

## 癌化学療法における薬物体内動態解析に関する研究

井藤 達也

## Pharmacokinetic Study of Cancer Chemotherapy

Tatsuya ITOH

Department of Pharmacy, Sapporo Social Insurance General Hospital, 6-2-1 Atsubetsu-chuo 2-jo,  
Atsubetsu-ku, Sapporo City 004-8618, Japan

(Received May 8, 2006)

We reported that the rate of conversion of lactone to carboxylate forms of irinotecan (CPT-11) and its metabolites plays a major role in the biliary excretion of these compounds. Sulfobromophthalein partially inhibited the secretion of SN-38-glucuronide into the gastrointestinal lumen, whereas little change was seen in that of active metabolite SN-38. Co-administration of sulfobromophthalein with CPT-11 might lower the late-onset gastrointestinal toxicity observed during treatment with CPT-11 without lowering anticancer activity. In the ileum, the level of transport in the direction from the serosal layer to mucosal layer was significantly greater than that in the direction from the mucosal layer to serosal layer, whereas a significant difference was not observed in the jejunum. This secretory transport required metabolic energy was diminished by sulfobromophthalein. A specific transport system plays a major role in the secretion of SN-38 and that this secretory transport system predominantly exists in the ileum. Uptake of SN-38 was significantly reduced at 4°C. Baicalin inhibited the uptake of SN-38. A specific transport system mediates the uptake of SN-38 across the apical membrane in Caco-2 cells. Inhibition of this transporter would be a useful means for reducing late-onset diarrhea.

**Key words**—irinotecan (CPT-11); SN-38; sulfobromophthalein; Caco-2 cells; transporter

## 1. はじめに

抗ガン薬は通常の薬物に比較して副作用の発現頻度が高いことから、投与方法、投与経路を制御することで可能な限り副作用を抑制することが臨床上望ましい。このように、ガン化学療法施行時における薬理効果の発現と副作用の抑制（適正使用）を適切に遂行していくためには、ガン病態における標的抗ガン薬の体内動態特性を十分に把握し投与設計を立てる必要がある。本研究では標的抗ガン薬として塩酸イリノテカン（CPT-11）を選択し、体内動態特性と適正使用との関連性について種々検討した。

塩酸イリノテカン（CPT-11; 7-ethyl-10-[4-(1-piperidino)-1-piperidino] carbonyloxy-camptothecin）は肺癌に施行する化学療法剤の中でも有効性が高く、世界的にも第一選択薬として認知されている。

CPT-11はプロドラックであり、主に肝ミクロソーム内のカルボキシエステラーゼによって活性代謝物（SN-38; 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin）に変換され抗腫瘍効果を発揮する。CPT-11及びSN-38は化学構造上、ラクトン環の可逆的開閉を生じ、酸性側では閉環体（ラクトン体）、アルカリ側では開環体（カルボキシル体）として存在する。

CPT-11は投与の段階ではほぼすべてラクトン体であるが、投与後、経時的にラクトン体からカルボキシル酸体に変換され抗腫瘍効果が低下すると言われる。また、SN-38も同様の構造変化を生じ、抗腫瘍活性を示す本体はラクトン体とされている。さらに、SN-38は肝でグルクロン酸抱合を受けグルクロナイド（SN-38-Glu）となって胆汁へ排泄される。CPT-11, SN-38, SN-38-Gluの胆汁中排泄経路の存在は下痢発症と大きく関わっているが、肝の胆管側膜上でこれらを輸送する有機アニオントランスポーター Multidrug resistance associated protein 2 (Mrp2 / Abcg2) がこれらアニオン化合物の輸送に大きく寄与していると考えられる。<sup>1)</sup>しかし、他にP糖蛋

札幌社会保険総合病院薬剤部（〒004-8618 札幌市厚別区厚別中央2条6-2-1）

e-mail: ssighpha@ruby.ocn.ne.jp

本総説は、平成17年度日本薬学会北海道支部奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

白 (P-gp/Abcb) による CPT-11 の輸送も関与しており, *in vitro* においても両者の寄与のバランスは明確でない.<sup>2)</sup> さらに, 生理的 pH では平衡が開環方向へ傾くため血液中の代謝物はカルボキシル体となり易く, 薬効低下や Mrp2 による排泄増加を招くことが報告されている.<sup>3,4)</sup>

一方, CPT-11 は多くの抗ガン薬の中でも初めて下痢が用量規定因子 (dose limiting factor) となっており, 多くの死亡例も報告されている. これまでに, この強い副作用である下痢発症を防ぐための方法として, SN-38-Glu が腸内細菌により SN-38 へ脱抱合されるのを抑える目的で半夏瀉心湯の併用,<sup>5)</sup> 抗生剤による腸内の殺菌,<sup>6)</sup> あるいは SN-38 の吸収を抑える目的で重曹の併用<sup>7)</sup> を行うことなどが知られている. しかしながら, 著者はこのように副作用発現を抑える処置をとっても効果なく, 遅発性の下痢を引き起こしてしまう症例を何度か医療現場で経験した. そこで, この副作用軽減措置には薬物動態学的な観点から工夫を要すると考え, 種々の検討を行った. 本研究では CPT-11 及び活性代謝物 SN-38 のカルボキシル体, ラクトン体の血液, 組織液中濃度を各々分離定量することにより CPT-11, SN-38, SN-38-Glu の体内動態, 消化管内挙動をより詳細に明らかにした. それらの結果を基に CPT-11 の下痢発症をより効率よく防ぐことのできる投与方法並びに, 体内動態すなわち血中濃度から下痢の発症を予測する方法について考察した.

## 2. ラットにおける CPT-11 とその代謝物の胆汁排泄解析及びスルフォプロモフタレインによる CPT-11 代謝物の体内挙動制御

CPT-11, SN-38, SN-38-Glu の胆汁中排泄経路の存在は下痢発症と大きく関わっている. 肝の胆管側膜上でこれらを輸送する Mrp2 はアニオン化合物の輸送に大きく寄与していると考えられる. しかし, 他に P-gp も CPT-11 の輸送に関与しており,<sup>2)</sup> *in vivo* での両者の寄与のバランスは明確ではない.

CPT-11 及びその代謝物はラクトン環を有し, pH 依存的に開環しカルボキシル体となり, この反応は可逆的である. 血液の pH 下では平衡が開環方向へ傾き, カルボキシル体となった代謝物は Mrp2 に対する親和性が高く排出され易い. また, カルボキシル体への移行は薬効の低下を招くため臨床有望ましくない.<sup>3,4)</sup> このような背景から, CPT-11 のラ

クトン体及びカルボキシル体の相違が薬物の体内動態, 主に胆汁中排泄に及ぼす影響を検討した.

**2-1. 実験方法** Kaneda らの方法<sup>8)</sup> に準じて実験を行った. すなわち Wistar 雄性ラットをペントバルビタールで麻酔後, 四肢を保定板に固定し, 大腿動脈, 大腿静脈及び胆管にカニューレ (Intra-medical PE-50, PE-10; Clay Adams, Parsippany, NJ) を挿入した. 大腿静脈カニューレより薬物を投与し, 500  $\mu$ l の生理食塩水でフラッシュした. 経時的に採取した血液及び胆汁から以下の方法でサンプルを調製した.

ラットの大腿静脈よりヘパリン添加したチューブに血液を約 300  $\mu$ l 採取し, これを遠心分離 (3000  $\times$ g) したのち, 血漿を採取し, 除蛋白並びに抽出を行い, 測定サンプルとした.

ラットの胆管より胆汁を回収し, 得られた各時間毎のフラクションの重量から胆汁量を求め, 総濃度及びラクトン型濃度の測定用サンプルを調製した. ラクトン体のサンプル調製はフラクション回収後速やかに行った.

