCl₂, 0.4 mM MgSO₄, 0.5 mM MgCl₂, 0.3 mM Na₂HPO₄, 0.4 mM KH₂PO₄, 4.2 mM NaHCO₃, 5.6 mM グルコース及び 25.0 mM HEPES) を除タンパク処理前の血清と等量となるように加え、得られた HEPES-HBSS 溶液を精密ろ過したものを 100 % (v/v) 血清残渣含有 HEPES-HBSS 溶液とした。

また、生体内条件下において、ビリルビン、脂肪酸、金属イオンなどの血清中成分のいくつかはアルブミンなどのタンパク質に結合して存在していることから^{82, 83)}、血清残渣のみを含有する反応溶液を用いた検討ではタンパク結合性の違いによっては血清含有率に応じて過小または過大評価してしまう恐れがある。したがって、より生体内条件下で血清残渣の影響を評価するために、アルブミンを加えて評価をした。すなわち、まず血清残渣に HEPES-HBSS を添加し、125 % (v/v) 血清を調製し、さらに、精密ろ過した。この 125 % (v/v) 血清残渣含有 HEPES-HBSS 溶液に対して、4 分の 1 量の 19 g/dL アル

ブミン含有 HEPES-HBSS 溶液を混和し、アルブミン含有反応溶液（終濃度：血清, 100 % (v/v); アルブミン, 3.8 g/dL）として使用した。



Scheme 1-1. Preparation of uptake buffer containing serum component

10. 取り込み実験に用いた緩衝液

取り込み実験に用いた SN-38 溶液は、取り込み実験前日にジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解し、等量の 0.05 M NaOH を添加し、SN-38 を完全にカルボキシル体に変換したものを使用した⁸⁴⁾。取り込み実験の反応溶液は、タンパク非結合型の SN-38 濃度が、5–50 μM とし、DMSO 濃度は 0.5% になるように HEPES-HBSS 溶液に溶解して調製した。また、細胞の洗浄には、0.9 mM CaCl_2 及び 0.9 mM MgCl_2 を加えた PBS (PBS (+)) を用いた。

11. SN-38 の取り込み実験

24 穴細胞培養プレート各穴の細胞培養液を吸引除去し、HEPES-HBSS 溶液で 2 回洗浄後、HEPES-HBSS 溶液で 10 分間前加温した。反応溶液 0.3 mL を添加することにより取り込み実験を開始した。開始 30 秒後に、24 穴細胞培養プレート中の溶液を吸引除去することにより取り込みを停止した。その後直ちに氷上に移し、細胞を氷冷した PBS (+) 0.5 mL で 2 回、2 mL で 1 回素早く洗浄した。取り込み実験終了後の細胞は、0.4 M NaOH

水溶液にて溶解後、0.4 M HCl 水溶液にて中和したものを検体とし、SN-38 の定量及びタンパク定量に用いた。

12. SN-38 の定量

SN-38 は、除タンパク法及び HPLC-蛍光光度法により定量した。すなわち、検体 100 μ L に内標準物質として 5 ng/mL カンプトテシン含有 50% メタノール水溶液 100 μ L 及びアセトニトリル 400 μ L を順次添加し、1 分間攪拌後、10,000 \times g で 3 分間遠心分離することで除タンパクした。上清 500 μ L を別のガラス製試験管に分取後、SN-38 をラクトン体に変換するために 0.02 M HCl 30 μ L を加え⁸⁵⁾、40 $^{\circ}$ C で窒素気流下にて蒸発乾固した。さらに、残渣に移動相 (0.02 M クエン酸緩衝液 (pH 3.0): アセトニトリル= 75 : 25) 200 μ L を添加した後、オートインジェクター: SIL-20A (島津製作所, Kyoto, Japan) を用いて蛍光検出器 (RF-20Axs, 島津製作所) 付 HPLC 装置 (ポンプ; LC-20AT, 島津製作所, システムコントローラー; CBM-20A, 島津製作所) に注入し、SN-38 を定量した。その際の分析条件は、カラム; Inertsil ODS-III (長さ 25 cm \times 内径 4.0 mm, 粒径 5 μ m, ジーエルサイエンス株式会社, Tokyo, Japan)、流速; 1.0 mL/min, カラム温度; 40 $^{\circ}$ C, 励起波長 370 nm, 蛍光波長 530 nm であった。なお、SN-38 及びカンプトテシンの保持時間は、それぞれ 17.3 分及び 18.7 分であった。SN-38 の検量線 (3.125–50 nM) は、原点を通る良好な直線性を示した ($r^2=0.999$)。タンパク定量は、標準タンパク質としてウシ血清アルブミンを用いて、Lowry らの方法⁸⁶⁾ に準じて行った。

13. アルブミン含有反応溶液中のタンパク非結合型 SN-38 濃度測定

アルブミンを含有した反応溶液中では、SN-38 はアルブミンに強く結合する^{39, 85)}。血清成分中にも、アルブミンと結合する成分が存在していることから、タンパク結合置換によるアルブミンからの SN-38 の解離によって、末期腎不全患者及び健常者血清間で SN-38 のタンパク非結合型濃度に差異が生じる可能性がある。一般的に、タンパク非結合型の薬物がトランスポーターによって輸送されるが、タンパク結合している薬物は輸送されないと考えられており、取り込み機能の評価を行う場合は、反応溶液中のタンパク非結合型濃度を測定し、取り込み速度を非結合型濃度で補正する必要がある。そこで、取り込み実験に用いたアルブミン含有反応溶液は、取り込み実験と同時に限外ろ過法を用いて SN-38 タンパク非結合型濃度を測定した。すなわち、アルブミン含有反応溶液の一部は、取り込み実験開始時間に合わせて Vivaspin[®]-2 を用いた限外濾過 (2,860 \times g, 1 分

間)を行った。得られた溶液中の SN-38 濃度は、アルブミン含有試験溶液中のタンパク非結合型濃度とした。

タンパク非結合型 SN-38 濃度の測定は、次の条件で行った。なお、反応溶液中の SN-38 総薬物濃度測定の検体は、反応開始直前の反応溶液 50 μ L を HEPES で 10 倍希釈し、以降の手順は、ろ過ろ液中の SN-38 非結合型濃度測定用の検体と同様に行った。総薬物濃度の検体及び限外ろ過された SN-38 の検体それぞれ 50 μ L に 1000 ng/mL カンプトテン含有 50%メタノール水溶液 50 μ L 及びメタノール 150 μ L を順次添加し、1 分間攪拌後、1,630 \times g で 30 分間遠心分離することで除タンパクした。上清 150 μ L を別のガラス製試験管に分取後、SN-38 を全てラクトン体に変換するために 0.02 M HCl 10 μ L を加え⁸⁵⁾、40 $^{\circ}$ C で窒素下にて蒸発乾固した。さらに、残渣に移動相 (0.02 M クエン酸緩衝液 (pH 3.0) : アセトニトリル= 75 : 25) 200 μ L を添加した後、第 2 章第 2 節 11 項で示す取り込み実験と同一条件の HPLC 法により SN-38 を定量した。

14. OATP1B1 活性の評価

アルブミン非存在下における OATP1B1 特異的な SN-38 の取り込み速度は、HEK/OATP1B1 細胞における取り込み速度から HEK/Mock 細胞における取り込み速度を差し引いて算出した。また、アルブミン存在下における SN-38 の細胞内への取り込みクリアランスは、OATP1B1 特異的な SN-38 の取り込み速度を試験溶液中の SN-38 タンパク非結合型濃度で除することにより算出した。

$$dX/dt = Uptake_{OATP1B1} - Uptake_{Mock} \quad \cdot \cdot \cdot \cdot \cdot \cdot \cdot \cdot \cdot (1-2)$$

$$CL_{OATP1B1} = \frac{dX/dt}{C_u} \quad \cdot \cdot \cdot \cdot \cdot \cdot \cdot \cdot \cdot (1-3)$$

ここで、 dX/dt 、 $Uptake_{OATP1B1}$ 、 $Uptake_{Mock}$ 、 $CL_{OATP1B1}$ 及び C_u は、それぞれ OATP1B1 特異的な取り込み初速度 (pmol/mg protein/min)、HEK/OATP1B1 細胞における取り込み初速度 (pmol/mg protein/min)、HEK/Mock 細胞における取り込み初速度 (pmol/mg protein/min)、OATP1B1 特異的な取り込みクリアランス (μ L/mg protein/min)、反応溶液中の SN-38 タンパク非結合型濃度 (μ M) を示す。

15. 速度論解析

OATP1B1 活性の速度論的パラメータであるミカエリス定数 (K_m , μM) 及び最大取り込み速度 (V_{max} , $\text{pmol/mg protein/0.5 min}$) は、非線形最小二乗法プログラム (MULTI) により⁸⁷⁾、HEK/OATP1B1 及び HEK/Mock 細胞により得たデータに式 (1-3) 及び (1-4) をそれぞれ同時に当てはめることにより算出した。

$$V = \frac{V_{max} \times S}{K_m + S} + P_{dif} \times S \quad \dots \dots \dots (1-4)$$

$$V = P_{dif} \times S \quad \dots \dots \dots (1-5)$$

ここで、 V 、 P_{dif} 及び S は、それぞれ取り込みの初速度 ($\text{pmol/mg protein/min}$)、OATP1B1 非特異的取り込み速度 ($\mu\text{L/mg protein/min}$)、反応溶液の SN-38 タンパク非結合型濃度 (μM) を示す。

16. 統計処理

得られた測定値は、すべて平均値 \pm 標準誤差 (S.E.) で表示した。統計学的検定として、二群間の比較には、unpaired student's t test を適用した。その際、危険率 5%未満 (両側) を有意差ありとした。

17. 倫理的配慮

本研究は、本研究はヒト血清試料を用いた研究であり、ヘルシンキ宣言の精神を遵守し、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」(平成 29 年 3 月 8 日改訂) に従った。なお、本研究は、仁真会白鷺病院及び京都薬科大学倫理委員会の承認を得た上で行った。

第3節 結果

1. HEK/OATP1B1 細胞における OATP1B1 の mRNA 発現量

HEK/Mock 細胞と比較して、HEK/OATP1B1 細胞において、OATP1B1 の mRNA の発現量は顕著に高値を示した (Figure 1-4)。

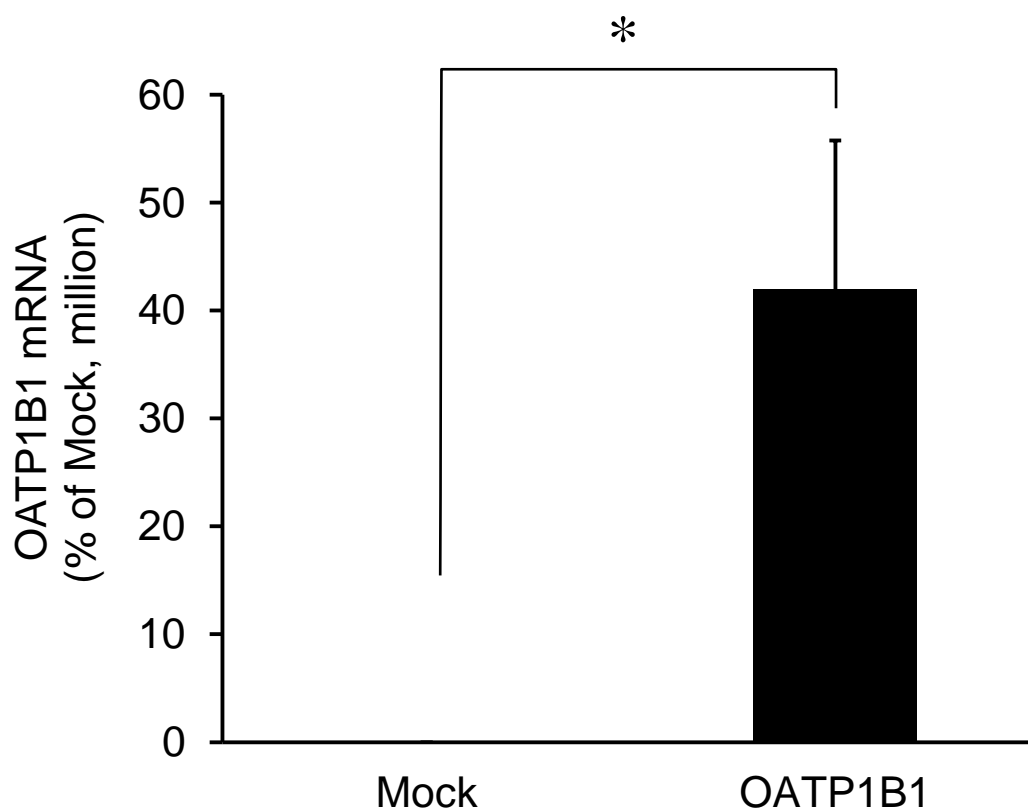


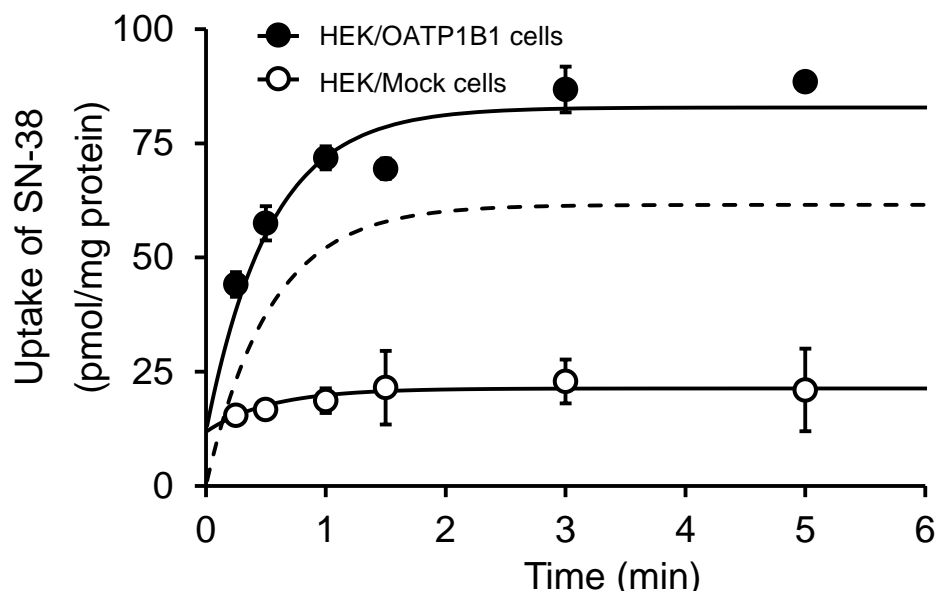
Figure 1-4. OATP1B1 mRNA expression level in HEK/OATP1B1 and HEK/Mock cells

HEK293 cells transfected with empty plasmid (HEK/Mock) or OATP1B1 cDNA (HEK/OATP1B1) were seeded at 2.0×10^6 cells/5 mL into 60 mm dish. After the cells were incubated with normal medium for 24 hours, OATP1B1 mRNA expression levels were quantified by real time RT-PCR. Each bar represents the mean \pm S.E. (n=3). The difference between OATP1B1 mRNA expression levels in HEK/Mock and HEK/OATP1B1 was analyzed by unpaired Student's t-test (* $p < 0.05$).

2. OATP1B1 安定発現細胞における OATP1B1 を介した SN-38 の取り込みの評価

HEK/OATP1B1 細胞における OATP1B1 を介した SN-38 の取り込み量は、1 分間までの範囲において時間依存的に増加し(Figure 1-5A)、10 μM までは濃度依存的に増加した(Figure 1-5B)。

(A) Time- dependent uptake of SN-38



(B) Concentration-dependent uptake of SN-38

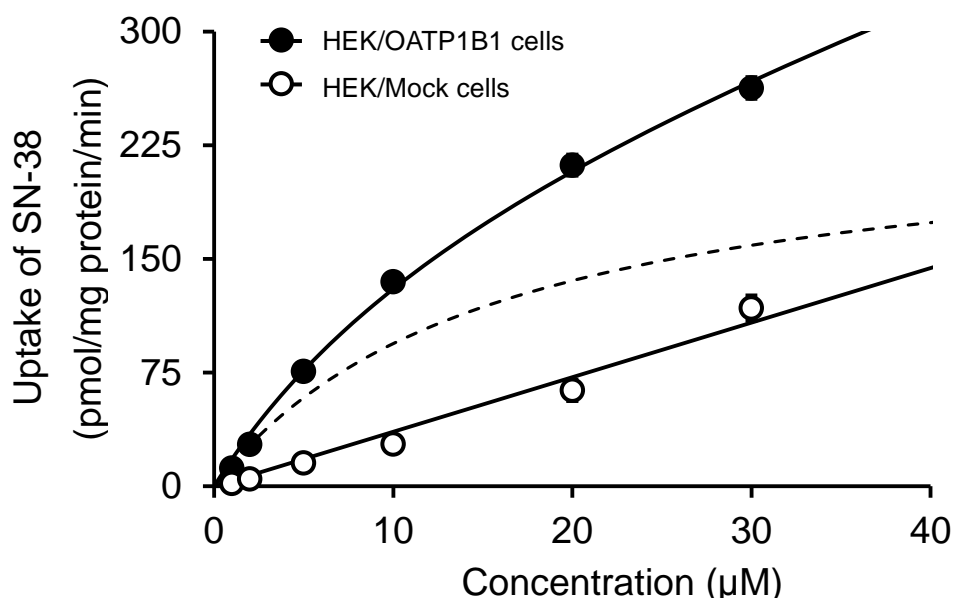
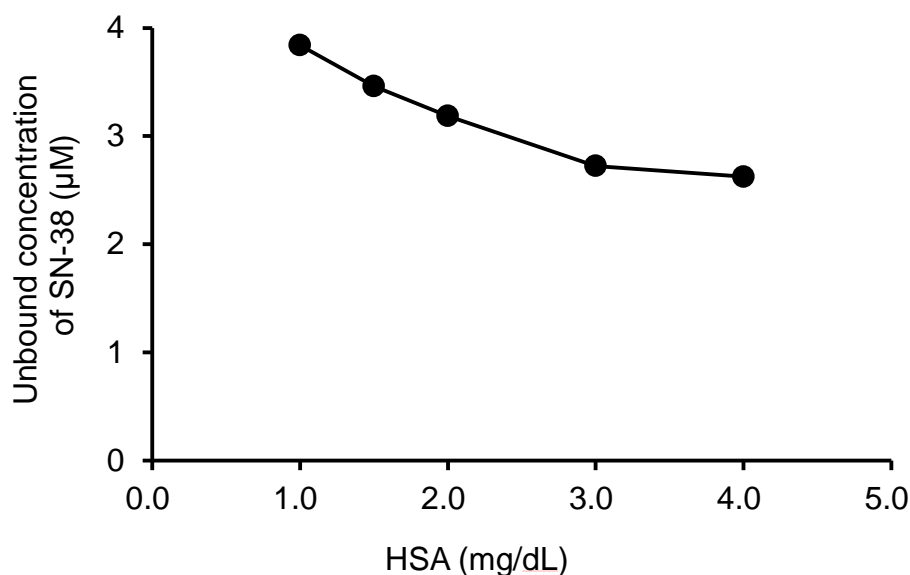


Figure 1-5. Evaluation of OATP1B1-mediated uptake of SN-38 by OATP1B1 cells

Cellular uptake of SN-38 was determined by following incubation of SN-38 (1-30 μM) in HEK/OATP1B1 at 37°C for 30 sec after 10 min preincubation. Each point represents the mean \pm S.E. ($n = 4$). The solid lines represented cellular uptake of SN-38 in HEK/OATP1B1 and HEK/Mock cells, fitted by Michaelis-Menten plot with MULTI program. Dashed-line represents OATP1B1-specific uptake of SN-38.

