

免疫抑制薬の胆汁分泌に及ぼす影響

水田 耕 一

免疫抑制薬の胆汁分泌に及ぼす影響

水田 耕一

背景

胆汁酸は、肝細胞内でコレステロールより生成され、胆汁を経て腸管内に排泄される。その大部分（約 95%）は回腸末端を中心とした腸管より再吸収され、門脈を経て、ふたたび肝細胞に取り込まれる。このようにして、胆汁酸は半閉鎖的な循環（enterohepatic circulation）を繰り返している。

シクロスポリンやタクロリムスなどの免疫抑制薬は、近年の実質臓器移植において広く使用され、特に肝移植治療において基盤となっている薬剤である。しかし、これらの薬剤は、前述した胆汁酸の動態（合成、代謝、排泄、吸収）に大きく影響していることが知られはじめた^{1)~12)}。これまでシクロスポリンについては、*in vitro*で肝細胞の胆汁酸摂取を抑制することや^{1)~3)} 細胆管への胆汁酸輸送を抑制する作用^{4)~5)}が報告されている。また、*in vitro*でのこれらの作用についての報告は *ex vivo* や、短期間の胆汁ドレナージを用いた *in situ* の実験に限られているが、頰洞側における胆汁酸の取り込み抑制作用があること⁶⁾⁷⁾、ならびに細胆管への胆汁酸排泄の低下による胆汁うっ滞作用を有すること^{8)~12)}が報告されている。また、タクロリムスの胆汁酸動態に及ぼす影響については、シクロスポリンに比べて情報が限られており¹³⁾¹⁴⁾、今だ十分明らかでないのが現状である。これら免疫抑制薬の反復投与下において新生胆汁酸の動態がどのように変化するかを示す *in vivo* のデータが求められているが、こうした報告はこれまでにない。その主な理由は、実験動物から胆汁を長期間誘導し、観察することが容易ではないためであり、腸肝循環の影響を除いた状態での新生胆汁の変化を直接みることができなかつたことに起因している。免疫抑制薬投与下における胆汁分泌の変化を基礎的に検討することは、胆汁を用いた診断、例えば、拒絶反応、感染症、さらに薬剤性肝障害などの鑑別診断に利用できる可能性もある¹⁵⁾¹⁶⁾。

本研究の目的は、シクロスポリンやタクロリムスの反復投与が *in vivo* における胆汁の生成、分泌に及ぼす影響をより明確にすることにある。そこで著者は、1) ラット持続胆汁ドレナージモデルにおける生理食塩水経口投与の重要性を確認し、本モデルを用いて、2) シクロスポリンおよびタクロリムスの反復投与下で、合成、排泄された新生胆汁を解析し、胆汁流量や胆汁内成分の変化を検討した。さらに、3) 肝内での胆汁酸構成成分の変化を測定することで、これらの薬剤が胆汁酸の合成と排泄に与える影響を明らかにしたので、ここにまとめ報告する。

1. ラット持続胆汁ドレナージモデルにおける生理食塩水経口投与の重要性

対象および方法

ラット：体重 350-450g の成熟雄性 Wistar ラット（日本 SLC より購入）を 12 時間サイクル（7:00 light on, 19:00 light off）の明暗コントロールされている状態で飼育した。

実験計画：ラットを無作為に 1. 蒸留水投与群、2. 生理食塩水投与群に分け、全てのラットに持続胆汁ドレナージ術を施行し、蒸留水投与群の動物には、術後に蒸留水を投与し、生理食塩水群の動物には生理食塩水を与え管理した。各ラットにおける術後の体重、経口飲水量、および胆汁量の変化を測定し、胆汁ドレナージ 3 日目に血液を採取し解析した。

手術手技：ラットを、エーテル（関東化学より購入）麻酔下で開腹し、総胆管周囲を剥離した。肝管合流部より 1 cm 下方で総胆管を結紮し、ポリエチレンカテーテル（PE50, Becton Dickinson より購入）を結紮部直上より 5 mm 挿入した。カテーテルを固定後、総胆管を切離し、カテーテルの自由端は開腹創から皮下を通し、背部正中の肩甲骨部より外へ誘導した。ドレナージしたカテーテルは、ラットの嘔みつきから保護するため、金属のスプリングの中を通し、接続部にシーベルを使用してカテーテルのねじれを予防した（図 1）。閉腹後、ラットを飼育ケージで非抑制下に管理し（図 2）、ドレナージ胆汁は自動分別回収装置（LKB より購入）にて、持続的に採取した。

血液分析：血清電解質（Na, K, Cl）、血清尿素窒素（BUN）、クレアチニン（Cr）は自動分析装置（日立製作所）にて測定した。

統計分析：統計分析は、分散分析（one way ANOVA）あるいは、Student's *t* テストで行った。各群の生存率（Kaplan-Meier 法）の解析には log-rank test を用いた。p 値が 0.05 以下を有意差ありとみなした。

結果

蒸留水投与群のラットは、術直後より経口水分量が少なく、著明な体重減少を呈して（表 1）、全例が術後 8 日以内に死亡した（図 3）。一方、蒸留水投与群では、経口量減少や体重減少はみられず（表 1）、全例が 14 日以上生存した（図 3）。蒸留水と生理食塩水投与における胆汁流出量をみてみると、蒸留水投与群では、平

均胆汁流量が次第に減少していくのに対し、生理食塩水投与群では良好に保たれていた(表1)。さらに、生理食塩水投与群ラットの排泄胆汁は、過去の報告でみられるように¹⁷⁾⁻¹⁹⁾、夜間(活動期)に増加して、昼間(非活動期)に減少する日内変動を認めた(図4)。両群におけるドレーナージ3日目の血液生化学検査をみると、蒸留水投与群は、術後、低ナトリウム、低クロール血症とともに急性腎不全の所見(BUN: 196 ± 60.4 mg/dl, Cr: 1.8 ± 1.20 mg/dl)を呈し、著明な高カリウム血症(8.0 ± 1.76 mEq/l)を認めた。一方、生理食塩水投与群では、これらの値は全て正常範囲内であった(表2)。

考察

実験動物からのドレーナージ胆汁を採取する場合は、麻酔下または実験動物の活動を拘束した状態で採取する方法が取られてきた。しかし、これらの方法では、正常に近い状態で、長期間、新生する胆汁を観察することは不可能である。麻酔薬の中にはバルビツール酸系のように胆酸代謝や胆汁流量に影響を与えるものもあるため²⁰⁾²¹⁾、本研究を始めるにあたって、非麻酔下、非拘束下で、胆汁を長期に採取可能な実験モデルの確立が必要であった。ラット持続胆汁ドレーナージモデルの手法は、1970年代より報告をみる¹⁷⁾²²⁾²³⁾。著者は、これらの報告²²⁾²³⁾をもとにして、総胆管より持続的に胆汁をドレーナージするラット外胆汁瘻モデルを作成した。しかし、これらのラットは、通常の管理では著明な体重減少を呈し死亡していくことが判明した。その理由は、ラットはヒトと異なり、胆汁ドレーナージに伴う体液や電解質の喪失を補うことができないためである。そこで、著者は術後に生理食塩水を与えることにより、それらの喪失を補い、本実験でその重要性を確認した。

本実験結果より、永久胆汁瘻を持つラットは、蒸留水による管理では良好な胆汁流量を維持することができず、血清電解質バランスの不均衡による急性腎不全で死亡することがわかった。また、経口水を蒸留水から生理食塩水に変更するだけでそれらを防ぐことが可能であり、さらに誘導胆汁が日内変動を呈すことは永久胆汁瘻ラットの生存に欠かせない重要な意義を持つことが判明した。ラット持続胆汁ドレーナージモデルに生理食塩水を使用することは過去極めて限られた情報として報告されていた²²⁾²⁴⁾⁻²⁵⁾。しかも、その重要性はその後強調されていなかった。本実験によって、ラット持続胆汁ドレーナージモデルにおける生理食塩水経口投与の重要性が確認できた²⁷⁾。

2. シクロスポリン及びタクロリムスの胆汁分泌に及ぼす影響

対象および方法

ラット:体重 300-350g の成熟雄性 Wistar ラットを 12 時間サイクル(7:00 light on, 19:00 light off) の明暗コントロールされている状態で飼育した。

薬剤:シクロスポリン(サンディミュン;ノバルティスファーマー社より購入)は、オリーブ油(関東化学より購入)に溶解し(1ml/kg)筋肉内注射を行った。対照群には同量のオリーブ油(1ml/kg)を使用した。実験動物用のタクロリムス(筋注用)とその賦形剤は、藤沢製薬より供与を受けた。タクロリムスは生理食塩水に溶解し(0.4ml/kg)筋肉内注射した。タクロリムスの対照群には、賦形剤のみを生食で溶解(0.4ml/kg)して投与した。

実験計画:シクロスポリンの実験ではラットを無作為に 4 群に分けた。

1. シクロスポリン 2.5 mg/kg/day,
2. シクロスポリン 10 mg/kg/day,
3. シクロスポリン 25 mg/kg/day,
4. 対照薬(オリーブ油)。

またタクロリムスの実験ではラットを無作為に以下の 4 群に振り分けた。

1. タクロリムス 0.4 mg/kg/day,
2. タクロリムス 1.0 mg/kg/day,
3. タクロリムス 4.0 mg/kg/day,
4. 対照薬(賦形剤)。