**2-2. 結果** ラクトン体 CPT-11 をラットに 100  $\mu$ g/body 静脈内投与時の胆汁中総排泄量を Fig. 1 に示した. 最も多く胆汁中へ排泄されたのは SN-38-Glu であった. これに対し抱合を受けていない SN-38 の排泄量は少なく, 両化合物のトランスポーターに対する親和性の違い, 及び SN-38 の迅速な抱合が示唆された結果となった.

また, この胆汁中排泄量に占めるラクトン体の量を Fig. 2 に示した. CPT-11 及び SN-38 ラクトン体の占める割合は低く, この理由として SN-38 の排出はカルボキシル体を認識するトランスポーター依存性であり, また胆汁が弱塩基性であるためと推察された. 以上のことから SN-38 の多くはカルボキシル体として胆管から小腸内に排泄されることが示された.

これに対しカルボキシル体 CPT-11 を投与したとき, 速やかに CPT-11 及び SN-38 が排泄され (Fig. 3), Mrp2 等の有機アニオン輸送体の関与が示唆された. 一方, SN-38-Glu の排泄量はラクトン体 CPT-11 投与時に比べ 1/2 以下となり, CPT-11 や SN-38 にみられる急速な排泄は認められなかった.

CPT-11 と SN-38 の胆汁中排泄総量を Table 1 に示した. CPT-11 のカルボキシル体を投与したとき,

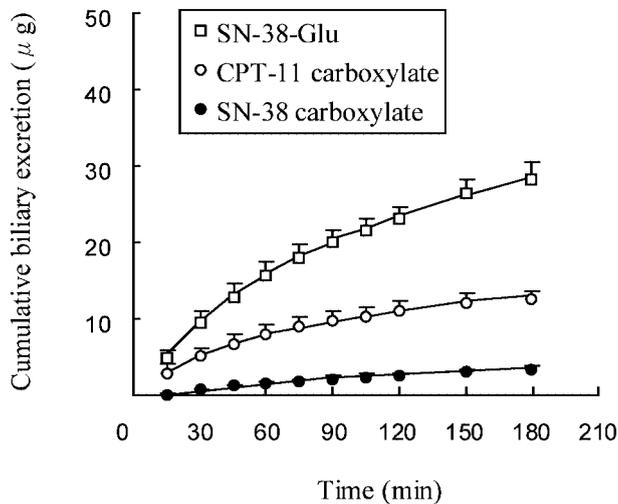


Fig. 1. Cumulative Biliary Excretion of CPT-11 and its Metabolites after Intravenous Administration of CPT-11 (100  $\mu\text{g}$ ) into Rats

Each point represents the mean with S.D. of 3 determinations.

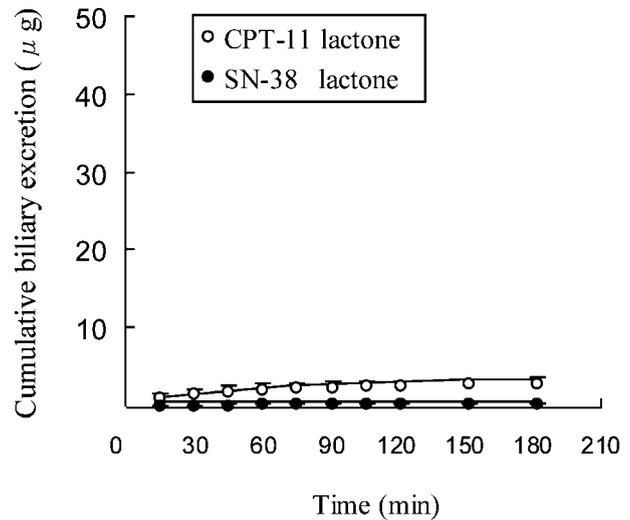


Fig. 2. Cumulative Biliary Excretion of Lactone Forms of CPT-11 and SN-38 after Intravenous Administration of CPT-11 (100  $\mu\text{g}$ ) into Rats

Each point represents the mean with S.D. of 3 determinations.

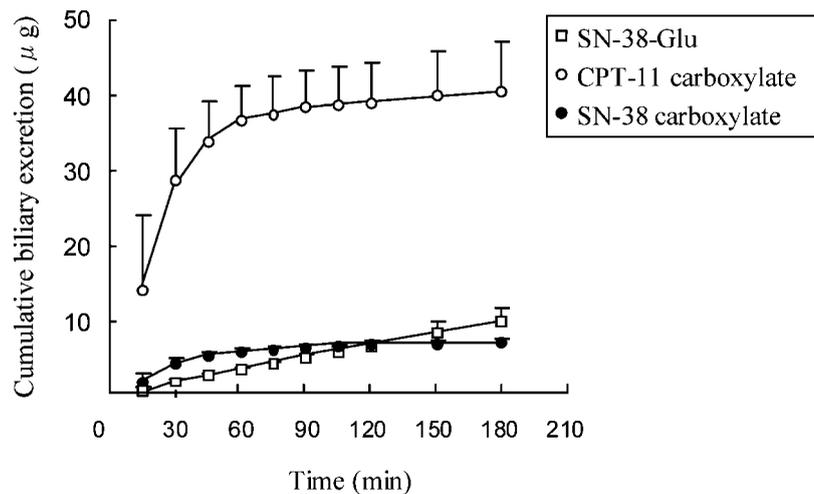


Fig. 3. Cumulative Biliary Excretion of CPT-11 and Its Metabolites after Intravenous Administration of Carboxylate Form of CPT-11 (100  $\mu\text{g}$ ) into Rats

Each point represents the mean with S.D. of 3 determinations.

SN-38-Glu の胆汁中排泄はラクトン体を投与したときの値に比べ有意に低下した。一方、CPT-11 カルボキシル体を投与時の CPT-11 と SN-38 の胆汁中排泄量はラクトン体投与時の値に比べ増大した。

管腔内へ排泄された SN-38-Glu は腸内細菌によって SN-38 となる。患者にとって腸管内の SN-38-Glu は副作用の原因となる。これに対する消化管内でのアプローチとして半夏瀉心湯の併用,<sup>5)</sup> 抗生剤による腸内の殺菌,<sup>6)</sup> あるいは SN-38 の吸収を抑える目的で重曹の併用<sup>7)</sup> が挙げられるが、消化管以外

での追加アプローチとして、胆汁中排泄を抑制し SN-38-Glu を腎排泄経路より体外に排泄させる方法が考えられる。

スルフォブROMOFタレイン (sulfobromophthalain; BSP) は薬理作用を目的としない肝機能検査薬としてヒトに投与される。この薬物の排泄にはアニオン輸送系である Mrp2 が関与していることから,<sup>9)</sup> Mrp2 遺伝子変異による Dubin-Johnson 症候群の診断に用いることができる。<sup>10)</sup> また BSP はその多くが胆汁中排泄であり、尿中移行が極めて少な

Table 1. Comparison of Biliary Excretion of CPT-11 and Its Metabolites after i.v. Administrations of CPT-11 Lactone and Carboxylate Forms (100  $\mu\text{g}/\text{body}$ ) in Rats

Compound	SN-38-Glu		CPT-11		SN-38	
	$X_{\text{bile 0-1 hr}}$	$X_{\text{bile 0-3 hr}}$	$X_{\text{bile 0-1 hr}}$	$X_{\text{bile 0-3 hr}}$	$X_{\text{bile 0-1 hr}}$	$X_{\text{bile 0-3 hr}}$
	$\mu\text{g}$					
CPT-11 lactone	15.7 $\pm$ 1.77	28.1 $\pm$ 2.50	7.92 $\pm$ 1.22	12.6 $\pm$ 0.92	1.53 $\pm$ 0.24	3.34 $\pm$ 0.39
CPT-11 carboxylate	3.90 $\pm$ 0.14*	10.1 $\pm$ 1.73*	36.6 $\pm$ 4.55*	40.4 $\pm$ 6.63*	6.11 $\pm$ 0.35*	7.34 $\pm$ 0.42*

CPT-11 (100  $\mu\text{g}/\text{body}$ ) was injected through the femoral vein. Bile specimens were collected at the specified times. Each value represents the cumulative amounts excreted into bile over periods 0 to 3 hr. Each value is the mean with S.D. \*  $p < 0.05$  vs i.v. administration of lactone form.

