

富山大学学位論文

角膜上皮及び血液眼関門を介したアニオン性及び
カチオン性薬物の輸送機構

藤井忍

62 頁

目次

第1章 緒言	3
第1節 前眼部疾患治療における薬物透過バリア	3
第2節 後眼部疾患治療における薬物透過バリア	6
第3節 本研究の目的	11
第2章 角膜上皮培養細胞を用いた ketoprofen の透過機構の解明	12
第1節 序論	12
第2節 結果	13
2.2.1 ウサギ摘出角膜及び培養角膜上皮細胞(RCECs)における ³ H]ketoprofen 透過性	13
2.2.2 RCECs への ³ H]ketoprofen 取り込み特性	14
2.2.3 RCECs への ³ H]ketoprofen 取り込みに対する有機アニオン性化合物の影響	18
第3節 考察	20
第3章 血液眼関門を介した薬物輸送における P-glycoprotein の関与	22
第1節 序論	22
第2節 結果	24
3.2.1 Wild-type ラットから単離した RPE 細胞における mdr1a/mdr1b の mRNA 発現解析	24
3.2.2 Wild-type と mdr1a knockout ラットを用いた AHUI、RUI 及び BUI の比較	24
3.2.3 Wild-type と mdr1a knockout ラットを用いた verapamil の取り込みクリアランスの算出	25
3.2.4 Quinidine、digoxin 及び verapamil の組織取り込みに対する阻害剤の影響	27
第3節 考察	30
第4章 血液網膜関門における pravastatin の輸送機構の評価	32
第1節 序論	32
第2節 結果	34
4.2.1 BRB 及び BBB を介した pravastatin 循環血液から組織への取り込み過程に関する評価	34
4.2.2 BRB を介した pravastatin の硝子体からの消失過程に関する評価	35
第3節 考察	37
第5章 本研究の結論および将来への展望	40
実験の部	42
引用文献	51
謝辞	61

第1章 緒言

第1節 前眼部疾患治療における薬物透過バリア

感染症やアレルギー、緑内障などの外眼部あるいは前眼部疾患の治療には、簡便で安全性の高い点眼剤が広く用いられる。点眼された薬物は、眼表面の涙液により希釈され、大部分が鼻涙管を通過して鼻粘膜あるいは消化管から全身血へと吸収される。点眼された一部の薬物が結膜及び角膜を透過して眼内へと移行するが、結膜には血管が豊富に存在することから、眼内への主要ルートは角膜であると考えられている。したがって、眼内移行性の良好な点眼剤を開発するためには、薬物の角膜透過性を把握し、透過機構を明らかにすることが重要である。

角膜は、強膜と共に外壁として眼球の形状を保持し、光を眼内に取り込み、屈折させるレンズとしての役割を担う。角膜は上皮、ボーマン膜、実質、デスメ膜および内皮の5層から形成される厚さ約0.5 mmの透明な無血管組織である。最表層にある上皮は、5-6層の重層扁平上皮細胞から成り、細胞間にはタイトジャンクションが存在する。外界からの異物侵入を防ぐ機能を持ち、点眼された薬物の角膜透過過程において、主要な透過バリアとなる。実質は角膜の約90%を占め、層状に配列するコラーゲン繊維と実質細胞から構成され、コラーゲン繊維間は、水分を吸収し、膨潤する性質を持つプロテオグリカンで充填されている。内皮は基底膜であるデスメ膜の上に配列した単層の多角形細胞がタイトジャンクションを形成し、角膜実質内の水分量を調整することで、角膜の透明性を保つポンプとしての機能を持つ(Figure 1-1)。

血管のない角膜組織は、外気から直接酸素を取り込み、涙液及び房水を介して栄養物供給や老廃物排出を行うため、種々の輸送担体が存在することが報告されている。角膜上皮には、アミノ酸トランスポーター(L-type amino acid transporter 1 (LAT1/SLC7A5))、amino acid carrier system B⁰⁺ (ATB⁰⁺/SLC6A14)、neutral amino acid transporter (ASCT1/SLC1A4)、ペプチドトランスポーター(oligopeptide transporter 1 (PepT1/SLC15A1))、PepT2/SLC15A2)、有機カチオントランスポーター(organic cation transporter 1 (OCT1/SLC22A1))、organic cation/carnitine transporter (OCTN1/SLC22A4)、OCTN2/SLC22A5)がRNAレベルで確認されている。また、グルコーストランスポーター(glucose transporter 1 (GLUT1/SLC2A1))、タウリントランスポーター(taurine transporter (TAUT/SLC6A6))、アスコルビン酸トランスポーター(sodium-dependent vitamin C transporter 2 (SVCT2/SLC23A2))、モノカルボン酸トランスポーター(monocarboxylic acid transporter 1 (MCT1/SLC16A1)、MCT2/SLC16A7、

MCT3/SLC16A8、MCT4/SLC16A3、MCT5/SLC16A4)、OCT3/SLC22A3、有機アニオントランスポーター(organic anion transporting polypeptide (OatpE/OATP12/SLCO4A1)、OATP2A1/SLCO2A1、OATP2B1/SLCO2B1、organic anion transporter 2 (OAT2/SLC22A7))については、タンパクレベルでの発現が確認されている(Ito et al., 2003; Mannermaa et al., 2006; Talluri et al., 2006; Zhang et al., 2008; Kraft et al., 2010; Dahlin et al., 2013; Kuipers et al., 2013)。さらに免疫電子顕微鏡観察によって、角膜上皮には排出トランスポーターである P-glycoprotein (P-gp/MDR1/ABCB1)、multidrug resistance protein (MRP1/ABCC1~MRP7/ABCC7)、breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2)の発現が報告されている(Saghizadeh et al., 2011; Chen et al., 2013)。

一般的に点眼された薬物は、角膜を受動拡散で透過し、薬物の脂溶性の指標であるオクタノール/緩衝液分配係数(Log D)が 3 付近のとき、角膜透過性が最大となる。つまり、Log D が 3 以下の脂溶性の低い薬物では、角膜上皮のタイトジャンクションがバリアとなり、Log D が 3 以上になると、角膜上皮は透過しやすくなる一方で、水分量の多い角膜実質が障壁となり、角膜透過性が低下する(Schoenwald and Huang, 1983; Chien et al., 1991)。小腸上皮や近位尿細管上皮等と同様、角膜上皮においても、薬物の取り込み及び排出に輸送担体が関与することが明らかになりつつある。例えば、 β ブロッカーである acebutolol が、脂溶性からの予測値よりも低い角膜透過性を示すのは、角膜上皮に存在する P-gp によって細胞内への透過が制限されていると考えられ(Kawazu et al., 2006)、抗菌剤である levofloxacin は、分子型分率が高く透過性が高いと推定される pH7.5 に比べて、pH6.5 の方が良好な角膜透過性を示すことから、何らかの能動輸送系の関与が示唆されている(Kawazu et al., 1999)。したがって、角膜上皮において薬物の透過に対する輸送担体の関与を解明することは、角膜透過性、すなわち眼内移行性の良好な点眼剤の開発に有益な情報を与える可能性がある。

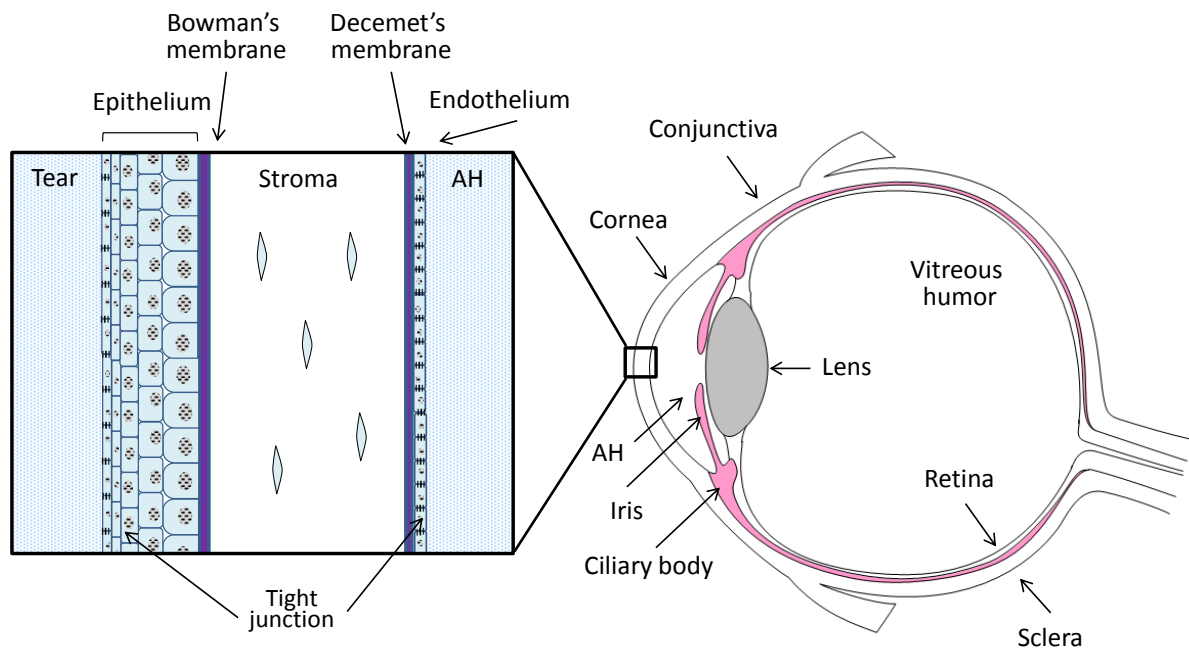


Figure 1-1. Schematic diagram of the ocular and cornea structure.

AH; aqueous humor

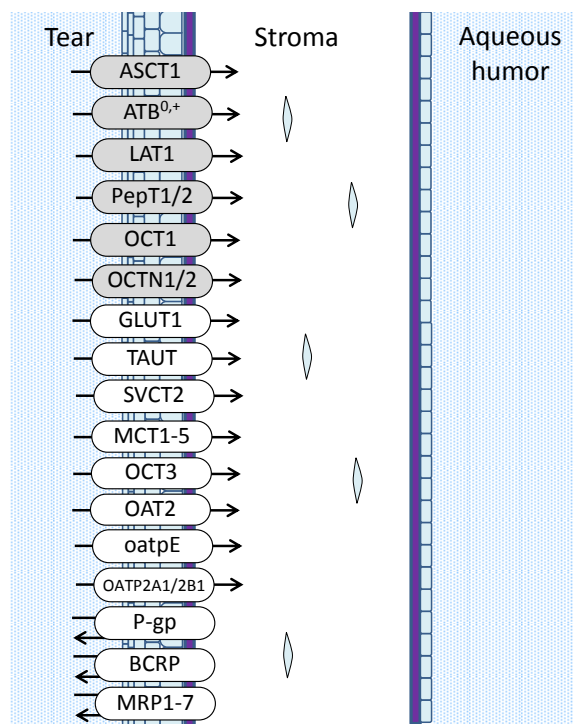


Figure 1-2. Schematic picture of transporters on the corneal epithelium.

Expression at RNA level shows gray and expression at protein level shows white.

ASCT1; neutral amino acid transporter 1, ATB^{0,+}; amino acid carrier system B^{0,+}, BCRP; breast cancer resistance protein, GLUT1; glucose transporter 1, LAT1; L-type amino acid transporter 1, MCT; monocarboxylic acid transporter, MRP; multidrug resistance protein, OAT; organic anion transporter, oatp; organic anion transporting polypeptide, OCT; organic cation transporter, OCTN; organic cation/carnitine transporter, PepT; oligopeptide transporter, P-gp; P-glycoprotein, SVCT; sodium-dependent vitamin C transporter, TAUT; taurine transporter

第2節 後眼部疾患治療における薬物透過バリア

我が国における、成人の中途視覚障害の原因疾患の第一位は緑内障(20.9%)、第二位以降は、糖尿病網膜症(19.0%)、網膜色素変性(13.5%)、黄斑変性(9.3%)と原因疾患の約50%が後眼部に原因のある後眼部疾患である(中江ら, 2008)。後眼部疾患治療の場合、点眼投与では、標的組織である網膜まで薬物を到達させることが難しいため、臨床では硝子体内投与が選択される。硝子体内投与では、標的組織近傍に直接薬物を投与するため、低用量で標的組織の曝露を高めることができるが、投与による侵襲性が高く、眼内炎や硝子体内出血といった合併症のリスクが高いことが問題となる。一方、侵襲性の低い経口投与によって、全身循環血から後眼部へと薬物を到達させるには、脳が血液脳関門(blood-brain barrier; BBB)によって薬物移行が制限されているのと同様、血液房水関門(blood-aqueous humor barrier; BAB)及び血液網膜関門(blood-retinal barrier; BRB)がバリアとして機能し、薬物の透過を制限していることが知られている(Figure 1-3)。

BABは、前眼部に存在する関門で、2種の異なる細胞、虹彩血管内皮細胞及び毛様体無色素上皮細胞(nonpigmented ciliary epithelial cells; NPE)から成る。NPEは、毛様体色素上皮細胞(pigmented ciliary epithelial cells; PE)とともに、房水産生の役割を担う。毛様体上皮では、PEのbasal側が毛様体実質(血液側)、NPEのbasal側が房水側に面し、NPEのapical側にタイトジャンクションが存在する。無色透明な房水は、水晶体、角膜内皮、硝子体など無血管組織の栄養・代謝をつかさどるとともに、眼圧の維持・調整の役割を果たしており、毛様体動脈毛細血管の血漿成分に由来する、グルコース、アミノ酸、アスコルビン酸などが含まれる。房水は後房にある毛様体突起から能動的に産生され、瞳孔を通過して前房に流れた後、線維柱帯を通りシュレム管から流出する(Cunha-Vaz, 1997)。房水に接した虹彩にある血管は非有窓性であり、内皮細胞間にはタイトジャンクションが存在し、BABの一部として機能する。房水には血漿タンパクの約1%が存在するが、これは毛様体実質から、虹彩実質へと移行したタンパク質が、root of irisから前房に滲出するためである。このタンパク質は後房から前房に絶えず流れる房水のフローによって、後房に滲出することはない(Coca-Prados, 2014)。

後眼部に存在するBRBは、中枢神経系がBBBによって保護されているのと同様、神経組織である網膜の至適環境を保つために、血液側から網膜側への物質の透過を制限している。網膜の内層約2/3は網膜毛細血管から、残りの1/3は網膜色素上皮(retinal pigment epithelial; RPE)細胞の外側にある脈絡膜毛細血管から栄養が供給される。網膜毛細血管内皮細胞(inner BRB)は、非有窓性でタイトジャンクションを持つが、脈絡膜血管は有窓性で、血管内の分子などは容易に血管外へと滲出する。しかし、脈絡膜から漏れ出

た分子は、RPE 細胞 (outer BRB) に存在するタイトジャンクションによって、網膜への移行を制限される。

このように、BAB と BRB は眼内の透明性を維持し、眼内環境を保つために、栄養物の供給と老廃物の排出に重要な役割を担っている。両関門はタイトジャンクションによって、細胞間隙を介した非特異的な物質の移行を制限し、経細胞輸送によって、必要な物質のみを透過させるため、様々な輸送担体が存在することが確認されている (Figure 1-4、Table 1-1 及び Figure 1-5)。

Figure 1-4 に示すように、BAB を構成する NPE の基底膜側には、GULT1、LAT1/b⁰⁺AT、有機アニオントランスポーターである (OAT3/SLC22A8、oatp1a4 (oatp2/slco1a4)、oatp1b2 (oatp4/slco1b2)) 及び排出トランスポーターである MRP1、4、5 が、apical 側には OAT3 及び MRP2、4、5 の発現が報告されており (Takata et al., 1991; Gao et al., 2005; Hu et al., 2011; Li et al., 2013; Umapathy et al., 2013)、局在は解明されていないが、NPE には MCT1、MCT2、oatpE 及び P-gp の存在が確認されている (Wu et al., 1996; Ito et al., 2003; Chidlow et al., 2005)。さらに、免疫電子顕微鏡観察によって、虹彩血管内皮細胞における GLUT1 及び P-gp の局在が明らかとなっている (Takata et al., 1991; Schlingemann et al., 1998)。また、Table 1-1 に示すように、mRNA レベルでは虹彩、毛様体に様々なトランスポーターが存在することが示されている (Zhang et al., 2008; Dahlin et al., 2013)。

Inner BRB では、Figure 1-5 に示すように、GLUT1、MCT1、アミノ酸トランスポーター (cationic amino acid transporter 1 (CAT1/SLC7A1)) 及び有機アニオントランスポーター (oatp1a4 及び oatp1c1) が luminal、abluminal の両側に発現し、P-gp、Mrp4 及び Bcrp が luminal 側にのみ存在することが確認されている。また、outer BRB では、GLUT1、MCT1、3、CAT1、oatp1a4、oatp1c1、OATP1A2 及び P-gp の局在が報告されている。その他、種々のトランスポーターが mRNA またはタンパクレベルで確認されている (Takata et al., 1992; Rajan et al., 2000; Kennedy and Mangini, 2002; Ito et al., 2003; Hosoya and Tomi, 2005; Asashima et al., 2006; Nagase et al., 2006; Kaneko et al., 2007; Mannermaa E et al., 2009; Pelis et al., 2009; Tagami et al., 2009; Tomi et al., 2009; Tomi and Hosoya, 2010; Akanuma et al., 2013; Chan et al., 2015; Kubo et al., 2015; Sakurai et al., 2015)。