実験手技:シクロスポリン実験群の動物には、シクロスポリンを 2.5、10、25 mg/kg/day あるいはオリーブ油の一日一回の筋注を 10 日間行った。また、タクロリムス実験群の動物には、タクロリムスを 0.4、1.0、4.0 mg/kg/day あるいは賦形剤を同様に 10 日間筋注した。投与 7 日目に、全てのラットに前述の方法による胆汁ドレナージ術を施行した。ドレナージした胆汁は自動分別回収装置にて 4~6 時間おきに 3 日間持続して採取した。ラット胆汁ドレナージモデルにおいては、腸管循環している胆汁はドレナージ後 12~18 時間で排泄されることが報告されており²⁸⁾、著者も本モデルを用いた予備実験において、新生胆汁による日内リズムが回復し、安定した胆汁量が得られるには、ドレナージ後 24~36 時間を要することを確認したため、新生胆汁の分析は胆汁ドレナージ 3 日目(投与 10 日目)のものを使用した。また、この間薬剤は前述どおりに投与し観察を行った。これらの動物は最終薬剤投与後 24 時間目に血液を採取し犠牲死させた。

胆汁分析:採取したドレナージ 3 日目の新生胆汁は、用量を測定後、総胆汁酸濃度は、3 α -hydroxysteroid dehydrogenase 法²⁹⁾で、コレステロール、リン脂質

の濃度は酵素法^{30,31)}で測定した。

胆汁中胆汁酸分画分析：胆汁中胆汁酸分画は、HPLC 法³²⁾で測定した。方法を要約すると、10 μ l の胆汁に 99.5% エタノール 2 ml を加え混和し、30 分室温放置後、遠心分離 (1600 g 10 分) し、上清 0.1 ml に内標準溶液 (タウロ-23-ノルデオキシコール酸のメタノール溶液; 80 μ mol/l) 0.1 ml を加えエバポレーターにより蒸発乾燥後、移動相 B 液 [20mM (NH₄)₂HPO₄ · MeCN · MeOH 混液; 2: 1: 2 / v: v: v] に溶解、この 10 μ l を HPLC で分析した。HPLC 装置は JASCO Triotar-VI (蛍光検出器 JASCO FP-210; λ ex 340 nm, λ em 460 nm)、分離カラムは Inertsil ODS-2 (4.6 mm I.D. × 15 cm)、酵素カラムはセクスイ E-3 α -HSD 固定化酵素カラム (4.0 mm I.D. × 2 cm) を用いた。グラジエント条件は、試料注入後 60 分間は A 液 [200mM (NH₄)₂HPO₄ · MeCN · MeOH 混液; 73: 19: 8 / v: v: v] 100% で送液し、次の 70 分間で A 液 100% から B 液 100% にリニアグラジエントを行った後、その後 20 分間は B 液 100% で送液した。流量は移動相、反応液 (0.3 mM β -NAD, 1 mM EDTA · 2Na, 0.05% 2-メルカプトメタノールを含む 10 mM リン酸緩衝液) とともに 1.0 ml/min で行った。

血液分析：血清胆汁酸の測定には、3 α -hydroxysteroid dehydrogenase 法²⁹⁾を用いた。血清コレステロールとリン脂質は酵素法^{33,34)}にて測定した。血清 Alanine aminotransferase (ALT)、Aspartate aminotransferase (AST) は、自動 UV 法で測定した³⁵⁾。血漿タクロリムス濃度は、酵素免疫法 (EIA) で測定した³⁶⁾。全血中のシクロスポリン濃度は、蛍光偏光免疫法 (FPIA) キット (ダイナボット社より購入) を用いて測定した。

統計分析：新生胆汁流量 (ml/hr)、新生胆汁酸排泄率 (mmol/hr)、コレステロール、リン脂質の胆汁内排泄率 (mmol/hr) は、ラットの体重で補正して表した。統計分析は、分散分析 (one way ANOVA) あるいは、Student's *t* テストで行い、*p* 値が 0.05 以下を有意差ありとみなした。胆汁流量と新生胆汁酸排泄速度との関係は回帰直線で分析した。回帰直線の Y 切片と傾きは、それぞれ、胆汁酸非依存性胆汁流量 (bile acid-independent flow; BAIF)、胆汁酸依存性胆汁流量 (bile acid-dependent flow; BADF) とみなした^{37,38)}。

結果

1) シクロスポリン群およびタクロリムス群における血清生化学検査と血中濃度 (表3)

全てのシクロスポリン投与群と対照群の間で、血清 AST、ALT、胆汁酸、コレステロール、リン脂質の値に有意な差は認めなかった。タクロリムスの投与においても、これらの値に対照群との有意な差はみられなかった。また、シクロスポリンおよびタクロリムスの血中濃度は投与量依存性に増加していた。

2) 新生胆汁流量、胆汁酸排泄率、およびコレステロール、リン脂質の胆汁内排泄率 (表4)

シクロスポリン投与群の新生胆汁流量と胆汁酸排泄率は、対照群に比し用量依存性に有意な減少を示した。一方、タクロリムス群では、新生胆汁酸排泄率は、対照群に比べ増加傾向を示したが、胆汁流量では対照群と同等な値であった (表4)。コレステロール、リン脂質の胆汁内排泄率をみると、シクロスポリン群では、用量依存性にコレステロール、リン脂質の胆汁内排泄が抑制され、特にシクロスポリン 25 mg/kg 群では、対照群に比し有意に減少した (抑制率: コレステロール 53%、リン脂質 66%)。これに対し、タクロリムス群では、対照群との間に有意な差はみられなかった (表4)。

3) 胆汁中胆汁酸分画の変化 (図5、6)

採取した胆汁の胆汁酸構成成分は、コール酸 (CA)、および ケノデオキシコール酸 (CDCA) などの肝内で合成される一次胆汁酸で占められており、腸管循環の間に腸内細菌による脱水酸化を受けて生じる二次胆汁酸 (デオキシコール酸; DCA、およびリトコール酸; LCA) は検出されなかった。薬剤の影響を胆汁酸分画別にみても、シクロスポリン投与群では、CA の排泄速度は高用量の群 (25 mg/kg) で低下傾向にあったが、他の群では対照群と同様な値であった (図5左)。これに対し、CDCA の排泄速度は、シクロスポリンの投与によって用量依存性に有意に減少した。特にシクロスポリン 10 mg/kg、25 mg/kg 投与群では、対照群に比べ、それぞれ 58%、88% の抑制率であった (図5右)。一方、タクロリムス群では、CA の排泄速度は対照群に比し、いずれの量においても増加傾向を認めた (統計学的には有意差なし) (図6左)。CDCA の排泄速度は、タクロリムス 0.4 mg/kg 投与群で対照群より増加傾向を示したが、その他のタクロリムス群では有意な差は認めなかった (図6右)。

4) 新生胆汁流量と胆汁酸排泄速度の関係 (図7, 8)

各薬剤群およびそれらの対照群より測定した新生胆汁流量と胆汁酸排泄速度との関係を図7, 8に示す。各群間において、新生胆汁流量と胆汁酸排泄速度の間には正の相関関係を認めた。これらの回帰直線から算出した胆汁酸非依存性胆汁流量 (BAIF) すなわち Y 切片と、胆汁酸依存性胆汁流量 (BADF) すなわち回帰直線の傾きを比較してみると、シクロスポリン群では、BAIF、BADF ともに対照群に比べ減少していた (それぞれ 17%、18%の減少率) (図7)。一方、タクロリムス群では、BAIF は対照群に比し低下したが (41%)、BADF は逆に増加していた (38%) (図8)。

考察

1980年代に導入されたシクロスポリンは、移植成績を飛躍的に向上させ、現在、臓器移植に広く用いられている免疫抑制薬である。しかし、その副作用には、腎毒性や高血圧、中枢神経障害などの他に、長期服用患者における胆石形成や、高脂血症など胆汁うっ滞に基づく合併症もある³⁹⁾⁻⁴¹⁾。これまで、シクロスポリンの胆汁分泌に及ぼす影響については、以下のメカニズムが提唱されている：(1) 類洞側肝細胞膜での胆汁酸の取り込みが障害される¹⁾⁻³⁾⁻⁶⁾⁻⁷⁾、(2) 毛細胆管膜での ATP 依存性の胆汁酸排泄が障害される⁴⁾⁻⁶⁾⁻¹¹⁾、(3) コレステロールから胆汁酸への代謝あるいは胆汁酸の抱合が障害される¹²⁾、(4) 腸管から胆汁酸の再吸収が障害される⁴³⁾。これらの研究はいずれも *in vitro* または短期間の *in situ* の実験で行われている。しかし直接的に、新生される胆汁酸の動態に免疫抑制薬がどのような影響を与えるかは、いまだに明らかにされていない。我々は前述したラット持続胆汁ドレナージモデルを確立し、シクロスポリンおよびタクロリムスが新生胆汁における胆汁成分にどのような影響を及ぼすかを研究した。