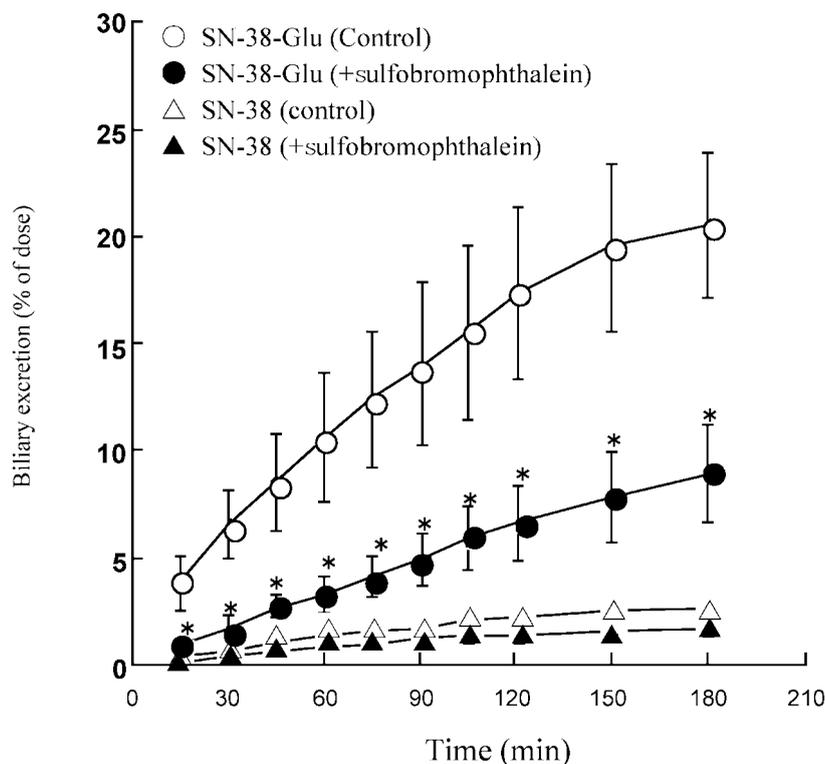


Fig. 4. Effect of Sulfobromophthalein on the Biliary Excretion of SN-38-Glu and SN-38 after CPT-11 Administration

CPT-11 (500  $\mu\text{g}/\text{body}$ ) was injected through the femoral vein in the presence or absence of sulfobromophthalein (20 mg/body). Each point represents the mean with S.D. of 4 determinations. \* $p < 0.05$  compared with absence of sulfobromophthalein.

い.

CPT-11 と BSP を同時投与した場合、これらの化合物が Mrp2 の基質として胆汁中排泄過程で競合し、CPT-11 の毒性が軽減される可能性が考えられる。

CPT-11 及びその代謝物は胆汁中排泄と尿中排泄という 2 つの排泄経路を持つことが報告されている。本章では CPT-11 とその代謝物の胆汁中排泄を選択的に阻害し、尿中排泄へシフトさせることで腸管への薬物の暴露を軽減するアプローチを検討した。

BSP (20 mg) を CPT-11 と併用した結果、SN-

38-Glu の胆汁からの排泄は有意に阻害され、180 分までの総排泄量は約 40% まで抑制されることが示された (Fig. 4)。これに対し SN-38 の胆汁中排泄は減少する傾向が認められたが、その差は小さいものであった。

また血中動態においても 15, 30, 60, 120 分での SN-38-Glu 血中濃度は、BSP による胆汁排泄阻害に基づくと考えられる有意な上昇が観測された。一方、SN-38 については有意差は観測されなかった (Fig. 5)。BSP によって SN-38-Glu の血中濃度は上昇するものの、この化合物の毒性は低く水溶性も高

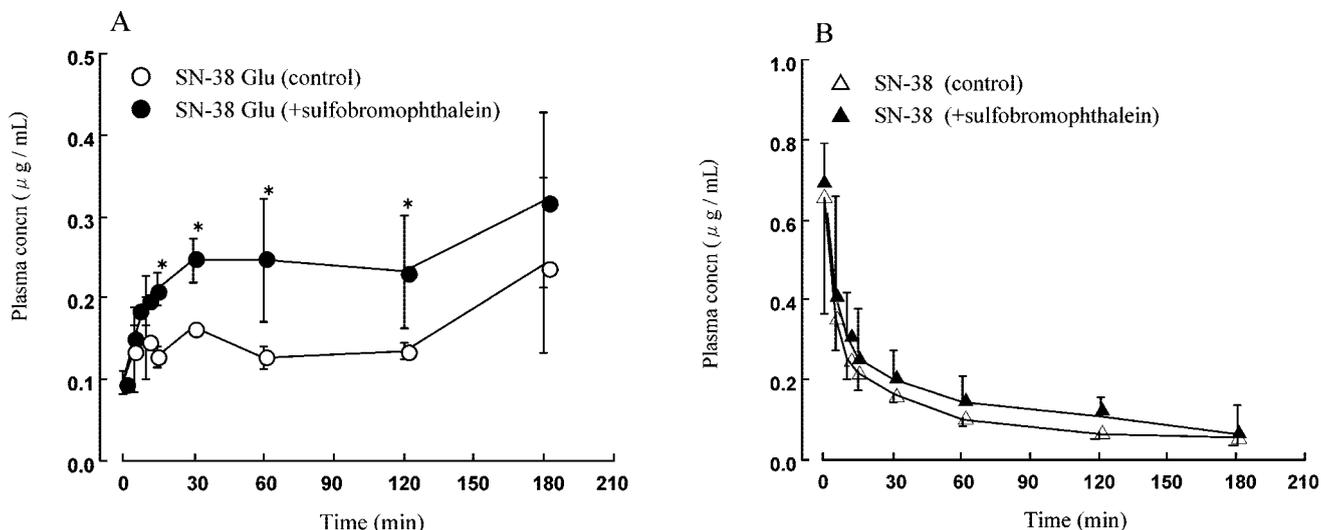


Fig. 5. Effect of Sulfobromophthalein on the Plasma Concentration of SN-38-Glu (A) and SN-38 (B) after CPT-11 Administration. CPT-11 (500  $\mu\text{g}/\text{body}$ ) was injected through the femoral vein in the presence or absence of sulphobromophthalein (20 mg/body). Each point represents the mean with S.D. of 4 determinations. \* $p < 0.05$  compared with absence of sulfobromophthalein.

いことから、抱合体である限り他の臓器への毒性はSN-38に比べ問題にならないほど低いと考えられる。またSN-38の動態の変化はほとんどみられず、SN-38血中レベル維持のための投与量調整は最小限で済むものと考えられた。

BSPをCPT-11と同時投与したときのSN-38-Glu及びSN-38のCL bileの減少をFig. 6に示した。SN-38のCL bile (Fig. 6(B))はわずかな減少であったのに対しSN-38-GluのCL bileは有意に低下した。

**2-3. 考察** CPT-11とその代謝物は主に胆汁中に排泄されることが報告されている。<sup>11)</sup> CPT-11は肝臓において活性代謝物SN-38に変換され、さらにグルクロン酸抱合を受け活性のないSN-38-Gluとなり胆汁中へ排泄される。このSN-38-Gluは腸内細菌によって脱抱合されSN-38となり下痢を引き起こすことが報告されている。<sup>5,12)</sup> 本章では、SN-38-Gluの胆汁中排泄を抑制することによって腸管内でのSN-38出現を抑えることを目的にCPT-11及びその代謝物の胆汁排泄挙動をラクトン体とカルボキシル体に分けて解析した。