BAB や BRB に発現する輸送担体の中には、他の組織と同様、薬物の取り込み (influx) あるいは排出 (efflux) に関わるものがあることが、示唆されている。例えば、ウサギに verapamil を硝子体内投与した後、P-gp 基質である quinidine を静脈内投与すると、房水及び硝子体内 quinidine 濃度が有意に上昇すること (Duvvuri et al., 2003)、quinidine を点

眼したウサギに P-gp 基質である rhodamine 123 (Rho-123) を静脈内投与したとき、房水中 Rho-123 濃度が増加すること(Kajikawa et al., 1999)など、BAB 及び BRB に存在する P-gp の阻害により、基質の組織内への取り込みが増加する現象が報告されている。さらに *p*-aminohippuric acid (PAH)、benzylpenicillin 及び 6-mercaptopurine は、ラット硝子体から *oat3* を介して消失すること(Hosoya et al., 2009)、vrapamil が新規カチオン輸送系に認識されてラット網膜に取り込まれること(Kubo et al., 2013)が示されている。したがって、BAB 及び BRB において、輸送担体が関与する薬物の透過機構を解明することは、全身循環血から、後眼部組織に効率よく薬物を移行させるためのヒントになると考えられる。

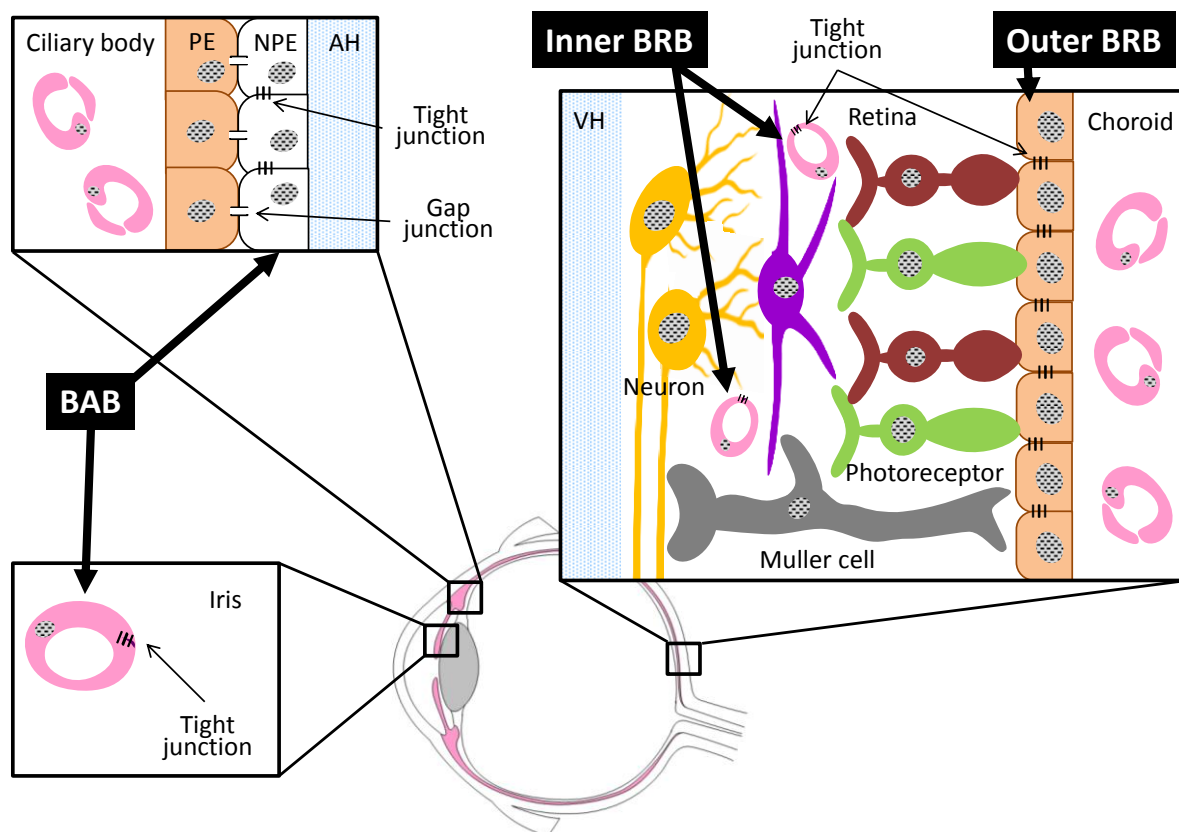


Figure 1-3. Schematic diagram of the blood-ocular barriers.

AH; aqueous humor, BAB; blood-aqueous humor barrier, BRB; blood-retinal barrier, NPE; non-pigmented epithelial cells, PE; pigmented epithelial cells, VH; vitreous humor

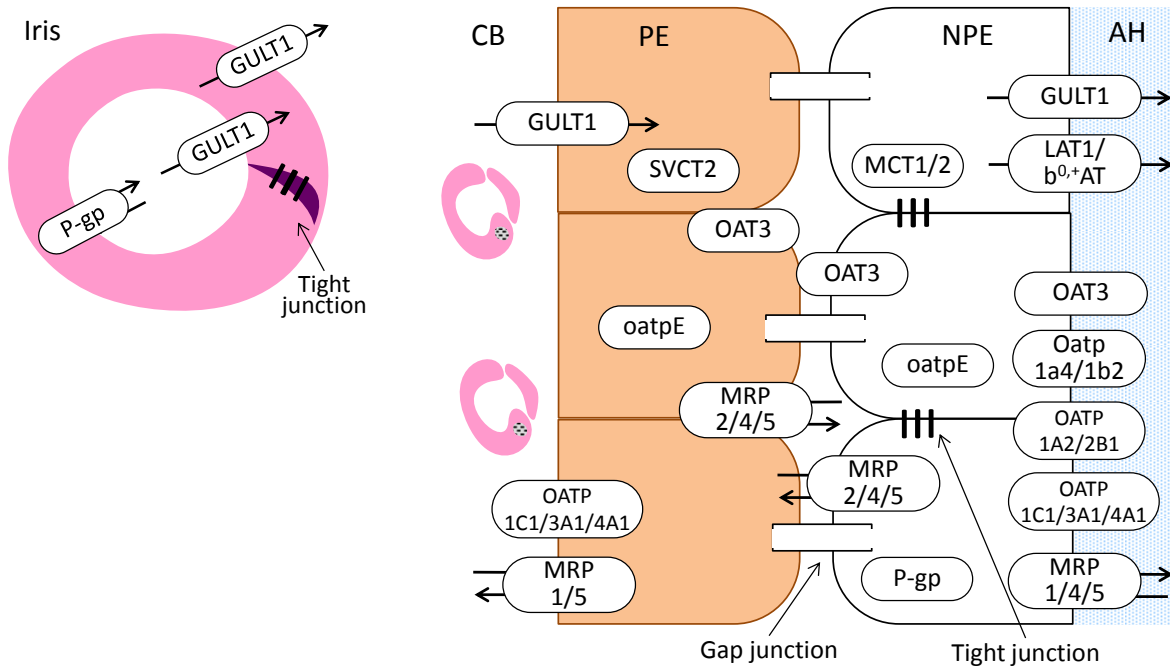


Figure 1-4. Schematic picture of transporters on the blood-aqueous humor barrier.

AH; aqueous humor, $b^{0,+}AT$; amino acid carrier system $B^{0,+}$, CB; ciliary body, GLUT1; glucose transporter 1, LAT1; L-type amino acid transporter 1, MCT; monocarboxylic acid transporter, MRP; multidrug resistance protein, NPE; non-pigmented epithelial cells, OAT; organic anion transporter, oatp; organic anion transporting polypeptide, PE; pigmented epithelial cells, P-gp; P-glycoprotein, SVCT; sodium-dependent vitamin C transporter

Table 1-1. Expression of mRNA in the blood-aqueous humor barrier.

Tissues	Iris-ciliary body	Iris	Ciliary body
Transporters	OAT1	OAT1,3	OCT2
	OCT1-3	OCT2	OCTN2
	OCTN1,2	OCTN2	Oatp1a5 (protein)
	PepT2	OATP2B1	BCRP
	BCRP	MRP1,4,5	
	MRP3		

BCRP; breast cancer resistance protein, MRP; multidrug resistance protein, OAT; organic anion transporter, oatp; organic anion transporting polypeptide, OCT; organic cation transporter, OCTN; organic cation/carnitine transporter, PepT; oligopeptide transporter

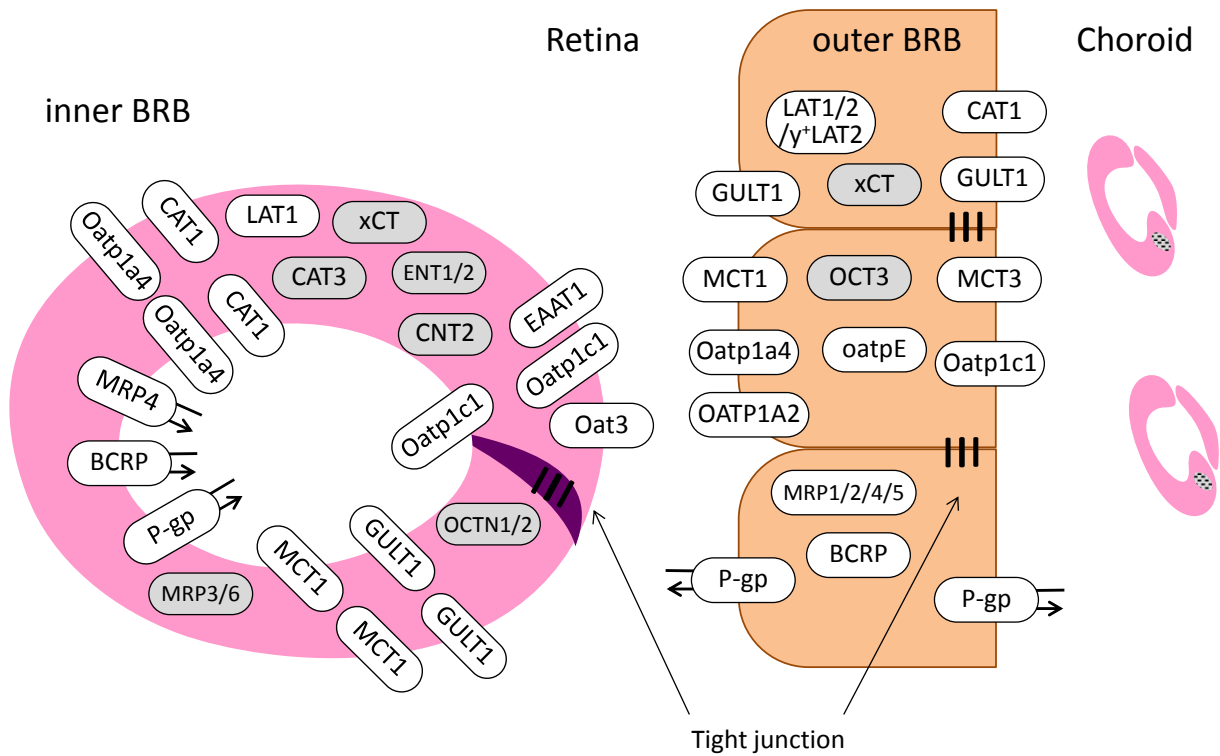


Figure 1-5. Schematic picture of transporters on the blood-retinal barrier.

Expression at RNA level shows gray and expression at protein level shows white.

BCRP; breast cancer resistance protein, BRB; blood-retinal barrier, CAT1; cationic amino acid transporter 1, CNT2; concentrative nucleoside transporter 2, EAAT1; excitatory amino acid transporter 1, ENT; equilibrative nucleoside transporter, GLUT1; glucose transporter 1, LAT; L-type amino acid transporter, MCT; monocarboxylic acid transporter, MRP; multidrug resistance protein, OAT; organic anion transporter, oatp; organic anion transporting polypeptide, OCT; organic cation transporter, OCTN; organic cation/carnitine transporter, P-gp; P-glycoprotein, xCT; x_c^- type amino-acid transporter, y^+ LAT2; y^+ L amino acid transporter 2

第3節 本研究の目的

前節までに、眼組織において薬物の透過バリアとなる角膜、BAB 及び BRB の機能について概説した。薬物動態の良好な眼科用剤を開発するためには、角膜上皮、BAB 及び BRB における薬物透過機構を解明することが重要である。特に、全身循環血を介して薬物を後眼部に到達させる場合には、中枢性の副作用を回避するために、BAB 及び BRB と BBB の薬物透過特性の違いを明らかにすることが、重要になると考えられる。

そこで、本研究では、点眼剤、経口剤など眼科用剤の開発に結び付く有益な知見を得るため、外眼部及び前眼部の薬物療法において重要となる角膜上皮での薬物透過特性を明らかにすること、及び後眼部の全身循環血を介した薬物治療において鍵となる、BAB 及び BRB の薬物透過特性を評価し、BBB における薬物透過特性と比較することを目的とした。

第2章では、眼科手術後の炎症の治療に汎用される非ステロイド性抗炎症薬(NSAIDs)の一つとして、ketoprofen をモデル化合物として選択し、角膜上皮培養細胞における透過機構、特に取り込み機構について評価した。第3章では、後眼部に焦点を移し、BAB、BRB 及び BBB における P-gp の寄与率を明らかにする目的で、mdr1a knockout ラットを用いたときの房水、網膜及び脳における P-gp 基質の透過特性を評価した。さらに、臨床において中枢性の副作用がなく、糖尿病網膜症に効果があると報告されている pravastatin の BRB における取り込み及び排出機構について、ラットを用いた in vivo 実験法にて評価し、第4章にまとめた。

第2章 角膜上皮培養細胞を用いた ketoprofen の透過機構の解明

第1節 序論

白内障手術など、眼科手術後に生じる炎症の治療には、ステロイド点眼剤と NSAIDs 点眼剤が併用、または単独で用いられる。ステロイドは強力な抗炎症作用を示す一方、ステロイド緑内障や感染症など副作用が問題となるため、軽度から中等度の炎症性疾患では NSAIDs が優先して使われる。一般的に NSAIDs は弱酸性化合物であり、生理的条件下ではイオン型であるため、負に帯電した角膜を透過しにくい(Rojanasakul and Robinson, 1989)。点眼剤の pH を低くすることで分子型となり脂溶性は高まるが、一方で NSAIDs の刺激性に低 pH による刺激が加わり、眼への負担が増大することから、眼内移行性の良好な点眼剤開発の解決策として現実的ではない。

NSAIDs である ketoprofen は、カルボキシル基を 1 つ持つモノカルボン酸化合物であり (Figure 2-1)、pKa 4.2、LogD 1.34 であることから、物理化学的には生体膜を透過しにくい性質を持つ。しかし、ウサギに ketoprofen を点眼すると、結膜だけでなく、虹彩・毛様体においてもプロスタグランジン合成が阻害された(Kulkarni and Srinivasan, 1985)ことから、良好な角膜透過性を持つと推察される。これは、ketoprofen が pH 分配仮説に基づく受動拡散で膜を透過するだけでなく、何らかのトランスポーターに認識されるためと考えられる。

Ketoprofen は、Caco-2 細胞に少なくとも MCT1 を介して取り込まれることが報告されている(Choi et al., 2005)。また、ラットへパトサイトに存在する 2 種類のトランスポーターに認識され、1 つは oat2、もう 1 つは oat3 または oatp であることが示唆されており(Morita et al., 2005)、oat3 を介した indoxyl sulfate 取り込みを阻害する(Ohtsuki et al., 2002)ことが報告されている。しかし、今までに角膜においてトランスポーターの関与を評価した報告はない。

角膜上皮には MCT1をはじめ、oatpE、OAT2、OATP2A1、OATP2B1、(Mannermaa et al., 2006; Kraft et al., 2010; Dahlin et al., 2013)がタンパクレベルで存在し、ウサギ角膜上皮細胞(rabbit corneal epithelial cells; RCECs)には、MCT1、2、4 および MCT5 の存在が確認されている(Kawazu et al., 2013)ことから、ketoprofen がこれら輸送担体に認識されて角膜を透過する可能性は十分に考えられる。

一般的に、眼内動態を評価する実験系として選択される、動物を用いた in vivo 試験では、角膜中薬物の濃度推移は、涙液や房水あるいは鼻腔への薬物消失などの影響を受け複雑な眼内動態が複合的に現れた結果として示される。これに対して、in vitro 試験系では、実験条件の設定が簡便であり、膜透過性の詳細な検討に適している。したがって、本章では、RCECs を用い、ketoprofen の角膜上皮透過特性、特に取り込み過程における輸送担体の関与を明らかにすることを目的とした。

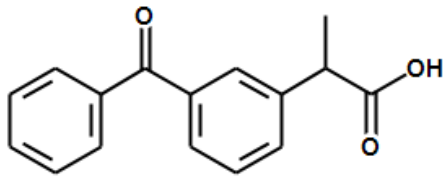


Figure 2-1. Structure of ketoprofen.