胆汁はその生成部位により、毛細胆管胆汁と遠位胆管胆汁とに分けられている。さらに毛細胆管胆汁はその生成機序の差から、胆汁酸非依存性胆汁 (BAIF) と胆汁酸依存性胆汁 (BADF) とに分けて考えられてきた⁴³⁾⁻⁴⁵⁾。BADF は、胆汁流量と胆汁酸排泄速度からなる回帰直線の傾きで表され、胆汁酸自身の持つ利尿効果であり、胆汁流量を作りだす主な要因と考えられている³⁷⁾⁻³⁸⁾。一方、BAIF は、胆汁酸排泄の排泄がないと仮定した時に生み出される胆汁流量のことで、先の回帰直線の Y 切片から算出される³⁷⁾⁻³⁸⁾。BAIF の主な構成要因としては、 HCO_3^- やグルタチ

オンなどの有機アニオンの排泄に伴う利胆効果と考えられている⁴⁵⁾⁴⁷⁾。

本実験において、シクロスポリンは胆汁酸排泄、および胆汁酸非依存性胆汁流量 (BAIF) と胆汁酸依存性胆汁流量 (BADF) をともに減少させ、胆汁うっ滞作用を示した。一方、タクロリムスは BAIF は減少させたが、BADF は逆に増加させ、シクロスポリンにみられたような胆汁うっ滞効果は認めなかった。

これまでのラットでのシクロスポリンの胆汁流量に関する研究の多くは、本実験と同じように BADF と BAIF を共に減少させると報告されている³⁰⁾¹¹⁾⁴⁸⁾。しかし、胆汁酸排泄抑制効果は認めても BADF はほとんど変化しなかったとの報告もあり¹⁰⁾²⁸⁾、ラットの種類や投与方法によって異なっている。本実験ではラットの治療量とされている 10 mg/kg⁴⁹⁾⁵⁰⁾の筋注を中心にその前後の用量で評価したが、報告されている血中濃度 (Lewis rats 10 mg/kg i.m. 投与 4 日目; 1000~1500 ng/ml) より極めて高い値 (Wistar rats 10 mg/kg i.m. 投与 10 日目; 2707 ng/ml) を示した⁵¹⁾。これは、筋肉内投与の生体内利用率の高さや蓄積性⁵¹⁾、または種族によるシクロスポリンの代謝の違いなどに起因していることが考えられる。本実験で観察されたシクロスポリンの実験結果は、臨床での状況においては、高濃度のシクロスポリンによる毒性の可能性も考慮すべきである。

一方、タクロリムスの胆汁流量や胆汁排泄に関する報告は少なく、胆汁うっ滞や肝の排泄能への作用は十分わかっていない⁹⁾¹³⁾¹⁴⁾。近年、Kadman らは⁹⁾、*in vitro* において、タクロリムスは、シクロスポリンに比し ATP 依存性の胆汁排泄を抑制する効果が少ないことを示した。また、Reese らは¹³⁾、イヌにおいて、経口投与のタクロリムスでは変化しないが、静脈投与でのタクロリムスは胆汁流量を用量依存性に増加させると報告している。最近、Sanchez-Campos らは¹⁴⁾、タクロリムスの腹腔内投与を長期行ったラットでは胆汁流量が減少し、その作用はグルタチオンの排泄阻害に伴う BAIF の減少に起因することを報告している。本実験では、タクロリムスによる BAIF の減少を認めたが、Sanchez-Campos らの報告とは異なり、胆汁うっ滞作用はみられなかった。これは、タクロリムス投与の急性期では、タクロリムスが BADF をむしろ増加させていたことに関係しているためと考えられる。

シクロスポリンやタクロリムスが胆汁中の胆汁酸分画に変化を与えることは、いくつかの臨床報告がなされている⁵²⁾⁵³⁾。本実験結果では、シクロスポリンは胆汁酸の排泄を、特に CDCA のそれを用量依存性に減少させている。一方、タクロリ

ムスは、胆汁酸排泄を増加させ、それは主に CA 成分の増加に伴うものであった。McCashland らは⁵⁰⁾、臨床の肝移植後にシクロスポリンまたはタクロリムスの投与を受けている患者において、胆汁流量の減少と胆汁酸排泄障害はともに認められるが、シクロスポリンで管理されている患者にだけ胆汁中の CDCA の減少がみられたと報告している。また、Sauer らは⁵¹⁾、タクロリムス治療中の肝移植患者において、CDCA の胆汁排泄率は健常人と変化はないが、CA の胆汁への排泄率は有意に増加したことを示しており、著者の実験結果と一致している。

近年、シクロスポリンがコレステロール 26 ハイドロキシシレースを選択的に阻害することで、コレステロールから CDCA の生成を特異的に阻害することが *in vitro* にて報告されている⁵⁶⁾⁻⁵⁸⁾。ラット持続胆汁排泄モデルを用いた著者の実験結果は、シクロスポリンが CDCA 合成を著明に抑制することを *in vivo* モデルで初めて明らかにした意義がある⁵⁹⁾。

タクロリムスが胆汁酸 (特に CA) 合成を増加させるメカニズムは明らかでないが、Ericzon らは⁵⁴⁾⁵⁵⁾、臨床の肝移植後タクロリムス投与中の患者は移植肝の胆汁合成能の回復が早く、それはタクロリムスの持つ肝栄養効果 (hepatotrophic effect) によると推測している。タクロリムスの hepatotrophic effect は、*in vitro* や *in vivo* の実験でも証明されている⁶⁰⁾⁶¹⁾。本実験では、循環している胆汁酸プールが消失した持続胆汁ドレナージ下においては、タクロリムスが胆汁酸合成を、特に CA 成分の合成を亢進させる作用を持つことが明らかとなった⁶²⁾。このことはタクロリムスの持つ hepatotrophic effect に起因している可能性も考えられた。

シクロスポリンの胆汁への脂質排泄に及ぼす影響は、基礎¹²⁾²⁸⁾⁴⁸⁾⁶³⁾⁶⁴⁾、ならびに臨床⁵⁵⁾⁶⁵⁾⁶⁶⁾での報告がある。一方、タクロリムスのそれに関する情報は、現在の所、臨床での報告のみに限られている⁵³⁾⁵⁵⁾。著者のラットモデルでの検討では、検討した投与量でのシクロスポリンは、血中の脂質レベルには影響を与えなかったものの、胆汁へのコレステロールとリン脂質の胆汁への排泄を用量依存性に抑制した。しかし、検討したタクロリムスの投与量において、このような脂質の排泄抑制作用は示さなかった。

これまでのシクロスポリンの胆汁中への脂質排泄に関する他の報告では、コレステロールとリン脂質の排泄を胆汁酸の排泄とともに抑制する報告⁴⁸⁾の他に、コレステロールのみの排泄を阻害する報告¹²⁾や、逆にリン脂質の排泄のみを抑制する報告²⁸⁾⁶³⁾⁶⁷⁾があり、モデルにより一致をみていない。著者の実験結果では、シクロ

スポリンは、胆汁酸と同様に、コレステロール、リン脂質の排泄をともに抑制し、特に高濃度ではリン脂質の排泄を大きく障害させていた。脂質が胆汁内へ排泄されるメカニズムの一つとしては、脂質が胆汁酸の排泄に誘導されることが知られている⁶⁸⁾⁻⁷⁰⁾。したがって、本実験でのシクロスポリンによる胆汁内の脂質排泄の抑制は、胆汁酸排泄の減少に伴う二次性的変化である可能性が考えられた。一方、シクロスポリンはより直接的に脂質の胆汁排泄を抑制している可能性もある。近年、Takeguchiらは⁷¹⁾、シクロスポリンが薬剤排泄ポンプの一つであるP糖蛋白を用量依存性に抑制し、その効果はタクロリムスより極めて強力であることを報告している。P糖蛋白は、生体外異物を選別輸送する能動的なトランスポータとして、毛細胆管壁に存在し、リン脂質の胆汁排泄に大きく関与していると考えられている⁷²⁾⁷³⁾。本実験において、シクロスポリン群のみが脂質排泄を抑制し、特に高濃度では、コレステロールよりもリン脂質の方が大きく障害されたのは、シクロスポリンのP糖蛋白阻害作用が関与しているとも考えられる。

3. シクロスポリン及びタクロリムスによる肝内における胆汁酸合成の変化

前実験の結果で、シクロスポリンやタクロリムスが肝細胞内での胆汁酸合成に影響を及ぼすことが明らかとなった。これまで、産生産物としての胆汁を解析してきたが、肝内での胆汁酸成分の変化をみることで、薬剤の影響をより直接的に検討することができる。そこで本実験では、これらの薬剤が胆汁酸の合成と排泄に与える影響を明確にするために、薬剤反復投与下での持続胆汁ドレナージラットにおいて、肝内の胆汁酸構成成分を測定し、その変化を検討した。

対象および方法

実験手技：前実験と同様に、シクロスポリン群のラットにはシクロスポリンを 2.5 (n=4)、25 mg/kg/day (n=4) あるいはオリーブ油 (n=4) を、またタクロリムス実験群の動物には、タクロリムスを 0.4 (n=4)、4.0 mg/kg/day (n=4) またはタクロリムス賦形剤 (n=4) を一日一回 10 日間筋肉内投与した。投与 7 日目より持続胆汁ドレナージを行い、ドレナージ 3 日目の新生胆汁における各胆汁酸の排泄率を測定し、実験終了時に肝を摘出し肝内の各胆汁酸濃度を測定した。