CPT-11のラクトン体を投与したあとのSN-38-Gluの胆汁中排泄量は、CPT-11やSN-38に比べ顕著に大きな値を示した。Mrp2はグルクロン酸抱合体や非抱合体の有機アニオンを認識し、CPT-11及びその代謝物のトランスポーターへの親和性につい

てはCPT-11やSN-38よりもSN-38-Gluが強く認識されることが報告されている。<sup>13-15)</sup> CPT-11とSN-38のカルボキシル体とラクトン体それぞれの胆汁中排泄量を測定した結果、CPT-11とSN-38はカルボキシル体として主に胆汁中に排泄された。これらの結果はCPT-11とSN-38の多くはラクトン環の水酸化もしくは10位の水酸化によるグルクロナイド化によって、どちらもアニオン体として肝側膜を通して排泄されることを示している。

CPT-11とSN-38のカルボキシル体の抗腫瘍活性はラクトン体より弱いことが報告され、<sup>16)</sup> 薬物動態学的、薬力学的研究の多くはラクトン体の投与のみ行われている。<sup>17-19)</sup> 本研究ではカルボキシル体の動態についても検討した。CPT-11ラクトン体の開環の影響を減らすために、CPT-11カルボキシル体を投与し、ラクトン体の開環の影響をなくした形で検討した。CPT-11のカルボキシル体を投与することによって、CPT-11の胆汁中排泄量はSN-38-GluやSN-38に比べ著しく増大した。CPT-11とSN-38のカルボキシル体はラクトン体に比べMrp2の親和性がより高いことが報告されている。<sup>13,14)</sup> したがって、今回の結果は、CPT-11カルボキシル体を投与したとき、ラクトン体へ変換されるよりも速くMrp2に認識され胆汁中へと排泄されたものと思われる。一方、CPT-11のカルボキシル体を投与した場合のSN-38-Gluの胆汁排泄は、CPT-11のラク

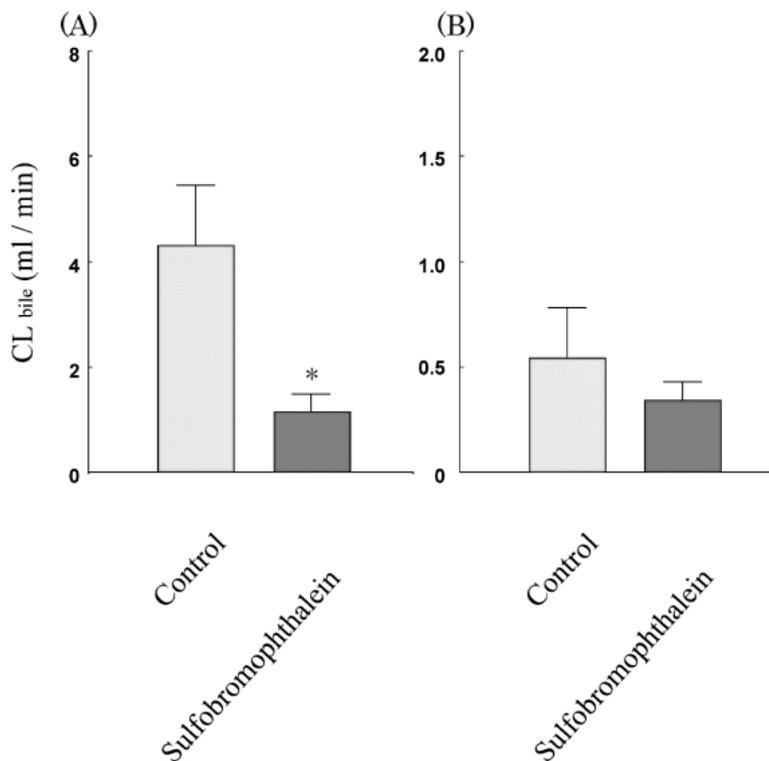


Fig. 6. Biliary Excretion Clearance of SN-38-Glu (A) and SN-38 (B) after CPT-11 Administration

CPT-11 (500  $\mu\text{g}/\text{body}$ ) was injected through the femoral vein in the presence or absence of sulfobromophthalein (20 mg/body). The CL bile values were calculated from the values shown in Figs. 4 and 5. Each value represents the mean with S.D. of 4 determinations. \* $p < 0.05$  compared with absence of sulfobromophthalein.

トン体投与時と比較し有意に低下した。このことはSN-38からSN-38-GluへのUGP1A1による抱合が、SN-38とCPT-11カルボキシル体の迅速な排泄によって低下したものと考えられた。

BSPによるCPT-11投与後のSN-38とSN-38-Gluの動態を検討した。その結果、BSPはSN-38-Gluの胆汁排泄を有意に阻害した。BSPによるSN-38-Gluの胆汁排泄阻害によってSN-38-Gluの血中レベルは上昇した。この阻害によってSN-38-GluのAUCは増大しCL bileは低下した。しかし、BSPによってSN-38のAUCとCL bileは変化しなかった。これら結果よりBSPはSN-38-Gluが胆汁排泄によって腸管腔へ排泄される系を部分的に抑えることが示唆された。BSPはCPT-11と同時に投与されることにより、抗腫瘍効果を低下させることなく、SN-38-Gluの胆汁排泄とそれによって引き起こされるSN-38による腸組織の障害を抑えることが考えられる。CPT-11の投与に半夏瀉心湯とネオマイシンを同時投与することで $\beta$ -グルクロニダーゼを抑えCPT-11による遅発性の下痢を抑制することが報告されている。<sup>5,6)</sup> これらの方法は既に臨床応

用されているが、BSPの併用と組み合わせることで、腸管に対する障害抑制効果をさらに高めることが期待される。

### 3. ラット小腸におけるSN-38の透過及びCaco-2細胞への取り込み

消化管へのSN-38暴露は、消化管上皮細胞に障害を引き起こし、これにより高度の水分・電解質喪失を伴う重篤な下痢に至る場合もある。

この消化管上皮細胞への暴露を防ぐために先に述べた方法が実施されているが、これらの処置でも下痢発症を回避できなかった症例もあったことで、SN-38の消化管内挙動、再吸収過程の更なる詳細なメカニズムの解明が必要となっている。そこで本章では、消化管内での腸内細菌によるSN-38への再変換以外の可能性を探る目的で、ラット小腸組織切片及びCaco-2細胞を用いて消化管上皮細胞へのSN-38の到達経路について検討した。

**3-1. 方法** Caco-2は、passage 45-58のものを用いた。培養は、温度37°C、5%CO<sub>2</sub>存在下インキュベーター内で行い、5日毎に継代培養を行った。継代は、0.25%トリプシン-0.02%EDTA/CMF

-PBS で細胞を分散後、新しいフラスコに播種して行った。

Culture medium には、10% FBS (56°C で1時間非働化)、0.1 mM NEAA, 2 mM L-glutamine 及び 100 IU/ml penicillin-100 µg/ml streptomycin を加えた DMEM (Sigma Chemical Co.) を使用した。

Caco-2 は、6 well 及び transwell に cell density  $6 \times 10^5/\text{cm}^2$  で播種した。取り込み実験には、4-7 日間単層培養し、100% コンフルエントに達した 6 well を使用した。

細胞のタンパク濃度は、BSA を標準タンパクとし、Lowry 法に準拠して定量した。<sup>20)</sup> Wistar 系雄性ラットをエーテル麻酔後、速やかに開腹し小腸を摘出した。摘出した小腸は氷冷した生理食塩水で洗浄し、同じく氷冷した HBSS で置換したのちに、胃に近い部分(空腸部)と結腸に近い部分(回腸部)からそれぞれ 3 cm ほどずつ切り取った。切り取った小腸切片は速やかに開き、内容物を除去後洗浄し、拡散チャンバーに貼り付けた。なお、実験中は 37°C 条件下 95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub> 混合ガスを通気し行った。吸収方向の透過をみる場合は漿膜側に、排出方向の透過をみる場合は粘膜側に同じく 37°C で温めておいた HBSS を 5 ml 入れ、続いて HBSS とは反対側に薬液を 5 ml 入れて、SN-38 の透過実験を開始した。サンプリングは HBSS 側から 200 µl ずつ、実験開始直後、15 分後、そして 30 分後からは 30 分毎に 120 分まで行った。