反応溶液中の SN-38 タンパク非結合型濃度は、アルブミンの添加濃度依存的に低下した (Figure 1-5C)。SN-38 の取り込み速度は、アルブミンの有無によらず、SN-38 非結合型濃度に比例して増大した ($R^2 = 0.9955$) (Figure 1-5D)。

(C) Unbound fraction of SN-38



(D) Cellular uptake of SN-38

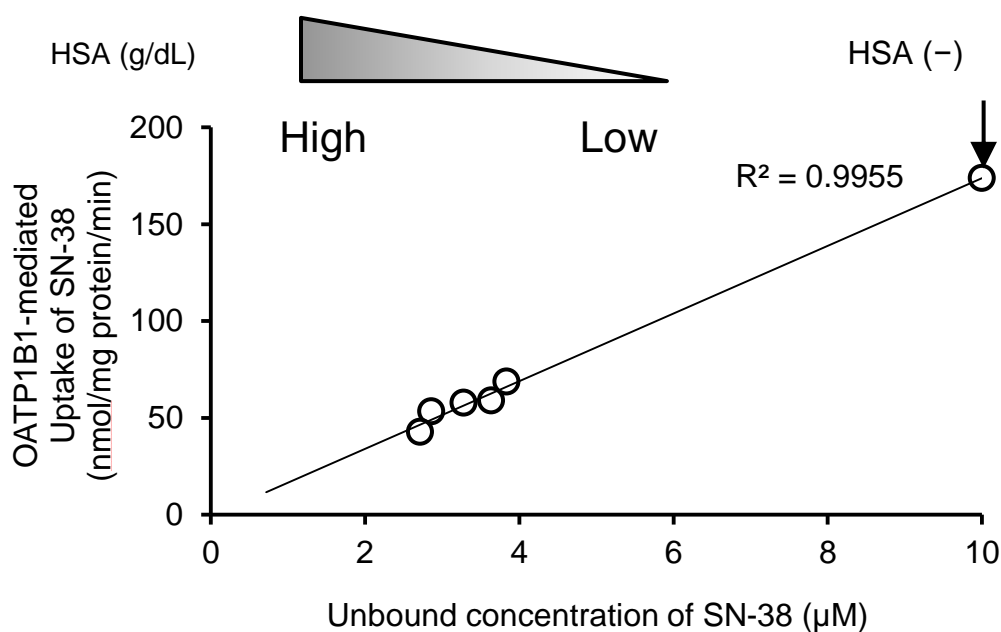


Figure 1-5. Evaluation of OATP1B1-mediated uptake of SN-38 by OATP1B1

(C) Unbound concentration of SN-38 in uptake buffer with albumin was determined by using ultrafiltration method, followed by a measure by HPLC. (D) Cellular uptake of SN-38 was determined by following incubation of SN-38 (10 μM) in HEK/OATP1B1 at 37°C for 30 sec after 10 min preincubation. HSA: human serum albumin.

アルブミン含有条件下における OATP1B1 を介した SN-38 の取り込みクリアランスは、アルブミン濃度に関わらず一定であり、そのクリアランスはアルブミン非含有条件下と同等であった (Figure 1-5E)。

(E) OATP1B1-mediated uptake clearance of SN-38

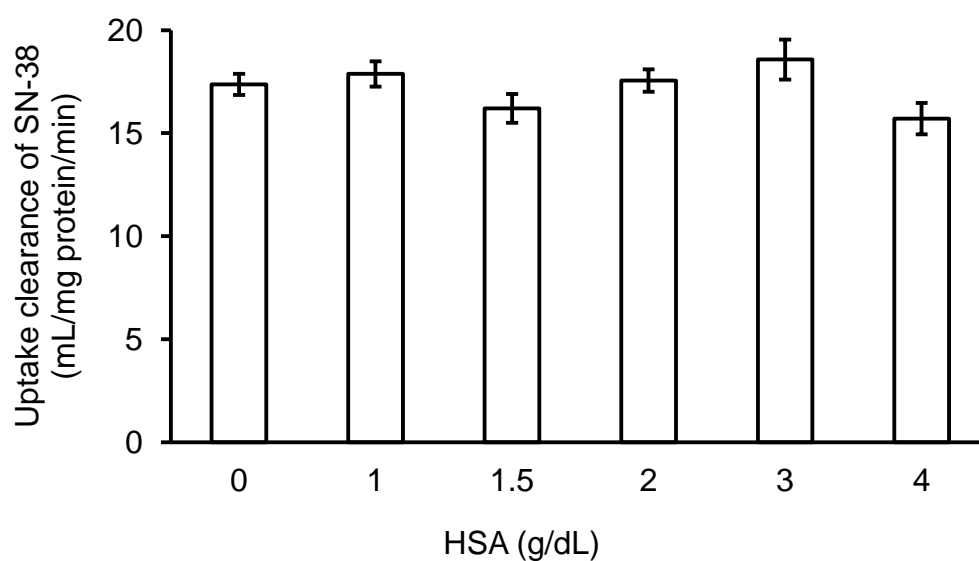


Figure 1-5. Evaluation of OATP1B1-mediated uptake of SN-38 by OATP1B1

(E) Uptake clearance of SN-38 was determined by normalizing intracellular uptake of SN-38 to extracellular concentration of unbound SN-38 in the albumin solution. Each point represents the mean \pm S.E. (n = 4). HSA: human serum albumin.

3. OATP1B1 機能に及ぼす健常者及び末期腎不全患者血清残渣の影響

アルブミン非存在下における健常者血清残渣及び末期腎不全患者血清残渣は、いずれも血清含有量依存的に OATP1B1 を介した SN-38 の取り込みを抑制し、その抑制の程度は末期腎不全患者血清残渣において軽微であった (Figure 1-6)。

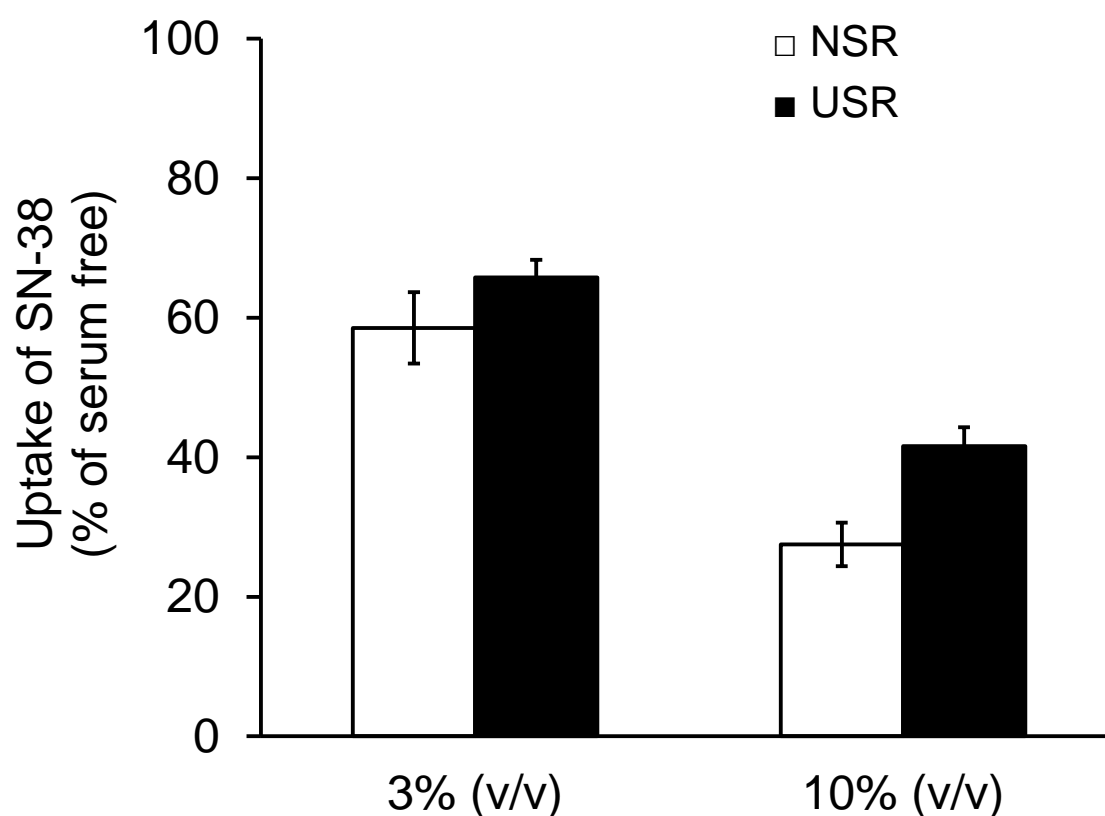


Figure. 1-6. Effect of NSR and USR without HSA on uptake of SN-38 by OATP1B1

The uptake of SN-38 was determined following incubation with SN-38 (10 μ M) in the presence of 3 and 10 % (v/v) of normal serum or uremic serum at 37°C for 0.5 min after 10 min preincubation. Each column and point represent the mean \pm S.E. (n = 4). HSA: human serum albumin, NSR: normal serum residue, USR: uremic serum residue.

4. OATP1B1 機能に及ぼすアルブミン含有末期腎不全患者血清残渣の影響

アルブミン含有健常者血清残渣及びアルブミン含有末期腎不全患者血清残渣は、血清非存在時と比較して、OATP1B1 を介した SN-38 の取り込みクリアランスをそれぞれ 43.4% 及び 17.4% と有意に低下させた。また、アルブミン含有末期腎不全患者血清残渣は、アルブミン含有健常者血清残渣の場合と比較して OATP1B1 を介した SN-38 の取り込みクリアランスを顕著に 40.1% 低下させた (Figure 1-7)。

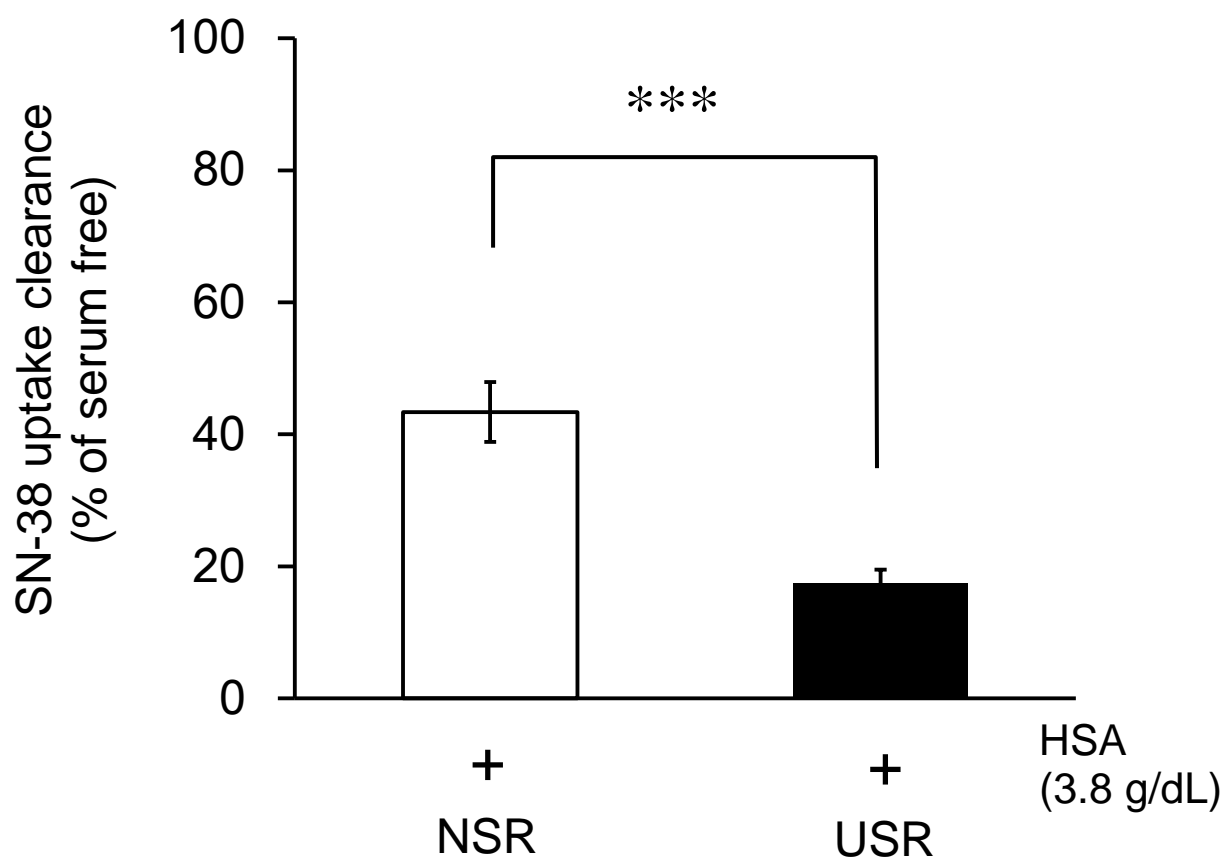


Figure 1-7. Effect of NSR and USR with HSA on uptake of SN-38 by OATP1B1

The uptake of SN-38 was determined following incubation with SN-38 (37.2 μ M) and human serum albumin in the presence of normal serum or uremic serum at 37°C for 0.5 min after 10 min preincubation. Each column and point represent the mean \pm S.E. (n = 4). The significance of differences between the mean values was determined by unpaired Student's t test ($^{***}p < 0.001$). HSA: human serum albumin, NSR: normal serum residue, USR: uremic serum residue.

Katsube Y., *et al.*, *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2017**, 79, 783–789, Figure 1.