第2節 結果

2.2.1 ウサギ摘出角膜及び培養角膜上皮細胞(RCECs)における $[^3\text{H}]$ ketoprofen 透過性

ウサギより摘出した角膜を用い、ドナー側(涙液側)からレシーバー側(房水側)への $[^3\text{H}]$ ketoprofenの透過性を評価した結果を Figure 2-2 A に示す。 $[^3\text{H}]$ Ketoprofenの見かけの透過係数($P_{\text{cornea, app}}$)は、 $8.2 \pm 1.2 \times 10^{-7}$ cm/sec であり、細胞間隙透過マーカである $[^{14}\text{C}]$ sucroseの $P_{\text{cornea, app}}$ ($7.8 \pm 2.3 \times 10^{-8}$ cm/sec)に比べ約 11 倍大きい値を示した。

また、RCECsを用いた apical 側(上皮側)から basal 側(実質側)への $[^3\text{H}]$ ketoprofenの見かけの透過係数($P_{\text{cell, app}}$)を求めたところ、 $2.4 \pm 0.08 \times 10^{-5}$ cm/sec であった。これは、 $[^{14}\text{C}]$ sucroseの $P_{\text{cell, app}}$ ($3.2 \pm 0.2 \times 10^{-6}$ cm/sec)に比べ、約 7.5 倍大きい値であった (Figure 2-2 B)。

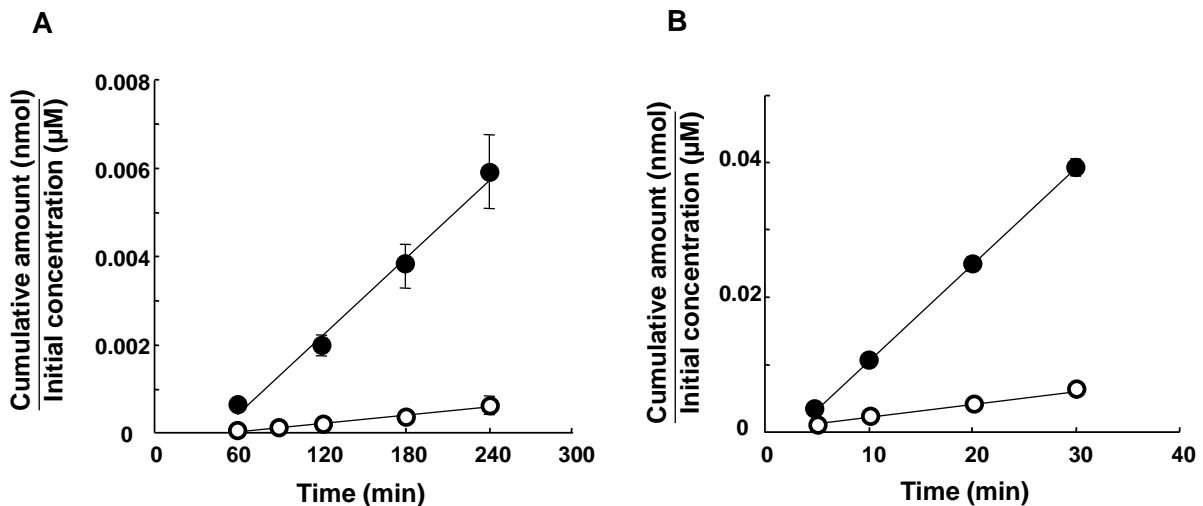


Figure 2-2. Time-course of $[^3\text{H}]$ ketoprofen (closed circle) and $[^{14}\text{C}]$ sucrose (open circle) permeation across isolated rabbit corneas (A) and cultured rabbit corneal epithelial cell (RCEC) layers (B) at 37 °C.

Each point represents the mean \pm SE (n=3-4 determinations).

2.2.2 RCECs への ^3H ketoprofen 取り込み特性

RCECs への ^3H ketoprofen 取り込みの時間依存性、温度依存性及び濃度依存性

RCECs への ^3H ketoprofen 取り込みは、少なくとも 1 分までは直線的に増加し、5 分には定常状態に達した (Figure 2-3 A)。したがって、以降の本細胞を用いた実験は、細胞内から細胞外への排出過程が無視でき、細胞外から細胞内への取り込み過程が主に反映される時間である 1 分にて実施した。

RCECs への ^3H ketoprofen 取り込みについて、温度依存性の結果を Figure 2-3 B に示す。 ^3H Ketoprofen の RCECs への取り込みは、温度の低下とともに減少し、活性化エネルギーは、9.24 kcal/mol であった。

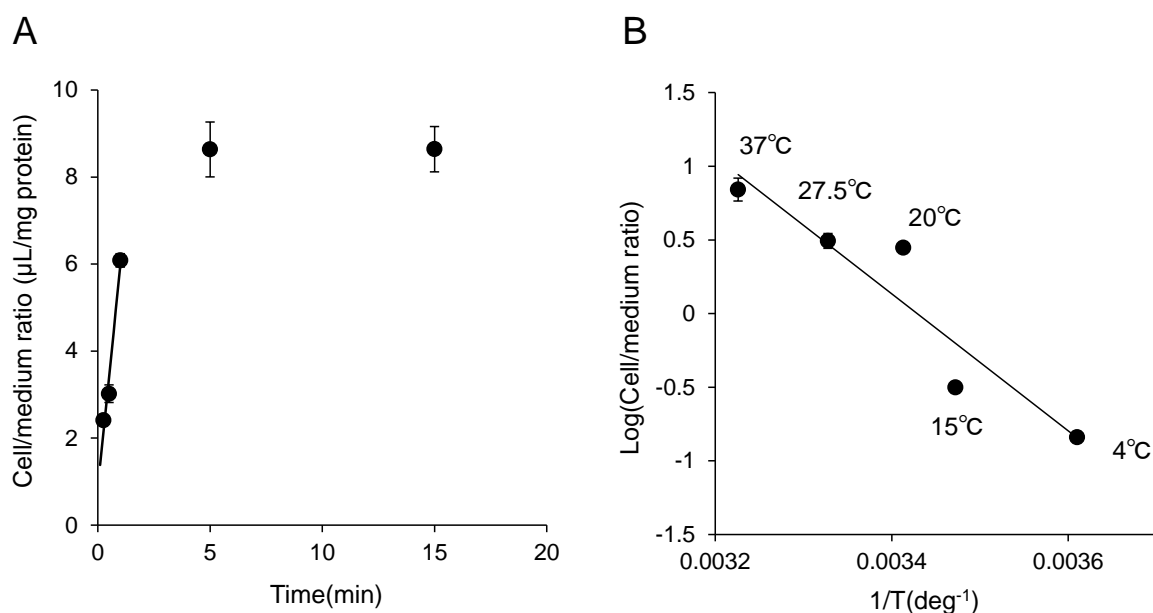


Figure 2-3. Time-course of ^3H ketoprofen uptake by the RCECs (A) and the Arrhenius plots for ^3H ketoprofen uptake by the RCECs (B).

Each point represents the mean \pm SE (n=4 determinations).

Figure 2-4 に示すように、37°C における ^3H ketoprofen の RCECs への取り込みは、濃度の増加に伴い飽和性を示した。この取り込み値から 4°C での非特異的な取り込みを差し引いたのち、Eadie-Scatchard plot を行ったところ、二相性となったことから、 ^3H ketoprofen の RCECs への取り込みには、高親和性と低親和性の過程があると考えられた。Michaelis-Menten 式を用い、非線形最小二乗法による解析を行ったところ、高親和性の K_m 値及び V_{max} 値はそれぞれ 0.559 ± 0.155 mM 及び 0.367 ± 0.050 nmol/(min·mg protein) であり、低親和性の値は、それぞれ 23.8 ± 2.8 mM 及び 60.5 ± 4.1 nmol/(min·mg of protein) であった。

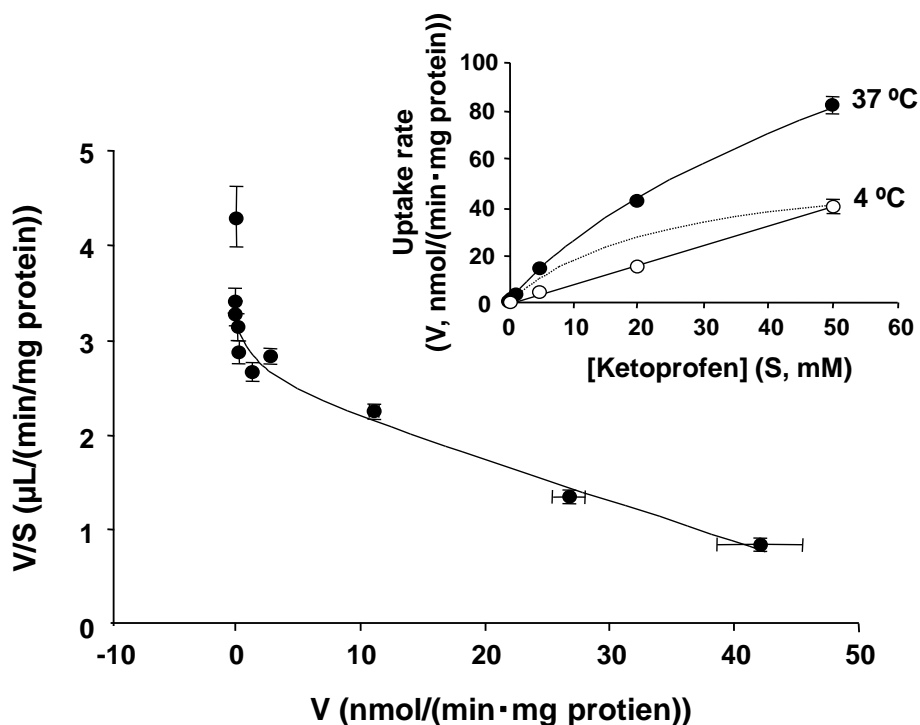


Figure 2-4. Eadie-Scatchard representation of [³H]ketoprofen uptake by the RCECs.

The uptake of ketoprofen by RCECs was examined at different concentrations. The values represent the total uptake (37°C) from which the nonspecific uptake (4°C) was subtracted. Each point represents the mean ± SE (n=4 determinations). The solid line for V was calculated by fitting the data to the Michaelis-Menten equation. S, substrate concentration; V, uptake rate.

RCECs への[³H]ketoprofen 取り込みに対するエネルギー及び各種阻害剤の影響

[³H]Ketoprofen の RCECs への取り込みに関する輸送担体の特性を明らかにするため、エネルギー依存性及び各種阻害剤の影響を評価した (Table 2-1)。[³H]Ketoprofen の RCECs への取り込みは、D-glucose を非代謝性の 3-O-methylglucose (3-O-MG) に置換したとき、1 mM dinitrophenol (DNP) 及び 10 mM アジ化ナトリウムを加えることにより、それぞれ 72% 及び 61% 有意に低下し、エネルギー依存的であることがわかった。

Table 2-1. Effect of metabolic inhibitors on [³H]ketoprofen uptake by RCECs.

Treatment	Relative uptake (% of control)
3-O-MG (-D-glucose) †	87.3 ± 2.1
1 mM DNP + 3-O-MG	27.9 ± 1.6*
10 mM sodium azide + 3-O-MG	39.5 ± 2.5*

After RCECs were pretreated at 37°C for 30 minutes with each compound, the uptake of [³H]ketoprofen (0.3 µM) was measured at 1 minute. Each value represents the mean ± SE (n = 4 determinations). * *p* < 0.001 compared with the control value (Barrett's test). † Upon replacing D-glucose with 3-O-MG, a non-metabolizable sugar analog in the medium.
3-O-MG ; 3-O-methylglucose DNP; dinitrophenol

RCECs への ^3H]ketoprofen 取り込みの pH 依存性及び driving force の評価

RCECs への ^3H]ketoprofen 取り込みへの pH の影響を評価したところ、pH の低下に伴いその取り込みは増加し、pH5.25 では pH7.4 の約 10 倍高い取り込み値を示した。またいずれの pH においても、10 mM 非標識体 ketoprofen の共存により、取り込み量は低下した (Figure 2-5)。

プロトンと共役した輸送担体の関与を調べるため、carbonyl cyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP; protonophore) 及び α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHC; MCT 阻害剤) 及び 4,4'-Diisothiocyano-2,2'-stilbenedisulfonic acid (DIDS; アニオン交換輸送系阻害剤) の阻害効果及びプロトンを Na^+ に置換した時の RCECs への ^3H]ketoprofen 取り込みの影響を評価した。その結果、FCCP 及び CHC 共存下で ^3H]ketoprofen の取り込みは有意に阻害されたが、DIDS 及び Na^+ -free の条件下では影響が認められなかった (Table 2-2)。

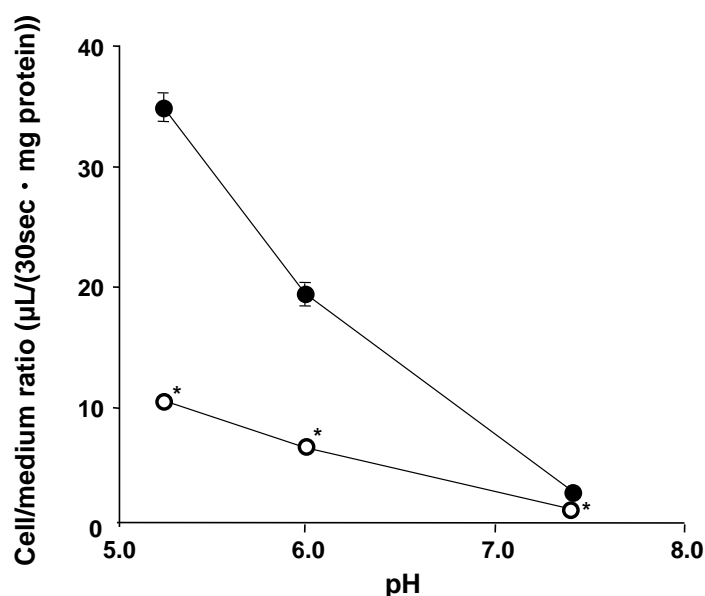


Figure 2-5. pH-dependence of ^3H]ketoprofen uptake by RCECs in the absence (closed circle) and presence (open circle) of unlabeled ketoprofen (10 mM).

The uptake of ^3H]ketoprofen was measured at 37°C by incubating the RCECs in the incubation medium (pH 5.25, 6.0 and 7.4). Each point represents the mean \pm SE (n=4 determinations). * $p < 0.01$ compared with the uptake measured at the same pH condition without unlabeled ketoprofen.

Table 2-2. Effect of ionophore and various inhibitors on [³H]ketoprofen uptake by RCECs.

Treatment	Relative uptake (% of control)
0.05 mM FCCP (pH6.0)	36.1 ± 7.9*
2 mM CHC (pH6.0)	22.9 ± 2.8*
0.1 mM DIDS	91.5 ± 1.4
Na ⁺ -free	95.3 ± 2.2

After RCECs were pretreated at 37 °C for 30 minutes with each compound, the uptake of [³H]ketoprofen (0.3 μM) was measured at 1 minute. Each value represents the mean ± SE (n = 4 determinations). **p* < 0.001 compared with the control value (Barrett's test).

Na⁺-free indicates that NaCl and Na₂HPO₄ in the incubation medium were isotonicly replaced with choline chloride and K₂HPO₄, respectively.

FCCP; carbonyl cyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone, CHC; α-cyano-4-hydroxycinnamic acid, DIDS; 4,4'-Diisothiocyano-2,2'-stilbenedisulfonic acid

RCECs への L-[¹⁴C]lactic acid 取り込みに対する ketoprofen の影響

RCECs への L-[¹⁴C]lactic acid 取り込みに対する 20 mM ketoprofen の阻害効果を Figure 2-6 に示した。Ketoprofen は、L-[¹⁴C]lactic acid 取り込みを競合的に阻害し、K_i 値は、8.64 ± 0.23 mM であった。

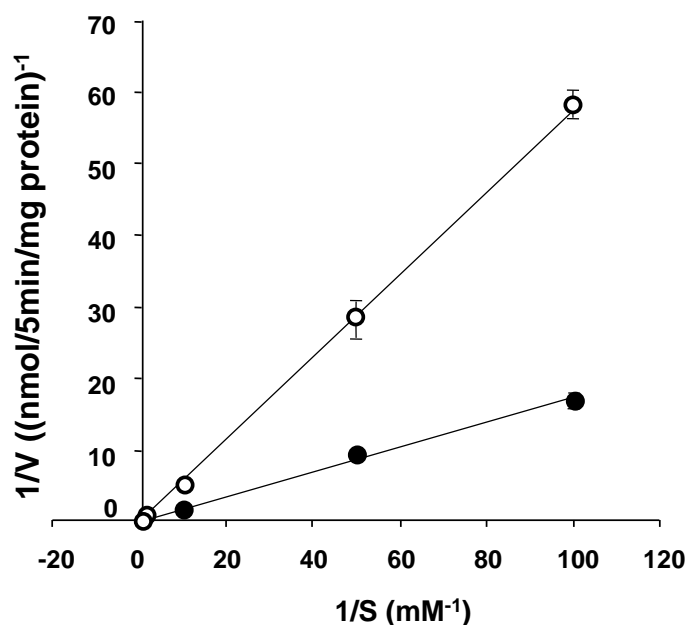


Figure 2-6. Lineweaver-Burk plot of the rate of L-[¹⁴C]lactic acid uptake by RCECs in absence (closed circle) and presence (open circle) of 20 mM ketoprofen.

The initial uptake rate of L-[¹⁴C]lactic acid was measured at 37°C for 5 minutes. Each point represents the mean ± SE (n=4 determinations). The inhibition constant (K_i) of ketoprofen was calculated to be 8.64 mM.