ATP 枯渇実験は、10 mM NaF : 10 mM NaN<sub>3</sub> = 1 : 1 となるように HBSS で調整し、透過実験開始前に両側に 5 ml ずつ加えて 20 分を行った。このときのサンプリングは、枯渇時間を考慮に入れ、90 分までとした。HBSS 及び薬液は pH 7.4 に調整し、薬液中の SN-38 濃度は 25 µM (5% DMSO/HBSS) とした。

見かけの透過量は次の式により求めた。

$$P_{app} = dQ/dt \cdot 1/(A \cdot C_0)$$

Q : 透過量, C<sub>0</sub> : 基質濃度 (25 µM), A : 膜面積 (1.78 cm<sup>2</sup>)

細胞を 37°C で加温しておいた HBSS で洗浄後、HBSS 1 ml を各ウェルに加え 37°C 下で 15 分プレインキュベーションし、HBSS を除去してから同じく 37°C で加温しておいた薬液 1 ml を加え、37°C 下で 10 分取り込ませた。

取り込み実験終了時に、ice cold HBSS で 2 回洗浄した後、1N NaOH 0.5 ml を各ウェルに加え 30 分以上細胞を溶解させたのちに 1N HCl 0.5 ml を加え中和させた。細胞溶解液を採取し激しくピペティング後、10000 rpm, 10 分で遠心し、上清の 50 µl を蛋白定量に、同じく 100 µl を HPLC 用のサンプルとした。また、ATP 枯渇実験は、10 mM NaF : 10 mM NaN<sub>3</sub> = 1 : 1 となるように HBSS で調整し、プレインキュベーション時に各ウェルに 1 ml ずつ加えて行った。阻害実験では、薬液中に阻害剤となる薬物を設定濃度になるように共存させて、取り込み実験と同様の手順で行った。

**3-2. 結果** 回腸における漿膜側から粘膜側 (serosal-to-mucosal: S-to-M) への SN-38 の透過は、粘膜側から漿膜側 (mucosal-to-serosal: M-to-S) と比較して有意に大きかった。一方、空腸においてはほとんど差がなかった (Fig. 7)。

そこで、回腸における分泌指向性の透過について詳細に検討した。メディウム pH を種々変化させたところ、SN-38 の分泌 (S-to-M) は全く影響を受けなかった。しかしながら、ATP 枯渇処理によってその透過は大きく低下した (Table 2)。

これらのことから、SN-38 は回腸においてのみ分泌指向性であること、さらにプロトンはその駆動力にはならないものの ATP 依存的であることが示唆された。

SN-38 分泌に係わるトランスポーターを明らかにするために、各種トランスポーターの基質及び阻害剤による影響について検討した。その結果、Bcrp の基質であるミトキサントロン (mitoxantrone),<sup>21)</sup> あるいは PAH (p-aminohippuric acid)<sup>22)</sup> 及びプロベネシド (probenecid),<sup>23)</sup> P 糖蛋白 (P-glycoprotein: P-gp/abcb1) の基質であるベラパミル (verapamil)<sup>24)</sup> は SN-38 の分泌に対してほとんど影響を与えなかった。一方、BSP は回腸における SN-38 の分泌を有意に阻害した (Table 3)。

ATP 依存性の能動輸送に係わるトランスポーター、すなわち ABC トランスポーターファミリーの中で、これまでに SN-38 や SN-38-Glu, その親化合物である CPT-11 を認識することが明らかになっているのは、P-gp, Mrp1, Mrp2 及び Bcrp である。<sup>25)</sup> また、P-gp は空腸部よりも回腸部に、逆に Mrp2 は回腸部よりも空腸部に多く分布してい

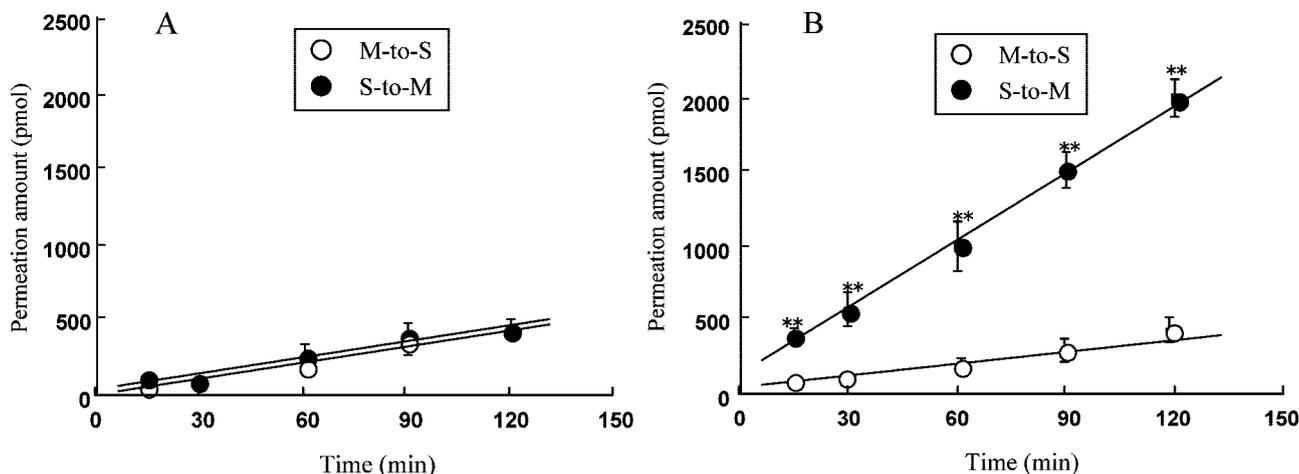


Fig. 7. Site Specificity of the Permeability of SN-38 in Rats

Permeation of SN-38 ( $25 \mu\text{M}$ ) across the jejunum (A) and ileum (B) was evaluated by the using chamber method. The experimental solution was adjusted to pH 7.4, and the temperature was maintained at  $37^\circ\text{C}$ . Each point represents the mean with S.D. of 4 determinations. \*\* $p < 0.01$ , significantly different from mucosal-to-serosal transport.

Table 2. Transport Characteristics of the Secretion of SN-38 in Rat Ileal Tissue

Extracellular pH (mucosal/serosal)	Inhibitors	Papp S-to-M $\times 10^6$ (cm/s)
8.5/7.4	None	$5.86 \pm 0.52$
7.4/7.4	None	$5.62 \pm 0.49$
6.0/7.4	None	$5.71 \pm 0.36$
7.4/7.4	NaF/NaN <sub>3</sub> (10 mM)	$2.97 \pm 0.72^{**}$

“S-to-M” refers to the serosal-to-mucosal direction. Permeation of SN-38 ( $25 \mu\text{M}$ ) was measured at  $37^\circ\text{C}$  for 120 min. Each value is the mean with S.D. of 3 to 4 determinations. \*\* $p < 0.01$ , significantly different from that in the absence of inhibitors.

Table 3. Effects of Various Compounds on the Secretion of SN-38 in Rat Ileal Tissue

Compound	Concentration	Relative uptake (% of control)
Control		100
Mitoxantrone	1 mM	$93.1 \pm 6.23$
BSP	0.2 mM	$53.6 \pm 2.93^{**}$
PAH	1 mM	$100 \pm 4.36$
Probenecid	1 mM	$114 \pm 13.7$
Verapamil	1 mM	$96.3 \pm 8.17$

“S-to-M” refers to the serosal-to-mucosal direction. Permeation of SN-38 ( $25 \mu\text{M}$ ) was measured at  $37^\circ\text{C}$  for 120 min. Each value is the mean with S.D. of 3 to 4 determinations. \*\* $p < 0.01$ , significantly different from that in the control.