胆汁中胆汁酸分画分析：採取した胆汁中の胆汁酸濃度は前実験と同様の HPLC 法³²⁾にて測定した。測定した胆汁酸はラット胆汁中に検出される 8 種類の遊離型胆汁酸（コール酸；CA、ケノデオキシコール酸；CDCA、デオキシコール酸；DCA、リトコール酸；LCA、ウルソデオキシコール酸；UDCA、 α -ムリコール酸； α -MCA、 β -ムリコール酸； β -MCA、ヒオデオキシコール酸；HDCA）と、それらのタウリン（T）、グリシン（G）抱合型の計 24 種類を分析した。

肝組織中胆汁酸分画分析：肝内の胆汁酸は、近年確立された HPLC 法⁷⁰⁾を用いて測定した。肝臓の前処置は、細断した肝臓 100 mg を内標準溶液（タウロ-23-ノルデオキシコール酸のメタノール溶液；80 μ mol/l）0.1ml と 0.2 M NaOH 1ml を加え、80°C の水浴に 30 分維持した後、水 3 ml を加え室温に戻し、ヘキサン 3 ml と 10 分間振盪後、遠心分離（1600 g 15 分）しヘキサンを除去した。この操作を 2 回繰り返す、Bond Elut C18 カートリッジカラムで胆汁酸を吸着させ、メタノールで溶出させた後、エバポレーターによる蒸発乾固を行った。さらに、移動相 B 液 [20mM (NH₄)₂HPO₄・MeCN・MeOH 混液；2: 1: 2 (v: v: v)] で溶解させ、この液を遠心分離（1600 g 15 分）し、上清 10 μ l を HPLC で分析した。HPLC 装

置は LC-10A (蛍光検出器 LC RF-550: λ_{ex} 340 nm, λ_{em} 460 nm)、分離カラムは SDR ODS-II (4.6 mm I.D. \times 15 cm)、酵素カラムはセキスイ E-3 α -HSD 固定化酵素カラム (4.0 mm I.D. \times 2 cm) を用いた。グラジエント条件は、試料注入後 60 分間は A 液 [10mM $(NH_4)_2HPO_4 \cdot 3H_2O \cdot MeCN \cdot MeOH$ 混液: 44: 12: 5 / v: v: v] 100% で送液し、次の 40 分間で A 液 100% から B 液 100% にリニアグラジエントを行った後、その後 40 分間を B 液 100% で送液した。流量は移動相、反応液 (0.3 mM β -NAD, 1 mM EDTA \cdot 2Na, 0.05% 2-メルカプトメタノールを含む 10 mM リン酸緩衝液) とも 1.0 ml/min で行った。

統計分析: 新生胆汁酸排泄率 (nmol/ml) は、ラットの肝重量で補正して表した。統計分析は、分散分析 (one way ANOVA) あるいは、Student's *t* テストで行った。p 値が 0.05 以下を有意差ありとみなした。

結果

シクロスポリン対照群 (オリーブ油) の総胆汁酸排泄率は 12.3 ± 0.5 nmol/g/min であり、排泄された胆汁中の胆汁酸分画では、95% がタウリン抱合型であった。構成成分は CA (45%)、CDCA (24%)、 β -MCA (18%) および α -MCA (12%)、UDCA (2%) であり、DCA、LCA などの二次胆汁酸は検出されなかった。タクロリムス対照群 (賦形剤) の胆汁酸排泄率及び胆汁中胆汁酸分画もシクロスポリン対照群とほぼ同様な値であった。シクロスポリン対照群とタクロリムス対照群における肝内の総胆汁酸濃度は、それぞれ 106.0 ± 15.9 nmol/g、 86.5 ± 10.2 nmol/g であり、これらは、胆汁ドレナージを受けていない正常ラット肝内の総胆汁酸濃度 (372.4 ± 3.9 nmol/g) に比べて著明に減少していた。

1) シクロスポリンによる胆汁中、肝組織中胆汁酸分画の変化 (図 9)

シクロスポリン投与による胆汁中、肝組織中の胆汁酸分画の変化を図 9 に示す。総胆汁酸排泄率は、シクロスポリンの投与によって用量依存性に減少した。CA、MCA (α -MCA + β -MCA)、UDCA の排泄は対照群に比べて有意な差は認めなかったが、CDCA はシクロスポリンの用量依存性に排泄が抑制された (図 9 左)。これに対し、肝内の総胆汁酸濃度は対照群に比べて著明に増加した。肝組織中の胆汁酸分画では、CA、MCA の濃度が上昇したが、CDCA は肝内でも用量依存性に低下していた (図 9 右)。

2) タクロリムス投与による胆汁中、肝組織中胆汁酸分画の変化 (図 10)

タクロリムス群の胆汁酸排泄率は、対照群のそれとほぼ同様な値であり、シクロスポリン投与時に観察された胆汁酸排泄の減少は認められなかった。胆汁中の胆汁酸分画では、対照群に比べ、CAの排泄が有意に増加していた(図10左)。一方、肝内の総胆汁酸濃度は、低用量のタクロリムス投与群では、対照群のそれと同様な値であったが、高用量のタクロリムス投与群では、他の2群に比し著明に増加していた。肝内の胆汁酸分画ではタクロリムス投与により、CA成分が用量依存性に増加していた(図10右)。

考察

ラットでは、 α -MCAや β -MCAなどヒトには存在しない胆汁酸が認められる。これは、ヒトとラットでの胆汁酸合成や代謝の違いによると考えられている^{70,77}。ラット肝では、CDCAは6 β 位の水酸化により、 α -MCAに代謝され、さらに7 α 水酸基の7 β への転位により、 β -MCAと代謝される⁷⁰(図11)。また、 α -MCAや β -MCAはCDCAよりも細胞毒性が弱いため、胆汁うっ滞時はCDCAからMCAへの代謝合成が増加することが知られている⁷⁸(図11)。これらMCAは、正常時でもラット総胆汁酸の約30%をしめる主要な成分であるため^{32,77}、ラットを用いて胆汁酸代謝を評価する場合、 α -MCAや β -MCAを測定し、CDCA合成系に含めて考慮することが必要である。

1) シクロスポリンの胆汁酸動態に及ぼす影響(図12左)

シクロスポリンは、胆汁中の胆汁酸の排泄を用量依存性に減少させ、特に胆汁酸分画中ではCDCAの減少が著明であった。一方、肝内の胆汁酸濃度はシクロスポリンによって逆に有意に上昇していた。すなわち、シクロスポリンは胆汁酸の排泄障害により肝内うっ滞を誘導すると考えられた。胆汁中のCDCA分画が用量依存性に減少した理由としては、シクロスポリンの投与により胆汁酸うっ滞となったラット肝において、自己防御的にCDCAからMCAへの代謝が亢進したことが考えられた。また、高用量のシクロスポリンでは低用量のシクロスポリンに比べ、肝内のCDCA合成系(CDCA+MCA)が減少しており、シクロスポリンの胆汁中CDCA分画の減少には、シクロスポリンのコレステロールからCDCAへの合成阻害作用も関与していることが考えられた⁷⁹。

2) タクロリムスの胆汁酸動態に及ぼす影響(図12右)

タクロリムス投与によっては胆汁への総胆汁酸排泄率はシクロスポリン投与時

のような減少傾向は認めなかった。胆汁中の胆汁酸分画では、CAの排泄率が対照群に比し有意な増加を示しており、肝でのCA濃度もタクロリムスの用量依存性に増加していた。コレステロールからの胆汁酸合成が亢進する状態においては、CDCAに比べCAの合成が有意に増加することが知られている⁸⁰⁾⁸¹⁾。本実験のタクロリムス群にみられた胆汁内、肝内でのCA成分の増加は、循環している胆汁酸プールが消失した状態の持続胆汁ドレナージラットにおいて、タクロリムスが胆汁酸合成を亢進させる作用を有しているためと考えられた。これまでの臨床例で、タクロリムスの方が、シクロスポリンに比べ高コレステロール血症が出現しにくいとする報告⁴¹⁾⁸²⁾⁻⁸⁴⁾や、シクロスポリンからタクロリムスへの変更によりコレステロール値が有意に減少したとする報告⁸⁵⁾⁸⁶⁾があるが、タクロリムスの持つ胆汁酸合成亢進作用(コレステロール代謝の亢進作用)が関係している可能性がある。しかし、高用量のタクロリムスでは、胆汁酸排泄率に比べ肝内の胆汁酸濃度は著明に増加しており、投与量によっては、胆汁酸の排泄を相対的に抑制する作用を有するものと考えられた。

まとめ

ラット持続胆汁ドレナージモデルを用いて、シクロスポリンやタクロリムスが胆汁流量や脂質分泌に与える影響、新生胆汁酸の合成や排泄に及ぼす影響を検討し以下の結果を得た。