2.2.3 RCECs への³H]ketoprofen 取り込みに対する有機アニオン性化合物の影響

RCECs への³H]ketoprofen 取り込みに対する阻害効果

RCECs への³H]ketoprofen 取り込みに対する有機アニオン性化合物を用いたときの阻害効果を Table 2-3 に示した。³H]Ketoprofen の取り込みは、20 mM モノカルボン酸系化合物 (lactic acid, pyruvic acid, acetic acid, benzoic acid, valproic acid 及び salicylic acid) によって、61~19%減少したが、2 mM では変化がなかった。また、probenecid や、他の NSAIDs (ibuprofen, flurbiprofen 及び indomethacin) は、2 mM 以下の濃度で³H]ketoprofen の取り込みを有意に阻害した。さらに、³H]ketoprofen の取り込みは、oat の基質である PAH によって 21%減少したが、oatp の基質である bromosulfophthalein (BSP) や taurocholic acid では阻害効果は示されなかった。

Table 2-3. Inhibitory effect of various compounds on [³H]ketoprofen uptake by RCECs.

Inhibitor	Conc. (mM)	Relative uptake (% of control)	Conc. (mM)	Relative uptake (% of control)
Lactic acid	20	81.0 ± 1.2*	2	112 ± 5
Pyruvic acid	20	57.5 ± 6.0*	2	105 ± 3
Acetic acid	20	55.8 ± 1.4*	2	125 ± 6
Benzoic acid	20	55.9 ± 1.0*	2	90.5 ± 8.4
Valproic acid	20	37.3 ± 4.9*	2	109 ± 6
Salicylic acid	20	38.6 ± 2.1*	2	86.8 ± 3.1
Probenecid	20	43.0 ± 4.0*	2	60.5 ± 1.9*
Ibuprofen		ND	2	50.1 ± 3.7*
Flurbiprofen		ND	2†	63.5 ± 4.4*
Indomethacin		ND	1	58.0 ± 1.0*
PAH		ND	2	78.8 ± 0.5*
BSP		ND	0.1	119 ± 9
Taurocholic acid		ND	0.1	95.4 ± 2.9

After RCECs were pretreated at 37 °C for 30 minutes with each compound, the uptake of [³H]ketoprofen (0.3 µM) was measured at 1 minute. Each value represents the mean ± SE (n = 4 determinations).

* $p < 0.05$ compared with the control value (Barrett's test). † Flurbiprofen (2 mM) was dissolved in 0.5% ethanol. ND; Not determined, PAH; *p*-aminohippuric acid, BSP; bromosulfophthalein

RCECs への ^3H]ketoprofen 取り込みにおける低親和性過程と高親和性過程の分離

Figure 2-7 に、 ^3H]ketoprofen の RCECs 取り込みに対する 20 mM benzoic acid (A) 及び 1 mM indomethacin (B) の阻害効果を Eadie-Scatchard 解析した結果を示す。20 mM benzoic acid は、 ^3H]ketoprofen の RCECs 取り込みにおける低親和性の過程を阻害し、1 mM indomethacin を共存させると、高親和性の過程が完全に消失した。

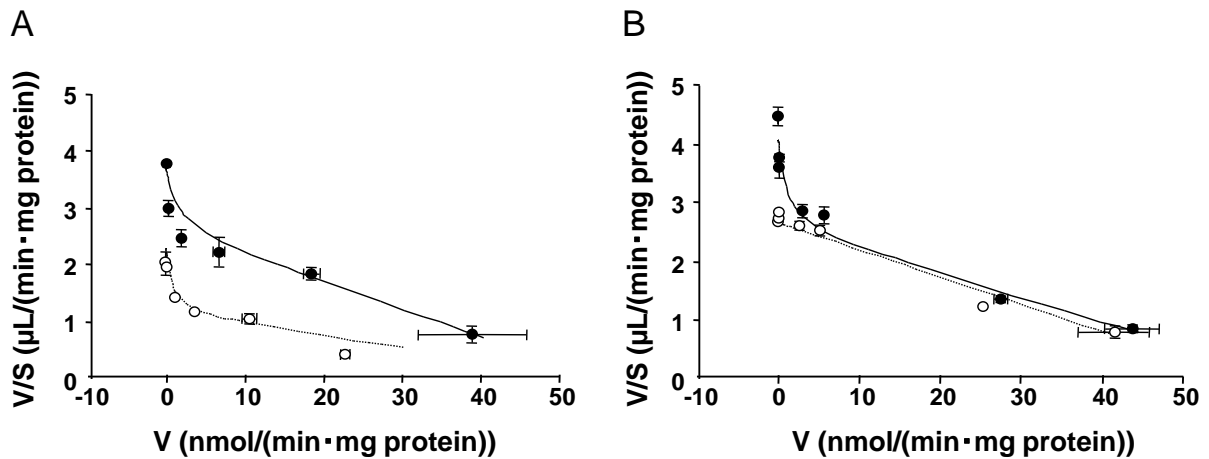


Figure 2-7. Eadie-Scatchard plot of ^3H]ketoprofen uptake by RCECs in the absence (closed circle) and presence (open circle) of inhibitors.

The uptake of ^3H]ketoprofen was examined in the presence of 20 mM benzoic acid (A) and 1 mM indomethacin (B). The dashed lines show the simulation results of competitive inhibition of low- and high-affinity ^3H]ketoprofen uptake by benzoic acid and indomethacin, respectively. Each point represents the mean \pm SE ($n = 4$ determinations).

第3節 考察

本章では、ketoprofen の角膜上皮透過特性を明らかにするため、主に RCECs を用いた透過及び取り込み実験を行った。ウサギ摘出角膜及び RCECs のいずれにおいても ketoprofen は細胞間隙透過マーカーである sucrose より 7~10 倍高い透過性を示したことから (Figure 2-2)、ketoprofen は角膜を経細胞的に透過すると考えられた。

そこで RCECs を用い、ketoprofen の取り込み過程について解析した。その結果、ketoprofen の RCECs への取り込みは、温度依存性 (Figure 2-3)、エネルギー依存性 (Table 2-1) であることがわかった。さらに、ketoprofen の RCECs への取り込みを Eadie-Scatchard plot すると、二相性の濃度依存性であった。Michaelis-Menten 式を用い、非線形最小二乗法による解析を行ったところ、高親和性及び低親和性輸送過程の K_m 値は、それぞれ 0.559 mM 及び 23.8 mM であった (Figure 2-4)。

低親和性の輸送過程については、ketoprofen の RCECs への取り込みは、pH の低下とともに増大し、10 mM ketoprofen 共存によりその取り込み量が低下したこと (Figure 2-5)、protonophore である FCCP、proton-linked MCT 阻害剤である CHC を添加することで ketoprofen の取り込みが阻害されたこと (Table 2-2)、ketoprofen が MCT1 の基質であること (Choi et al., 2005)、RCECs には MCT1 の存在が確認されていること (Kawazu et al., 2013) から、ketoprofen の RCECs への取り込みには MCT1 が関与していると考えられる。Ketoprofen が L-[^{14}C]lactic acid の RCECs への取り込みを競合的に阻害し (Figure 2-6)、その K_i 値 (8.64 mM) が、低親和性の輸送過程から算出した K_m 値 (23.8 mM) と近似したことから、MCT1 の関与が示唆される。Table 2-3 に示すように、モノカルボン酸系化合物 6 種を阻害剤としたときの ketoprofen の RCECs への取り込みを評価したところ、用いた 6 化合物いずれにおいても 20 mM では有意に阻害効果を示し、2 mM では効果がなかった。MCT1 に対する L-lactic acid、pyruvic acid、acetic acid 及び benzoic acid の K_m 値は、それぞれ 3.9 mM (Kawazu et al., 2013)、2.1 mM (Manning Fox et al., 2000)、1.6 mM (Galic et al., 2003) 及び 3.05 mM (Tamai et al., 1999) と報告されており、これら化合物が ketoprofen の MCT1 を介した取り込みを阻害したと考えると、2 mM では阻害効果を示さず、20 mM でのみ有意な阻害を示したことは妥当である。MCT1 の基質である valproic acid 及び salicylic acid (Tamai et al., 1999) は、L-lactic acid の取り込みを 1 mM よりも 10 mM で強く阻害すること (Emoto et al., 2002) から、ketoprofen の低親和性の輸送過程が MCT1 であるとすれば、両化合物が高濃度でのみ ketoprofen の RCECs への取り込みを阻害したことが説明できる。さらに ketoprofen の RCECs への取り込みに対して、20 mM benzoic acid の阻害効果を Eadie-Scatchard 解析したところ、低親和性の過程のみを阻害

した(Figure 2-7)ことから、RCECs における ketoprofen の低親和性輸送過程には、MCT1 が関与していると考えられる。

一方、ketoprofen の高親和性の輸送過程は、1 mM indomethacin によって完全に消失し(Figure 2-7)、NSAIDs (ibuprofen、flurbiprofen、indomethacin)、oat の基質である PAH、oat 及び oatp の阻害剤である probenecid によって阻害されたが、oatp の阻害剤である BSP、oatp の基質であるタウロコール酸では阻害が認められなかった(Table 2-3)。Indomethacin は、ラット oat2 の基質であり(Morita et al., 2001)、flurbiprofen はマウス oat2 の基質である(Ito et al., 2007)。また ibuprofen は oat2 を介した salicylic acid の取り込みを阻害する(Morita et al., 2001)との報告があることから、RCECs への ketoprofen の取り込みには、oat families が関わっている可能性が高いと考えられる。

Ketoprofen の oat families への関与について、ラットへパトサイトへの ketoprofen の取り込みは二相性を示し、oat2 と oat3 もしくは oatp に認識される(Morita et al., 2005)こと、ラット oat2 発現細胞を用いた評価では、salicylic acid の取り込みを ketoprofen が阻害する(Morita et al., 2001)こと、また Ohtsuki らは、oat3 発現 oocyte への indoxyl sulfate の取り込みを ketoprofen が阻害することを報告している(Ohtsuki et al., 2002)。ヒト角膜上皮には OAT2 が存在し(Dahlin et al., 2013)、ラット角膜には oat1 は存在せず、oat3 は角膜内皮にのみ存在するとの報告がある(Li et al., 2012)。ウサギ角膜及び RCECs において、oat families の発現に関する報告はなく、今後、さらに検討が必要ではあるが、ketoprofen の高親和性の輸送過程には、oat2 が関与している可能性が高いと考えられた。

以上、本章での結果より、ketoprofen は輸送担体を介して、ウサギ角膜上皮細胞に取り込まれていることが明らかとなった。その輸送は、pH、温度、エネルギー、濃度依存的であり、低親和性と高親和性の輸送過程が存在することが示された。このうち、低親和性の輸送過程には MCT1 が関与することが示唆され、高親和性の過程には oat2 が関わる可能性が高いと考えられた。

第3章 血液眼関門を介した薬物輸送における P-glycoprotein の関与

第1節 序論

全身循環血から後眼部への薬物移行は、BAB 及び BRB によって制限され、非常に低いことを第 1 章にて述べた。一般的に、受動拡散で生体膜を透過する化合物群の脂溶性と BAB 及び BRB の薬物透過性については、BAB では脂溶性に関わらずほぼ一定の透過性を示すが、BRB では BBB と同様、脂溶性の増加に伴い、網膜への薬物透過性が増大することが報告されている。BAB では、脂溶性が高くなり過ぎると房水に分配しないため、見かけ上一定の透過性を示すと考えられる。しかし、P-gp 基質では、BAB、BRB において、脂溶性から予測される透過性よりも低い値を示すことから、BAB、BRB においても P-gp が機能していることが示唆されている(Hosoya et al., 2010; Toda et al., 2011)。

P-gp は、ABC トランスポーターの一つであり、ATP を駆動力として、様々な化合物を細胞内から細胞外へと輸送する異物除去を担う膜タンパクである。P-gp は広い基質認識性を持ち、BBB、胎盤、肝臓、腎臓、小腸等に発現し、薬物の吸収、分布、排泄に関わることが知られている。BAB を構成する虹彩血管内皮細胞及び NPE にも発現が認められ(Wu et al., 1996; Schlingemann et al., 1998)、inner BRB の luminal 側(Hosoya and Tomi, 2005)、outer BRB の apical、basal の両側に発現している(Kennedy and Mangini, 2002)。

これまでに BRB における P-gp の寄与は、BBB よりも低いことが示唆されているが(Hosoya et al., 2010; Toda et al., 2011)、その程度については明らかではない。BRB と BBB で P-gp の機能が異なるなら、中枢性副作用を回避し、眼組織への移行性を増加させることが可能になると考えられる。P-gp は広い基質認識性を持つが、P-gp の基質は同時に様々なトランスポーターにも認識される場合が多いこと、BAB、BRB とともにそれぞれ 2 種類の細胞から形成され、P-gp の発現部位が複数あることから、in vivo でその寄与率を見積もることは難しい。そこで、本章ではラット P-gp をコードする遺伝子の一つ *mdr1a* をノックアウトした、*mdr1a* knockout ラットを用いて、P-gp の基質である digoxin、quinidine 及び verapamil (Figure 3-1) の BAB 及び BRB を介した房水及び網膜への取り込みを、BBB を介した脳への取り込みと比較するため、aqueous humor uptake index (AHUI)、retinal uptake index (RUI) 及び brain uptake index (BUI) を指標に解析した。さらに integration plot 法を用いて得た *mdr1a* knockout ラット及び wild-type ラットにおける verapamil の房水、網膜及び脳への取り込みクリアランスから、P-gp 寄与率を評価した。

なお、ラット P-gp は、*mdr1a* 及び *mdr1b* 遺伝子にコードされているが、inner BRB 及び BBB では *mdr1b* に比べて *mdr1a* が優位に発現し(Regina et al., 1998; Tomi and Hosoya,

2004)、mdr1a knockout ラットの脳、小腸、腎臓では、mdr1a の発現が wild-type ラットの 8-23 倍低減し、mdr1b の発現が増加していないことが確認されている (Zamek-Gliszczynski et al., 2012; Zamek-Gliszczynski et al., 2013)。したがって、本研究の目的を明らかにするために mdr1a knockout ラットは適したモデルであると考えた。

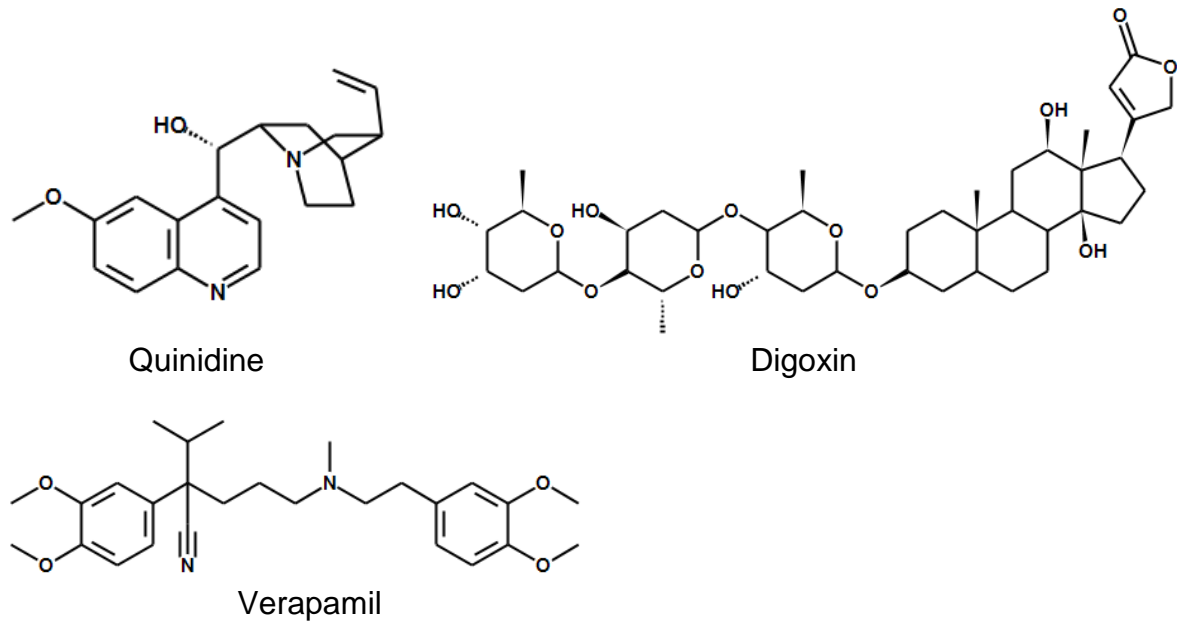


Figure 3-1. Structure of quinidine, digoxin and verapamil.

第2節 結果

3.2.1 Wild-type ラットから単離した RPE 細胞における mdr1a 及び mdr1b の mRNA 発現解析

Wild-type ラット単離 RPE 細胞における mdr1a および mdr1b の mRNA 発現を RT-PCR 法を用いて解析した (Figure 3-2)。その結果、ラット単離 RPE 細胞において、mdr1b に比べ、mdr1a の mRNA が優位に発現していた。

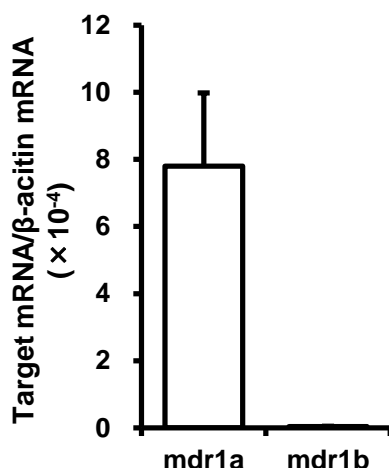


Figure 3-2. Quantitative real-time RT-PCR analysis of mdr1a and mdr1b in freshly isolated rat retinal pigment epithelial cells.