る.<sup>26,27)</sup> また、Bcrp においては、ヒト空腸部で Mrp2 とほぼ同程度分布している。<sup>28)</sup> したがって、今回明らかとなった回腸部における SN-38 の能動

的な分泌には、この3種のトランスポーターが複合的に関与しているものと考えられる。すなわち、血液中から回腸管腔側に SN-38 が分泌されることにより、上皮細胞を直接的に暴露し下痢症状を引き起こしたと考えられる。このことは、腸内細菌の殺菌などを行うことによっても、CPT-11 投与時に生じる副作用である下痢を完全には回避できない原因の1つと推察される。

小腸組織切片を用いた SN-38 の透過実験の結果から、回腸部の排出方向の透過に関して興味ある結果が得られた。この回腸部での SN-38 の排出には、P-gp や Mrp2, Bcrp などの ABC トランスポーターが関与しているものと示唆された。そこでこの排出のメカニズムをより詳細に解明するために、より簡便な小腸透過モデルとして apical 側に P-gp 及び Mrp2 の発現が確認されている Caco-2 を用い検討を行った。その結果、Caco-2 における SN-38 の取り込みは 15 分まで直線的に増加し、かつ温度依存性を示した (Fig. 8)。

次に、Caco-2 における SN-38 の取り込みの濃度依存性を検討した結果、その取り込みは  $25 \mu\text{M}$  までの濃度範囲内において飽和現象は認められなかった。

臨床現場では、バイカリン (baicalin) を含む漢方薬が SN-38 を原因とする下痢に対して抑制効果を発揮することが報告されている。<sup>5)</sup> このバイカリンは、グルクロン酸抱合体で、SN-38-Glu から SN-38 への腸内細菌による再変換を抑制してその効

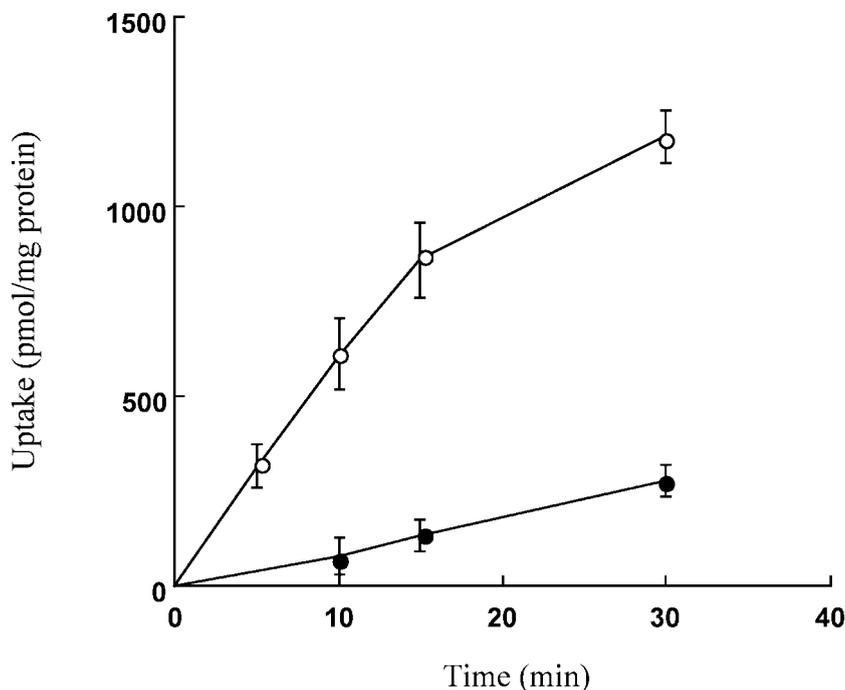


Fig. 8. Uptake of SN-38 by Caco-2 Cells

Cells were incubated for the indicated periods at 37°C (open circles) or 4°C (closed circles) with SN-38 (25  $\mu$ M). Each value is the mean with S.D. of 3 determination.

果を発揮していると考えられている。<sup>29,30)</sup>

しかし、SN-38が消化管内に直接排出された場合には、この効果だけでは下痢を抑制することは期待できない。ところが、臨床報告では良好な成績を示しており、バイカリンの下痢抑制作用はSN-38自体の消化管挙動に対しても何らかの影響が及んでいるためと推察される。そこで、次にSN-38の取り込みに対するバイカリンの影響を検討した。

その結果、バイカリン 1 mM 共存時にはその取り込みは約 60% まで減少し、バイカリンはSN-38の取り込みに対して濃度依存的に阻害することが示された (Fig. 9)。

種々の取り込みトランスポーターの基質/阻害剤の影響を確認した。BSPはSN-38の取り込みに対して、濃度依存的かつ強い阻害効果を示した。一方、有機アニオン性化合物に対して特異的な影響を及ぼすプロベネシド (probenecid),<sup>23)</sup> organic anion transporting polypeptide (OATP) の阻害剤であるプラバスタチン (pravastatin),<sup>31)</sup> Mrp2 の阻害剤になることが報告されているグレパフロキサシン (grepafloxacin)<sup>32)</sup> はSN-38の取り込みに対してほとんど影響を与えなかった (Table 4)。

**3.3. 考察** CPT-11の消化器毒性は胆汁中よ

り排泄されたSN-38-Gluが脱抱合され、SN-38となり消化管組織を障害することによる。<sup>5,33)</sup> 一方、消化管内に排出されたSN-38の一部は胆汁による経路以外に小腸粘膜からの排出があり、シクロスポリンAがその排出を抑えるとの報告がある。<sup>18,34)</sup> この小腸からのSN-38の排出を抑えることで消化管毒性を軽減できる可能性が考えられる。そこで、小腸におけるSN-38の分泌について検討した。その結果、回腸において漿膜側から粘膜側へのSN-38の透過は、粘膜側から漿膜側と比較して有意に大きな値を示し、小腸下部に分泌に係わるトランスポーターが存在する可能性が示唆された。次にSN-38の分泌機構とその輸送エネルギーについて検討した。その結果、SN-38の小腸分泌はATP依存的でありpH非依存的であることが示された。これらの結果はプロトンやヒドロキシルイオンがSN-38輸送のエネルギーとはならないことを示唆するものである。

Bcrpは*in vitro*において肺癌細胞のSN-38輸送に関与することが報告されている。<sup>21)</sup> また、Bcrpは小腸及び結腸のapical側に発現していることが報告されている。<sup>35)</sup> しかし、SN-38の小腸分泌にBcrpが関与するかは明らかにされていない。そこ

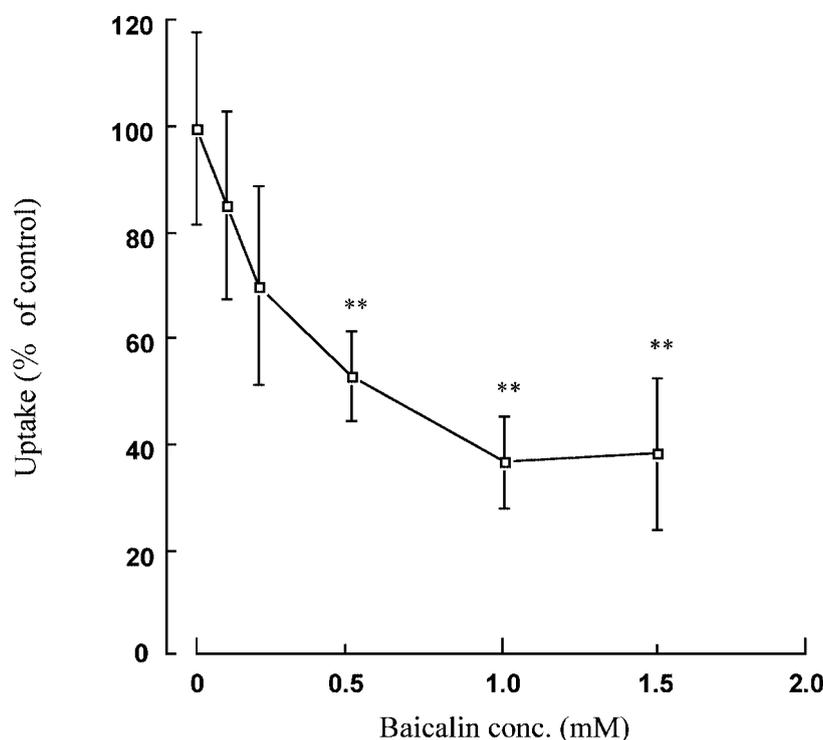


Fig. 9. Inhibitory Effects of Baicalin on the Uptake of SN-38 by Caco-2 Cells

The uptake of SN-38 (25  $\mu$ M) by Caco-2 cells was determined in the presence or absence of baicalin at designed concentrations. Each value is expressed as a percentage of the uptake in the absence of baicalin. Each value is the mean with S.D. of 3 to 4 determinations. \*\* $p < 0.01$ , significantly different from that in the absence of baicalin.