1. シクロスポリンは胆汁酸依存性胆汁、胆汁酸非依存性胆汁を減少させ、著明な胆汁うっ滞作用を示した。一方、タクロリムスは、胆汁酸非依存性胆汁を減少させたが、胆汁酸依存性胆汁は増加させた。
2. シクロスポリンは、胆汁中への胆汁酸排泄を抑制し、特に CDCA を有意に減少させた。肝内での胆汁酸濃度は増加しており、胆汁酸の排泄抑制が胆汁うっ滞の主な原因と考えられた。また、高用量では、胆汁酸 (CDCA) 合成阻害作用が胆汁流量の減少に関与しているものと考えられた。一方、タクロリムスは、胆汁中への胆汁酸排泄を促進させ、特に CA 成分を増加させた。肝内では CA 合成が増加しており、タクロリムスは胆汁酸合成促進作用があるためと思われる。
3. シクロスポリンは、胆汁内へのコレステロール、リン脂質の排泄を抑制したが、タクロリムスには、その作用は認められなかった。またシクロスポリンがコレステロール代謝阻害作用 (胆汁酸合成阻害作用) を有したのに対し、タクロリムスには、コレステロール代謝促進作用 (胆汁酸合成促進作用) があり、シクロスポリンに比べ高コレステロール血症や高脂血症の出現が少ない理由と考えられた。

謝辞

本論文を書き終えるにあたり、研究の推進に終始適切な指導と助言を頂きました自治医科大学臨床薬理学教室助教授小林英司先生に深謝いたします。また、実験モデルの作成を指導下さった吉田剛先生、菱川修司先生にお礼申し上げます。

参考文献

1. Stacey NH, Kotecka B. Inhibition of taurocholate and ouabain transport in isolated rat hepatocytes by cyclosporin A. *Gastroenterology* 1988; 95: 780.
2. Ziegler K, Polzin G, Frimmer M. Hepatocellular uptake of cyclosporin A by simple diffusion. *Biochim Biophys Acta* 1988; 938: 44.
3. Azer SA, Stacey NH. Differential effects of cyclosporin A on transport of bile acids by rat hepatocytes: relationship to individual serum bile acid levels. *Toxicol Appl Pharm* 1994; 124: 302.
4. Kadman M, Klunemann C, Bohme M, et al. Inhibition by Cyclosporine A of adenosine triphosphate-dependent transport from the hepatocyte into bile. *Gastroenterology* 1993; 104: 1507.
5. Bohme M, Muller M, Leier I, Jedlitschky G, Keppler D. Cholestasis caused by inhibition of the adenosine triphosphate-dependent bile salt transport in rat liver. *Gastroenterology* 1994; 107: 255.
6. Roman ID, Coleman R. Disruption of canalicular function in isolated rat hepatocyte couplets caused by cyclosporin A. *Biochem pharmacol* 1994; 48: 2181.
7. Hagmann W, Parthe S, Kaiser I. Uptake, production and metabolism of cysteinyl leukotrienes in the isolated perfused rat liver. Inhibition of leukotriene uptake by cyclosporine. *Biochem J* 1989; 261: 611.
8. Rotolo FS, Branum GD, Bowers BA, Meyers WC. Effect of cyclosporine on bile secretion in rats. *Am J Surg* 1986; 151: 35.
9. Stone BG, Udani M, Sanghvi A, et al. Cyclosporin A-induced cholestasis. The mechanism in a rat model. *Gastroenterology* 1987; 93: 344.
10. Le Thai B, Dumont M, Michel A, Erlinger S, Houssin D. Cholestatic effect of cyclosporine in the rat. An inhibition of bile acid secretion. *Transplantation* 1988; 46: 510.
11. Roman ID, Monte MJ, Gonzalez BJ, Esteller A, Jimenez R. Inhibition of hepatocytary vesicular transport by cyclosporin A in the rat: relationship with cholestasis and hyperbilirubinemia. *Hepatology* 1990; 12: 83.
12. Chanussot F, Botta-Fridlund D, Lechene de la Porte P, et al. Effects of cyclosporine and corticosteroids on bile secretion in the rat. *Transplantation* 1992; 54: 226.

13. Reese JC, Fairchild RB, Solomon H, Warty V, Kaminski DL. The effect of FK506 on canine bile flow. *Transplantation* 1993; 56: 1162.
14. Sanchez-Campos S, Lopez-Acebo R, Gonzales P, Culebras JM, Tunun MJ, Gonzalez-Gallego J. Cholestasis and alterations of glutathione metabolism induced by tacrolimus (FK506) in the rat. *Transplantation* 1998; 66: 84.
15. Lang T, Sendl AF, Esquivel CO, Berquist WE, Cox KL. Cholic acid synthesis is reduced in pediatric liver recipients during graft dysfunction due to ischemic injury and allograft rejection. *Transplantation* 1997; 64: 1585.
16. Melendez H, Rela M, Murphy G, Heaton N. Liver transplantation and bile analysis. *Transplantation* 1998; 65: 1289.
17. Vonk RJ, van DA, Strubbe JH. Bile secretion and bile composition in the freely moving, unanaesthetized rat with a permanent biliary drainage: influence of food intake on bile flow. *Clin Sci Mol Med* 1978; 55: 253.
18. Ho KJ, Drummond JL. Circadian rhythm of biliary excretion and its control mechanism in rats with chronic biliary drainage. *Am J Physiol* 1975; 229: 1427.
19. Balabaud C, Noel M, Beraud C, Dangoumau J. Circadian rhythm of bile secretion in the rat. *Experientia* 1975; 31: 1299.
20. Cohen BI. Effects of phenobarbital upon bile acid synthesis in two strains of rats. *Lipids* 1975; 10: 168.
21. Okolicsanyi L, Lirussi F, Strazzabosco M, et al. The effect of drugs on bile flow and composition. An overview. *Drugs* 1986; 31: 430.
22. Enderlin FE, Honohan T. Long term bile collection in the rat. *Lab Anim Sci* 1977; 27: 490.
23. Kuipers F, Havinga R, Bosschieter H, Toorop GP, Hindriks FR, Vonk RJ. Enterohepatic circulation in the rat. *Gastroenterology* 1985; 88: 403.
24. Harrington FG, Greaves JD, Schmidt CLA. A bile fistula procedure in the rat. *Proc Soc Exp Biol Med* 1936; 34: 611.
25. Eriksson S. Biliary excretion of bile acids and cholesterol in bile fistula rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 1956; 94: 578.
26. Light HG, Witmer C, Vars HM. Interruption of the enterohepatic circulation and its effect on rat bile. *Am J Physiol* 1959; 197: 1330.
27. Mizuta K, Yoshida T, Hishikawa S, et al. Survival of rats undergoing continuous bile drainage depends upon maintenance of circadian rhythm of bile secretion. *Chronobiol Int* (in press)

28. Chan FK, Shaffer EA. Cholestatic effects of cyclosporine in the rat. *Transplantation* 1997; 63: 1574.
29. Mashige F, Imai K, Osuga T. A simple and sensitive assay of total serum bile acids. *Clin Chim Acta* 1976; 70: 79.
30. Lie RF, Schmitz JM, Pierre KJ, Gochman N. Cholesterol oxidase-based determination, by continuous-flow analysis, of total and free cholesterol in serum. *Clin Chem* 1976; 22: 1627.
31. Gurantz D, Laker MF, Hofmann AF. Enzymatic measurement of choline-containing phospholipids in bile. *J Lipid Res* 1981; 22: 373.
32. Sakakura H, Suzuki M, Kimura N, Takeda H, Nagata S, M. M. Simultaneous determination of bile acids in rat bile and serum by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 1993; 621: 123.
33. Richmond W. Use of cholesterol oxidase for assay of total and free cholesterol in serum by continuous-flow analysis. *Clin Chem* 1976; 22: 1579.
34. Takayama M, Itoh S, Nagasaki T, Tanimizu I. A new enzymatic method for determination of serum choline-containing phospholipids. *Clin Chim Acta* 1977; 79: 93.
35. Proia AD. Du Pont aca and Dow AST/ALT-UV (PLP activated)-centrifugal analyzer serum aspartate aminotransferase assays compare well [letter]. *Clin Chem* 1983; 29: 1701.
36. Tamura K, Kobayashi M, Hashimoto K, et al. A highly sensitive method to assay FK-506 levels in plasma. *Transplant Proc* 1987; 19: 23.
37. Erlinger S, Dhumeaux D, Berthelot P, Dumont M. Effect of inhibitors of sodium transport on bile formation in the rabbit. *Am J Physiol* 1970; 219: 416.
38. Wheeler HO. Secretion of bile acids by the liver and their role in the formation of hepatic bile. *Arch Intern Med* 1972; 130: 533.
39. Farouk M, Branum GD, Watters CR, et al. Bile compositional changes and cholesterol stone formation following orthotopic liver transplantation. *Transplantation* 1991; 52: 727.
40. Kasiske BL, Tortorice KL, Heim DK, Awni WM, Rao KV. The adverse impact of cyclosporine on serum lipids in renal transplant recipients. *Am J Kidney Dis* 1991; 17: 700.