Each column represents the mean ± SE (n=3 measurements).

3.2.2 Wild-type と mdr1a knockout ラットを用いた AHUI、RUI 及び BUI の比較

BAB、BRB 及び BBB を介した房水、網膜及び脳への取り込みを AHUI、RUI 及び BUI を指標に評価した。Figure 3-1 に、AHUI、RUI 及び BUI と Log D の関係を示す。Mdr1a knockout ラットにおける生体膜を受動拡散によって透過する化合物 (D-mannitol、thiourea 及び progesterone; Table 3-1) の AHUI、RUI 及び BUI は、wild-type ラットと同様の値を示し、mdr1a knockout による膜透過への影響は認められなかった。いずれのラットにおいても、網膜、脳では脂溶性の増大に伴い UI 値も増加し、房水では脂溶性の大小に関わらず UI 値は一定であった。

P-gp 基質である quinidine、digoxin 及び verapamil の房水及び脳への取り込みは、wild-type ラットに比べて mdr1a knockout ラットで高い値を示した。しかし網膜への取り込みは、digoxin は mdr1a knockout ラットで高い値を示したが、quinidine 及び verapamil では両ラットに差がなかった。

Table 3-1. Classification and Log D_{7.4} of the tested compounds.

Classification	Compounds	Log D _{7.4} ^a
Passive diffusion	D-Mannitol	-3.26
	Thiourea	-1.02
	Progesterone	3.83
Active transport	Quinidine	0.98
	Digoxin	1.29
	Verapamil	2.46

^a The Log D_{7.4} value of each compound was calculated using Log D version 12.0 (Advanced Chemistry Development, Inc.).

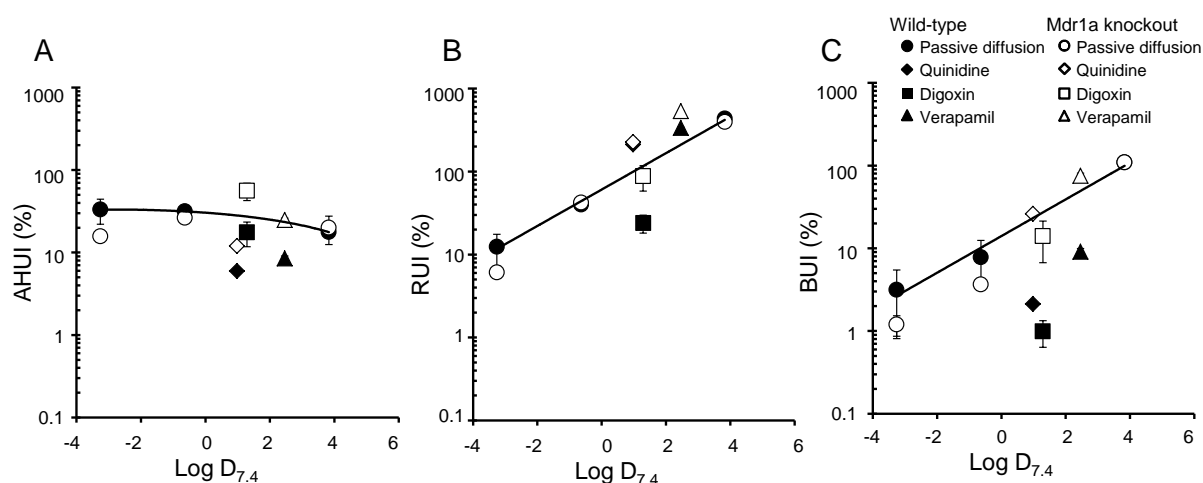


Figure 3-1. Correlation of the aqueous humor uptake index (AHUI, A), retinal uptake index (RUI, B), and brain uptake index (BUI, C) with Log D_{7.4} for tested compounds (Table 3-1) in wild-type (closed symbols) and mdr1a knockout rats (open symbols).

The Log D_{7.4} value of each compound was calculated using Log D version 12.0 (Advanced Chemistry Development, Inc.). The line represents the lipophilicity trend line in wild-type rats using the data of D-mannitol, thiourea, and progesterone, which are expected to permeate by passive diffusion. The line represents the quadric regression curve (A) or the linear regression curve (B, C) by the linear least-squares methods for the three compounds (passive diffusion; Table 3-1) in wild-type rats. $AHUI = 1.22 \times (\text{Log } D_{7.4})^2 - 1.48 \times \text{Log } D_{7.4} + 41.2$ ($r^2=1.00$) (A), $RUI = 69.4 \times \exp(0.493 \times \text{Log } D_{7.4})$ ($r^2=0.993$) (B), and $BUI = 16.9 \times \exp(0.496 \times \text{Log } D_{7.4})$ ($r^2=0.998$) (C). Points represent mean \pm SE (n=3–6 rats).

3.2.3 Wild-type と mdr1a knockout ラットを用いた verapamil の取り込みクリアランスの算出

[³H]Verapamil を各ラットに静脈内投与したとき、循環血液から網膜、房水及び脳への [³H]verapamil の移行性を in vivo integration plot 法を用いて解析した。結果を Figure 3-2 に、算出したパラメータを Table 3-2 示した。

Wild-type ラット及び mdr1a knockout ラットにおける $[^3\text{H}]$ verapamil の循環血液から網膜への見かけの透過クリアランス($K_{in, \text{retina}}$)は、 0.824 ± 0.201 及び 0.849 ± 0.980 mL/(min \cdot g retina)であり、両者に差はなかった。Mdr1a knockout ラットにおける $[^3\text{H}]$ verapamil の房水への見かけの透過クリアランス($K_{in, \text{aqueous humor}}$)は 0.0065 ± 0.0013 mL/(min \cdot g aqueous humor)、脳への見かけの透過クリアランス($K_{in, \text{brain}}$)は 1.73 ± 0.09 mL/(min \cdot g brain)となり、それぞれ wild-type ラットの約 3 倍及び 12 倍高い値を示した。

Wild-type ラット及び mdr1a knockout ラットを用いて求めた取り込みクリアランスから、verapamil の BRB 透過における P-gp の寄与率を算出すると 3.0%であった。同様に求めた BAB 及び BBB での P-gp 寄与率は、66.1%及び 91.9%であった。

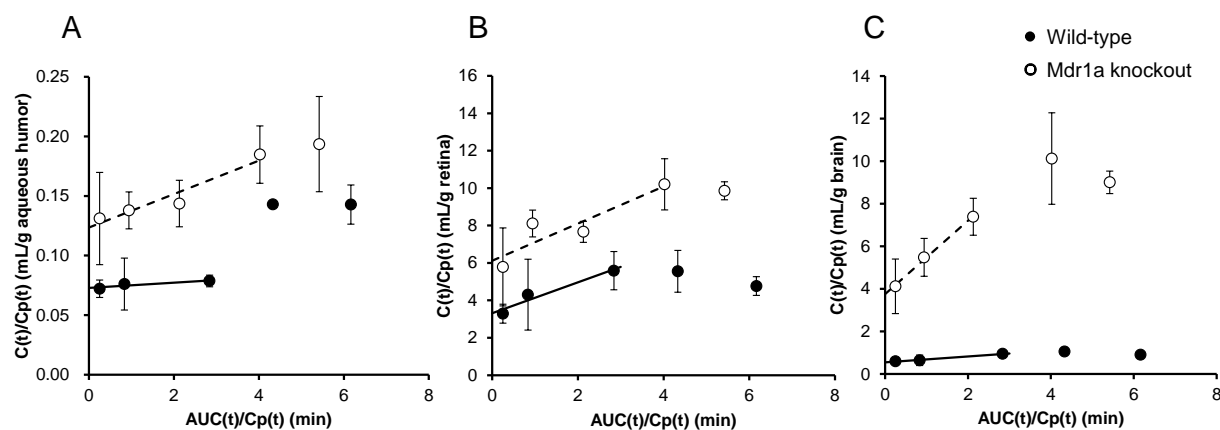


Figure 3-2. The initial uptake of $[^3\text{H}]$ verapamil by the aqueous humor (A), retina (B), and brain (C) in wild-type (closed circles) and mdr1a knockout rats (open circles).

In the integration plot analysis, $[^3\text{H}]$ verapamil was injected into the femoral vein. Points represent mean \pm SE ($n=3$ rats). The line represents the regression line using the initial tissue uptake data in wild-type (solid line) and mdr1a knockout rats (dashed line). The slope represents the apparent influx permeability clearance (K_{in}).

Table 3-2. The apparent influx permeability clearance (K_{in}) per gram of rat tissue of $[^3\text{H}]$ verapamil and the contribution ratio of P-gp to tissue uptake.

	K_{in} mL/(min \cdot g tissue)	V_i mL/(g tissue)	Contribution of P-gp(%)
<u>Wild-type</u>			
Aqueous humor	0.0022 ± 0.0010	0.0728 ± 0.0017	66.1
Retina	0.824 ± 0.201	3.32 ± 0.34	3.0
Brain	0.140 ± 0.012	0.542 ± 0.020	91.9
<u>Mdr1a knockout</u>			
Aqueous humor	$0.0065 \pm 0.0013^*$	$0.130 \pm 0.001^*$	-
Retina	0.849 ± 0.980	$6.25 \pm 1.32^*$	-
Brain	$1.73 \pm 0.09^*$	$3.75 \pm 0.13^*$	-

* $p<0.05$, significantly different from wild-type rats.

3.2.4 Quinidine、digoxin 及び verapamil の組織取り込みに対する阻害剤の影響

Quinidine、digoxin 及び verapamil の AHUI、RUI 及び BUI に対する各種阻害剤の影響を検討した結果を Table 3-3 及び Figure 3-3 に示す。

Wild-type ラットを用いて評価したとき、 ^3H quinidine の房水及び脳への取り込みは、10 mM quinidine の添加によって、コントロールよりもそれぞれ約 2 倍及び 8.6 倍有意に増加し、3 mM verapamil の添加によって、それぞれ 2.4 倍及び 6.2 倍有意に増加したが、網膜への取り込みは変化しなかった。同様に、 ^3H verapamil の房水及び脳への取り込みは、1 mM vinblastine の添加によって、コントロールよりもそれぞれ 1.9 倍及び 4.7 倍有意に増加し、3 mM verapamil の添加によって、それぞれ 2.7 倍及び 8.6 倍有意に増加したが、網膜への取り込みには影響しなかった。また、0.01 mM digoxin 及び 3 mM verapamil は、 ^3H digoxin の AHUI、RUI 及び BUI を変化させなかった。

Mdr1a knockout ラットを用いて評価したとき、 ^3H quinidine の房水、網膜及び脳への取り込みは、3 mM verapamil の添加によって、それぞれ 26.4%、37.4%及び 52.6%有意に減少した。 ^3H Digoxin の AHUI、RUI 及び BUI は、0.01 mM digoxin 及び 3 mM verapamil の添加によって、70%以上減少した。 ^3H Verapamil の網膜への取り込みは、1 mM vinblastine 及び 3 mM verapamil の添加によって、32.4%及び 29.3%有意に減少し、房水への取り込みも 1 mM vinblastine を共存させることで、46%有意に減少した。しかし、これら阻害剤は ^3H verapamil の BUI には影響しなかった。

Table 3-3. The effect of P-gp inhibitors on the aqueous humor, retinal, and brain uptake index for [³H]quinidine, [³H]digoxin, and [³H]verapamil in wild-type and mdr1a knockout rats.

	Inhibitor	Uptake index (%)		
		Aqueous humor	Retina	Brain
<u>Wild-type</u>				
Quinidine	Control	5.95 ± 0.38	212 ± 13	2.12 ± 0.12
	10 mM quinidine	11.7 ± 0.6*	187 ± 22	18.2 ± 1.2*
	3 mM verapamil	14.2 ± 3.5*	180 ± 12	13.2 ± 3.2*
Digoxin	Control	17.5 ± 5.8	24.0 ± 5.8	0.987 ± 0.350
	0.01 mM digoxin	15.8 ± 3.5	26.3 ± 5.7	1.18 ± 0.20
	3 mM verapamil	9.48 ± 0.55	27.9 ± 5.7	0.969 ± 0.045
Verapamil	Control	8.46 ± 0.61	336 ± 7	9.07 ± 0.89
	1 mM vinblastine	15.7 ± 1.0*	327 ± 35	42.5 ± 4.8*
	3 mM verapamil	23.1 ± 6.4*	439 ± 57	77.7 ± 7.2*
<u>Mdr1a knockout</u>				
Quinidine	Control	12.0 ± 0.6 [†]	227 ± 25	26.1 ± 2.4 [†]
	10 mM quinidine	12.5 ± 0.7	182 ± 24	21.6 ± 0.6
	3 mM verapamil	8.83 ± 0.40*	142 ± 5*	12.4 ± 1.7*
Digoxin	Control	55.9 ± 13.2 [†]	88.0 ± 29.7 [†]	14.0 ± 7.3 [†]
	0.01 mM digoxin	11.0 ± 0.5*	18.8 ± 3.1*	1.83 ± 0.07*
	3 mM verapamil	10.3 ± 1.1*	27.0 ± 3.2*	1.68 ± 0.07*
Verapamil	Control	24.8 ± 1.4 [†]	536 ± 6 [†]	75.0 ± 5.8 [†]
	1 mM vinblastine	13.4 ± 0.5*	362 ± 53*	74.0 ± 8.3
	3 mM verapamil	21.0 ± 2.4	379 ± 18*	75.5 ± 6.3

[³H]Quinidine, [³H]digoxin, and [³H]verapamil with [¹⁴C]*n*-butanol as the highly diffusible reference were injected into the internal carotid artery in the absence (control) or presence of inhibitors. Values represent mean ± SE (n=3–6 rats). **p*<0.05, significantly different from each control. [†]*p*<0.05, significantly different from wild-type rats.

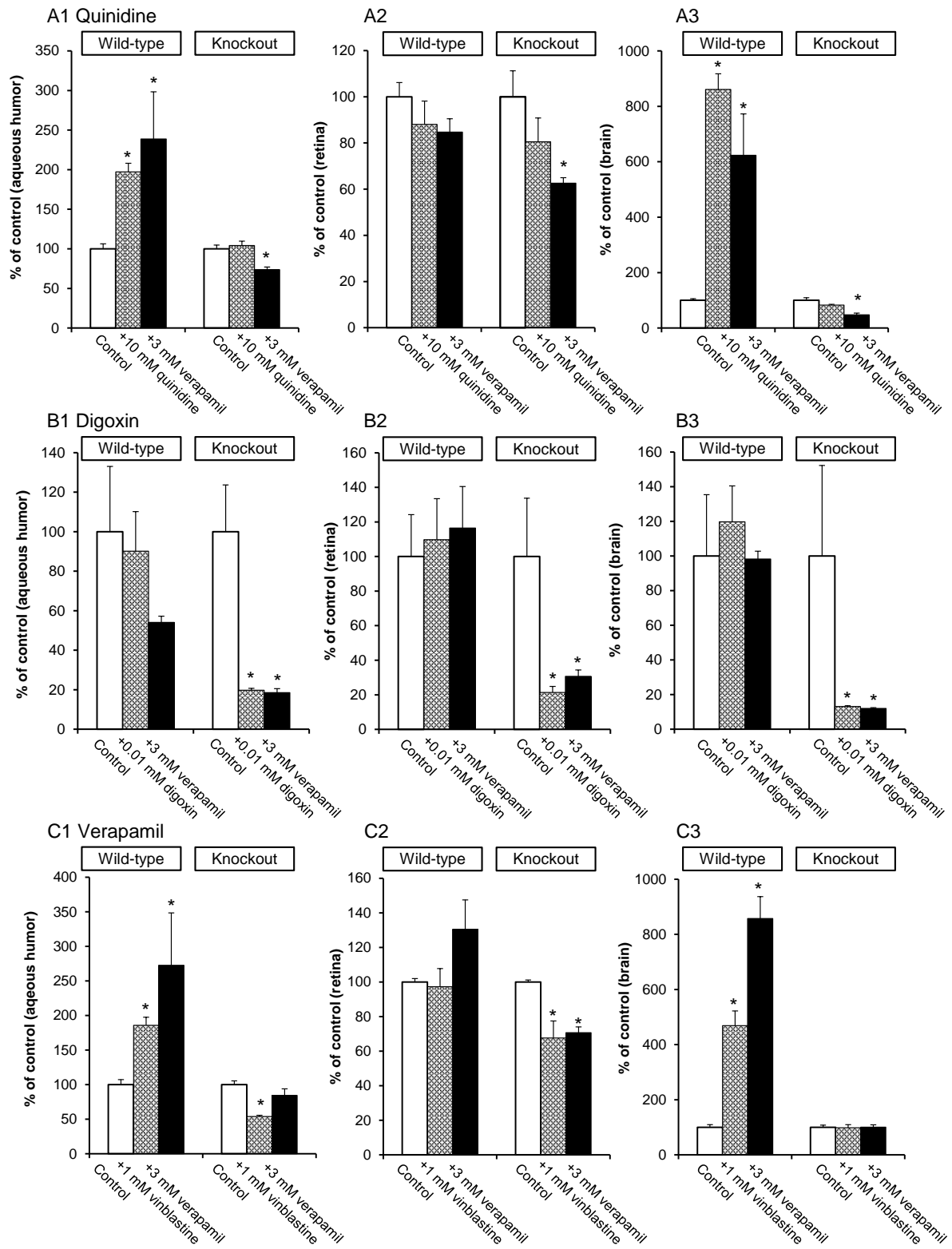


Figure 3-3. The effect of P-gp inhibitors on the AHUI, RUI, and BUI for [³H]quinidine (A1–A3), [³H]digoxin (B1–B3), and [³H]verapamil (C1–C3) in wild-type and mdr1a knockout rats.