Table 4. Effects of Various Compounds on the Uptake of SN-38 by Caco-2 Cells

Compound	Concentration	Relative uptake (% of control)
Control		100 $\pm$ 18.9
BSP	0.05 mM	95.6 $\pm$ 6.70
BSP	0.2 mM	40.2 $\pm$ 9.95**
BSP	1 mM	34.1 $\pm$ 7.26**
Probenecid	1 mM	86.8 $\pm$ 13.2
Pravastatin	1 mM	89.9 $\pm$ 31.4
Grepafloxacin	1 mM	98.1 $\pm$ 28.4

Cells were incubated with SN-38 (25  $\mu$ M) for 10 min at 37°C in the presence or absence of inhibitors. Each value is the mean with S.D. of 3 to 5 determinations. \*\*  $p < 0.01$ , significantly different from control.

で、Bcrp の阻害剤であるミトキサントロンを用いて SN-38 の排出を検討したが、阻害効果は認められなかった。このときのミトキサントロンの濃度は 1 mM であり、SN-38 の Bcrp に対する  $K_m$  値<sup>21)</sup> よりはるかに高い濃度であったことから、SN-38 の小腸分泌に Bcrp が関与する可能性は低いことが示唆された。PAH トランスポーターと P-gp は代謝エネルギー依存的トランスポーターであり回腸に発現

していることが報告されている。<sup>22,24)</sup> これらトランスポーターの阻害剤は SN-38 の排出に影響を与えなかった。これらの結果より SN-38 の排出に PAH トランスポーターや P-gp も関与しないことが明らかとなった。一方、BSP は SN-38 の排出を有意に抑制したことから SN-38 の分泌の主な経路として、Bcrp や P-gp、PAH トランスポーターとは別の輸送系の関与が考えられた。

Caco-2 細胞の取り込みの結果においても、SN-38 の取り込みが 4°C で有意に低下したことからトランスポーターを介した輸送系の存在が示唆された。次に Caco-2 細胞への SN-38 の取り込みに対してバイカリンの影響を検討した結果、バイカリンは濃度依存的に SN-38 の取り込みを抑制した。このことよりバイカリンが  $\beta$ -グルクロニダーゼ活性を抑制するばかりではなく、SN-38 の小腸からの吸収をも抑える可能性が示唆された。半夏瀉心湯の臨床効果はこの両方によるものであると考えられる。CPT-11 と同時にプロベネシドを投与することで、CPT-11 によって引き起こされる遅発性下痢を減らすという報告<sup>36)</sup>がある。これには SN-38 吸収阻害が関与し

ている可能性があることから、プロベネシドによる SN-38 の取り込みを Caco-2 細胞を用い検討した。しかしながら、プロベネシドの影響は観察されなかった。一方、BSP は SN-38 の取り込みを抑制したことから、BSP は SN-38-Glu の腸管内腔への分泌を抑制するばかりではなく、SN-38 の小腸吸収をも抑える可能性が示唆された。その他のアニオン輸送系として MCTs が報告されている。<sup>37,38)</sup> そこで、MCTs の関与を確認すべく、MCT の阻害剤である プラバスタチン<sup>31)</sup> を用いて SN-38 の取り込みを検討したが、SN-38 の取り込みに影響はなかった。上述したプロベネシドもまた MCT の阻害剤であったこと<sup>23)</sup> を合わせて考えると、これらの結果は SN-38 の吸収に MCT が寄与していないことを示唆するものである。また、ヒト小腸において OATPs が発現していることが報告されている。<sup>31,38)</sup> また、OATP-B (SLC21A9) がアニオン化合物をヒト小腸上皮細胞の apical 側の膜を透過させるとの報告もある。<sup>39)</sup> しかし、プラバスタチンが SN-38 の取り込みに影響しなかったことから、OATP-B の関与も否定される。

#### 4. まとめ

ガン薬物治療を適切に実施する場合、化学療法薬の動態学的な変動も考慮しながら投与設計をしていくことが重要となる。

一般に、抗ガン薬治療は、骨髄抑制等の重篤な副作用と背中合わせの状態で使用されるため、この骨髄抑制が用量規定因子となる。イリノテカン (CPT-11) は骨髄抑制が少ないという利点を有し、肺癌治療の第一選択薬として認知されてきたが、一方では薬物療法の中止を余儀なくされる程の遅延性の激しい下痢を訴える症例が報告されている。CPT-11 はプロドラックであり主に肝ミクロソームのカルボキシエステラーゼによって活性代謝物 SN-38 に変換され抗腫瘍効果を発揮するが、この SN-38 消失経路が下痢発症と大きく係わっていると考えられる。

CPT-11 及びその代謝物の胆汁排泄挙動をさらに明らかにするため、ラットを用い詳細に検討した。その結果、通常 CPT-11 はラクトン体として投与され、この場合、多くは SN-38-Glu として胆管から小腸管腔内に排泄されることが確認された。これに対し、CPT-11 のカルボキシル体を投与したときは

CPT-11 カルボキシル体がそのまま速やかに排泄され、Mrp2 などの有機アニオン輸送体の関与が示唆された。以上のことより、CPT-11 及び SN-38 のラクトン体割合は体内動態、特にその排泄速度を大きく左右することが示唆された。

BSP を CPT-11 と併用した結果、SN-38-Glu の胆汁からの排泄は有意に阻害され、総排泄量は約 40% にまで抑制されたが、SN-38 の胆汁中排泄は減少する傾向に留まった。また、15 分から 120 分までの SN-38-Glu の血中動態は、BSP の併用により有意に上昇した。これに対し、SN-38 の血中動態はほとんど変化しなかった。以上の結果より、SN-38 の胆汁排出経路を抑制し尿中排出経路により体外へと排出させる方法の 1 つとして、BSP の併用は、従来広く用いられている半夏瀉心湯による  $\beta$ -グルクロニダーゼ阻害による消化管内 SN-38 の生成抑制<sup>5)</sup> をより効果的にすると考えられる。

小腸における SN-38 の腸管への分泌あるいは管腔内の SN-38 の上皮細胞への吸収について、小腸切片及び Caco-2 細胞を用いて検討した。その結果、SN-38 は回腸部で、ATP 依存的な消化管腔への分泌機構が存在することを明らかにした。この回腸部における SN-38 の能動的な分泌には、トランスポーターが関与しているものと考えられる。このことは、腸内細菌の殺菌などを行うことによっても、CPT-11 投与時に生じる副作用である下痢を完全には回避できないことを意味している。すなわち、血液中から回腸管腔側に SN-38 が分泌されることにより、上皮細胞を直接的に暴露し下痢症状を引き起こすことがあると考えられる。