41. Abouljoud MS, Levy MF, Klintmalm GB. Hyperlipidemia after liver transplantation: long-term results of the FK506/cyclosporine a US Multicenter trial. US Multicenter Study Group. *Transplant Proc* 1995; 27: 1121.
42. Sauer P, Kloters PP, Stiehl A. Inhibition of ileal bile acid transport by cyclosporin A in rat. *Eur J Clin Invest* 1995; 25: 677.
43. Erlinger S, Dhumeaux D. Mechanisms and control of secretion of bile water and electrolytes. *Gastroenterology* 1974; 66: 281.
44. Paumgartner G, Paumgartner D. Current concepts of bile formation. *Prog Liver Dis* 1982; 7: 207.
45. Blitzer BL, Boyer JL. Cellular mechanisms of bile formation. *Gastroenterology* 1982; 82: 346.
46. Hardison WG, Wood CA. Importance of bicarbonate in bile salt independent fraction of bile flow. *Am J Physiol* 1978; 235: E158.
47. Ballatori N, Truong AT. Glutathione as a primary osmotic driving force in hepatic bile formation. *Am J Physiol* 1992; 263: G617.
48. Galan AI, Fernandez E, Moran D, Munoz ME, Jimenez R. Cyclosporine A hepatotoxicity: effect of prolonged treatment with cyclosporine on biliary lipid secretion in the rat. *Clin Exp Pharmacol P* 1995; 22: 260.
49. Lee KK, Schraut WH. Structure and function of orthotopic small bowel allografts in rats treated with cyclosporine. *Am J Surg* 1986; 151: 55.
50. Strome M, Strome S, Darrell J, Wu J, Brodsky G. The effect of cyclosporin A on transplanted rat allografts. *Laryngoscope* 1993; 103: 394.
51. Wassef R, Cohen Z, Langer B. Pharmacokinetic profiles of cyclosporine in rats. Influence of route of administration and dosage. *Transplantation* 1985; 40: 489.
52. McCashland TM, Donovan JP, Amelsberg A, et al. Bile acid metabolism and biliary secretion in patients receiving orthotopic liver transplants: differing effects of cyclosporine and FK 506. *Hepatology* 1994; 19: 1381.
53. Sauer P, Stiehl A, Otto G, Theilmann L. In patients with orthotopic liver transplantation, serum markers of cholestasis are unreliable indicators of biliary secretion. *J Hepatol* 1995; 22: 561.
54. Soderdahl G, Groth CG, Angelin B, Duraj F, Einarsson K, Ericson BG. FK 506 improves recovery of bile secretion following orthotopic liver transplantation in man. *Transplant Proc* 1995; 27: 1125.

55. Ericzon BG, Eusufzai S, Soderdahl G, Duraj F, Einarsson K, Angelin B. Secretion and composition of bile after human liver transplantation: studies on the effects of cyclosporine and tacrolimus. *Transplantation* 1997; 63: 74.
56. Princen HM, Meijer P, Wolthers BG, Vonk RJ, Kuipers F. Cyclosporin A blocks bile acid synthesis in cultured hepatocytes by specific inhibition of chenodeoxycholic acid synthesis. *Biochem J* 1991; 275: 501.
57. Dahlback-Sjoberg H, Bjorkhem I, Princen HM. Selective inhibition of mitochondrial 27-hydroxylation of bile acid intermediates and 25-hydroxylation of vitamin D3 by cyclosporin A. *Biochem J* 1993; 293: 203.
58. Levy J, Budai K, Javitt NB. Bile acid synthesis in HepG2 cells: effect of cyclosporin. *J Lipid Res* 1994; 35: 1795.
59. Mizuta K, Kobayashi E, Uchida H, Fujimura A, Kawarasaki H, Hashizume K. Dose-dependent reduction of bile secretion in cyclosporine treated rats. *Transplantation* 1998; 65: 758.
60. Francavilla A, Starzl TE, Carr B, et al. The effects of FK 506, cyclosporine, and rapamycin on liver growth in vitro and in vivo. *Transplant Proc* 1991; 23: 2817.
61. Starzl TE, Porter KA, Mazzaferro V, Todo S, Fung J, Francavilla A. Hepatotrophic effects of FK506 in dogs. *Transplantation* 1991; 51: 67.
62. Mizuta K, Kobayashi E, Uchida H, Fujimura A, Kawarasaki H, Hashizume K. Influence of tacrolimus on bile acid and lipid composition in the continuously drained bile using a rat model -comparative study with cyclosporine-. *Transpl Int* (in press)
63. Sutherland FR, Preshaw RM, Shaffer EA. The effect of cyclosporine and liver autotransplantation on bile flow and composition in dogs. *Transplantation* 1993; 55: 237.
64. Chan FK, Zhang Y, Lee SS, Shaffer EA. The effects of liver transplantation and cyclosporine on bile formation and lipid composition: an experimental study in the rat. *J Hepatol* 1998; 28: 329.
65. Ericzon BG, Eusufzai S, Kubota K, Einarsson K, Angelin B. Characteristics of biliary lipid metabolism after liver transplantation. *Hepatology* 1990; 12: 1222.
66. Ko CW, Kowdley KV, Haigh KW, Lee SP. Biliary lipid composition after liver transplantation: Effect of allograft function and cyclosporine. *Liver Transplant Surg* 1998; 4: 258.

67. Galan AI, Roman ID, Munoz ME, et al. Inhibition of biliary lipid and protein secretion by cyclosporine A in the rat. *Biochem Pharmacol* 1992; 44: 1105.
68. Rahman K, Coleman R. Biliary lipid secretion and its control. Effect of taurodehydrocholate. *Biochem J* 1987; 245: 531.
69. Hofmann AF. Bile acid secretion, bile flow and biliary lipid secretion in humans. *Hepatology* 1990; 12: 17S.
70. Verkade HJ, Vonk RJ, Kuipers F. New insights into the mechanism of bile acid-induced biliary lipid secretion. *Hepatology* 1995; 21: 1174.
71. Takeguchi N, Ichimura K, Koike M, Matsui W, Kashiwagura T, Kawahara K. Inhibition of the multidrug efflux pump in isolated hepatocyte couplets by immunosuppressants FK506 and cyclosporine. *Transplantation* 1993; 55: 646.
72. Smit JJ, Schinkel AH, Oude ER, et al. Homozygous disruption of the murine *mdr2* P-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and to liver disease. *Cell* 1993; 75: 451.
73. Elferink RP, Tytgat GN, Groen AK. Hepatic canalicular membrane 1: The role of *mdr2* P-glycoprotein in hepatobiliary lipid transport. *FASEB J* 1997; 11: 19.
74. Sakakura H, Kimura N, Takeda H, Komatsu H, Ishizaki K, Nagata S. Simultaneous determination of bile acids in rat liver tissue by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B* 1998; 718: 33.
75. Samuelsson B. On the metabolism of chenodeoxycholic acid in the rat. Bile acids and steroids 85. *Acta Chem Scand* 1959; 13: 976.
76. Mosbach EH. Effects of drugs on bile acid metabolism. *Drugs Affecting Lipid Metabolism* 1969; 421.
77. Botham KM, George SB. Metabolism of chenodeoxycholic acid to β -muricholic acid in rat liver. *Eur J Biochem* 1983; 134: 191.
78. Greim H, Trulzsch D, Roboz J, et al. Mechanism of cholestasis: bile acids in normal rat livers and in those after bile duct ligation. *Gastroenterology* 1972; 63: 837.
79. Mizuta K, Kobayashi E, Uchida H, et al. Cyclosporine inhibits transport of bile acid in rats -Comparison of bilirubin composition between liver and bile. *Transplant Proc* (in press)

80. Angelin B, Einarsson K, Hellstrom K. Effect of cholestyramine on bile acid kinetics in patients with portal cirrhosis of the liver. Evidence of a selective defect in the formation of cholic acid. *Am J Dig Dis* 1978; 23: 1115.
81. Einarsson K, Akerlund JE, Reihner E, Bjorkhem I. 12 alpha-hydroxylase activity in human liver and its relation to cholesterol 7 alpha-hydroxylase activity. *J Lipid Res* 1992; 33: 1591.
82. Jindal RM, Popescu I, Emre S, et al. Serum lipid changes in liver transplant recipients in a prospective trial of cyclosporine versus FK506. *Transplantation* 1994; 57: 1395.
83. Pirsch JD, Miller J, Deierhoi MH, Vincenti F, Filo RS. A comparison of tacrolimus (FK506) and cyclosporine for immunosuppression after cadaveric renal transplantation. FK506 Kidney Transplant Study Group. *Transplantation* 1997; 63: 977.
84. Satterthwaite R, Aswad S, Sunga V, et al. Incidence of new-onset hypercholesterolemia in renal transplant patients treated with FK506 or cyclosporine. *Transplantation* 1998; 65: 446.
85. Pratschke J, Neuhaus R, Tullius SG, et al. Treatment of cyclosporine-related adverse effects by conversion to tacrolimus after liver transplantation. *Transplantation* 1997; 64: 938.
86. McCune TR, Thacker LI, Peters TG, et al. Effects of tacrolimus on hyperlipidemia after successful renal transplantation: a Southeastern Organ Procurement Foundation multicenter clinical study. *Transplantation* 1998; 65: 87.