Percentage of control was calculated from data in Table3-3. Values represent mean ± SE (n=3–6 rats). **p* < 0.05, significantly different from each control.

第3節 考察

本章では、UI 法を用い、P-gp 基質である quinidine、digoxin 及び verapamil の房水、網膜及び脳への取り込みを mdr1a knockout ラットと wild-type ラットによって評価することで、BAB、BRB 及び BBB を介した薬物透過における P-gp の関与を解析した。

ラット P-gp は、mdr1a 及び mdr1b 遺伝子にコードされるが、inner BRB 及び BBB では mdr1b に比べて mdr1a が優位に発現し(Regina et al., 1998; Tomi and Hosoya, 2004)、Figure 3-2 に示すように、outer BRB でも mdr1a が優位であった。Mdr1a knockout ラットの脳、小腸、腎臓では、mdr1a の発現が wild-type ラットの 8-23 倍低減し、mdr1b の発現が増加していないことが確認されている (Zamek-Gliszczyński et al., 2012; Zamek-Gliszczyński et al., 2013)。また、本章で用いた P-gp 基質である quinidine、digoxin 及び verapamil は mdr1a、mdr1b ともに基質として認識される(Takeuchi et al., 2006)ことから、mdr1a knockout rat を用いて、P-gp 寄与率を評価することは妥当であると考えられる。

生体膜を受動拡散で透過する化合物では、mdr1a knockout ラットにおける各 UI 値は、wild-type ラットと同程度であった。また wild-type ラットにおける RUI 及び BUI は、脂溶性の増大とともに増加し、AHUI は脂溶性に関わらずほぼ一定の値を示し(Figure 3-1)、過去の報告(Hosoya et al., 2010; Toda et al., 2011)と一致した。Quinidine 及び verapamil の RUI は、wild-type ラットと mdr1a knockout ラットでほぼ一致し、 $\text{LogD}_{7.4}$ から予測される値よりも高いこと(Figure 3-1)から、両化合物の BRB を介した透過には P-gp の影響が小さいこと、排出過程よりも取り込み過程の関与が大きいことが示唆された。さらに、wild-type ラットと mdr1a knockout ラットの verapamil の網膜への取り込みクリアランスから算出した P-gp の寄与率が 3%と BAB での寄与率(66%)、BBB での寄与率(92%)と比べて非常に小さいことが明らかとなり(Table 3-2)、過去の結果(Hosoya et al., 2010; Toda et al., 2011)を支持した。

Mdr1a knockout ラットを用いた digoxin の RUI、BUI は、0.01 mM digoxin あるいは 3 mM verapamil の存在下で有意に低下し、influx 輸送担体の関与が示唆された。Digoxin は、oatp1a4 の基質であり、ラット脳に oatp1a4 を介して取り込まれることが報告されている (Noe et al., 1997)。Oatp1a4 は、ラット脳毛細血管内皮細胞及び inner BRB の apical 及び basal 側(Gao et al., 1999; Akanuma et al., 2013)、ラット RPE の apical 側に存在し(Gao et al., 2002; Akanuma et al., 2013)、oatp1a4 発現 LLC-PK 細胞を用いた検討により、verapamil が digoxin の取り込みを阻害することが報告されている(Shitara et al., 2002)。したがって、digoxin は oatp1a4 を介して網膜に取り込まれるものと考えられた。なお、wild-type ラットを用いた阻害実験で、digoxin の取り込み値が変化しなかったのは、0.01

mM digoxin あるいは 3 mM verapamil が、P-gp 及び influx 輸送担体の両方を阻害したためと考えられる。

Mdr1a knockout ラットを用いた quinidine の RUI、BUI は、3 mM verapamil の共存により、有意に減少したことから、quinidine の網膜及び脳への取り込みには influx に働く輸送担体が関与しており、その寄与率は少なくとも約 20%と考えられた。Quinidine 及び verapamil は、OCTN1 及び OCTN2 の基質であり(Ohashi et al., 1999; Yabuuchi et al., 1999)、両輸送担体は BRB 及び BBB に発現することが確認されている(Kido et al., 2001; Tachikawa et al., 2010)。したがって、quinidine が認識される influx トランスポーターは OCTN1 あるいは OCTN2 と推察される。

Mdr1a knockout ラットを用いた verapamil の RUI は、1 mM vinblastine もしくは 3 mM verapamil の共存により、有意に低い値を示したが、BUI は変化しなかった。これまでに、verapamil の取り込み過程には、inner 及び outer BRB の両方で OCTN1 や OCTN2 とは異なる新規 influx トランスポーターが関与することが示唆されており(Han et al., 2001; Kubo et al., 2013)、本結果からも、BRB には、BBB には存在しない verapamil を取り込み方向に輸送するトランスポーターが存在することが明らかとなった。

以上、本章での結果より、BAB 及び BRB において P-gp が機能していること、BRB での P-gp 寄与率は BBB に比べて低い場合があること、両関門には influx 方向に働く輸送担体が存在することが明らかとなった。また、verapamil を認識する influx トランスポーターの機能は、BRB と BBB で明確に異なることが示唆された。

第4章 血液網膜関門における pravastatin の輸送機構の評価

第1節 序論

スタチンは、hydroxymethylglutaryl-CoA (HMG-CoA) 還元酵素を阻害し、血中コレステロール及び低比重リポタンパク質を低下させる高脂血症治療薬である。近年、コレステロール低下に依存せず、血管内皮細胞に直接作用し、血管拡張作用を持つ一酸化窒素の合成酵素 (endothelial NO synthase; eNOS) の活性化、血管収縮作用を持つエンドセリン-1 発現の抑制などにより血行動態を改善することが報告されている(Hernandez-Perera et al., 1998; Greenwood and Mason, 2007)。

眼科領域でも、ラット虚血再灌流モデル(Honjo et al., 2002)及び streptozotocin (STZ) 誘発糖尿病モデルにおいて、スタチンが白血球の血管内皮への接着を抑制すること(Miyahara et al., 2004)、STZ 誘発糖尿病モデルにおいて、スタチンが BRB の血管透過性亢進を抑制すること(Mooradian et al., 2005)から、スタチンは網膜でも循環障害改善作用を発揮することが示唆されている。また、スタチンは糖尿病網膜症患者において網膜循環を改善するだけでなく(Ozkiris et al., 2007)、健常人においても網膜血流を増加させることが報告されており(Nagaoka et al., 2006)、その作用機序の一つとして、スタチンが網膜血管に直接作用することで、一酸化窒素が関与する血管拡張が引き起こされると考えられている(Nagaoka et al., 2007)。

スタチンの一つである pravastatin は、臨床において他のスタチンで認められている中枢性の副作用がなく、糖尿病網膜症を改善することが報告されている(Gordon et al., 1991; Saheki et al., 1994)。Pravastatin は、cultured bovine aortic endothelial cells において eNOS を活性化させ(Kaesemeyer et al., 1999)、高脂血症患者において、eNOS 阻害剤が網膜血流を減少させる反応を増強する(Bayerle-Eder et al., 2002)との報告があることから、pravastatin が網膜内皮細胞に直接作用した結果、糖尿病網膜症が改善されたと考えられる。

Pravastatin は、oatp1a4 の基質であると同時に、oat3 に認識される(Kikuchi et al., 2004)。Oarp1a4 は、ラット inner BRB の luminal および abluminal 側に存在し、RPE 細胞の apical 側にも確認されている(Akanuma et al., 2013)。また oat3 は、inner BRB の abluminal 側だけに存在し、RPE 細胞での存在は確認されていない(Hosoya et al., 2009)。両輸送担体の BBB での局在は BRB と類似し、oatp1a4 はラット脳毛細血管内皮細胞の luminal 及び abluminal 側に(Gao et al., 1999)、oat3 は abluminal 側にのみ存在する(Kusuhara and Sugiyama, 2004)。

これまでに、pravastatin は oatp1a4 及び oat3 の両方に認識されてラット脳から排出され、排出クリアランスは取り込みクリアランスに比べて、約 3 倍高いことが報告されている (Kikuchi et al., 2004)。また、oatp1a4 及び oat3 の基質である estradiol 17- β glucuronide (E17 β G) のラット脳からの消失には、oatp1a4 及び oat3 を含む oat families が関与することが示唆されている (Sugiyama et al., 2001)。さらに、E17 β G のラット脳硝子体からの消失について、microdialysis 法による評価の結果、硝子体に投与された E17 β G の一部は、BRB に存在する oatp1a4 を介して消失することが報告されており (Katayama et al., 2006)、BRB 及び BBB において、oatp1a4 は排出方向に働くと考えられている。しかし、第 3 章に述べた mdrla knockout ラットを用いた結果から、digoxin は oatp1a4 を介して網膜に取り込まれている可能性を示唆している。

そこで、本章では、oatp1a4 及び oat3 の基質である pravastatin を用いて、BRB における取り込み及び排出機構の解明を試みた。BRB の取り込み過程については、pravastatin と同様 oatp1a4 及び oat3 の基質であり、すでに BRB を介した硝子体からの消失について報告されている E17 β G をモデル化合物として選択した (Figure 4-1)。

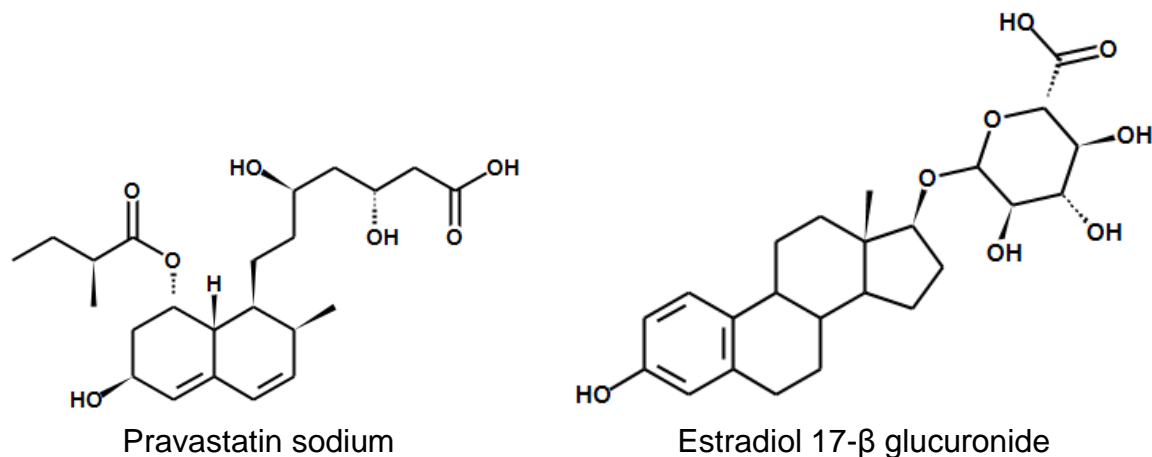


Figure 4-1. Structure of pravastatin and estradiol 17- β glucuronide (E17 β G)

第2節 結果

4.2.1 BRB 及び BBB を介した pravastatin 循環血液から組織への取り込み過程に関する評価

Figure 4-2 に、RUI 及び BUI と Log D の関係を示す。Mdr1a knockout ラットを用いて得られた pravastatin 及び E17βG の RUI 及び BUI と、wild-type ラットを用いて得られた値に差はなかった。しかし、生体膜を受動拡散によって透過する化合物 (D-mannitol, thiourea 及び progesterone; Table 3-1) から得た、脂溶性と UI 値の関係から予測される RUI 及び BUI よりも、pravastatin 及び E17βG の実測値は低い値を示した。

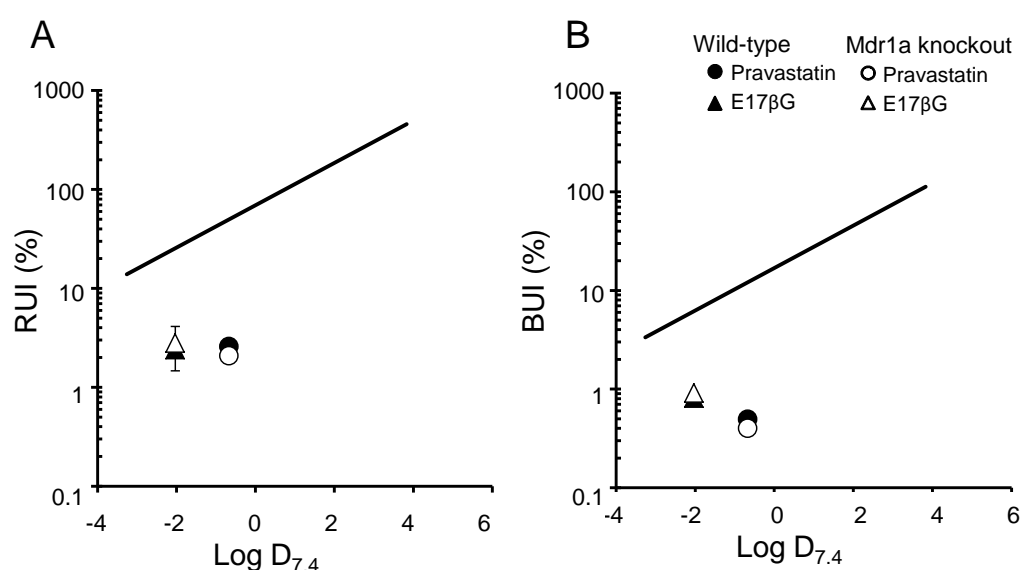


Figure 4-2. Correlation of the retinal uptake index (RUI, A) and brain uptake index (BUI, B) with the Log D_{7.4} of pravastatin (Log D_{7.4}: -0.67) and E17βG (Log D_{7.4}: -2.03) in wild-type (closed symbols) and mdr1a knockout (open symbols) rats.

The Log D_{7.4} value of each compound was calculated using ACD/Percepta (Advanced Chemistry Development). The line represents the lipophilicity trend line in wild-type rats using the data of D-mannitol, thiourea, and progesterone, which are expected to permeate by passive diffusion. The line represents the linear regression curve according to the linear least-squares methods for the three compounds in wild-type rats. RUI = 69.4 × exp (0.493 × Log D_{7.4}) (r² = 0.993) (A) and BUI = 16.9 × exp (0.496 × Log D_{7.4}) (r² = 0.998) (B) (referred from previous chapter). Points represent mean ± SE (n = 3 rats).

Pravastatin 及び E17βG の網膜及び脳への取り込みに対する各種阻害剤の影響を検討した結果を Table 4-1 に示す。[³H]Pravastatin の網膜への取り込みは、40 mM pravastatin、0.01 mM digoxin 及び 1 mM provenecid の添加によって、それぞれ 47%、53%及び 47%、脳への取り込みは、46%、54%及び 58%有意に減少した。[³H]E17βG の網膜への取り込みは、0.01 mM digoxin 及び 1 mM provenecid の添加によって、それぞれ 40%及び 48%有意に減少したが、脳への取り込みには影響を与えなかった。

Table 4-1. The effect of compounds on the retinal and brain uptake index for [³H]pravastatin and [³H]E17βG in wild-type rats.

Inhibitor	Uptake index (%)		Percentage of control (%)	
	Retina	Brain	Retina	Brain
[³ H]Pravastatin uptake				
Control	2.58 ± 0.52	0.485 ± 0.031	100 ± 20	100 ± 6
40 mM pravastatin	1.38 ± 0.22*	0.263 ± 0.024**	53.4 ± 8.4	54.2 ± 5.0
0.01 mM digoxin	1.20 ± 0.24*	0.224 ± 0.024**	46.6 ± 9.2	46.1 ± 4.9
0.3 mM E17βG	1.21 ± 0.16*	0.361 ± 0.079	46.8 ± 6.1	74.5 ± 16.2
1 mM probenecid	1.36 ± 0.14*	0.204 ± 0.025**	52.8 ± 5.4	42.1 ± 5.2
[³ H]E17βG uptake				
Control	2.40 ± 0.03	0.808 ± 0.158	100 ± 1	100 ± 20
40 mM pravastatin	1.68 ± 0.33	0.688 ± 0.059	69.8 ± 13.6	85.2 ± 7.2
0.01 mM digoxin	1.45 ± 0.19*	0.646 ± 0.048	60.2 ± 8.1	80.0 ± 5.9
1 mM probenecid	1.24 ± 0.16**	0.664 ± 0.060	51.8 ± 6.8	82.2 ± 7.5

[³H]Pravastatin (10 μCi/rat), with [¹⁴C]*n*-butanol (0.1 μCi/rat) as the highly diffusible reference, injected into the internal carotid artery in the absence (control) and presence of inhibitors. Values represent mean ± SE (n = 3 or 4 rats). **p* < 0.05 and ***p* < 0.01, significantly different from the control. E17βG, estradiol 17-β glucuronide.