臨床現場で繁用される半夏瀉心湯に含まれるバイカリンによる SN-38 の取り込みに対する影響を Caco-2 細胞を用い検討した。その結果、バイカリンは SN-38 の取り込みに対して濃度依存的に阻害することが示された。さらに、BSP も SN-38 の取り込みに対して、濃度依存的かつ強い阻害効果を示した。Mrp2 の基質である BSP は、SN-38 胆汁排泄を抑制するばかりではなく、回腸においても、SN-38 の透過をバイカリンと同等の抑制効果を示した。以上の結果より、BSP は CPT-11 の下痢対策の 1 つとして腸内アルカリ化や半夏瀉心湯と併用することで、その相乗効果が期待される。

今後の研究を始めとする薬物動態学的な基礎的治

験を積み上げ、ガン化学療法による副作用を適切に回避することで、患者の QOL を飛躍的に改善し治療全体を最適化することが期待される。

**謝辞** 本研究は北海道大学大学院薬学研究科臨床薬剤学分野との共同研究であり、実験を行うに当たりご指導賜りました井関 健教授に感謝申し上げます。

## REFERENCES

- 1) Sugiyama Y., Kato Y., Chu X., *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **42**, S44-S49 (1998).
- 2) Chu X., Kato Y., Sugiyama Y., *Drug Metab. Dispos.*, **27**, 440-441 (1999).
- 3) Drengler R. L., Kuhn J. G., Schaaf L. J., Rodriguez G. I., Villalona-Calero M. A., Hammond L. A., Stephenson J. A., Hodges S., Kraynak M. A., Staton B. A., Elfring G. L., Locker P. K., Miller L. L., von Hoff D. D., Rothenberg M. L., *J. Clin. Oncol.*, **17**, 685-696 (1999).
- 4) Sadzuka Y., Hirotsu S., Hirota S., *Cancer Lett.*, **127**, 99-106 (1998).
- 5) Takasuna K., Hagiwara T., Hirohashi M., Kato M., Nomura M., Nagai E., Yokoi T., Kamataki T., *Cancer Res.*, **56**, 3752-3757 (1996).
- 6) Kehrer D. F. S., Sparreboom A., Verweij J., de Bruijn P., Nierop C. A., van de Schraaf J., Ruijgrok E. J., de Jonge J. A., *Clin. Cancer Res.*, **7**, 1136-1141 (2001).
- 7) Takeda Y., Kobayashi K., Akiyama Y., Soma T., Honda S., Kudoh S., Kudo K., *Int. J. Cancer*, **92**, 269-275 (2001).
- 8) Kaneda N., Yookura T., *Cancer Res.*, **50**, 1721-1725 (1990).
- 9) Lecureur V., Courtois A., Payen L., Verhnet L., Guillouzo A., Fardel O., *Toxicology*, **153**, 203-219 (2000).
- 10) Yamamoto W., Verweij J., de Bruijn P., de Jonge M. J., Takano H., Nishiyama M., Kurihara M., Sparreboom A., *Anticancer Drugs*, **12**, 419-432 (2001).
- 11) Lokiec F., Canal P., Gay C., Chatelut E., Armand J. P., Roche H., Bigat R., Goncalves E., Mathieu-Boue A., *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **36**, 79-82 (1995).
- 12) Iyer L., King C. D., Whittington P. F., Green M. D., Roy S. K., Tephly T. R., Coffman B. L., Ratain M. J., *J. Clin. Invest.*, **101**, 847-854 (1998).
- 13) Chu X. Y., Kato Y., Sugiyama Y., *Cancer Res.*, **57**, 1934-1938 (1997).
- 14) Chu X. Y., Kato Y., Ueda K., Suzuki H., Niinuma K., Tyson C. A., Weizer V., Dabbs J. E., Froehlich R., Green C. E., Sugiyama Y., *Cancer Res.*, **58**, 5137-5143 (1998).
- 15) Leier I., Eisenbeiss J. H., Cui Y., Keppler D., *Kidney Int.*, **57**, 1636-1643 (2000).
- 16) Wani M. C., Ronman P. E., Lindley J. T., Wall M. E., *J. Med. Chem.*, **23**, 554-560 (1980).
- 17) Rivory L. P., Chatelut E., Canal P., Mathieu-Boue A., Robert J., *Cancer Res.*, **54**, 6330-6333 (1994).
- 18) Arimori K., Kuroki N., Kumamoto A., Tanoue N., Nakano M., Kumazawa E., Tohgo A., Kikuchi M., *Pharm. Res.*, **18**, 814-822 (2001).
- 19) Rowinsky E. K., Grochow L. B., Ettinger D. S., Satorius S. E., Lubejko B. G., Chen T. L., Rock M. K., Conehower R. C., *Cancer Res.*, **54**, 427-436 (1994).
- 20) Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J., *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951).
- 21) Nakatomi K., Yoshikawa M., Oka M., Ikegami Y., Hayasaka S., Sano K., Shiozawa K., Kawabata S., Soda H., Ishikawa T., Tanabe S., Kohno S., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **288**, 827-832 (2001).
- 22) Naruhashi K., Tamai I., Sai Y., Suzuki N., Tsuji A., *J. Pharm. Pharmacol.*, **53**, 73-81 (2001).
- 23) Enerson B. E., Drewes L. R., *J. Pharm. Sci.*, **92**, 1531-1544 (2003).
- 24) Fricke G., Drewe J., Huwyler J., Gutmann H., Beglinger C., *Br. J. Pharmacol.*, **118**, 1841-1847 (1996).
- 25) Yamamoto W., Verweij J., de Bruijn P., de Jonge M. J., Takano H., Nishiyama M., Kurihara M., Sparreboom A., *Anticancer Drugs*, **12**, 419-432 (2001).
- 26) Stephens R. H., O'Neill C. A., Warhurst A., Carlson G. L., Rowland M., Warhurst G., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **296**, 584-591 (2001).

- 27) Gotoh Y., Suzuki H., Kinoshita S., Hirohashi T., Kato Y., Sugiyama Y., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **292**, 433–439 (2000).
- 28) Taipalensuu J., Tornblom H., Lindberg G., Einarsson C., Sjoqvist F., Melhus H., Garberg P., Sjostrom B., Lundgren B., Artursson P., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **299**, 164–170 (2001).
- 29) Narita M., Nagai E., Hagiwara H., Aburada M., Yokoi T., Kamataki T., *Xenobiotica*, **23**, 5–10 (1993).
- 30) Takasuna K., Kasai Y., Kitano Y., Mori K., Kobayashi R., Hagiwara T., Kakihata K., Hirohashi M., Nomura M., Nagai E., Kamataki T., *Jpn. J. Cancer Res.*, **86**, 978–984 (1995).
- 31) Tamai I., Takanaga H., Maeda H., Sai Y., Ogihara T., Higashida H., Tsuji A., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **214**, 482–489 (1995).
- 32) Yamaguchi H., Yano I., Saito H., Inui K., *Eur. J. Pharmacol.*, **431**, 297–303 (2001).
- 33) Atsumi R., Suzuki W., Hakusui H., *Xenobiotica*, **21**, 1159–1169 (1991).
- 34) Arimori K., Kuroki N., Hidaka M., Iwakiri T., Yamasaki K., Okumura M., Ono H., Takamura N., Kikuchi M., Nakano M., *Pharm. Res.*, **20**, 910–917 (2003).
- 35) Maliepaard M., Scheffer G. L., Faneyte I. F., van Gastelen M. A., Pijnenborg A. C., Schinkel A. H., van De Vijver M. J., Scheper R. J., Schellens J. H., *Cancer Res.*, **61**, 3458–3464 (2001).
- 36) Horikawa M., Kato Y., Sugiyama Y., *Pharm. Res.*, **19**, 1345–1353 (2002).
- 37) Katsura T., Inui K. I., *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **18**, 1–15 (2003).
- 38) Tsuji A., *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **17**, 253–274 (2002).
- 39) Kobayashi D., Nozawa T., Imai K., Nezu J., Tsuji A., Tamai I., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **306**, 703–708 (2003).