表1 生理食塩水投与群と蒸留水投与群における胆汁ドレナージ後の体重、
経口水分量、胆汁流量の変化

| | | 平均 ± 標準偏差 | | | |
|--------------------|-------|-----------|------------|------------|------------|
| | 経口水 | day 0 | day 1 | day 2 | day 3 |
| 体重 (g) | 生理食塩水 | 387 ± 58 | 381 ± 59 | 371 ± 55 | 368 ± 57 |
| | 蒸留水 | 385 ± 56 | 366 ± 56 | 346 ± 55 | 328 ± 57 |
| 経口水分量 (ml/day) | 生理食塩水 | 35 ± 9* | 31 ± 8* | 30 ± 6* | 25 ± 6* |
| | 蒸留水 | 22 ± 7 | 15 ± 7 | 15 ± 11 | 10 ± 9 |
| 胆汁流量 (ml/kg/hr) | 生理食塩水 | 1.9 ± 0.4 | 1.7 ± 0.3* | 1.8 ± 0.3* | 1.7 ± 0.3* |
| | 蒸留水 | 1.9 ± 0.3 | 1.4 ± 0.2 | 1.0 ± 0.3 | 0.6 ± 0.4 |

各グループとも n=8

*p<0.05 compared with the water- intake rats

表2 生理食塩水投与群と蒸留水投与群における胆汁ドレナージ後の
血清電解質、BUN、クレアチニン値

| | | 平均 ± 標準偏差 | |
|-----|------------|------------|---------|
| | 生理食塩水(n=6) | 蒸留水 (n=5) | p 値 |
| Na | 147 ± 3.3 | 129 ± 3.9 | <0.0001 |
| Cl | 107 ± 11.9 | 79 ± 4.6 | <0.001 |
| K | 3.3 ± 0.18 | 8.0 ± 1.76 | <0.0001 |
| BUN | 15 ± 1.5 | 196 ± 60.4 | <0.0001 |
| Cr | 0.3 ± 0.06 | 1.8 ± 1.20 | 0.014 |

表3 シクロスポリン群とタクロリムス群における血液生化学検査と血中濃度

| | AST (IU/l) | ALT (IU/l) | Bile acid (mmol/ml) | Cholesterol (mg/dl) | Phospholipid (mg/dl) | TCR or CsA level (ng/ml) |
|---------------------|---------------|---------------|------------------------|------------------------|-------------------------|-----------------------------|
| Cyclosporine | | | | | | |
| 2.5mg/kg (n=6) | 178 ± 16 | 57 ± 37 | 1.2 ± 0.1 | 63.6 ± 7.3 | 131.3 ± 17.8 | 535 ± 38 |
| 10mg/kg (n=6) | 98 ± 8 | 36 ± 47 | 1.3 ± 0.3 | 72.0 ± 9.3 | 135.4 ± 12.1 | 2707 ± 281 ^a |
| 25mg/kg (n=8) | 115 ± 7 | 38 ± 57 | 2.9 ± 0.9 | 55.3 ± 2.9 | 129.8 ± 6.7 | 5556 ± 229 ^{ab} |
| Vehicle (n=7) | 98 ± 13 | 36 ± 67 | 2.0 ± 0.9 | 61.4 ± 3.8 | 131.5 ± 11.1 | — |
| Tacrolimus | | | | | | |
| 0.4mg/kg (n=5) | 169 ± 12 | 62 ± 8 | 0.7 ± 0.3 | 72.8 ± 2.1 | 134.6 ± 4.8 | 9.0 ± 0.7 |
| 1.0mg/kg (n=5) | 124 ± 21 | 54 ± 5 | 0.8 ± 0.4 | 80.2 ± 2.9 | 147.0 ± 2.9 | 15.8 ± 1.8 |
| 4.0mg/kg (n=5) | 158 ± 31 | 54 ± 11 | 0.8 ± 0.3 | 69.6 ± 1.5 | 140.8 ± 5.3 | 61.3 ± 6.7 ^{cd} |
| Vehicle (n=7) | 116 ± 18 | 48 ± 7 | 0.6 ± 0.2 | 66.3 ± 3.7 | 137.4 ± 5.8 | — |

平均値 ± 標準誤差

^aP<0.05 compared with the CsA 2.5mg group

^bP<0.05 compared with the CsA 10mg group

^cP<0.05 compared with the TCR 0.4mg group

^dP<0.05 compared with the TCR 1.0mg group

表4 シクロスポリン群とタクロリムス群における胆汁流量、胆汁酸排泄率、及び胆汁内脂質排泄率

| | Bile flow (ml/kg/hr) | BASR (mmol/kg/hr) | Cholesterol (mmol/kg/hr) | Phospholipid (mmol/kg/hr) |
|---------------------|--------------------------|---------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| Cyclosporine | | | | |
| 2.5mg/kg(n=6) | 1.61 ± 0.09 ^a | 15.59 ± 1.07 | 0.69 ± 0.09 | 5.44 ± 1.07 |
| 10mg/kg (n=6) | 1.52 ± 0.06 ^a | 12.26 ± 1.02 | 0.62 ± 0.06 | 5.31 ± 1.06 |
| 25mg/kg (n=8) | 1.49 ± 0.12 ^a | 9.37 ± 0.62 ^{ab} | 0.43 ± 0.03 ^a | 2.84 ± 0.54 ^a |
| Vehicle (n=7) | 2.03 ± 0.09 | 15.19 ± 0.90 | 0.91 ± 0.17 | 8.71 ± 0.60 |
| Tacrolimus | | | | |
| 0.4mg/kg (n=5) | 1.96 ± 0.13 | 22.03 ± 3.74 | 0.96 ± 0.05 | 8.83 ± 0.56 |
| 1.0mg/kg (n=5) | 1.78 ± 0.07 | 19.63 ± 2.19 | 0.84 ± 0.04 | 8.34 ± 0.46 |
| 4.0mg/kg (n=5) | 1.94 ± 0.11 | 22.24 ± 1.81 | 0.88 ± 0.06 | 9.01 ± 0.84 |
| Vehicle (n=7) | 1.94 ± 0.08 | 15.75 ± 0.42 | 0.90 ± 0.10 | 8.41 ± 0.78 |

平均値 ± 標準誤差

^aP<0.05 compared with the vehicle (olive oil) group

^bP<0.05 compared with the CsA 2.5mg group



図1 持続胆汁ドレナージラット (1)

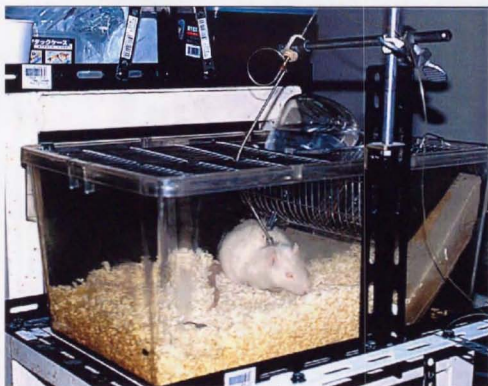


図2 持続胆汁ドレナージラット (2)