4.2.2 BRB を介した pravastatin の硝子体からの消失過程に関する評価

[³H]Pravastatin を bulk flow マーカーである [¹⁴C]D-mannitol と同時にラット硝子体内に投与し、硝子体からの消失を microdialysis 法を用いて評価した。両化合物は、硝子体から指数関数的に消失し (Figure 4-3 A)、最終消失相から求めた [³H]pravastatin の消失速度定数 (β; 0.0179 ± 0.001 min⁻¹) は、 [¹⁴C]D-mannitol (0.0107 ± 0.0005 min⁻¹) に比べて、約 1.66 倍有意に高い値を示した (Figure 4-3 B)。

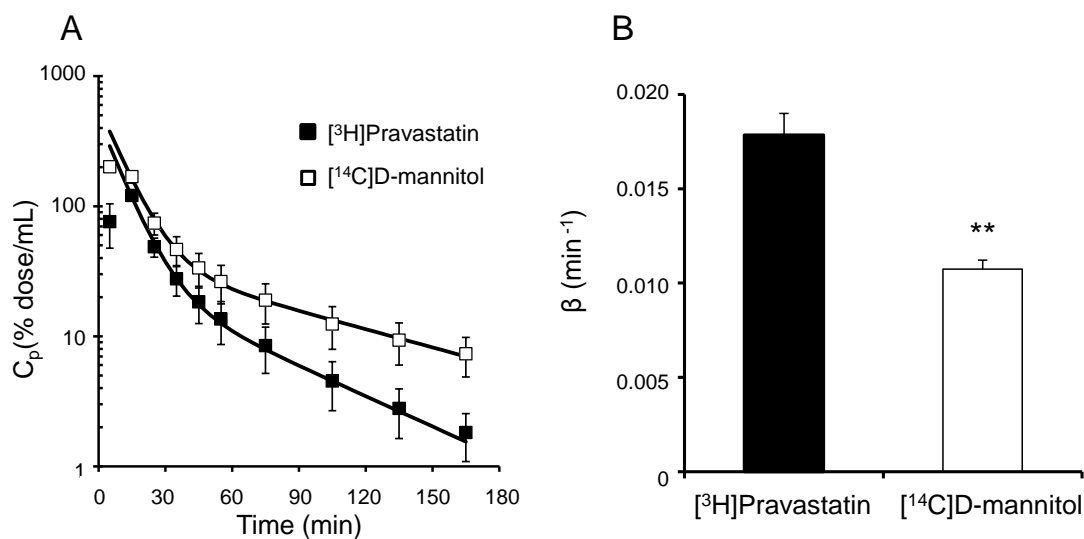


Figure 4-3. Time-profile of $[^3\text{H}]$ pravastatin and $[^{14}\text{C}]$ D-mannitol in the vitreous humor after their intravitreal injection into rats (A) and elimination rate constants (β) of $[^3\text{H}]$ pravastatin and $[^{14}\text{C}]$ D-mannitol during the terminal phase (B).

Each column represents the mean \pm SE ($n = 3$ rats). An unpaired, two-tailed Student's t-test was used to assess the significance of the differences between the means of the two groups. $**p < 0.01$, significantly different from $[^3\text{H}]$ pravastatin. Closed squares and open squares represent the concentrations of $[^3\text{H}]$ pravastatin and $[^{14}\text{C}]$ D-mannitol in the dialysate, respectively.

Pravastatin の硝子体からの消失に対する各種阻害剤の影響を、 $[^3\text{H}]$ pravastatin と $[^{14}\text{C}]$ D-mannitol の消失速度定数の差で評価した。阻害剤を添加しない場合(コントロール)に比べて、20 mM pravastatin、0.01 mM digoxin 及び 20 mM benzylpenicillin の添加により、それぞれ 69%、67%及び 53%有意に低下した。しかし、20 mM choline は、 $[^3\text{H}]$ pravastatin の硝子体からの消失に影響を及ぼさなかった。(Table 4-2)。

Table 4-2. Effect of several inhibitors on the elimination rate constant (β) difference between $[^3\text{H}]$ pravastatin and $[^{14}\text{C}]$ D-mannitol during the terminal phase.

Inhibitors	Percentage of control (%)
Control	100 \pm 12
20 mM pravastatin	30.9 \pm 7.3**
0.01 mM digoxin	33.4 \pm 5.1**
20 mM benzylpenicillin	46.9 \pm 12.0*
20 mM choline	81.2 \pm 10.0

Percentage of control was calculated as follows: $[\beta \text{ value of } [^3\text{H}] \text{pravastatin} - \beta \text{ value of } [^{14}\text{C}] \text{D-mannitol in the presence of inhibitor}] / [\beta \text{ value of } [^3\text{H}] \text{pravastatin} - \beta \text{ value of } [^{14}\text{C}] \text{D-mannitol in the absence of inhibitor}] \times 100$. The statistical significance of the differences in the means of the groups was determined using Bartlett's test followed by Dunnett's multiple comparison test. $*p < 0.05$ and $**p < 0.01$, significantly different from control. Each value represents the mean \pm SE ($n = 3$ or 4 rats).

第3節 考察

本章では、臨床において中枢性の副作用がなく、糖尿病網膜症に効果があると報告されている pravastatin を用いて、BRB における取り込み及び排出機構の解明を試みた。

Pravastatin 及び E17βG の取り込み過程について、UI 法を用いて評価した結果、RUI 及び BUI は、wild-type ラットと mdr1a knockout ラットにおいて同程度の値を示し、第3章で得られた生体膜を受動拡散によって透過する化合物群の脂溶性からの予想値よりも小さかった(Figure 4-2)。したがって、両化合物は P-gp に認識されず、BRB 及び BBB において取り込み過程よりも排出過程の方が優位に機能していることが示唆された。

両化合物の取り込みに関わる輸送担体を明らかにするため、wild-type ラットを用いた阻害実験を行った。その結果、pravastatin の RUI 及び BUI は、oatp1a4 の基質である digoxin、oatp 及び oat families の阻害剤である probenecid の添加により有意に低下し、E17βG の網膜への取り込みについても、digoxin、probenecid によって有意に減少したことから(Table 4-1)、BRB において oatp1a4 が取り込み側に機能すること、網膜及び脳への pravastatin の取り込みには、少なくとも oatp1a4 が関与していることが示唆された。

さらに、pravastatin の BRB を介した排出機構について、ラット硝子体に投与した pravastatin の消失を microdialysis 法により評価した。その結果、pravastatin は指数関数的に硝子体内から消失し、消失速度定数は、bulk flow マーカーである D-mannitol の約 1.66 倍有意に高い値を示した(Figure 4-3)。その消失は digoxin だけでなく、oat3 の阻害剤である benzylpenicillin によっても有意に低下し(Table 4-2)、pravastatin の BRB を介した消失には、oatp1a4 及び oat3 の両方が関与していることが示唆された。

Pravastatin は、Mrp2、Mrp4 及び Bcrp の基質であることが知られている(Yamazaki et al., 1997; Hirano et al., 2005; Uchida et al., 2007)。Mrp2 は、ヒト網膜、RPE に存在するが(Pelis et al., 2009)、マウス inner BRB やラット脳において、mRNA として検出されていない(Ohtsuki et al., 2007; Tachikawa et al., 2008)。また、Mrp4 はマウス inner BRB の luminal 側に(Tagami et al., 2009)、BBB では血管内皮細胞の両側に存在し(Kusuhara and Sugiyama, 2005)、Bcrp はマウス inner BRB と BBB の luminal 側に局在することが確認されている(Asashima et al., 2006)。したがって、pravastatin の BRB 及び BBB を介した排出過程にはこれら ABC トランスポーターが関与している可能性が考えられる。本章で得られた知見と、これまでに得られている報告に基づき、pravastatin の BRB における膜透過に関わる influx 及び efflux 輸送系を Figure 4-4 に示した。

また、STZ 誘発糖尿病モデルラットに pravastatin を投与すると、normal ラットよりも低い血漿中濃度を示し、その原因がモデルラットの肝臓において oatp1a4 が増加し MRP2 が減少するためであるとの報告(Hasegawa et al., 2010)や、糖尿病モデルラットの腎臓では

oat3 の機能が低下しているとの報告がある(Phatchawan et al., 2014)。病態時の BRB における輸送担体の発現や機能の変化に関して、これまでに報告はないが、正常時と病態時の輸送担体の機能の差を利用することによって、新しい網膜治療薬の開発に繋がることが期待される。

ラット *oatp1a4* は、ヒト OATP1A2 と同じサブファミリーに分類される(Hagenbuch and Meier, 2004)。OATP1A2 は網膜及び BBB においてタンパクレベルで確認されており(Gao et al., 2015)、OAT3 の mRNA はヒト網脈絡膜、BBB で検出されている(Cha et al., 2001; Zhang et al., 2008)。また OATP1A2 及び OAT3 はいずれも、pravastatin を基質として認識する(Takeda et al., 2004; Shirasaka et al., 2010)。したがって、本研究で得られた結果は、pravastatin の中枢性副作用を回避し、糖尿病網膜症に効果があるという臨床結果を矛盾せず説明することができる。つまり、経口投与後、全身循環に入った pravastatin は、標的組織である網膜血管内皮細胞に OATP1A2 を介して取り込まれて薬理効果を発揮するが、脳毛細血管内皮細胞に取り込まれた pravastatin は、中枢神経系へと到達する前に排出輸送担体を介して排出されるため、中枢性副作用を示さないと考えられる。

以上、本章での結果から、pravastatin は BRB 及び BBB において、取り込み及び排出輸送担体に認識されること、その担体を介して両方向に輸送されること、取り込み過程よりも排出過程の方が優位に機能することが明らかとなった。

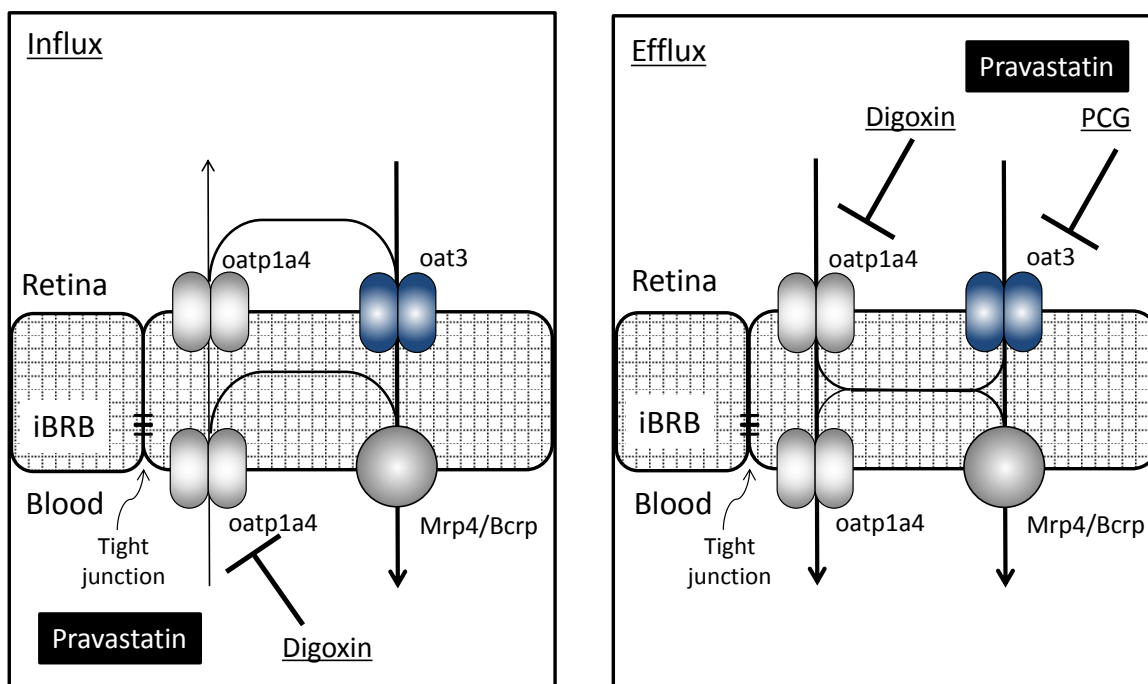


Figure 4-4. Schematic illustration of pravastatin transport across the rat inner blood-retinal barrier.

In vivo inhibition studies using an uptake index and microdialysis methods have suggested that the influx mechanism for pravastatin is at least partly accounted for by oatp1a4, and the efflux transport of pravastatin is mediated by both oatp1a4 and oat3. The illustration is based on the present study and the papers. iBRB, inner blood-retinal barrier; PCG, benzylpenicillin.

第5章 本研究の結論および将来への展望

本研究では、点眼剤や経口剤などの眼科用剤の開発に有益な知見を得るため、外眼部及び前眼部の薬物療法において重要となる角膜上皮での薬物透過特性を明らかにするとともに、全身循環血を介した後眼部の薬物治療において、鍵となる BAB 及び BRB の薬物透過特性を評価し、BBB における薬物透過特性と比較した。

第2章では、眼科手術後の炎症の治療に汎用される NSAIDs の一つとして、ketoprofen をモデル化合物として選択し、角膜上皮培養細胞における透過機構、特に取り込み特性に関わる輸送担体を明らかにした。Ketoprofen は輸送担体を介して RCECs に取り込まれ、その取り込みは、pH、温度、エネルギー、濃度依存的であり、低親和性と高親和性の2つの輸送過程が存在することが示された。このうち、低親和性の輸送過程には MCT1 が関与することが示唆され、高親和性の過程には oat2 が関わる可能性が高いと考えられた。

第3章では、後眼部に焦点を移し、BAB、BRB 及び BBB における P-gp の寄与率を明らかにするため、mdr1a knockout ラットを用いて房水、網膜及び脳における P-gp 基質化合物の透過特性を評価した。BAB 及び BRB において、P-gp が機能していること、BRB での P-gp 寄与率は BBB に比べて低い場合があること、両関門には取り込み方向に働く輸送担体が存在することが明らかとなった。また、verapamil を認識する取り込み輸送担体の機能は、BRB と BBB で明確に異なることが示唆された。

第4章では、臨床において中枢性の副作用がなく、糖尿病網膜症に効果があると報告されている pravastatin の BRB における取り込み及び排出機構について、ラットを用いた *in vivo* 実験法により評価し、BBB での輸送機構と比較した。Pravastatin は BRB 及び BBB において、取り込み及び排出輸送担体に認識されること、その担体を介して両方向に輸送されること、BRB、BBB ともに取り込み過程よりも排出過程の方が優位に機能することが明らかとなった。

以上、本研究から得られた知見を総合すると、眼内の透明性を維持し、眼内環境を一定に保つための前眼部及び後眼部のバリアとして機能する、角膜上皮及び BAB、BRB に存在する輸送担体の中には、薬物を認識し、取り込み方向に働く輸送系があることが示唆された。さらに、後眼部において、代表的な排出輸送系である P-gp の BRB での寄与率は BBB に比べ低い場合があること、化合物によっては、BRB、BBB ともに取り込み過程よりも排出過程が優位に働いていることがわかった。

一般的に、アニオン性化合物はその物理化学的な性質から、生体膜の透過性は低いことが知られている。しかし、ketoprofen のように2つ以上の親和性の異なる輸送担体に認識されて角膜に移行する薬物であれば、点眼後、涙液中濃度が経時的に減少する場合でも、複数の輸送担体を利用することで、効率的に角膜中濃度を高め

ることに繋がると考えられる。特に感染症やドライアイといった角膜が標的組織となる疾患の治療薬であれば、角膜上皮に存在する influx 輸送系を利用した医薬品開発は、有効な手段の一つになることが期待される。

成人の中途視覚障害の原因疾患である糖尿病網膜症や、黄斑変性の非侵襲的な治療薬の開発が望まれている。そのためには、病態の発生機序を解明しターゲット分子を明らかにするという薬理的なアプローチだけでなく、薬物を標的組織である網膜にどのようにデリバリーするかという薬物動態学的なアプローチが非常に重要になる。なぜなら、BRB 透過性の良い化合物は、概して BBB や血液精巣関門など他の関門をも透過してしまい、脳あるいは生殖器官に有害な作用を与える可能性があるためである。本研究で得られた BRB と BBB における P-gp の寄与率の差や、verapamil を基質とする influx 輸送担体の機能の違いは、全身循環血から網膜に選択的に薬物を到達させる手段として応用可能である。一方、BRB と BBB の両関門の輸送担体機能に差がなく、いずれの関門においても排出過程が優位に働いている pravastatin のような薬物は、網膜循環改善を目指した網膜血管内皮をターゲットとした治療薬に適していると考えられる。本研究で得られた知見は、輸送担体を利用した眼科用剤の開発、特に BRB 及び BBB に存在する輸送担体の influx あるいは efflux 機能の差を利用することで、中枢性副作用を回避した網膜疾患治療薬の開発に繋がる可能性がある。