5. アルブミン含有末期腎不全患者血清残渣による OATP1B1 阻害の速度論的解析

アルブミン含有末期腎不全患者血清残渣存在下における SN-38 の固有クリアランス (V_{max}/K_m) 値は、7.44 $\mu\text{L}/\text{mg protein}/\text{min}$ であり、アルブミン含有健常者血清残渣 (5.67 $\mu\text{L}/\text{mg protein}/\text{min}$) の 65% であった。また、アルブミン含有末期腎不全患者血清残渣存在下における V_{max} 値は、452.2 $\text{pmol}/\text{mg protein}/\text{min}$ (331.0 $\text{nmol}/\text{mg prot}/\text{min}$) であり、アルブミン含有健常者血清残渣存在下と比較して 0.68 倍であった。一方、 K_m 値に違いは認められなかった (Figure 1-8 and Table 1-2)。

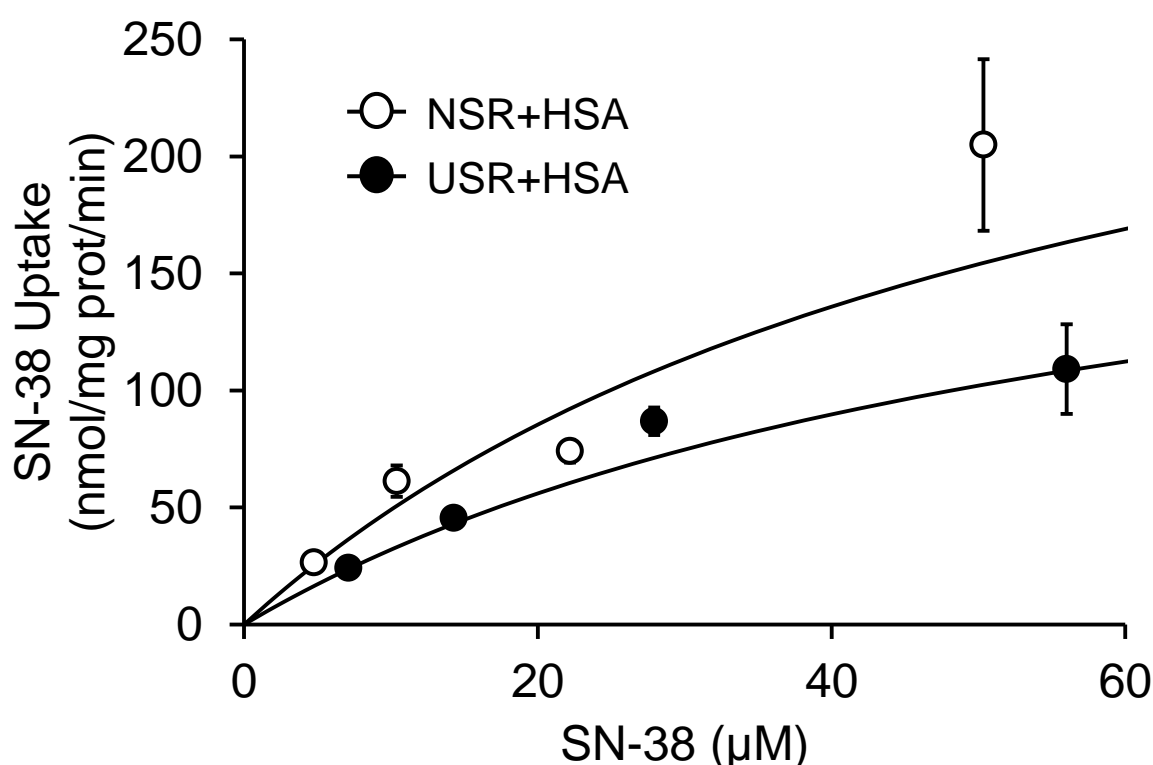


Figure 1-8. Effects of NSR and USR with HSA on the concentration-dependent uptake of SN-38 by OATP1B1

The uptake of SN-38 was determined following incubation with SN-38 (18.25, 37.5, 75, 150 μM) and human serum albumin in the presence of normal or uremic serum at 37 °C for 0.5 min after 10 min preincubation. Each column and point represent the mean \pm S. E. (n = 4). X-axis represents the each free concentration of SN-38 in the each uptake buffer with albumin. Y-axis of HEK/OATP1B1 represents the uptake of SN-38 in HEK/OATP1B1 cells. Y-axis of OATP1B1 mediated uptake was assessed by subtracting the uptake of SN-38 in HEK/Mock cells from that in HEK/OATP1B1 cells. Each point represents the mean \pm S.E. (n = 4). HSA: human serum albumin, NSR: normal serum residue, USR: uremic serum residue.

Table 1-2. Kinetics analysis of OATP1B1-mediated transport of SN-38 after treatment with HSA solution with serum

Serum residue	K_m	V_{max}	V_{max}/K_m
with HSA	(μM)	(nmol/mg protein/min)	($\mu\text{L}/\text{mg protein/min}$)
NSR	57.5 (36.3-78.8)	331.0 (238-424)	5.76
USR	60.7 (20.5-101.0)	226.1 (106-346)	3.72

Each column represents estimated value obtained using MULTI software (95% confidence interval)

HSA: human serum albumin, NSR: normal serum residue, USR: uremic serum residue, V_{max} : maximum uptake velocity, K_m : Michaelis-Menten constant, V_{max}/K_m : intrinsic clearance

Katsube Y., *et al.*, *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2017**, 79, 783–789, Table 1.

第4節 考察

本研究において構築した HEK/OATP1B1 細胞において、HEK/Mock 細胞と比較して顕著な OATP1B1 mRNA 発現が確認された (Figure 1-4)。また、HEK/OATP1B1 細胞において、OATP1B1 の基質である SN-38 の取り込み量が顕著に多かったことから (Figure 1-5)、OATP1B1 を高発現した HEK/OATP1B1 細胞の構築が確認された。HEK/OATP1B1 細胞における SN-38 の取り込み量は、1 分間までは取り込み時間に比例して増加し、10 μ M までは SN-38 濃度に比例して増加した (Figure 1-5)。したがって、10 μ M 以下の SN-38 濃度、並びに 1 分間以内の取り込み時間において、HEK/OATP1B1 細胞における SN-38 の初期取り込み速度が評価可能であると考えられた。

アルブミン含有反応溶液中の SN-38 非結合型濃度は、アルブミンの添加濃度依存的に低下した (Figure 1-5C)。一方で、SN-38 の初期取り込み速度は、アルブミンの濃度に関わらず SN-38 非結合型濃度に比例して増大した (Figure 1-5D)。すなわち、検討した濃度範囲内において、SN-38 の取り込みクリアランスは、アルブミン濃度に関わらず、一定であることが示された (Figure 1-5E)。したがって、アルブミン含有反応溶液における OATP1B1 を介した SN-38 の取り込み能力は、SN-38 の取り込みクリアランスにより比較可能であると考えられた。

除タンパク処理済みの血清残渣は、血清残渣含量依存的に OATP1B1 機能を低下させた (Figure 1-6)。さらに、血清成分による OATP1B1 阻害作用は、健常者血清においても顕著に認められた (Figure 1-6)。OATP1B1 を介して肝細胞内に輸送される内因性成分として、例えば、ビリルビン⁸⁸⁾、グリココール酸⁸⁹⁾ やタウロコール酸⁸⁹⁾などの胆汁酸、プロスタグランジン⁴⁹⁾ やロイコトリエン⁴⁹⁾などのエイコサノイド及びエストラジオール代謝物^{49, 90)} が報告されている。これら内因性成分のうち、ビリルビン及び胆汁酸は OATP1B1 阻害作用を有することが報告されているが、ビリルビン⁹¹⁾ 及び胆汁酸⁹²⁾ はいずれもアルブミンに強く結合するため、本検討においてアルブミンを含有する反応溶液中の非結合型濃度では OATP1B1 に対する影響は無視できる程度である。

アルブミン含有末期腎不全患者血清残渣は、同一の方法により調製した健常者血清と比較して、SN-38 の取り込みクリアランスを顕著に低下させた (Figure 1-7)。アルブミン非含有条件下における、10 % (v/v) 末期腎不全患者血清残渣による OATP1B1 阻害作用は、強力な OATP1B1 機能阻害を示したものの (Figure 1-6)、10 倍量である 100% (v/v) 血清にアルブミンを添加した条件下では、10% (v/v) 末期腎不全患者血清残渣のおよそ 2 倍

程度の阻害に留まったことから、末期腎不全患者血清残渣中の OATP1B1 阻害成分はタンパク結合性の強い成分である可能性が考えられる。

速度論解析によって、末期腎不全患者血清残渣存在時の V_{max} 値は健常者血清存在時の V_{max} 値と比較して、低下傾向が認められたことから (Table 1-2)、末期腎不全患者血清中には SN-38 の初期取り込みを非競合的に阻害する物質の存在が示唆される。ビリルビンや胆汁酸は OATP1B1 の基質であることから、競合阻害を引き起こすと推定されるため、末期腎不全患者血清中に蓄積するビリルビンや胆汁酸以外の成分が、本検討で認められる OATP1B1 の機能低下を引き起こすと考えられる。

末期腎不全患者血清残渣は、健常者血清残渣と比較して、OATP1B1 機能低下を 30-60% 低下させた (Figure 1-7, 1-8)。OATP1B1 機能が低下する *SLCO1B1**15 アレル保因者では、非保因者と比較して SN-38 の消失速度が、1.56 倍延長することが報告されている⁵⁸⁾。一塩基多型を導入した OATP1B1 安定発現細胞を用いて OATP1B1 輸送特性に及ぼす影響を評価した報告によると、*SLCO1B1**15 は、OATP1B1 基質薬物の K_m 値には影響せず、OATP1B1 発現量による補正済みの V_{max} 値を 30% 未満まで低下させることが報告されている⁵⁶⁾。また、単純に *in vitro* の結果を臨床結果に外挿できないが、OATP1B1 機能低下だけでは末期腎不全患者における 10 倍もの顕著な消失半減期の延長を説明できない。一方で、ヒト肝細胞に末期腎不全患者の血清を処置したところ、OATP1B1 発現量が低下することが報告されており⁹³⁾、末期腎不全患者では OATP1B1 の活性及び発現が抑制されることによって相乗的に OATP1B1 機能が低下し、SN-38 の消失遅延を惹起する可能性が考えられる。

肝類洞側膜には OATP1B1 だけでなく、OATP1B3 及び OATP2B1 も局在している^{45, 93, 94)}。OATP2B1 安定発現細胞を用いた検討において、OATP2B1 を介した SN-38 の取り込みは、OATP2B1 非発現細胞とほとんど違いがないことが報告されている⁹⁵⁾。一方で、OATP1B3 は、OATP1B1 と同様に SN-38 を基質とするため⁹⁵⁾、末期腎不全患者における SN-38 の消失遅延に OATP1B3 の機能低下が関与している可能性が考えられる。しかしながら、OATP1B1 は肝細胞全体に発現が認められるのに対して OATP1B3 は中心静脈近傍の肝細胞に発現が限局していること⁹³⁾、初代肝細胞を用いた検討では SN-38 の肝取り込みに及ぼす OATP1B3 の寄与は OATP1B1 と比較して小さいこと、が報告されている⁹⁵⁾。したがって、末期腎不全患者において、仮に OATP1B3 の機能低下が生じたとしても、SN-38 の肝消失の遅延はほとんど生じないと推察される。

OATP1B1 を介した肝取り込み以降の SN-38 の消失は、UGT1A1 によるグルクロン酸抱合が強く関わっている。UGT1A1 の機能低下型遺伝子多型を有するアレルの頻度が日本人で特に高いため、イリノテカンによる重篤な有害事象の危険因子として重要視されており、SN-38 の消失遅延に UGT1A1 の機能低下の関与が考えられる。また、末期腎不全モデルラットである 5/6 腎摘出ラットにおいて、肝細胞における UGT 発現量は低下することが報告されている。しかしながら、この発現量の低下は、摂餌量の低下に起因しており、病態特異的な変化でないことが示されている⁹⁶⁾。したがって、末期腎不全時には UGT1A1 の発現変動が生じる可能性は低いと考えられる。

末期腎不全患者における UGT1A1 活性変動の有無は、これまで十分に検討されていない。しかしながら、肝細胞を用いた検討ではないものの、尿毒症物質のひとつである *p*-クレジル硫酸は、近位尿細管細胞株において UGT の活性低下を引き起こすことが報告されている⁹⁷⁾。また、末期腎不全患者において、UGT1A1 を介するグルクロン酸抱合化が主要な消失経路であるラルテグラビルについて、その消失半減期は 5.8 倍に延長することが示されており⁹⁸⁾、UGT1A1 の機能低下が生じている可能性が考えられる。一方で、末期腎不全患者では、イリノテカン投与時の用量規制因子である遅発性下痢の発症頻度が増大している⁴³⁾。イリノテカン投与時に生じる遅発性下痢は、胆汁中に排泄された SN-38G が腸内細菌の有する β -グルクロニダーゼにより脱抱合され再び SN-38 グルクロン酸抱合化体 (SN-38) となり、腸管粘膜を傷害することに起因すると考えられている^{99, 100)}。実際、OATP1B1 の機能低下型アレル保因者や UGT1A1 の機能低下型アレルの保因者では、イリノテカン投与による遅発性下痢の発症頻度は増大しない^{39, 61, 101)}。また、Xie らは、遅発性下痢の発症頻度が SN-38 の AUC の増大とは弱い相関しか示すに過ぎないが、SN-38G の AUC と強く相関することを報告しており¹⁰²⁾、遅発性下痢の発症は胆汁中への SN-38G 排泄量に依存していることが考えられる。さらに、OATP1B1*15 アレル保有者における SN-38G の AUC は顕著に低下する⁵⁸⁾。ここまでの情報を総合的に考えると、末期腎不全患者における、重篤な遅発性の下痢の発症頻度増大を合理的に説明するためには、OATP1B1 機能の低下に加え、UGT1A1 の機能亢進によって SN-38G の腸管曝露量が増大している可能性が考えられる。しかしながら、UGT1A1 の機能亢進は SN-38 の消失半減期を短縮させる方向に働くため、矛盾が生じる。一方で、腸肝循環の亢進は、薬物の見かけの消失半減期を顕著に延長させる¹⁰³⁾。したがって、末期腎不全患者では、UGT1A1 の機能亢進及び腸肝循環の亢進により消失半減期の顕著な延長をもたらす可能性が考えられる。

第5節 小括

本章では、OATP1B1 を介した SN-38 の取り込みに及ぼす末期腎不全患者血清の影響について健常者血清と比較検討し、次の知見を得た。

1. 健常者血清残渣及び末期腎不全患者血清残渣が、OATP1B1 を介した SN-38 の初期取り込み速度を低下させる。
2. アルブミン存在時、末期腎不全患者血清残渣は、健常者血清残渣と比較して、より強力に SN-38 の取り込みクリアランスを低下させる。
3. 末期腎不全患者血清残渣は、健常者血清と比較して、SN-38 の V_{max} 値を低下させる。

以上の結果から、末期腎不全患者血清中には、OATP1B1 を介した SN-38 の初期取り込み速度を非競合的に低下させるタンパク結合性の強い成分が蓄積している可能性が考えられる。

第2章 血清中の内因性成分及び尿毒症物質が OATP1B1 機能に及ぼす影響

第1節 緒言

第1章において、末期腎不全患者血清中には OATP1B1 機能を非競合的に低下させるタンパク結合性の強い成分が蓄積している可能性を明らかにした。末期腎不全患者では、腎機能正常時には、腎臓から排泄される代謝産物などの生体内老廃物が高濃度に蓄積している。これらの蓄積成分は、末期腎不全患者において生じる消化管障害や中枢神経障害などの尿毒症症状を惹起することから、尿毒症物質と総称されている。尿毒症物質は、透析性に着目して分子量や血漿タンパク質との結合性に基づいて分類される。そのうち、タンパク結合性の小分子尿毒症物質は、透析によっても除去できないため末期腎不全患者において非常に高濃度に蓄積すること、また、その小分子尿毒症物質は薬物の代謝や肝取り込みを阻害することが報告されている。例えば、3-インドキシル硫酸 (IS) が、CYP2C9 を介したロサルタンの代謝を非競合的に阻害すること⁸¹⁾、また、3-カルボキシ-4-メチル-5-プロピル-2-フランプロパン酸 (CMPF) がジゴキシンの肝取り込みを阻害すること⁷⁷⁾ が明らかにされている。以上のことから、尿毒症物質による OATP1B1 の阻害が、末期腎不全患者における SN-38 の血中濃度上昇に関与していると推察できる。

肝細胞は、細網内皮系であり、終末門脈枝と肝動脈の終末が混合して網目状に類洞が形成されている。類洞壁は不連続性の内皮細胞から形成されるため、アルブミンと結合した薬物は類洞壁を通り抜け、肝細胞類洞側膜近傍まで達することが可能である。

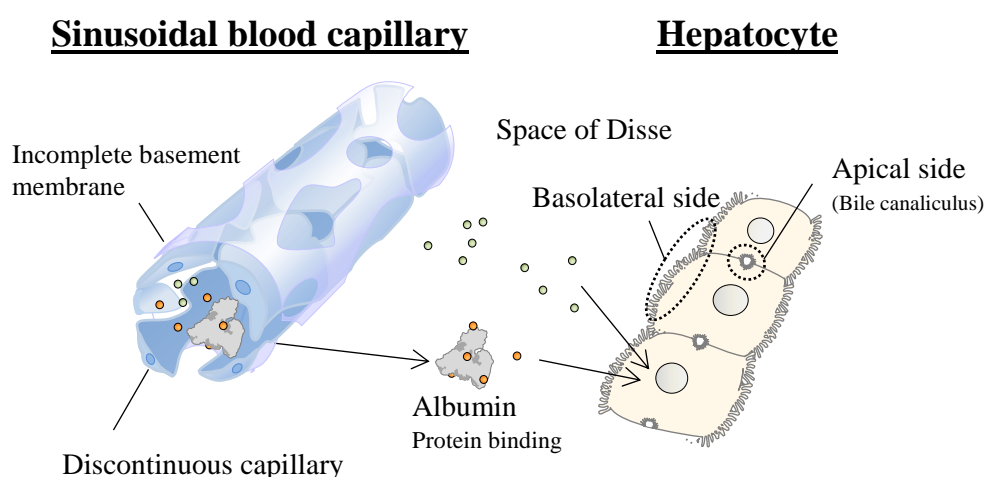


Figure 2-1. Permeability of sinusoidal blood capillary to albumin and albumin-bound drugs

先行研究において、類洞側膜近傍においてアルブミンからの薬物の解離が促進するモデル¹⁰⁴⁻¹⁰⁷⁾ や肝細胞に発現する銅トランスポーターの C 末端構造と相互作用し、アルブミンの高次構造が変化すること¹⁰⁸⁾、アルブミン処置により薬物の経細胞膜透過性が促進すること¹⁰⁹⁾ がそれぞれ報告されていることから、タンパク非結合型の成分のみならず、アルブミンと結合した尿毒症物質などの血清中 OATP1B1 阻害成分も影響する可能性が考えられる。

そこで本章では、代表的なタンパク結合性の尿毒症物質である CMPF、馬尿酸 (HA)、インドール酢酸 (IAA) 及び IS が、OATP1B1 を介した SN-38 の取り込みに及ぼす影響について評価した。また、第 1 章において、健常者血清中にも OATP1B1 機能を低下させる成分が存在していることを明らかにしていることから、健常者血清中の OATP1B1 阻害成分と尿毒症物質による協働作用についても検討した。