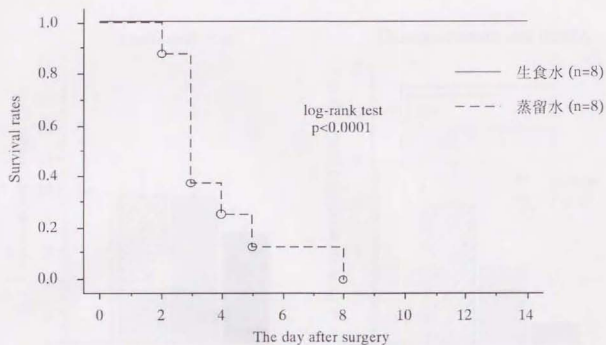


図3 生理食塩水投与群と蒸留水投与群における胆汁ドレナージ後の生存率

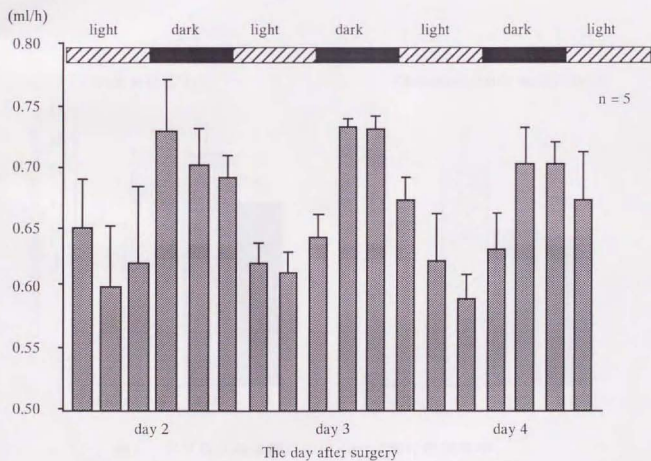


図4 生理食塩水投与群における胆汁排泄の日内変動

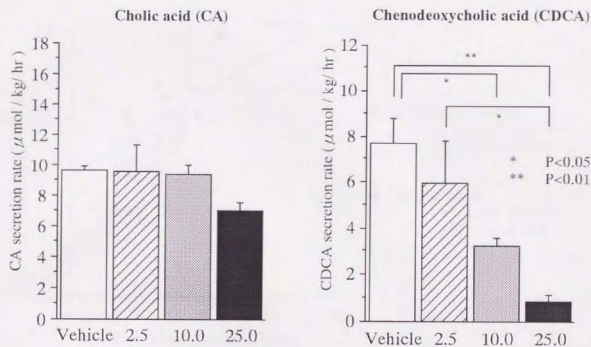


図5 シクロスポリン群における一次胆汁酸排泄率

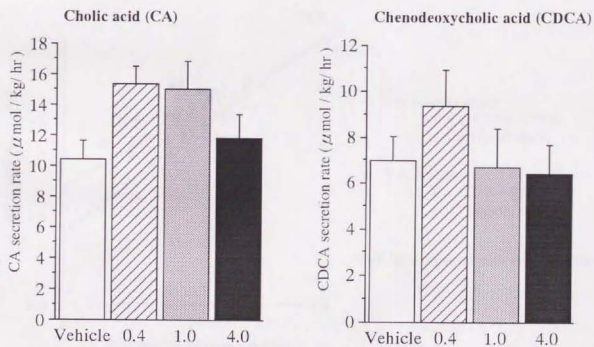


図6 タクロリムス群における一次胆汁酸排泄率

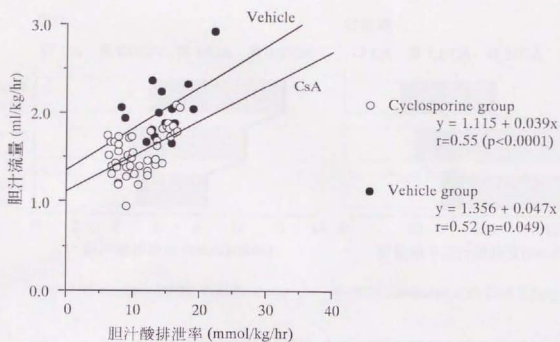


図7 シクロスポリン群における新生胆汁流量と胆汁酸排泄率

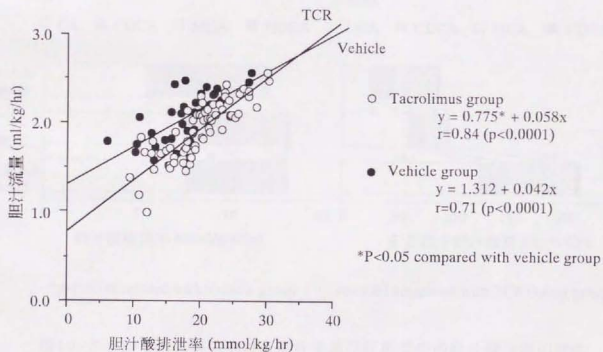


図8 タクロリムス群における新生胆汁流量と胆汁酸排泄率

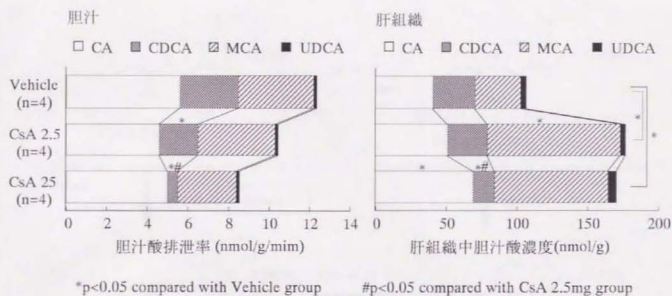


図9 シクロスポリン群における胆汁中及び肝組織中の胆汁酸分画の変化

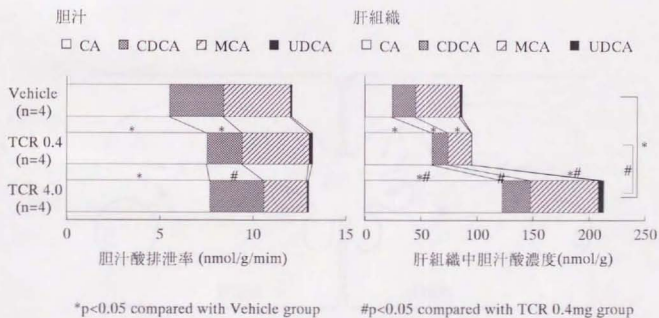
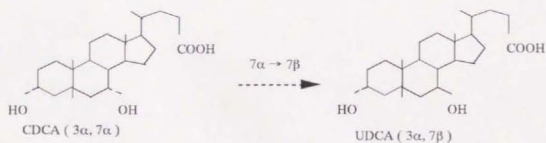


図10 タクロリムス群における胆汁中及び肝組織中の胆汁酸分画の変化

Humans



Rats

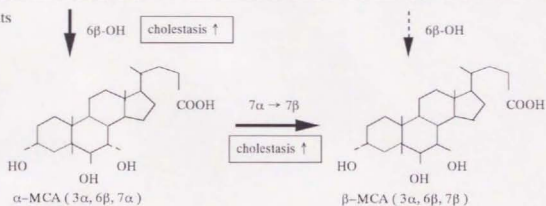


図11 ヒトとラットにおけるCDCA代謝経路の相違

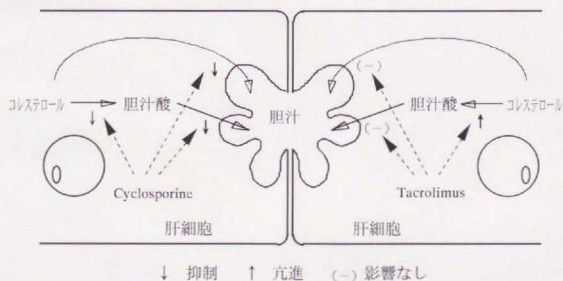
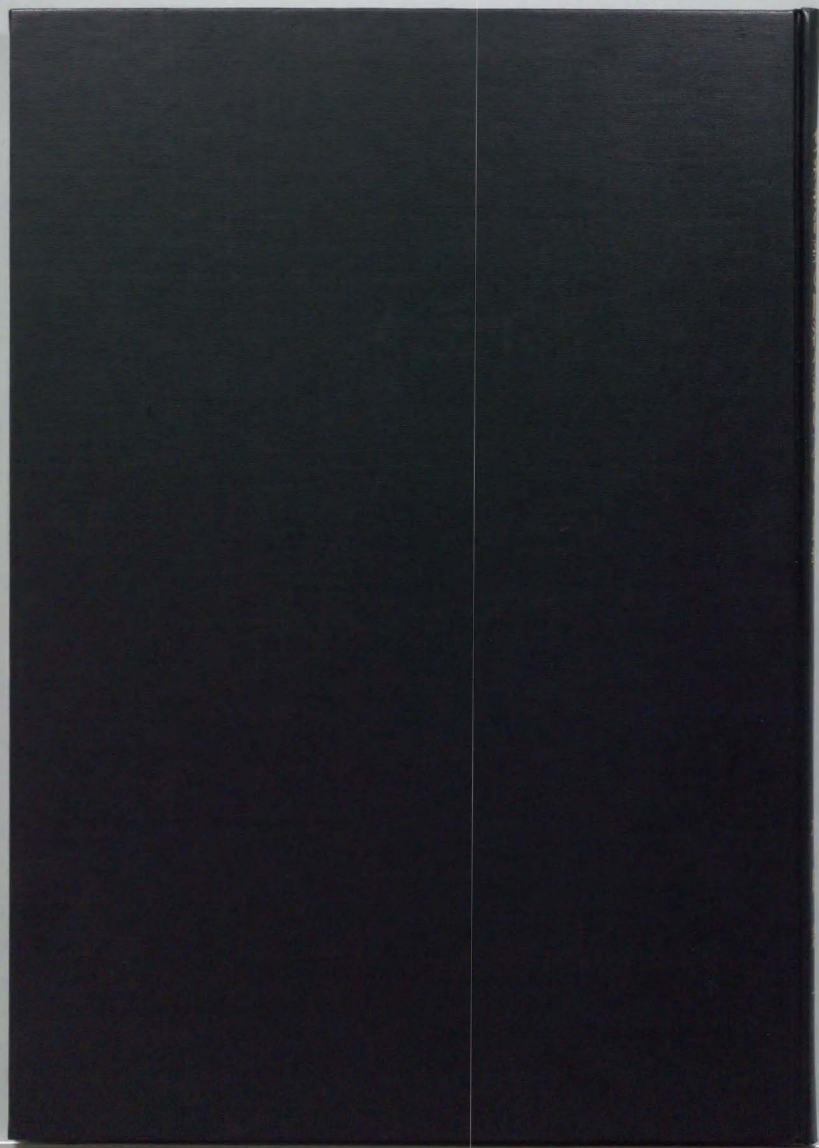
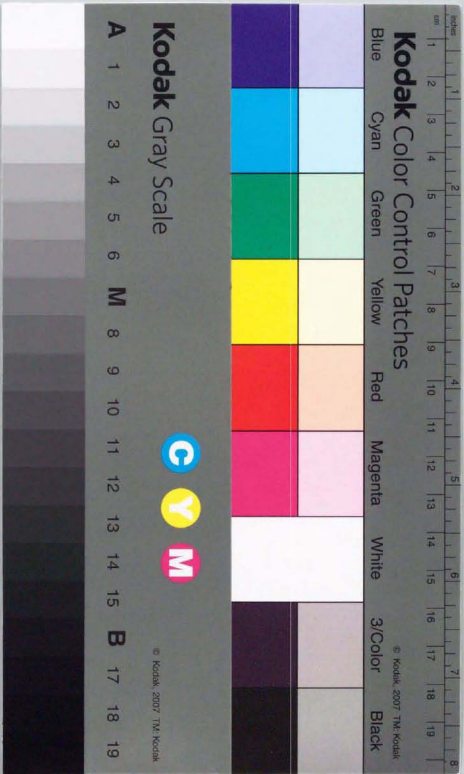


図12 シクロスポリン及びタクロリムスの胆汁酸動態に及ぼす影響





Kodak Color Control Patches

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black

Kodak Gray Scale

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19



© Kodak, 2007 TM Kodak