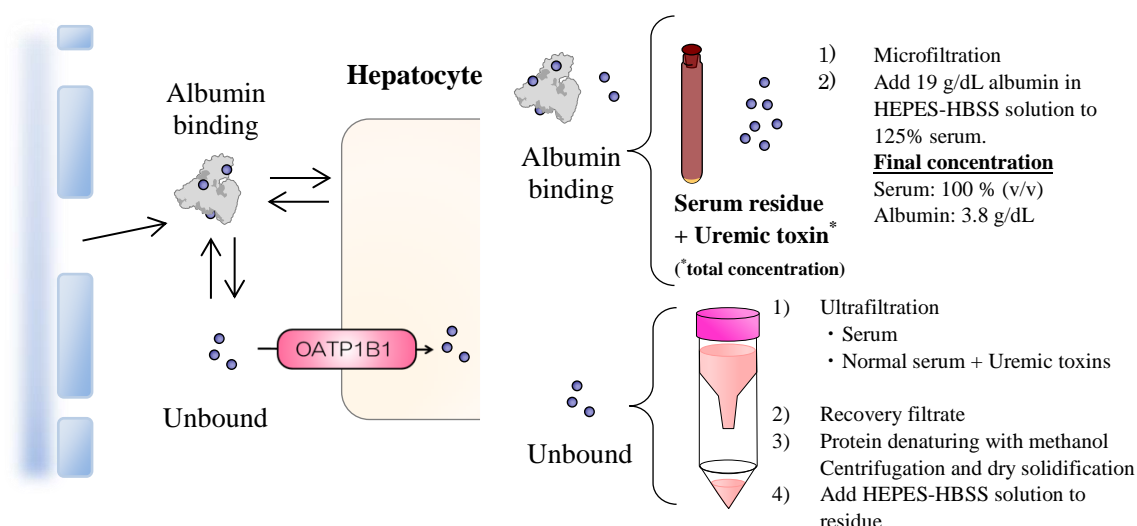
第2節 方法

1. 試薬及び実験材料

Amicon Ultra-15 (Ultracel-3K[®], 3,000 NMWL) は、Merck Millipore Ltd. (Darmstadt, HE, Germany) から購入した。CMPF は、Cayman Chemical Co. (Ann Arbor, MI, USA) より、馬尿酸 (HA) 及び IS は、Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) より、及びインドール-3-酢酸 (IAA) は、ナカライテスク株式会社 (Kyoto, Japan) よりそれぞれ購入した。その他の試薬は、第1章で述べたものを使用した。

2. 血清残渣及びろ過血清残渣含有反応溶液の調製の作成

健常者血清及び末期腎不全患者血清の入手方法は第1章で記した通りである (第1章第2節9項)。タンパク非結合型の血清成分の影響は、限外ろ過法によりタンパク結合型の成分を分離除去して得られたろ液中に含まれる成分を用いて評価した。限外濾過装置は、アルブミン等の血清タンパク質の透過を最小限にするため 3,000 NMWL の分離性能を有するろ過膜を選択した。すなわち、ウルトラセル再生セルロース膜を素材に持つ Amicon Ultra-15 のフィルターカップ内に血清 15 mL を加え、5,000×g で 15 分間遠心分離した。限外ろ過膜を透過してしまう可能性のある血清タンパク質も除去するために、ろ液に3倍量のメタノールを添加して除タンパク処理した後、15,000×g で 3 分間遠心分離することにより得られた上清を窒素気流下にて 50°C で乾固した。得られた残渣に用いたろ液と等量の HEPES-HBSS 溶液を加え、0.22 µm のメンブレンフィルターを用いて精密ろ過した溶液をろ過血清残渣溶液とした。



Scheme 2-2. Preparation of reaction buffer to evaluate unbound or total serum contents

3. 細胞培養

HEK/OATP1B1 及び HEK/Mock 細胞はコラーゲン処置済 24 穴細胞培養プレートに 5.5×10^4 cells/well の細胞密度で、 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 条件下にて 3 日間培養した。その後、OATP1B1 の転写活性を安定化させる目的でヒストン脱アセチル化酵素阻害薬である酪酸ナトリウム (終濃度 5 mM) 含有細胞培養液に交換し、さらに 24 時間培養したものを実験に用いた⁸⁰⁾。

4. 取り込み実験に用いた緩衝液

取り込み実験に用いた SN-38 溶液の調製方法は、第 1 章で記した通りである。

SN-38 の取り込み速度に及ぼす尿毒症物質の影響を評価するため、実験に用いた CMPF、HA、IAA 及び IS 濃度は、末期腎不全患者血清中の非結合型濃度及び総濃度を含むように¹¹⁰⁾、それぞれ $2.2\text{--}180\ \mu\text{M}$ 、 $27.8\text{--}2250\ \mu\text{M}$ 、 $1.1\text{--}90\ \mu\text{M}$ 及び $6.7\text{--}540\ \mu\text{M}$ に設定した。

尿毒症物質は、CMPF、HA、IAA 及び IS を選択し、それらの 100% 末期腎不全患者血清中の濃度を反映して¹¹⁰⁾、それぞれ $180\ \mu\text{M}$ 、 $250\ \mu\text{M}$ 、 $10\ \mu\text{M}$ 及び $150\ \mu\text{M}$ となるように、アルブミン含有反応溶液に追加した。なお、アルブミン含有反応溶液中の SN-38 の非結合型濃度の測定方法は、第 1 章に記した通りである (第 1 章第 2 節 13 項)。

タンパク非結合型の血清成分の評価には、第 2 節 2 項に記した限外ろ過法により得ら

れた、ろ過血清残渣溶液を取り込み実験に使用した。末期腎不全患者血清中で想定される総濃度の尿毒症物質は限外濾過を行う前に健常者血清に添加した。

5. SN-38 の取り込み実験

24 穴細胞培養プレート各穴の細胞培養液を吸引除去し、HEPES-HBSS 溶液で 2 回洗浄後、HEPES-HBSS 溶液で 10 分間前加温した。反応溶液 0.3 mL を添加することにより取り込み実験を開始した。開始 30 秒後に、24 穴細胞培養プレート中の溶液を吸引除去することにより取り込みを停止した。その後直ちに氷上に移し、細胞を氷冷した PBS (+) 0.5 mL で 2 回、2 mL で 1 回素早く洗浄した。取り込み実験終了後の細胞は、0.4 M NaOH 水溶液にて溶解後、0.4 M HCl 水溶液にて中和したものを検体とし、SN-38 の定量及びタンパク定量に用いた。

6. SN-38 定量

SN-38 は、除タンパク法及び HPLC-蛍光光度法により定量した。すなわち、検体 100 μ L に内標準物質として 5 ng/mL カンプトテシン含有 50%メタノール水溶液 100 μ L 及びアセトニトリル 400 μ L を順次添加し、1 分間攪拌後、10,000 \times g で 3 分間遠心分離 (TOMY MX-301) することで除タンパクした。上清 500 μ L を別のガラス製試験管に分取後、SN-38 をラクトン体に変換するために 0.02 M HCl 30 μ L を加え⁸⁵⁾、40°C で窒素気流下にて蒸発乾固した。さらに、残渣に移動相 (0.02 M クエン酸緩衝液 (pH 3.0): アセトニトリル= 75 : 25) 200 μ L を添加した後、オートインジェクター: SIL-20A (島津製作所, Kyoto, Japan) を用いて蛍光検出器 (RF-20Axs, 島津製作所) 付 HPLC 装置 (ポンプ; LC-20AT, 島津製作所, システムコントローラー; CBM-20A, 島津製作所) に注入し、SN-38 を定量した。その際の分析条件は、カラム; Inertsil ODS-III (長さ 25 cm \times 内径 4.0 mm, ジーエルサイエンス株式会社, Tokyo, Japan)、流速; 1.0 mL/min, カラム温度; 40°C, 励起波長 370 nm, 蛍光波長 530 nm であった。なお、SN-38 及びカンプトテシンの保持時間は、それぞれ 17.3 分及び 18.7 分であった。SN-38 の検量線 (3.125–50 nM) は、原点を通る良好な直線性を示した ($r^2=0.999$)。タンパク定量は、標準タンパク質としてウシ血清アルブミンを用いて、Lowry らの方法⁸⁶⁾ に準じて行った。

7. アルブミン含有反応溶液中のタンパク非結合型 SN-38 濃度測定

アルブミン含有反応溶液の一部は、取り込み実験開始時間に合わせて Vivaspin[®]-2 を用

いた限外濾過 (2,860×g, 1 分間) を行った。得られた溶液中の SN-38 濃度は、アルブミン含有試験溶液中のタンパク非結合型濃度とした。

タンパク非結合型 SN-38 濃度の測定は、次の条件で行った。なお、反応溶液中の SN-38 総薬物濃度測定の検体は、反応開始直前の反応溶液 50 μ L を HEPES で 10 倍希釈し、以降の手順は、ろ過ろ液中の SN-38 非結合型濃度測定用の検体と同様に行った。総薬物濃度の検体及び限外ろ過された SN-38 の検体それぞれ 50 μ L に 1000 ng/mL カンプトテシン含有 50% メタノール水溶液 50 μ L 及びメタノール 150 μ L を順次添加し、1 分間攪拌後、1,630×g で 30 分間遠心分離 (TOMY MX-301) することで除タンパクした。上清 150 μ L を別のガラス製試験管に分取後、SN-38 を全てラクトン体に変換するために 0.02 M HCl 10 μ L を加え⁸⁵⁾、40°C で窒素下にて蒸発乾固した。さらに、残渣に移動相 (0.02 M クエン酸緩衝液 (pH 3.0): アセトニトリル= 75 : 25) 200 μ L を添加した後、第 2 章 2 節 6 項で示す取り込み実験と同一条件の HPLC 法により SN-38 を定量した。

8. OATP1B1 活性の評価

アルブミン非存在下における OATP1B1 特異的な SN-38 の取り込み速度は、HEK/OATP1B1 細胞における取り込み速度から HEK/Mock 細胞における取り込み速度を差し引いて算出した。また、アルブミン存在下における SN-38 の細胞内への取り込みクリアランスは、OATP1B1 特異的な SN-38 の取り込み速度を試験溶液中の SN-38 タンパク非結合型濃度で除することにより算出した。

$$dX/dt = Uptake_{OATP1B1} - Uptake_{Mock} \quad \cdot \cdot \cdot \cdot \cdot \cdot \cdot \cdot \cdot (1-2)$$

$$CL_{OATP1B1} = \frac{dX/dt}{C_u} \quad \cdot \cdot \cdot \cdot \cdot \cdot \cdot \cdot \cdot (1-3)$$

ここで、 dX/dt 、 $Uptake_{OATP1B1}$ 、 $Uptake_{Mock}$ 、 $CL_{OATP1B1}$ 及び C_u は、それぞれ OATP1B1 特異的な取り込み初速度 (pmol/mg protein/min)、HEK/OATP1B1 細胞における取り込み初速度 (pmol/mg protein/min)、HEK/Mock 細胞における取り込み初速度 (pmol/mg protein/min)、OATP1B1 特異的な取り込みクリアランス (μ L/mg protein/min)、反応溶液の SN-38 タンパク非結合型濃度 (μ M) を示す。

9. OATP1B1 を介した SN-38 の取り込みに及ぼす尿毒症物質の影響評価

尿毒症物質による SN-38 の取り込み 50% 阻害濃度 (IC_{50}) は、MULTI により⁸⁷⁾、OATP1B1 特異な取り込み速度に式 (2-1) を当てはめることで算出した。

$$I = I_{max} \times \left(1 - \frac{C^\gamma}{C^\gamma + IC_{50}^\gamma} \right) \quad \dots \dots \dots (2-1)$$

なお、 C 、 I 、 I_{max} 、及び γ はそれぞれ反応溶液中阻害薬濃度 (μM)、取り込み阻害率 (% of コントロール)、最大取り込み阻害率 (%) 及びシグモイド係数を示している。

10. 統計処理

得られた測定値は、すべて平均値 \pm S.E. で表示した。統計学的検定として、二群間の比較には、対応のない Student's t test を、三群間以上のコントロールとの比較または多群間の比較には、一元配置分散分析法 (non-repeated measures ANOVA) に続く Dunnett's test 又は Tukey-Kramer test を適応した。その際、危険率 5% 未満 (両側) を有意差ありとした。

11. 倫理的配慮

本研究は、本研究はヒト血清試料を用いた研究であり、ヘルシンキ宣言の精神を遵守し、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」(平成 29 年 3 月 8 日改訂) に従った。なお、本研究は、仁真会白鷺病院及び京都薬科大学倫理委員会の承認を得た上で行った。

第3節 結果

1. SN-38 の取り込み速度に及ぼす尿毒症物質の影響

CMPF、HA、IAA 及び IS 単独処置は、濃度依存的に SN-38 の取り込みを抑制させ、 IC_{50} 値はそれぞれ 0.55 ± 0.052 mM、 5.57 ± 0.81 mM、 0.19 ± 0.029 mM、 1.06 ± 0.13 mM であった。すべての尿毒症物質において、末期腎不全患者血清中で想定される非結合型濃度では、SN-38 の取り込み速度にほとんど影響しなかった (Figure 2-2, Table 2-1)。

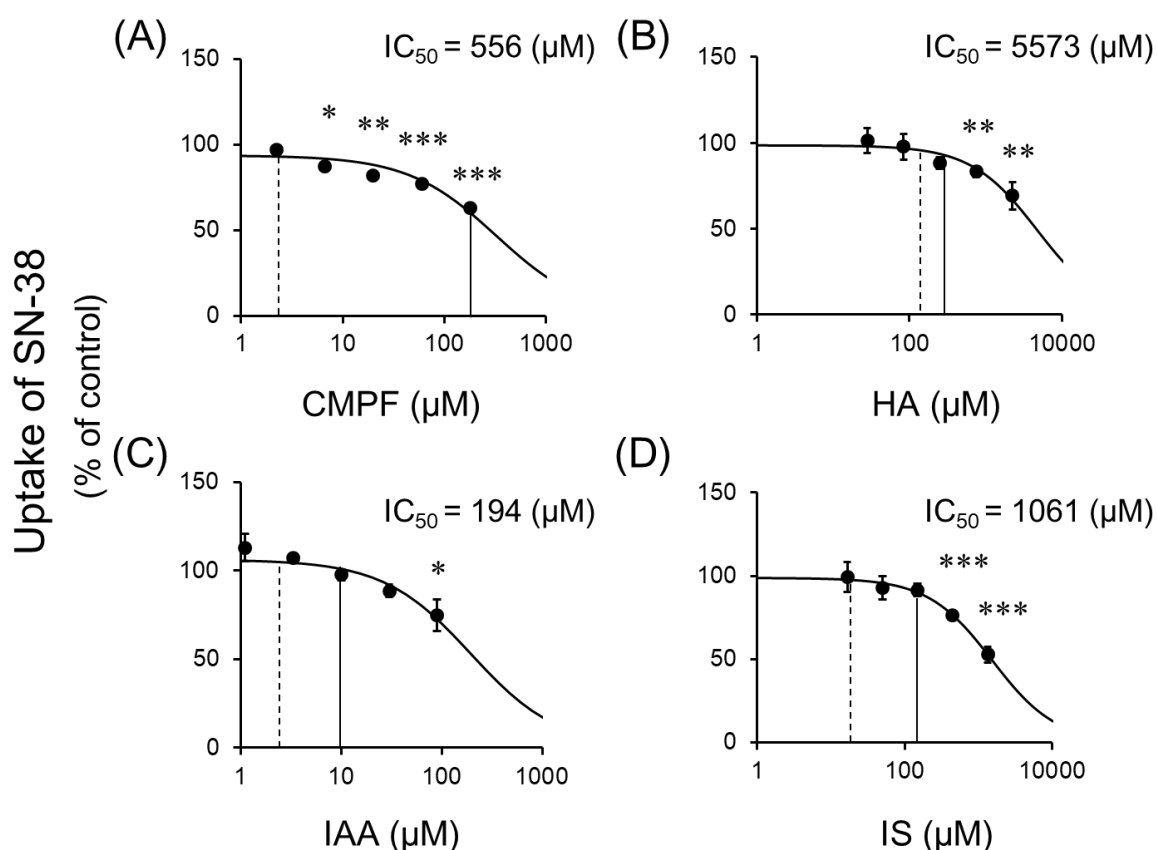


Figure 2-2. Effects of uremic toxins without HSA on uptake of SN-38 by OATP1B1

The uptake of SN-38 was determined following incubation with SN-38 (10 μM) in the presence of (A) CMPF (2.2, 6.7, 20, 60, and 180 μM), (B) HA (27.8, 83.3, 250, 750, and 2250 μM), (C) IAA (1.1, 3.3, 10, 30, and 90 μM), or (D) IS (6.7, 20, 60, 180, and 540 μM) at 37 °C for 0.5 min after 10 min preincubation. Each point represents the mean \pm S. E. (n = 4). Solid and dashed lines represent unbound and total concentrations of uremic toxins in patients with end-stage renal disease, respectively. The significance of differences from control was determined by ANOVA followed by Dunnett's test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$). CMPF: 3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropionic acid, HA: hippuric acid, HSA: human serum albumin, IAA: indole-3-acetic acid, IS: 3-indoxyl sulfuric acid

Table 2-1. Effects of uremic toxins at unbound or total concentrations and IC₅₀ values

	Uptake of SN-38 without HSA (% of control)		IC ₅₀ values (mM)
	<i>Unbound conc.</i> ^{a)}	<i>Total conc.</i> ^{b)}	
CMPF	96.0	62.9 ± 3.61	0.55
HA	95.9	88.2 ± 3.29	5.57
IAA	107	97.6 ± 3.05	0.19
IS	102	92.4 ± 3.68	1.06

a) estimate values by using MULTI program analysis, b) mean values S. E. (n = 4), CMPF: 3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropionic acid, HA: hippuric acid, HSA: human serum albumin, IAA: indole-3-acetic acid, IS: 3-indoxyl sulfuric acid

2. アルブミン非存在下における SN-38 の取り込み速度に及ぼす 4 種混合尿毒症物質の影響

アルブミン非存在下において、4 種の尿毒症物質を血清中総濃度と同濃度になるように溶解した 4 種尿毒症物質混合溶液は、SN-38 の取り込みを有意に低下させた (Figure 2-3)。

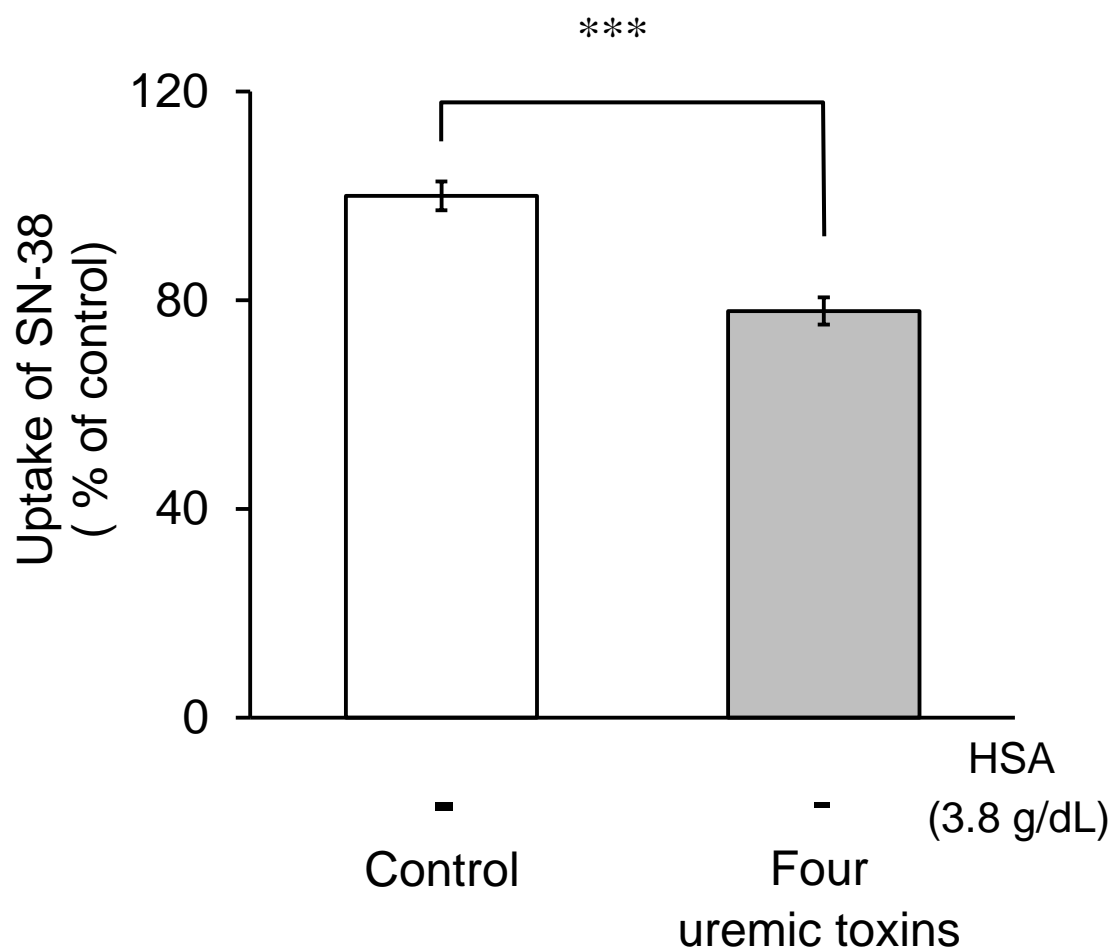


Figure 2-3. Effects of uremic toxins in the absence of albumin on uptake of SN-38 by OATP1B1

The uptake of SN-38 was determined following incubation with SN-38 (5 μ M) and albumin in the absence (control) or presence of 180 μ M CMPF, 250 μ M HA, 10 μ M IAA or 150 μ M IS at 37°C for 0.5 min after 10 min preincubation. Each column represents the mean \pm S. E. (n = 6). The significance of any difference from control was determined by ANOVA followed by Dunnett's test (***) ($p < 0.001$). HSA: human serum albumin.

Katsube Y., *et al.*, *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2017**, 79, 783–789, Figure 3.

3. アルブミン存在下における SN-38 の取り込みクリアランスに及ぼす尿毒症物質の影響

4 種尿毒症物質混合溶液は、アルブミン非存在下とは異なり、有意な影響を及ぼさなかった (Figure 2-4)。

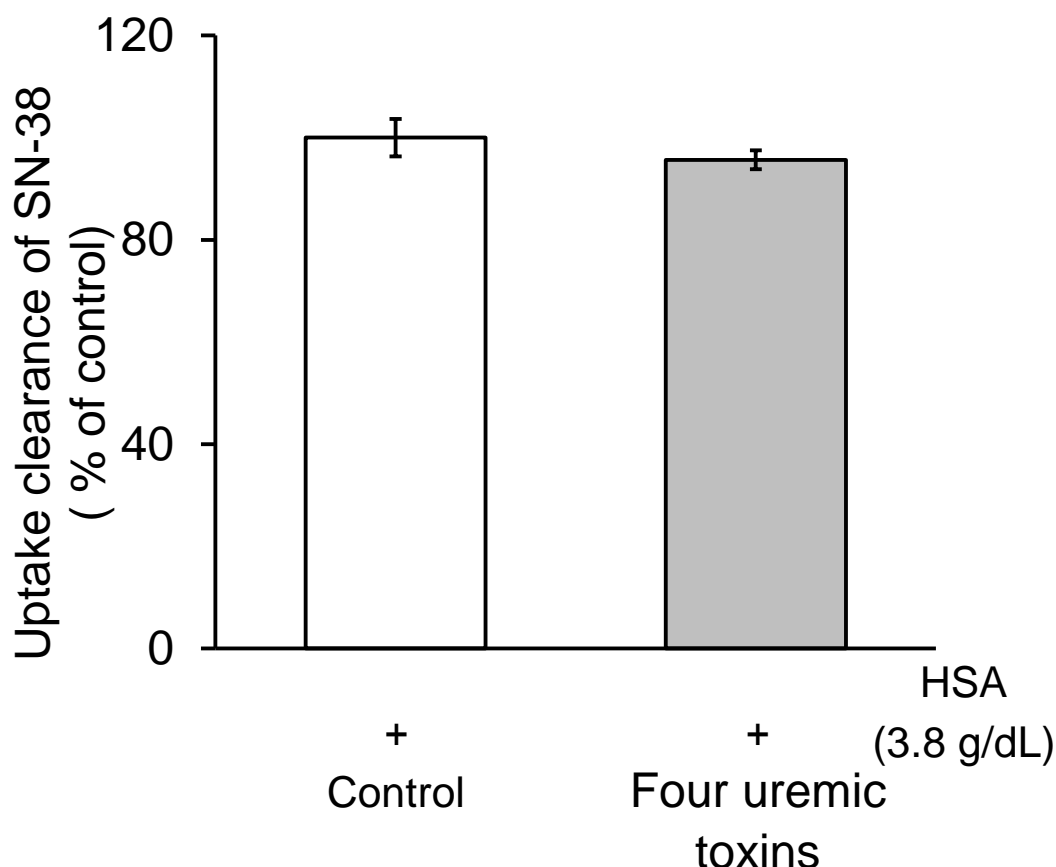


Figure 2-4. Effects of uremic toxins in the absence of HSA on uptake of SN-38 by OATP1B1

The uptake of SN-38 was determined following incubation with SN-38 (37.2 μM) and albumin in the absence (control) or presence of 180 μM CMPF, 250 μM HA, 10 μM IAA or 150 μM IS at 37°C for 0.5 min after 10 min preincubation. Each column represents the mean \pm S. E. (n = 6). The significance of any difference from control was determined by ANOVA followed by Dunnett's test.

CMPF: 3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropionic acid, HA: hippuric acid, HSA: human serum albumin, IAA: indole-3-acetic acid, IS: 3-indoxyl sulfuric acid

Katsube Y., et al., *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2017**, 79, 783–789, Figure 3.

4. SN-38 のヒト血清アルブミン結合率に及ぼす尿毒症物質の影響

健常者血清単独と比較して、末期腎不全患者血清は SN-38 のアルブミン非結合率を 1.42 倍に増大させた。また、CMPF は SN-38 のアルブミン非結合率を 1.22 倍増大させ、CMPF 及び HA 同時処置は、SN-38 のアルブミン非結合率を 1.30 倍増加させた。一方で、HA、IAA 及び IS 単独処置は影響しなかった (Table 2-2)。

Table 2-2. Effects of uremic toxins and uremic serum on unbound fraction of SN-38 in HSA containing uptake buffer

		F_b^u ratio (v.s. NSR)
Uremic toxins + NSR	CMPF	1.22
	HA	1.00
	IAA	0.96
	IS	0.96
	CMPF+HA	1.30
	IAA+IS	1.03
	CMPF+HA+IAA+IS	1.41
USR		1.42

CMPF: 3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropionic acid, F_b^u : unbound fraction of SN-38, HA: hippuric acid, HSA: human serum albumin, IAA: indole-3-acetic acid, IS: 3-indoxyl sulfuric acid, NSR: normal serum residue, USR: uremic serum residue.

5. SN-38 の取り込みクリアランスに及ぼす血清残渣及び尿毒症物質の影響

健常者血清残渣含有アルブミン溶液と比較して、4 種尿毒症物質を添加した健常者血清残渣含有アルブミン溶液は、アルブミン含有末期腎不全患者血清残渣による OATP1B1 阻害を完全に再現することはできなかったものの、SN-38 の取り込みクリアランスを 32.1%低下させた (Figure 2-5)。

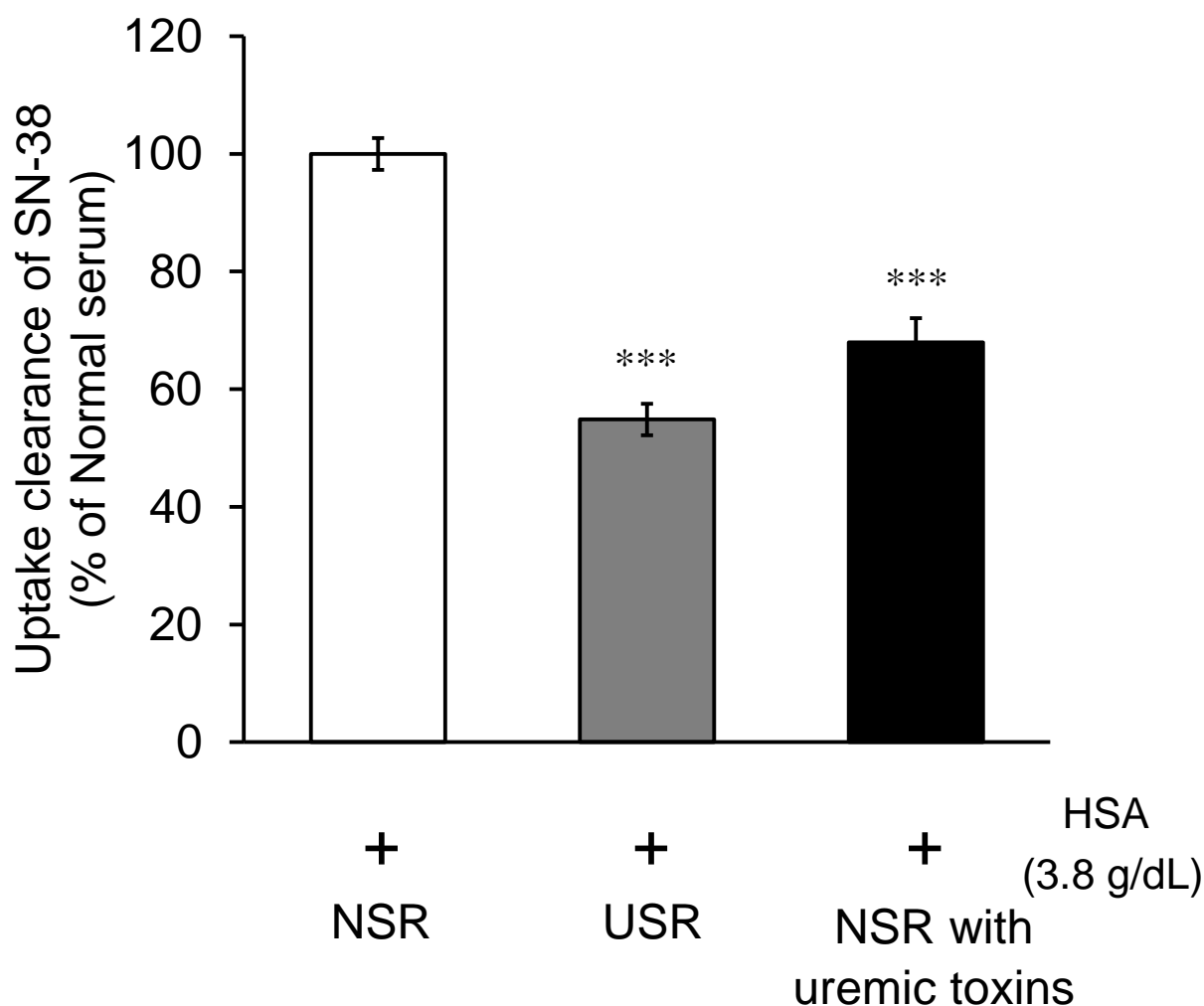


Figure 2-5. Effects of uremic toxins added to 100% NS with albumin on uptake of SN-38 by OATP1B1

The uptake of SN-38 was determined following incubation with SN-38 (10 μ M) and albumin in the presence or absence of uremic toxins added to 100 % (v/v) normal serum at 37°C for 0.5 min after 10 min preincubation. Uremic toxins (180 mM CMPF, 250 mM HA, 10 mM IAA and 150 mM IS) were used at the total concentrations in uremic serum. Each column represents the mean \pm S. E. (n = 6). The significance of any differences from normal serum was determined by ANOVA followed by Tukey-Kramer test ($^{***}p < 0.001$). HSA: human serum albumin, NSR: normal serum residue, USR: uremic serum residue.

Katsube Y., et al., *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2017**, 79, 783–789, Figure 3.

6. SN-38 の取り込みクリアランスに及ぼすろ過血清残渣の影響

限外ろ過法によって調製したろ過血清残渣の影響について比較検討したところ、ろ過健常者血清残渣と比較して、ろ過末期腎不全患者血清は顕著に OATP1B1 を介した SN-38 の取り込み速度を低下させた。また、ろ過健常者血清と比較して、4 種混合尿毒症物質を添加した健常者血清のろ過血清残渣は、SN-38 の取り込み速度を 17.3% 低下させた (Figure 2-6)。

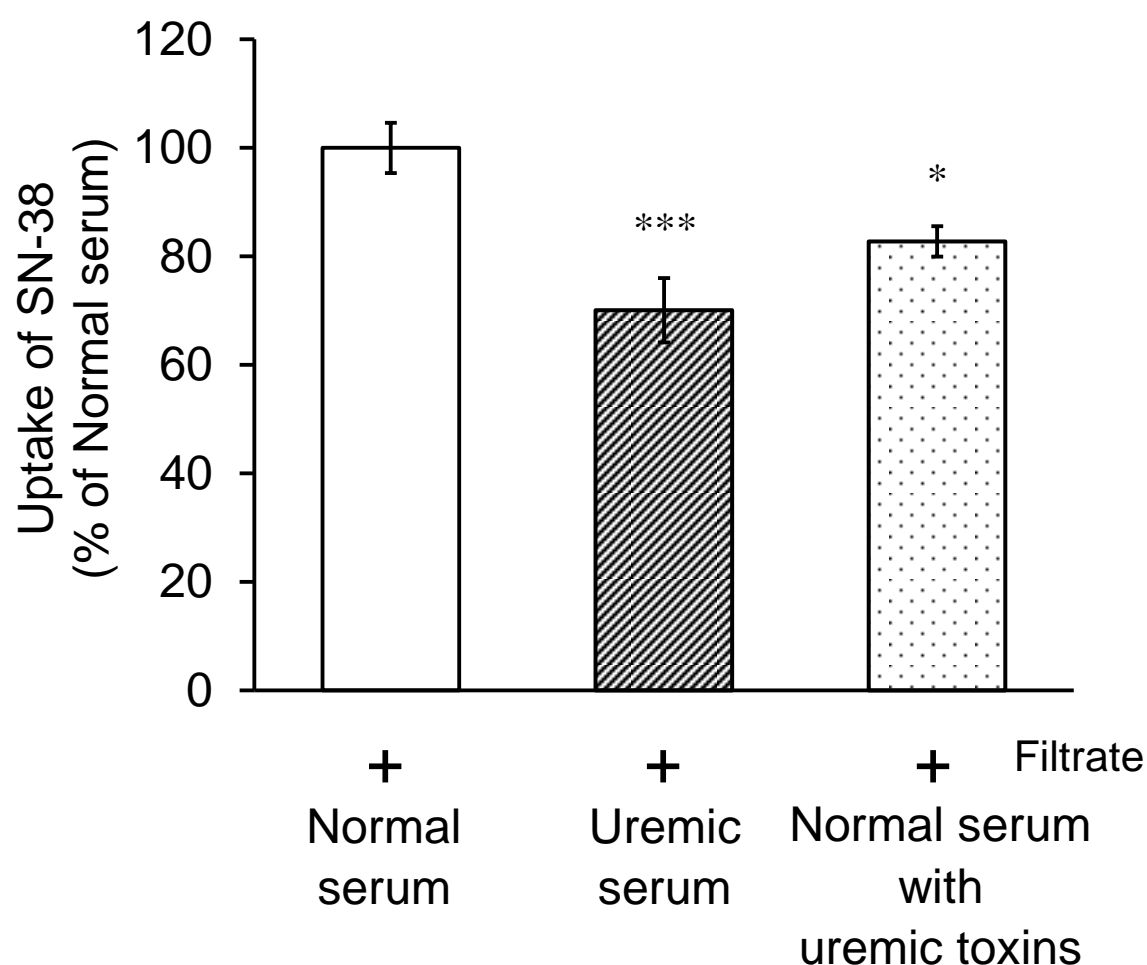


Figure 2-6. Effects of filtrate of additional treatment with uremic toxins and NSR on the uptake of SN-38

Uptake of SN-38 was determined following incubation with SN-38 (5 μ M) in the presence of test compounds at 37 °C for 0.5 min after 10 min preincubation. Normal serum, uremic serum, and combination with uremic toxins and normal serum were centrifuged and the filtrate was used in the uptake study. Each column represents the mean \pm S. E. (n = 6). The significance of differences from NSR was determined by ANOVA followed by Tukey-Kramer test (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$).

Katsube Y., et al., *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2017**, 79, 783–789, Figure 3.

第4節 考察

代表的な尿毒症物質である CMPF、HA、IAA 及び IS は、SN-38 の取り込み速度を濃度依存的に減少させた (Figure 2-2)。しかしながら、末期腎不全患者血清中で想定される非結合型濃度では、SN-38 の取り込み速度にほとんど影響しなかった (Figure 2-2, Table 2-2)。また、末期腎不全患者血清で想定される総濃度の尿毒症物質は、SN-38 の取り込みを阻害したものの (Figure 2-3)、アルブミンを追加することでその阻害作用は完全に消失した (Figure 2-4)。藤田ら⁹⁵⁾も OATP1B1 機能に及ぼす尿毒症物質の IC₅₀ 値は、想定される血清中遊離型濃度よりも高い濃度であることを報告しており、本検討結果と一致している。これらの結果及び知見は、アルブミン含有末期腎不全患者血清による OATP1B1 の機能低下は、尿毒症物質による直接的な OATP1B1 の阻害のみでは説明できないことを示している。

尿毒症物質の血中濃度は、食事や透析方法などの影響を受けるため、大きな個人差が存在している (血液透析後血清中濃度¹¹¹⁾ CMPF; 32.9-266.7 µM, HA; 3.91-254.5 µM, IAA; 3.42-13.7 µM, IS; 29.0-151.6 µM)。米国医薬食品安全局が提示する OATP1B1 を介した相互作用の可能性を示すカットオフライン (Step 1, $C_{\max, u}/IC_{50} \geq 0.1$, Table 2-3) に従うと、特に高濃度に尿毒症物質が蓄積している末期腎不全患者において OATP1B1 への直接阻害を生じる可能性があると考えられる。末期腎不全患者におけるこれらの尿毒症物質の個人差と OATP1B1 基質薬物の体内動態との関連性について検討が必要である。

Table 2-3. Clinical relevant concentrations of uremic toxins

	C_{\max} (mg/L) ¹¹²⁾	F_b^u (%)	IC ₅₀ (µM)	R, $C_{\max, u}/IC_{50}$	C_{\max}/IC_{50}
CMPF	94.0	2.0	554	0.01	0.71
HA	247	18.5	4603	0.06	0.30
IAA	9.76	55.5	218	0.14	0.26
IS	53.58	15.0	1518	0.03	0.17

C_{\max} : maximum concentration of uremic toxins in patients with end-stage kidney disease, $C_{\max, u}$: unbound maximum plasma concentration; F_b^u , unbound fraction ratio of SN-38; IC₅₀, 50% inhibitory concentration, CMPF: 3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropionic acid, HA: hippuric acid, IAA: indole-3-acetic acid, IS: 3-indoxyl sulfuric acid.

CMPF 及び HA は、SN-38 のアルブミンへの結合率を低下させ、末期腎不全患者血清のタンパク結合率と同程度まで低下させた。特に、CMPF が最も強いタンパク結合阻害作用を示し、HA の併用によりその阻害作用がより強まった (Table 2-2)。藤田ら¹¹³⁾は、SN-38 のアルブミンへの結合は、アルブミンのサイト 1 に結合するフロセミドやバルプロ酸により阻害されること、CMPF も阻害作用を示すことを報告している。さらに、ヒト健常者血清に尿毒症物質を加えた検討においても、SN-38 非結合型濃度は、CMPF の濃度依存的に上昇し、臨床濃度範囲内の IS 及び HA により変動しないことが報告されている¹¹³⁾。IS 及び HA は、アルブミンのサイト 2 結合部位を構成するサブタイプ IIIA に高い親和性を示し¹¹⁴⁾、一方で CMPF はサイト 1 を構成するサブサイト IIA に対して高い親和性を有し、サイト 2 を構成するサブサイト IIIA に対しては弱い親和性を示すことが報告されている¹¹⁵⁾。本検討においても、藤田らの報告と同様に単独の HA は SN-38 のタンパク結合率に影響を及ぼさなかったが、CMPF と同時存在下ではわずかに SN-38 タンパク結合率に対する阻害作用を増強させた。アルブミンのサイト 1 を構成するサブサイト IIB は、サイト 2 に結合する薬物のタンパク結合を調節すること¹¹⁶⁾や、高親和性部位への結合が阻害された薬物が再び低親和性結合部位するサイト-サイト結合移行機構が提唱されている^{117, 118)}。したがって、本研究において認められた末期腎不全患者血清による SN-38 のタンパク結合阻害作用は、主として、サイト 1 における CMPF とサイト 2 における HA による部分的な結合置換に起因すると考えられる。

本検討において、末期腎不全患者において SN-38 のタンパク結合率が顕著に低下している可能性を示した (Table 2-2)。一般的に、タンパク結合率が低下しても、非結合型のクリアランスは変動しないため、重大な薬物動態変動は生じにくい。しかしながら、末期腎不全患者における SN-38 のように、同時に肝固有クリアランスが低下している場合は注意が必要である。藤田らは、腎機能低下にしたがい、SN-38 の蛋白結合率が低下し、腎機能正常患者と比較して非結合型の SN-38 濃度は 4.38 倍に増大するものの、SN-38 の総濃度の増大は 1.7 倍程度と軽微であると報告している¹¹³⁾。この現象は、タンパク結合率が高い薬物の特徴であり、肝固有クリアランスの低下に伴う腎外クリアランスの低下が、非結合型濃度の上昇に伴う腎外クリアランスの増大によって相殺されているためである。したがって、末期腎不全患者において、タンパク結合率の高い薬物については、総薬物濃度のみのモニタリングでは、腎外クリアランスの低下を過小評価してしまう危険性が高く、非結合型濃度の測定が必要であると考えられる。

4 種の尿毒症物質を混合した場合の SN-38 の取り込み阻害作用は、アルブミン添加に

より消失したものの (Figure 2-2, 3)、4 種混合尿毒症物質を添加した健常者血清ろ液は、健常者血清ろ液の単独と比較して、有意な阻害作用を示した (Figure 2-6)。すなわち、末期腎不全患者血清残渣による阻害は、これら 4 種の尿毒症物質が他の血清成分と協働することで生じていると考えられる。この協働メカニズムとして、次の仮説が考えられる。一つ目の仮説として、尿毒症物質が血清中の OATP1B1 阻害成分をアルブミンから解離させているという可能性である。すでに、タンパク結合率の高いグリコケノデオキシコール酸やビリルビンが^{88, 89)}、*in vitro* 実験において、OATP1B1 を阻害することが報告されている^{119, 120)}。さらに、CMPF がビリルビンのアルブミンに対する結合を阻害することも報告されている¹²¹⁾。したがって、CMPF 等の尿毒症物質が、ビリルビンをはじめとする生体内 OATP1B1 阻害成分のアルブミンとの結合を阻害しており、遊離した生体内 OATP1B1 阻害成分が SN-38 の取り込みを阻害する可能性が考えられる。二つ目の仮説として、血清中の OATP1B1 阻害成分と尿毒症物質が相加・相乗的に OATP1B1 機能を阻害しているという可能性である。エストラジオール-17 β -グルクロニドは OATP1B1 に対して異なる複数の K_m を有することが報告されている¹²²⁾。すなわち、OATP1B1 には複数の基質結合部位が存在しているものと考えられ、血清中の OATP1B1 阻害成分と尿毒症物質がそれぞれ異なる基質結合部位を阻害している可能性が考えられる。三つ目の仮説として、OATP1B1 の基質輸送部位とは異なる部位に輸送能を調節する結合部位が存在するという可能性である。NSAIDs が、アロステリックな調節機構によりプラバスタチンの OATP1B1 を介した輸送を増大させる可能性が報告されている¹²³⁾。したがって、アロステリックな調節機構の働きにより、血清成分が尿毒症物質による OATP1B1 の阻害作用を増強している可能性が考えられる。

本研究のリミテーションとして、末期腎不全患者血清中の尿毒症物質の個人差を反映した OATP1B1 機能に及ぼす尿毒症物質の影響を評価できていないことが挙げられる。また、末期腎不全患者は、活性型ビタミン製剤や脂質異常症治療薬など特有の合併症に対する薬物を服用している。臨床において OATP1B1 基質薬物との相互作用は一部の薬物に限られているものの、血清中に含まれる併用薬物が OATP1B1 機能に影響を及ぼす可能性は否定できない。したがって、末期腎不全患者における OATP1B1 基質薬物の体内動態攪乱因子の同定をより詳細に明らかにするために、併用薬物の影響を考慮した尿毒症物質の蓄積の個人差と OATP1B1 基質薬物の血中濃度との関連について今後、検討する必要がある。

第5節 小括

本章では、OATP1B1 を介した SN-38 の取り込みに及ぼす尿毒症物質及び健常者血清の影響について比較検討し、次の知見を得た。

1. 本検討に用いた末期腎不全患者血清中に蓄積する尿毒症物質は、単独では OATP1B1 に及ぼす影響は軽微である。
2. 尿毒症物質は、健常者血清成分との共存下において、OATP1B1 機能を有意に低下させる。

以上の結果から、末期腎不全患者に蓄積するタンパク結合性尿毒症物質と健常者血清にも存在する成分とが協働して OATP1B1 機能を抑制する可能性が示唆される。

総括

本論文では、OATP1B1 安定発現 HEK293 細胞を用いた *in vitro* 実験系において、末期腎不全患者血清が OATP1B1 機能に及ぼす影響について、健常者血清を対照として比較検討した。その結果、以下に示す知見を得た。

第 1 章 OATP1B1 を介した SN-38 の取り込みに及ぼす末期腎不全患者血清の影響

1. 健常者血清及び末期腎不全患者血清中には OATP1B1 機能を低下させる成分が存在していることが明らかとなった。
2. 末期腎不全患者血清中には OATP1B1 を阻害するタンパク結合性成分が蓄積している可能性が示唆された。
3. 末期腎不全患者血清中成分による OATP1B1 阻害性は非競合的な阻害様式を示した。

第 2 章 血清中の内因性成分および尿毒症物質が OATP1B1 機能に及ぼす影響

1. 本検討に用いた末期腎不全患者血清中に蓄積する尿毒症物質は、単独では OATP1B1 に及ぼす影響は軽微であった。
2. アルブミンの存在下あるいは非存在下のいずれの評価系においても、尿毒症物質は、健常者血清と共存下において OATP1B1 機能を有意に低下させた。

したがって、末期腎不全患者血清中に蓄積するタンパク結合性の尿毒症物質と内因性の血清成分とが協働的に OATP1B1 機能を阻害すると共に、末期腎不全患者における SN-38 消失遅延が、OATP1B1 を介した SN-38 の肝取り込み過程の低下に起因することが明らかとなった。

以上の観点は、OATP1B1 がアニオン性薬物の肝細胞内取り込みに関わる重要な役割を担うことから、末期腎不全患者において肝消失型薬物の薬物動態が変動する可能性を示しており、末期腎不全患者における肝消失型薬物の適正使用に寄与するものと考えられる。

謝辞

終わりに臨み、本論文提出の機会を与えて戴くとともに、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました京都薬科大学臨床薬学分野 西口工司教授に衷心より御礼申し上げます。

さらに、本論文の作成に際して多大な御助言を賜りました京都薬科大学臨床薬理学分野 中田徹男教授、薬剤学分野 山本昌教授に衷心より御礼申し上げます。

本研究に際して直接の御指導、御鞭撻を賜りました京都薬科大学臨床薬学分野 辻本雅之講師に衷心より御礼申し上げます。

また、本研究及び学生生活の面において、多くの御協力、御助言を賜りました京都薬科大学臨床薬学分野 峯垣哲也助教に衷心より御礼申し上げます。

加えて、本研究の実施において、透析患者血清のご提供にあたり御協力賜りました仁真会 山川智之理事長、仁真会白鷺病院医療技術部 和泉智部長、仁真会白鷺病院薬剤科 古久保拓薬剤科長に衷心より御礼申し上げます。

本研究の遂行に際し、数々の御助言を賜りました東和薬品医薬分析部生物分析課 内山仁修士、仁真会白鷺病院薬剤科 吉田拓弥博士、京都薬科大学臨床薬学分野 志摩大介修士、小出博義学士、宮本恵輔学士、須本真理子学士、住本菜摘学士、中川智加学士、松本光司学士、小川佳織学士、神原健吾学士、鳥居奈央学士に並びに京都薬科大学臨床薬学分野の諸氏に心から感謝申し上げます。

臨床研修の機会をご提供頂くとともに、臨床研究の御指導を賜りました滋賀医科大学医学部附属病院薬剤部 寺田智祐 教授、森田真也 准教授、平大樹 客員助教、池田義人 特任助教をはじめとする薬剤部の皆様に心より感謝申し上げます。

2014 年度リジョナルプロジェクト女子大学院生奨学金給付制度によりご支援を賜りました国際ソロプチミスト京都、並びに奨学金給付生としてご推薦を賜りました森田和子 前会長に心より御礼申し上げます。

最後に、長きに渡る学生生活において、研究に専念できる自由を与えて下さり、精神面・健康面ともに昼夜を問わずご支援いただきました両親及び姉に深く感謝致します。

引用文献

- 1) 日本腎臓学会編. CKD 診療ガイド2012. 東京医学社. **2012**.
- 2) Kunihiro Yamagata, Takashi Yagisawa, Shigeru Nakai, Masaaki Nakayama, Enyu Imai, Motoshi Hattori, Kunitoshi Iseki, Takashi Akiba. Prevalence and incidence of chronic kidney disease stage G5 in Japan *Clin. Exp. Nephrol.* **2015**, 19, 54–64.
- 3) Vivekanand Jha, Guillermo Garcia-Garcia, Kunitoshi Iseki, Zuo Li, Saraladevi Naicker, Brett Plattner, Rajiv Saran, Angela Yee-Moon Wang, Chih-Wei Yang. Chronic kidney disease: global dimension and perspectives. *Lancet.* **2013**, 382, 260–272.
- 4) Enyu Imai, Masaru Horio, Tsuyoshi Watanabe, Kunitoshi Iseki, Kunihiro Yamagata, Shigeko Hara, Nobuyuki Ura, Yutaka Kiyohara, Toshiki Moriyama, Yasuhiro Ando, Shoichi Fujimoto, Tsuneo Konta, Hitoshi Yokoyama, Hirofumi Makino, Akira Hishida, Seiichi Matsuo. Prevalence of chronic kidney disease in the Japanese general population *Clin. Exp. Nephrol.* **2009**, 13, 621–630.
- 5) 日本透析医学会, 2015年末の慢性透析患者に関する基礎集計 図説 わが国の慢性透析療法の現状. **2016**.
- 6) Michael J. Lysaght. Maintenance Dialysis Population Dynamics: Current Trends and Long-Term Implications. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2002** Suppl 1:S37-40.
- 7) Peter J. Swedko, Heather D. Clark, Koushi Paramsothy, Ayub Akbari. Serum creatinine is an inadequate screening test for renal failure in elderly patients. *Arch. Intern. Med.* **2003**, 163, 356–360.
- 8) Mattia A. E. Valente, Hans L. Hillege, Gerjan Navis, Adriaan A. Voors, Peter H. J. M. Dunselman, Dirk J. Van Veldhuisen, Kevin Damman. The Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration equation outperforms the modification of Diet in Renal Disease equation for estimating glomerular filtration rate in chronic systolic heart failure *Eur. J. Heart Fail.* **2014**, 16, 86–94.
- 9) J. H. Martin, M. F. Fay, A. Udy, J. Roberts, C. Kirkpatrick, J. Ungerer, J. Lipman. Pitfalls of using estimations of glomerular filtration rate in an intensive care population *Intern. Med. J.* **2011**, 41, 537–543.
- 10) Akihiro Tsuda, Eiji Ishimura, Yoshiteru Ohno, Mitsuru Ichii, Shinya Nakatani, Yuuichi Machida, Katsuhito Mori, Junji Uchida, Shinya Fukumoto, Masanori Emoto, Tatsuya Nakatani, Masaaki Inaba. Poor glycemic control is a major factor in the overestimation of

- glomerular filtration rate in diabetic patients. *Diabetes. Care.* **2014**, 37, 596–603.
- 11) Jones D. Jones, Burnett C. Burnett. Creatinine metabolism in humans with decreased renal function: creatinine deficit. *Clin. Chem.* **1974**, 20, 1204–1212.
 - 12) Yoshiyuki Ohno, Makiko Kusama, Akihiro Hisaka, Yoshitsugu Yanagihara, Hiroshi Suzuki. Analysis of pharmacokinetic data provided in Japanese package inserts and interview forms focusing on urinary excretion of pharmacologically active species. *Yakugaku Zasshi.* **2006**, 126, 489–494.
 - 13) Donald L. Giusti, Hayton L. William. Dosage regimen adjustments in renal impairment. *Drug. Intel. Clin. Pharm.* **1973**, 7, 382–387.
 - 14) Neal S. Bricker, Saulo. Klahr, Herbert. Lubowitz, Eduardo. Slatopolsky. The pathophysiology of renal insufficiency. On the functional transformations in the residual nephrons with advancing disease. *Pediatr. Clin. North. Am.* **1971**, 18, 595–611.
 - 15) Dieter Häberle, A. Ober, G. Ruhland. Influence of glomerular filtration rate on the rate of para-aminohippurate secretion by the rat kidney: Micropuncture and clearance studies. *Kidney Int.* **1975**, 7, 385–396.
 - 16) Amor Maiza, Peter T. Daley-Yates. Prediction of the renal clearance of cimetidine using endogenous N-1-methylnicotinamide. *J. Pharmacokinet. Biopharm.* **1991**, 19, 175–188.
 - 17) Carol A. Gloff, Leslie Z. Benet. Differential effects of the degree of renal damage on p-aminohippuric acid and inulin clearances in rats. *J. Pharmacokinet. Biopharm.* **1989**, 17, 169–177.
 - 18) Jiunn H. Lin, Tsu-han Lin. Renal handling of drugs in renal failure. I: Differential effects of uranyl nitrate- and glycerol-induced acute renal failure on renal excretion of TEAB and PAH in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1988**, 246, 896–901.
 - 19) Christof Westenfelder, Gilberto J. Arevalo, Paul W. Crawford, Philip. Zerwer, Robert. L. Baranowski, Fredric M. Birch, Wayne R. Earnest, Ronald K. Hamburger, Richard D. Coleman, Neil A. Kurtzman. Renal tubular function in glycerol-induced acute renal failure. *Kidney Int.* **1980**, 18, 432–444.
 - 20) A. Chapron, D. D. Shen, B. R. Kestenbaum, C. Robinson-Cohen, J. Himmelfarb, C. K. Yeung. Does secretory clearance follow glomerular filtration rate in chronic kidney diseases? Reconsidering the intact nephron hypothesis. *Clin. Transl. Sci.* **2017**, 10, 395–403.

- 21) Marcus M. Reidenberg, Harry Kostenbauder, Wallace P. Adams. Rate of drug metabolism in obese volunteers before and during starvation and in azotemic patients. *Metabolism*. **1969**, 18, 209–213.
- 22) Albert W. Dreisbach, Juan J. L. Lertora. The effect of chronic renal failure on hepatic drug metabolism and drug disposition. *Semin. Dial.* **2003**, 16, 45–50.
- 23) Hong Sun, Lynda Frassetto, Leslie Z. Benet. Effects of renal failure on drug transport and metabolism. *Pharmacol. Ther.* **2006**, 109, 1–11.
- 24) Albert W. Dreisbach, Juan J. L. Lertora. The effect of chronic renal failure on drug metabolism and transport. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2008**, 4, 1065–1074.
- 25) Y. Zhang, L. Zhang, S. Abraham, S. Apparaju, T. C. Wu, J. M. Strong, S. Xiao, a J. Atkinson, K. E. Thummel, J. S. Leeder, C. Lee, G. J. Burckart, L. J. Lesko, S. M. Huang. Assessment of the impact of renal impairment on systemic exposure of new molecular entities: evaluation of recent new drug applications. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2009**, 85, 305–311.
- 26) Roger K. Verbeeck, Flora T. Musuamba. Pharmacokinetics and dosage adjustment in patients with renal dysfunction. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **2009**, 65, 757–773.
- 27) Albert W. Dreisbach. The influence of chronic renal failure on drug metabolism and transport. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2009**, 86, 553–556.
- 28) Catherine K. Yeung, Danny D. Shen, Kenneth E. Thummel, Jonathan Himmelfarb. Effects of chronic kidney disease and uremia on hepatic drug metabolism and transport. *Kidney Int.* **2014**, 85, 522–528.
- 29) Albert W. Dreisbach, Shanker Japa, Aster B. Gebrekal, Sarah E. Mowry, Juan J. L. Lertora, Burde L. Kamath, Allan E. Rettie. Cytochrome P4502C9 activity in end-stage renal disease. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2003**, 73, 475–477.
- 30) Nita A. Limdi, Mark T. Beasley, Melissa F. Baird, Joyce A. Goldstein, Gerald McGwin, Donna K. Arnett, Ronald T. Acton, Michael Allon. Kidney function influences warfarin responsiveness and hemorrhagic complications. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2009**, 20, 912–921.
- 31) G. Bianchetti, G. Graziani, D. Brancaccio, A. Morganti, G. Leonetti, M. Manfrin, R. Sega, R. Gomeni, C. Ponticelli, P. L. Morselli. Pharmacokinetics and effects of propranolol in terminal uraemic patients and in patients undergoing regular dialysis treatment. *Clin. Pharmacokinet.* **1976**, 1, 373–384.

- 32) David T. Lowenthal, William A. Briggs, Thomas P. Gibson, Howard Nelson, William J. Cirksena. Pharmacokinetics of oral propranolol in chronic renal disease. *Clin. Pharmacol. Ther.* **1974**, 16, 761–769.
- 33) Thomas D. Nolin, Reginald F. Frye, Phuong Le, Hooman Sadr, Judith Naud, Francois A. Leblond, Vincent Pichette, Jonathan Himmelfarb. ESRD impairs nonrenal clearance of fexofenadine but not midazolam. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2009**, 20, 2269–2276.
- 34) Graham Lappin, Yoko Shishikura, Roeline Jochemsen, Richard John Weaver, Charlotte Gesson, Brian Houston, Berend Oosterhuis, Ole J. Bjerrum, Malcolm Rowland, Colin Garner. Pharmacokinetics of fexofenadine: evaluation of a microdose and assessment of absolute oral bioavailability. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2010**, 40, 125–131.
- 35) Maiko Yamada, Yoshiyuki Ohno, Akihiro Hisaka. Systematic analysis of changes in drug exposure in patients with renal dysfunction and their relationships with renal excretion ratio of the drug. *医療薬学* **2013**, 39, 660–667.
- 36) Ming-Liang Tan, Kenta Yoshida, Ping Zhao, Lei Zhang, Thomas D. Nolin, Micheline Piquette-Miller, Aleksandra Galetin, Shiew-Mei Huang. Effect of chronic kidney disease on nonrenal elimination pathways: A systematic assessment of CYP1A2, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, and OATP. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2017**, doi: 10.1002/cpt.807.
- 37) H. Inamoto, R. Ozaki, T. Matsuzaki, M. Wakui, T. Saruta, A. Osawa. Incidence and mortality patterns of malignancy and factors affecting the risk of malignancy in dialysis patients. *Nephron.* **1991**, 59, 611–617.
- 38) Alex Sparreboom, Maja J. A. de Jonge, Peter de Bruijn, Eric Brouwer, Kees Nooter, Walter J. Loos, Robbert J. van Alphen, Ron H. J. Mathijssen, Gerrit Stoter, Jaap Verweij. Irinotecan (CPT-11) metabolism and disposition in cancer patients. *Clin. Cancer. Res.* **1998**, 4, 2747–2754.
- 39) カンプト®点滴静注 医薬品インタビューフォーム (改訂第8版), 株式会社ヤクルト. **2014**.
- 40) Yoshitaka Iwazu, Makoto Inoue, Satoru Yanagiba, Yukio Miyata, Masaki Okada, Yasuhiro Ando, Sumiko Honma, Yasushi Asano, Eiji Kusano. Pharmacokinetics of irinotecan hydrochloride (CPT-11) in a hemodialysis. *日本透析医学会* **2003**, 36, 1625–1630.
- 41) David Czock, Franz Maximilian Rasche, Benjamin Boesler, Maria Shipkova, Frieder Keller. Irinotecan in cancer patients with end-stage renal failure. *Ann. Pharmacother.* **2009**,

- 43, 363–369.
- 42) Ken-ichi Fujita, Yu Sunakawa, Keisuke Miwa, Yuko Akiyama, Minako Sugiyama, Kaori Kawara, Hiroo Ishida, Keishi Yamashita, Keiko Mizuno, Shigehira Saji, Wataru Ichikawa, Wataru Yamamoto, Fumio Nagashima, Toshimichi Miya, Masaru Narabayashi, Yuichi Ando, Takashi Hirose, Yasutsuna Sasaki. Delayed elimination of SN-38 in cancer patients with severe renal failure. *Drug Metab. Dispos.* **2011**, 39, 161–164.
 - 43) G. Freyer, P. Rougier, R. Bugat, J. P. Droz, M. Marty, H. Bleiberg, D. Mignard, L. Awad, P. Herait, S. Culine, V. Trillet-Lenoir. Prognostic factors for tumour response, progression-free survival and toxicity in metastatic colorectal cancer patients given irinotecan (CPT-11) as second-line chemotherapy after 5FU failure. CPT-11 F205, F220, F221 and V222 study groups. *Br. J. Cancer.* **2000**, 83, 431–437.
 - 44) F. A. De Jong, J. M. Van Der Bol, R. H. J. Mathijssen, T. Van Gelder, E. A. C. Wiemer, A. Sparreboom, J. Verweij. Renal function as a predictor of irinotecan-induced neutropenia. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2008**, 84, 254–262.
 - 45) Bruno Hagenbuch, Peter J. Meier. Organic anion transporting polypeptides of the OATP/SLC21 family: Phylogenetic classification as OATP/SLCO super-family, new nomenclature and molecular/functional properties. *Pflugers Arch.* **2004**, 447, 653–665.
 - 46) Emmanuel Jacquemin, Bruno Hagenbuch, Bruno Stieger, Allan W. Wolkoff, Peter J. Meier. Expression cloning of a rat liver Na(+)-independent organic anion transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1994**, 91, 133–137.
 - 47) Bonnie Hsiang, Yingjie Zhu, Zhaoqing Wang, Yuli Wu, Vito Sasseville, W. P. Yang, Todd G. Kirchgeßner. A novel human hepatic organic anion transporting polypeptide (OATP2). Identification of a liver-specific human organic anion transporting polypeptide and identification of rat and human hydroxymethylglutaryl-CoA reductase inhibitor transporters. *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 37161–37168.
 - 48) Ikumi Tamai, J. Nezu, Hiroshi Uchino, Yoshimichi Sai, Asuka Oku, Miyuki Shimane, Akira Tsuji. Molecular identification and characterization of novel members of the human organic anion transporter (OATP) family. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, 273, 251–260.
 - 49) Takaaki Abe, Masayuki Kakyo, Taro Tokui, Rie Nakagomi, Toshiyuki Nishio, Daisuke Nakai, Hideki Nomura, Michiaki Unno, Masanori Suzuki, Takeshi Naitoh, Seiki Matsuno,

- Hiromu Yawo. Identification of a novel gene family encoding human liver-specific organic anion transporter LST-1. *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 17159–171563.
- 50) Jörg König, Yunhai Cui, Anne T. Nies, Dietrich Keppler. A novel human organic anion transporting polypeptide localized to the basolateral hepatocyte membrane. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **2000**, 278, G156-164.
- 51) Pablo Martinez-Becerra, Oscar Briz, Marta R. Romero, Rocio I. R. Macias, Maria J. Perez, Carlos Sancho-Mateo, Maria P. Lostao, Jose M. Fernandez-Abalos, Jose J. G. Marin. Further characterization of the electrogenicity and pH sensitivity of the human organic anion-transporting polypeptides OATP1B1 and OATP1B3. *Mol. Pharmacol.* **2011**, 79, 596–607.
- 52) Inna Y. Gong, Richard B. Kim. Impact of genetic variation in OATP transporters to drug disposition and response. *Drug Metab. Pharmacokinet.* **2013**, 28, 4–18.
- 53) Hannah H. Lee, Richard H. Ho. Interindividual and interethnic variability in drug disposition: polymorphisms in organic anion transporting polypeptide 1B1 (OATP1B1; *SLCO1B1*). *Br. J. Clin. Pharmacol.* **2017**, 83, 1176–1184.
- 54) Kenneth Kellick. Organic ion transporters and statin drug interactions. *Curr. Atheroscler. Rep.* **2017**, 19, 1–5.
- 55) Yoshihisa Shitara, Kazuya Maeda, Kazuaki Ikejiri, Kenta Yoshida, Toshiharu Horie, Yuichi Sugiyama. Clinical significance of organic anion transporting polypeptides (OATPs) in drug disposition: their roles in hepatic clearance and intestinal absorption. *Biopharm. Drug Dispos.* **2013**, 34, 45–78.
- 56) Megumi Iwai, Hiroshi Suzuki, Ichiro Ieiri, Kenji Otsubo, Yuichi Sugiyama. Functional analysis of single nucleotide polymorphisms of hepatic organic anion transporter OATP1B1 (OATP-C). *Pharmacogenetics.* **2004**, 14, 749–757.
- 57) Yohei Nishizato, Ichiro Ieiri, Hiroshi Suzuki, Miyuki Kimura, Kiyoshi Kawabata, Takeshi Hirota, Hiroshi Takane, Shin Irie, Hiroyuki Kusuhara, Yoko Urasaki, Akinori Urae, Shun Higuchi, Kenji Otsubo, Yuichi Sugiyama. Polymorphisms of OATP-C (SLC21A6) and OAT3 (SLC22A8) genes: consequences for pravastatin pharmacokinetics. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2003**, 73, 554–565.
- 58) Xiaoqiang Xiang, Srinivasa Rao Jada, Hui Hua Li, Lu Fan, Lai San Tham, Chiung Ing Wong, Soo Chin Lee, Robert Lim, Qing Yu Zhou, Boon Cher Goh, Eng Huat Tan, Balram

- Chowbay. Pharmacogenetics of *SLCO1B1* gene and the impact of **1b* and **15* haplotypes on irinotecan disposition in Asian cancer patients. *Pharmacogenet Genomics*. **2006**, 16, 683–691.
- 59) W. A. Teft, S. Welch, J. Lenehan, J. Parfitt, Y. H. Choi, E. Winkvist, R. B. Kim. OATP1B1 and tumour OATP1B3 modulate exposure, toxicity, and survival after irinotecan-based chemotherapy. *Br. J. Cancer*. **2015**, 112, 857–865.
- 60) Ji-Youn Han, Hyeong-Seok Lim, Yong Hoon Park, Sung Young Lee, Jin Soo Lee. Integrated pharmacogenetic prediction of irinotecan pharmacokinetics and toxicity in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. **2009**, 63, 115–120.
- 61) Ji-Youn Han, Hyeong-Seok Lim, Eun Soon Shin, Yeon-Kyeong Yoo, Yong Hoon Park, Jong-Eun Lee, Heung Tae Kim, Jin Soo Lee. Influence of the organic anion-transporting polypeptide 1B1 (OATP1B1) polymorphisms on irinotecan-pharmacokinetics and clinical outcome of patients with advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. **2008**, 59, 69–75.
- 62) K. Yoshida, B. Sun, L. Zhang, P. Zhao, D. R. Abernethy, T. D. Nolin, A. Rostami-Hodjegan, I. Zineh, S. M. Huang. Systematic and quantitative assessment of the effect of chronic kidney disease on CYP2D6 and CYP3A4/5. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2016**, 100, 75–87.
- 63) W. Mück, S. Park, W. Jäger, B. Voith, E. Wandel, P. R. Galle, A. Schwarting. The pharmacokinetics of cerivastatin in patients on chronic hemodialysis. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* **2001**, 39, 192–198.
- 64) A. L. Mazzu, J. T. Lettieri, E. Kelly, R. Vargas, T. Marbury, M. C. Liu, P. Sundaresan. Influence of renal function on the pharmacokinetics of cerivastatin in normocholesterolemic adults. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **2000**, 56, 69–74.
- 65) エゼチミブ®錠インタビューフォーム (改訂版第6版), バイエル製薬株式会社. **2016**.
- 66) Thomas C. Dowling, Andrew E. Briglia, Jeffrey C. Fink, Donna S. Hanes, Paul D. Light, Lucy Stackiewicz, Chetan S. Karyekar, Natalie D. Eddington, Matthew R. Weir, William L. Henrich. Characterization of hepatic cytochrome p4503A activity in patients with end-stage renal disease. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2003**, 73, 427–434.
- 67) Robert L. Lins, Katelijne E. Matthys, Gert A. Verpooten, Patrick C. Peeters, Max Dratwa,

- Jean-Claude Stolear, Norbert H. Lameire. Pharmacokinetics of atorvastatin and its metabolites after single and multiple dosing in hypercholesterolaemic haemodialysis patients. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2003**, 18, 967–976.
- 68) クレストール®錠インタビューフォーム (改訂第19版), 塩野義製薬株式会社. **2017**.
- 69) Charles E. Halstenson, Joseph Triscari, Arthur DeVault, Bruce Shapiro, William Keane, Henry Pan. Single-dose pharmacokinetics of pravastatin and metabolites in patients with renal impairment. *J. Clin. Pharmacol.* **1992**, 32, 124–132.
- 70) Joseph Gibbons, Merrill J. Egorin, Ramesh K. Ramanathan, Pingfu Fu, Daniel L. Mulkerin, Stephen Shibata, Chris H. M. Takimoto, Sridhar Mani, Patricia A. LoRusso, Jean L. Grem, Anna Pavlick, Heinz-Josef Lenz, Susan M. Flick, Sherrie Reynolds, Theodore F. Lagattuta, Robert A. Parise, Yanfeng Wang, Anthony J. Murgo, S.Percy Ivy, Scot C. Remick. Phase I and pharmacokinetic study of imatinib mesylate in patients with advanced malignancies and varying degrees of renal dysfunction: a study by the National Cancer Institute Organ Dysfunction Working Group. *J. Clin. Oncol.* **2008**, 26, 570–576.
- 71) S. Schumacher, I. Abbasi, D. Weise, V. Hatorp, K. Sattler, J. Sieber, C. Hasslacher. Single- and multiple-dose pharmacokinetics of repaglinide in patients with type 2 diabetes and renal impairment. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **2001**, 57, 147–152.
- 72) Thomas C. Marbury, Jon L. Ruckle, Vibeke Hatorp, Michael P. Andersen, Karin Kramer Nielsen, Won Chin Huang, Poul Strange. Pharmacokinetics of repaglinide in subjects with renal impairment. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2000**, 67, 7–15.
- 73) Sivi Ouwerkerk-Mahadevan, Maria Beumont-Mauviel, Steven Mortier, Monika Peeters, Rene Verloes, Carla Truyers, Geert Mannens, Inneke Wynant, Alexandru Simion. Evaluation of the pharmacokinetics and renal excretion of simeprevir in subjects with renal impairment. *Drugs R. D.* **2015**, 15, 261–270.
- 74) Norikazu Terao, Danny D. Shen. Reduced extraction of L-propranolol by perfused rat liver in the presence of uremic blood. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1985**, 233, 277–284.
- 75) Ryohei Hori, Katsuhiko Okumura, Masato Yasuhara, Hirokazu Katayama. Reduced hepatic uptake of propranolol in rats with acute renal failure. *Biochem. Pharmacol.* **1985**, 34, 2679–2683.
- 76) Chen Fee Lim, Bert F. Bernard, M. de Jong, Roel Docter, Eric P. Krenning, Georg Hennemann. A furan fatty acid and indoxyl sulfate are the putative inhibitors of thyroxine

- hepatocyte transport in uremia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1993**, 76, 318–324.
- 77) Masayuki Tsujimoto, Yuri Kinoshita, Sumio Hirata, Masaki Otagiri, Hisakazu Ohtani, Yasufumi Sawada. Effects of uremic serum and uremic toxins on hepatic uptake of digoxin. *Ther. Drug Monit.* **2008**, 30, 576–582.
 - 78) Wendy M. van der Deure, Robin P. Peeters, Theo J. Visser. Molecular aspects of thyroid hormone transporters, including MCT8, MCT10, and OATPs, and the effects of genetic variation in these transporters. *J. Mol. Endocrinol.* **2010**, 44, 1–11.
 - 79) T. J. van der Deure, W. M. Friesema, E. C. Peeters, R. P., Visser. Thyroid hormone transport by OATP1A2 and OATP1B3: functional comparison with other human OATP1 family members. *Inter-individual differences in thyroid hormone bioactivity.* **2009**, 75–88.
 - 80) Yunhai Cui, Jörg König, Ulrike Buchholz, Herbert Spring, Inka Leier, Dietrich Keppler. Drug resistance and ATP-dependent conjugate transport mediated by the apical multidrug resistance protein, MRP2, permanently expressed in human and canine cells. *Mol. Pharmacol.* **1999**, 55, 929–937.
 - 81) Masayuki Tsujimoto, Keishi Higuchi, Daisuke Shima, Hitoshi Yokota, Taku Furukubo, Satoshi Izumi, Tomoyuki Yamakawa, Masaki Otagiri, Sumio Hirata, Kohji Takara, Kohshi Nishiguchi. Inhibitory effects of uraemic toxins 3-indoxyl sulfate and p-cresol on losartan metabolism *in vitro*. *J. Pharm. Pharmacol.* **2010**, 62, 133–138.
 - 82) Daniel C. Carter, Joseph X. Ho. Structure of serum albumin. *Adv. Protein Chem.* **1994**, 45, 153–203.
 - 83) Ekaterina A. Litus, Sergei E. Permyakov, Vladimir N. Uversky, Eugene A. Permyakov. Intrinsically disordered regions in serum albumin: What are they for? *Cell Biochem. Biophys.* **2017**, 1–19.
 - 84) Yusuke Ueno, Hiroko Matsuda, Hideki Mizutani, Takuya Iwamoto, Masahiro Okuda. Involvement of specific transport system on uptake of lactone form of SN-38 in human intestinal epithelial cell line Caco-2. *Biol. Pharma. Bull.* **2012**, 35, 54–8.
 - 85) Manlio Palumbo, Claudia Sissi, Barbara Gatto, S. Moro, Giuseppe Zagotto. Quantitation of camptothecin and related compounds. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* **2001**, 764, 121–140.
 - 86) O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **1951**, 193, 265–75.

- 87) K. Yamaoka, Y. Tanigawara, T. Nakagawa, T. Uno. A pharmacokinetic analysis program (multi) for microcomputer. *J. Pharmacobio-Dyn.* **1981**, 4, 879–85.
- 88) Oscar Briz, Maria A. Serrano, Rocio I. R. MacIas, Javier Gonzalez-Gallego, Jose J. G. Marin. Role of organic anion-transporting polypeptides, OATP-A, OATP-C and OATP-8, in the human placenta-maternal liver tandem excretory pathway for foetal bilirubin. *Biochem. J.* **2003**, 371, 897–905.
- 89) Gerd A. Kullak-Ublick, Manfred G. Ismail, Bruno Stieger, Lukas Landmann, Robert Huber, Flavia Pizzagalli, Karin Fattinger, Peter J. Meier, Bruno Hagenbuch. Organic anion-transporting polypeptide B (OATP-B) and its functional comparison with three other OATPs of human liver. *Gastroenterology.* **2001**, 120, 525–533.
- 90) Masaru Hirano, Kazuya Maeda, Yoshihisa Shitara, Yuichi Sugiyama. Contribution of OATP2 (OATP1B1) and OATP8 (OATP1B3) to the hepatic uptake of pitavastatin in humans. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2004**, 311, 139–146.
- 91) Catherine Hamar, Gerhard Levy. Serum protein binding of drugs and bilirubin in newborn infants and their mothers. *Clin. Pharmacol. Ther.* **1980**, 28, 58–63.
- 92) a Roda, G. Cappelleri, R. Aldini, E. Roda, L. Barbara. Quantitative aspects of the interaction of bile acids with human serum albumin. *J. Lipid Res.* **1982**, 23, 490–495.
- 93) T. Abe, M. Unno, T. Onogawa, T. Tokui, T. N. Kondo, R. Nakagomi, H. Adachi, K. Fujiwara, M. Okabe, T. Suzuki, K. Nunoki, E. Sato, M. Kakyo, T. Nishio, J. Sugita, N. Asano, M. Tanemoto, M. Seki, F. Date, Takeshi Naitoh, Seiki Matsuno, Hiromu Yawo. LST-2, a human liver-specific organic anion transporter, determines methotrexate sensitivity in gastrointestinal cancers. *Gastroenterology.* **2001**, 120, 1689–1699.
- 94) Jörg König, Yunhai Cui, Anne T. Nies, Dietrich Keppler. Localization and genomic organization of a new hepatocellular organic anion transporting polypeptide. *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 23161–23168.
- 95) Ken-ichi Fujita, Tomoko Sugiura, Hidenori Okumura, Saki Umeda, Noritaka Nakamichi, Yusuke Watanabe, Hiromichi Suzuki, Yu Sunakawa, Ken Shimada, Kaori Kawara, Yasutsuna Sasaki, Yukio Kato. Direct inhibition and down-regulation by uremic plasma components of hepatic uptake transporter for SN-38, an active metabolite of irinotecan, in humans. *Pharm. Res.* **2014**, 31, 204–215.
- 96) Chuanhui Yu, Joseph K. Ritter, Richard J. Krieg, Bhaskar Rege, Thomas H. Karnes,

- Mohamadi A. Sarkar. Effect of chronic renal insufficiency on hepatic and renal UDP-glucuronyltransferases in rats. *Drug Metab. Dispos.* **2006**, 34, 621–627.
- 97) Mutsaers A. M. Mutsaers, Martijn J. G. Wilmer, Dorien Reijnders, Jitske Jansen, Petra H. H. van den Broek, Marleen Forkink, Eva Schepers, Griet Glorieux, Raymond Vanholder, Lambert P. van den Heuvel, Joost G. Hoenderop, Rosalinde Masereeuw. Uremic toxins inhibit renal metabolic capacity through interference with glucuronidation and mitochondrial respiration. *Biochim. Biophys. Acta.* **2013**, 1832, 142–150.
- 98) Marian Iwamoto, William D. Hanley, Amelia S. Petry, Evan J. Friedman, James T. Kost, Sheila A. Breidinger, Kenneth C. Lasseter, Richard Robson, Norman M. Lunde, Larissa A. Wenning, Julie A. Stone, John A. Wagner. Lack of a clinically important effect of moderate hepatic insufficiency and severe renal insufficiency on raltegravir pharmacokinetics. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2009**, 53, 1747–1752.
- 99) Norimasa Kaneda, Teruo Yokokura. Nonlinear pharmacokinetics of CPT-11 in rats. *Cancer Res.* **1990**, 50, 1721–1725.
- 100) R. Atsumi, W. Suzuki, H. Hakusui. Identification of the metabolites of irinotecan, a new derivative of camptothecin, in rat bile and its biliary excretion. *Xenobiotica.* **1991**, 21, 1159–1169.
- 101) Hironobu Minami, Kimie Sai, Mayumi Saeki, Yoshiro Saito, Shogo Ozawa, Kazuhiro Suzuki, Nahoko Kaniwa, Jun-ichi Sawada, Tetsuya Hamaguchi, Noboru Yamamoto, Kuniaki Shirao, Yasuhide Yamada, Hironobu Ohmatsu, Kaoru Kubota, Teruhiko Yoshida, Atsushi Ohtsu, Nagahiro Saijo. Irinotecan pharmacokinetics/pharmacodynamics and UGT1A genetic polymorphisms in Japanese: roles of *UGT1A1**6 and *28. *Pharmacogenet. Genomics.* **2007**, 17, 497–504.
- 102) Rujia Xie, Ron H. J. Mathijssen, Alex Sparreboom, Jaap Verweij, Mats O. Karlsson. Clinical pharmacokinetics of irinotecan and its metabolites in relation with diarrhea. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2002**, 72, 265–275.
- 103) Michael S. Roberts, Beatrice M. Magnusson, Frank J. Burczynski, Michael Weiss. Enterohepatic circulation: physiological, pharmacokinetic and clinical implications. *Clin. Pharmacokinet.* **2002**, 41, 751–790.
- 104) E. L. Forker, C. Ghiron. ESR, albumin, and the riddle of organic anion uptake by the liver. *Am. J. Physiol.* **1988**, 254, G463–464.

- 105) Toshiharu Horie, Takashi Mizuma, Sadako Kasai, Shoji Awazu. Conformational change in plasma albumin due to interaction with isolated rat hepatocyte. *Am. J. Physiol.* **1988**, 254, G465-4670.
- 106) Patrick Poulin, Sami Haddad. Albumin and uptake of drugs in cells: Additional validation exercises of a recently published equation that quantifies the albumin-facilitated uptake mechanism (s) in physiologically based pharmacokinetic and pharmacodynamic modeling research. *J. Pharm. Sci.* **2015**, 104, 4448–4458.
- 107) Patrick Poulin, Frank J. Burczynski, Sami Haddad. The role of extracellular binding proteins in the cellular uptake of drugs: Impact on quantitative in vitro-to-in vivo extrapolations of toxicity and efficacy in physiologically based pharmacokinetic-pharmacodynamic research. *J. Pharm. Sci.* **2016**, 105, 497–508.
- 108) Yulia Shenberger, Amit Shimshi, Sharon Ruthstein. EPR spectroscopy shows that the blood carrier protein, human serum albumin, closely interacts with the N-terminal domain of the copper transporter, Ctr1. *J. Phys. Chem. B.* **2015**, 119, 4824–4830.
- 109) J. Jansen, M. Fedecostante, M. J. Wilmer, J. G. Peters, U. M. Kreuser, P. H. van den Broek, R. A. Mensink, T. J. Boltje, D. Stamatialis, J. F. Wetzels, L. P. van den Heuvel, J. G. Hoenderop, R. Masereeuw. Bioengineered kidney tubules efficiently excrete uremic toxins. *Sci. Rep.* **2016**, 6, doi: 10.1038/srep26715.
- 110) Masayuki Tsujimoto, Yui Nagano, Satomi Hosoda, Asuka Shiraishi, Ayaka Miyoshi, Shima Hiraoka, Taku Furukubo, Satoshi Izumi, Tomoyuki Yamakawa, Tetsuya Minegaki, Kohshi Nishiguchi. Effects of decreased vitamin D and accumulated uremic toxin on human CYP3A4 activity in patients with end-stage renal disease. *Toxins* **2013**, 5, 1475–1485.
- 111) Yoshiharu Itoh, Atsuko Ezawa, Kaori Kikuchi, Yoshinari Tsuruta, Toshimitsu Niwa. Protein-bound uremic toxins in hemodialysis patients measured by liquid chromatography/tandem mass spectrometry and their effects on endothelial ROS production. *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, 403, 1841–1850.
- 112) Uremic Toxin - Data Base Uremic Solutes Database.
<http://www.uremic-toxins.org/DataBase.html> (Feb. 9, 2018).
- 113) Ken-ichi Fujita, Yusuke Masuo, Hidenori Okumura, Yusuke Watanabe, Hiromichi Suzuki, Yu Sunakawa, Ken Shimada, Kaori Kawara, Yuko Akiyama, Masanori Kitamura,

- Munetaka Kunishima, Yasutsuna Sasaki, Yukio Kato. Increased plasma concentrations of unbound SN-38, the active metabolite of irinotecan, in cancer patients with severe renal failure. *Pharm. Res.* **2016**, 33, 269–282.
- 114) Toshiyuki Sakai, Keishi Yamasaki, Tomoko Sako, Ulrich Kragh-Hansen, Ayaka Suenaga, Masaki Otagiri. Interaction mechanism between indoxyl sulfate, a typical uremic toxin bound to site II, and ligands bound to site I of human serum albumin. *Pharm. Res.* **2001**, 18, 520–524.
- 115) Nida Zaidi, Mohammad Rehan Ajmal, Gulam Rabbani, Ejaz Ahmad, Rizwan Hasan Khan. A comprehensive insight into binding of hippuric acid to human serum albumin: a study to uncover its impaired elimination through hemodialysis. *PLoS One* **2013**, 8, e71422.
- 116) Keishi Yamasaki, Toru Maruyama, Kaori Yoshimoto, Yasuhiro Tsutsumi, Ryuichi Narazaki, Akira Fukuhara, Ulrich Kragh-Hansen, Masaki Otagiri. Interactive binding to the two principal ligand binding sites of human serum albumin: effect of the neutral-to-base transition. *Biochim. Biophys. Acta.* **1999**, 1432, 313–323.
- 117) Mohammed Habibur Rahman, Toru Maruyama, Tomoko Okada, Teruko Imai, Masaki Otagiri. Study of interaction of carprofen and its enantiomers with human serum albumin—II: Stereoselective site-to-site displacement of carprofen by ibuprofen. *Biochem. Pharmacol.* **1993**, 46, 1733–1740.
- 118) Keishi Yamasaki, Mohammed H. Rahman, Yasuhiro Tsutsumi, Toru Maruyama, Shamim Ahmed, Ulrich Kragh-Hansen, Masaki Otagiri. Circular dichroism simulation shows a site-II-to-site-I displacement of human serum albumin-bound diclofenac by ibuprofen. *AAPS. PharmSciTech.* **2000**, 1, E12.
- 119) Maria Karlgren, Anna Vildhede, Ulf Norinder, Jacek R. Wisniewski, Emi Kimoto, Yurong Lai, Ulf Haglund, Per Artursson. Classification of inhibitors of hepatic organic anion transporting polypeptides (OATPs): influence of protein expression on drug-drug interactions. *J. Med. Chem.* **2012**, 55, 4740–4763.
- 120) Tom De Bruyn, Gerard J. P. van Westen, Adriaan P. Ijzerman, Bruno Stieger, Peter de Witte, Patrick F. Augustijns, Pieter P. Annaert. Structure-based identification of OATP1B1/3 inhibitors. *Mol. Pharmacol.* **2013**, 83, 1257–1267.
- 121) Yasuhiro Tsutsumi, Toru Maruyama, Akira Takadate, Masafumi Goto, Hiroshi Matsunaga, Masaki Otagiri. Interaction between two dicarboxylate endogenous substances, bilirubin

- and an uremic toxin, 3-carboxy-4-methyl-5-propyl-2-furanpropanoic acid, on human serum albumin. *Pharm. Res.* **1999**, 16, 916–923.
- 122) Ikumi Tamai, Takashi Nozawa, Minako Koshida, Jun-ichi Nezu, Yoshimichi Sai, Akira Tsuji. Functional characterization of human organic anion transporting polypeptide B (OATP-B) in comparison with liver-specific OATP-C. *Pharm. Res.* **2001**, 18, 1262–1269.
- 123) Juergen Kindla, Fabian Müller, Maren Mieth, Martin F. Fromm, Jörg König. Influence of non-steroidal anti-inflammatory drugs on organic anion transporting polypeptide (OATP) 1B1- and OATP1B3-mediated drug transport. *Drug Metab. Dispos.* **2011**, 39, 1047–1053.