角膜における輸送担体は、点眼投与後の薬物の眼内移行に影響を与えるため、臨床的には点眼剤の併用投与や配合剤の投与による薬物間相互作用の原因となりうる。また、遺伝子多型や病態によるトランスポーターの機能変化によって、角膜を含め BAB 及び BRB に発現する輸送担体を介した薬物動態の変動が起こる可能性も否定できない。これまでに、眼局所での輸送担体を介した薬物間相互作用や、薬物の眼内動態へのトランスポーターの関与について報告はないが、今後、眼科領域においてもトランスポーターの役割解明、遺伝子多型と薬物の眼内動態、薬効・毒性との関係解明などトランスポーター機能の解明が必要であり、医薬品開発という視点からは、動物だけでなくヒト眼組織での検討が重要であると考えられる。今後のさらなる高齢化の進展により、生活習慣病から生じる網膜症や、加齢黄斑変性に対する侵襲性の低い治療薬が望まれることが予測され、角膜や BAB、BRB に発現するトランスポーターの機能解明は、侵襲性の高い既存治療薬に変わる Quality of Life 及び Quality of Vision を改善する網膜疾患治療薬の開発に結び付くことが期待される。

本知見は、眼疾患治療薬を開発するための標的組織移行性を改善する方法として、眼組織に存在する輸送担体を利用・制御することにより、標的組織への優れた移行性を持ち、有効性と安全性を両立した化合物の開発や、効率的な薬物デリバリーシステムへの応用が可能であることを示唆している。

実験の部

試薬

放射性標識化合物

D-[1-¹⁴C]Mannitol ([¹⁴C]D-mannitol, 55 mCi/mmol)、[1,2,6,7-³H]progesterone (³H]progesterone, 0.1 mCi/mmol)、[p-³H]quinidine (³H]quinidine, 0.02 mCi/mmol)、[N-methyl-³H]verapamil hydrochloride (³H]verapamil, 0.08 mCi/mmol)、n-[1-¹⁴C]butanol ([¹⁴C]n-butanol, 2 mCi/mmol)、pravastatin [³H(G)] sodium salt (³H]pravastatin, 5 Ci/mmol)、ketoprofen, [³H(G)] (³H]ketoprofen, 3 Ci/mmol) 及び [6,6'(n)-³H]-sucrose (³H]sucrose, 2 Ci /mmol)は、American Radiolabeled Chemicals (St. Louis, MO) から購入した。³H(G)]Digoxin (³H]digoxin, 29.8 Ci/mmol)、[estradiol-6,7-³H(N)]-estradiol 17β-D-glucuronide (³H]E17βG, 36.6 Ci/mmol) 及び D-[1-¹⁴C]mannitol ([¹⁴C]D-mannitol, 55 mCi/mmol) は PerkinElmer (Waltham, MA)から購入し、¹⁴C]thiourea (59.4 mCi/mmol) 及び [³H]water (25 mCi/mL) は、Moravek Biochemicals, Inc. (Brea, CA) から購入した。¹⁴C]Sucrose (0.6 Ci/mmol) 及び L-[¹⁴C]lactic acid (0.15 Ci/mmol) は DUPONT NEN Research Products (Boston, MA) から購入した。

細胞培養関連試薬

ウサギ角膜上皮細胞 (RCECs: Rabbit Corneal Epithelial Cells、Corne Pack NRCE[®]) は Kurabo (Osaka, Japan)から、Dulbecco's modified Eagle's medium-nutrient mixture F-12 (DMEM/F-12)、ウシ胎児血清 (FBS)、その他培養に用いた試薬は、Gibco (Grand Island, NY) から購入した。Epidermal growth factor (EGF)、cholera toxin (CTX)、hydrocortisone、insulin-transferrin sodium selenite media supplement は、Sigma Chemical (St. Louis, MO) から購入した。Benzylpenicillin potassium 及び streptomycin は、Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan) から購入した。Human fibronectin は Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Germany) から購入した。

上記以外の試薬は市販の特級品を用いた。

実験動物

使用動物及び飼育方法

Sprague-Dawley 系雄性ラット(6-8 週齢、Charles River Laboratories, Yokohama, Japan)、Sprague-Dawley 系雄性 mdrla knockout ラット(7-10 週齢、Sage Labs, St.

Louis, MO)は、参天製薬株式会社 奈良研究開発センターにて、雄性日本白色ウサギ (約 3 kg、Kitayama Labes, Ina, Japan) は、静岡県立大学にて、自由に水及び固形飼料を摂取させて飼育した。尚、実験動物の取り扱いについては参天製薬株式会社動物実験委員会が作成した「動物実験倫理指針」に従った。

細胞培養

RCECs の培養には、培養液 DMEM/F-12 (pH7.4; 5% FBS、10 ng/mL EGF、0.1 µg/mL CTX、0.5 µg/mL hydrocortisone、5 µg/mL insulin、70 µg/mL benzylpenicillin 及び 139 µg/mL streptomycin 含有)を用いた。透過実験に用いる際には、4 µg/mL fibronectin でフィルターをプレコートした Transwell-COL cell culture chambers (pore size: 0.4 µm, diameter: 12 mm, surface area: 1 cm², Costar, Bedford, MA) に、RCECs を 4×10⁴ cells/cm² で播種し、取り込み実験に用いる際には、培養ディッシュ(surface area: 1.9 cm²) に 8×10³ cells/cm² で播種した。培養は、加湿された 5% CO₂/air、37°C で行い、培養液は毎日交換した。

In vitro ウサギ摘出角膜透過試験

薬液の調製

被験物質として、³H]ketoprofen (0.7 µM) 及び¹⁴C]sucrose (6.1 µM)を用い、Hank's balanced salt solution (HBSS; 1.3 mM CaCl₂, 5.0 mM KCl, 0.3 mM KH₂PO₄, 0.8 mM MgCl₂, 138 mM NaCl, 0.3 mM Na₂HPO₄, 5.6 mM D-glucose, and 10 mM HEPES for pH 7.4 or 10 mM MES for pH < 7.4) に溶解した。

摘出角膜を用いた透過実験

ウサギの耳静脈内に pentobarbital sodium (Nembutal Sodium Solution, Abbot Laboratories, North Chicago, MI)を 5 mL 投与して安楽殺後、眼球を摘出し、角膜を採取した。直ちに 37°Cに加熱した球面膜用拡散セル(PermcCell KH-5P, Vidrex, Fukuoka, Japan) に角膜をセットし、ドナー側に薬液、レシーバー側にHBSSを、それぞれ 4 mL ずつ充填した。ドナー側から 0、2 及び 4 時間に薬液を 0.2 mL ずつ採取し、その平均値をドナー側の濃度とした。レシーバー側からは 1、2、3 及び 4 時間に 3 mL ずつ試料を採取し、直ちに 37°Cに加熱した HBSS を補充した。各試料にシンチレーションカクテル(Hionic Fluor; PerkinElmer, Waltham, MA)を加え、液体シンチレーションカウンター (LSC-5100, Aloka, Tokyo, Japan) で放射活性を測定した。

見かけの角膜透過係数 ($P_{\text{cornea, app}}$) の算出

以下の式に従い $P_{\text{cornea, app}}$ を算出した。即ち、ketoprofen の滴出角膜透過量を経時的にプロットしたときの傾きから算出した。

$$P_{\text{cornea, app}} = (dQ/dt)/(60 \times A \times C_0)$$

- $P_{\text{cornea, app}}$: 見かけの角膜透過係数
 dQ/dt : 単位時間当たりの透過量
 A : 角膜表面積 (球面膜用拡散セルの表面積 0.6 cm^2)
 C_0 : ドナー側の初濃度

In vitro RCECs 透過試験

薬液の調製

$[^3\text{H}]$ Ketoprofen ($0.01 \text{ }\mu\text{M}$) 及び $[^{14}\text{C}]$ sucrose ($0.18 \text{ }\mu\text{M}$) を HBSS に溶解した。

RCECs 用いた透過実験

Kawazu らの方法に従い、Transwell-COL cell culture chambers 上にて 8 日間培養した RCECs を用いた (Kawazu et al., 1998)。Millicell-ERS (Millipore, Bedford, MA) により測定した膜抵抗値 (TEER; transepithelial electric resistance) は $250\text{-}259 \text{ }\Omega \cdot \text{cm}^2$ であった。Transwell-COL cell culture chambers を 37°C に維持し、培地を除去後、 37°C に加温した HBSS 約 1 mL で RCECs を 3 回洗浄した。ドナー側に 0.5 mL 、アクセプター側に 1.5 mL の 37°C に加温した HBSS を加え、30 分間プレインキュベーションを行った。ドナー側の HBSS を薬液に置換し、透過実験を開始した。透過実験開始後 10、20、30 分にアクセプター側から 0.3 mL ずつ試料を採取し、直ちに 37°C に加温した HBSS を補充した。各試料に Hionic Fluor を加え、液体シンチレーションカウンター (LSC-5100) で放射活性を測定した。なお、RCECs を培養していない fibronectin コート済フィルターを用いた透過実験も、同様に実施した。

見かけの角膜上皮細胞透過係数 ($P_{\text{cell, app}}$) の算出

以下の式に従い $P_{\text{cell, app}}$ を算出した。即ち、ketoprofen の RCECs 透過量を経時的にプロットしたときの傾きから算出した。

$$P_{\text{app}} = (dQ/dt)/(60 \times A_{\text{cell}} \times C_0)$$

$$1/P_{\text{app}} = 1/P_{\text{cell, app}} + 1/P_{\text{filt, app}}$$

$$P_{\text{cell, app}} = P_{\text{app}} \times P_{\text{filt, app}} / (P_{\text{filt, app}} - P_{\text{app}})$$

- $P_{\text{cell, app}}$: 見かけの角膜上皮細胞透過係数
 $P_{\text{filt, app}}$: 見かけのフィルターのための透過係数

$P_{\text{cell, app}}$:	見かけの角膜上皮細胞透過係数
$P_{\text{filt, app}}$:	見かけのフィルターのみの透過係数
dQ/dt :	単位時間当たりの透過量
A_{cell} :	RCECs 表面積 (Transwell-COL の表面積 1 cm^2)
C_0 :	ドナー側の初濃度

In vitro RCECs 取り込み試験

薬液の調製

$[^3\text{H}]$ Ketoprofen ($0.3 \mu\text{M}$) 及び $[^{14}\text{C}]$ sucrose ($0.9 \mu\text{M}$) を HBSS に溶解した。L- $[^{14}\text{C}]$ Lactic acid の RCECs への取り込み評価の際には、L- $[^{14}\text{C}]$ lactic acid ($0.6 \mu\text{M}$) 及び $[^3\text{H}]$ sucrose ($2.7 \mu\text{M}$) を HBSS に溶解した。

RCECs 用いた取り込み実験

培養ディッシュ上にて 8 日間培養した RCECs を用いた。ディッシュを 37°C に維持し、培地を除去後、 37°C に加温した HBSS 約 1 mL で RCECs を 3 回洗浄した。細胞上に 0.25 mL の 37°C に加温した HBSS を加え、30 分間プレインキュベーションを行った。HBSS を薬液に置換し、取り込み実験を開始した。設定時間後、 0.1 mL の薬液を採取し、残りの薬液を吸引除去後、氷冷した HBSS 約 1 mL で 3 回洗浄した。 1 N 水酸化ナトリウム溶液 (0.5 mL) を加え、約 60°C にて 30 分間インキュベーションし、細胞を可溶化した。そのうち 0.3 mL に Hionic Fluor を加え、液体シンチレーションカウンター (LSC-5100) で放射活性を測定した。また残りの細胞可溶化液を 10 倍希釈し、BCATM Protein Assay Kit (PIERCE, Rockford, IL) を用いてタンパク定量を行った。

実験目的により、ketoprofen または L-lactic acid 濃度、取り込み実験温度は、適宜変更した。また種々阻害剤の影響を検討した際には、あらかじめ設定濃度の阻害剤を含有させた HBSS にて、 37°C 、30 分間プレインキュベーションを行い、阻害剤を共存させて ketoprofen の取り込みを評価した。

代謝阻害実験では、HBSS 中の D-glucose を非代謝性の 3-O-methylglucose (3-O-MG) に置換した。またプロトン共輸送系の阻害剤である carbonyl cyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP) 及び α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHC) を用いた実験は、薬液、HBSS とも pH 6.0 に調整したものを使用した。 Na^+ 依存性の実験においては、HBSS に含まれる NaCl 及び Na_2HPO_4 をそれぞれ choline chloride 及び K_2HPO_4 に置換した。

細胞内取り込みの評価

得られた放射活性及びタンパク量から、細胞内取り込みを以下の cell/medium ratio (C/M ratio) で表した。阻害実験の結果は、コントロールに対する%で表示した。

C/M ratio ($\mu\text{L}/\text{mg protein}$)

$$= [^3\text{H}]\text{ketoprofen in cells (dpm/mg protein)} / [^3\text{H}]\text{ketoprofen in medium (dpm}/\mu\text{L})$$

Ketoprofen の RCECs への取り込みに対する最大取り込み速度定数 (V_{max}) 及び Michaelis-Menten 定数 (K_m) は、基質濃度 (S) に対する初期取り込み速度 (V) の plot から、Yamaoka らにより開発された非線形最小二乗法プログラム、MULTI を用いて解析した。初期パラメーターは simplex 法から概算し、アルゴリズムは Damping Gauss-Newton 法を用いた。

$$V = V_{\text{max}} \times [S] / (K_m + [S])$$

Wild-type ラットから単離した retinal pigment epithelial cells を用いた定量的 reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 解析

RPE cells の単離

ラット RPE 細胞の回収は Usui らの報告を minor modification し、行った (Usui et al., 2013)。6 週齢 Long-Evans ラット (Institute for Animal Reproduction, Ibaraki, Japan) から単離した眼球を 5% povidone-iodine solution (LKT Laboratories, St. Paul, MN, USA) にて消毒し、Hank's Balanced Salt Solution (HBSS; 138 mM NaCl, 5.3 mM KCl, 5.6 mM D-glucose, 0.44 mM KH_2PO_4 , 4.2 mM NaHCO_3 , 0.34 mM Na_2HPO_4 , 0.34 mM Na_2HPO_4 , 0.02 mM Phenol red) にて洗浄後、38 U/mL testicular hyaluronidase (Worthington Biochemical, NJ, USA) 及び 20 U/mL collagenase type II (Worthington Biochemical) を含有する HBSS 中にてインキュベートした (37°C , 30 分)。さらに 0.1% trypsin 含有 HBSS にてインキュベートし (37°C , 30 分)、外科的に RPE 細胞を回収した。回収した RPE 細胞は HBSS にて 1 回、次いで phosphate-buffered saline (PBS(-), 137 mM NaCl, 8.1 mM Na_2HPO_4 , 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH_2PO_4) にて 2 回洗浄し、ペレットとして RPE 細胞を得た。

Total RNA の抽出

RPE 細胞からの total RNA 抽出は RNeasy[®] Mini kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いて実施した。Total RNA から、ReverTra Ace (TOYOBO, Osaka, Japan) を用い、complementary DNA (cDNA) を調製した。

定量的 real-time RT-PCR 法

定量的 real-time RT-PCR 法は Mx3000P (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) 及び SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II (Takara, Shiga, Japan) を用いて実施した。Primer は、Tomi らの報告に従って設計し (Tomi and Hosoya, 2004)、Table 1 に示した。サンプル中の mRNA 発現を定量化するため、対象増幅産物を組み込んだ pGEM-T Easy Vector を用いて検量線を作成した。PCR 条件は、95°C、1 分にて denature 処理、次いで 95°C で 30 秒、60°C で 45 秒及び 72°C で 45 秒を 40 cycle と設定した。Mdr1a 及び mdr1b の mRNA 発現レベルは β -actin の mRNA 発現量にて normalize し、算出した。なお、Mx3000P にて検出された SYBR[®] 由来の蛍光シグナルが特異的増幅産物によることを、反応終了後の溶液について 0.6 μ g/mL ethidium bromide 含有 2% agarose gel を用いて電気泳動し、それぞれの PCR product のみが検出されることで (mdr1a, 437 bp; mdr1b, 352 bp; β -actin, 285 bp)、確認した。

Table 1. Oligonucleotide primers for RT-PCR analysis.

Target mRNA	GenBank Accession No.	Primer sequences (Upper, sense primer; Lower, antisense primer)	Product size (bp)
mdr1a (abcb1a)	NM_133401	5'-acagaaacagaggatcgc-3' 5'-cgtcttgatcatgtggcc-3'	437
mdr1b (abcb1b)	NM_012623	5'-acagaaacagaggatcgc-3' 5'-agaggcaccagtgtcact-3'	352
β -actin	NM_031144	5'-tcatgaagtgtgacgttgacatccgt-3' 5'-cctagaagcatttgcggtgcacgatg-3'	285

Uptake index 法による循環血液から組織への BAB、BRB または BBB を介した被験物質取り込みの評価

トレーサー液の調製

Wild-type ラット及び mdr1a knockout ラットを用いた BAB、BRB または BBB を介した P-gp 寄与率の評価の際には、被験物質として、³H]progesterone、¹⁴C]D-mannitol、¹⁴C]tiourea、³H]quinidine、³H]verapamil、³H]digoxin を、oatp1a4 機能解析の際には、被験物質として、³H]pravastatin 及び ³H]E β 17G を用いた。また、透過性の指標として、³H]被験物質の場合は ¹⁴C]n-butanol を、¹⁴C]被験物質の場合は ³H]water を用いた。各被験物質を必要量分取し、減圧乾固後、Ringer-HEPES buffer に溶解した。調製した投与液は、³H]被験物質の場合は ³H]及び ¹⁴C]の放射能がそれぞれ 50 μ Ci/mL 及び 0.5 μ Ci/mL であること、¹⁴C]被験物質の場合は ¹⁴C]及び ³H]の放射能がそれぞれ 5 μ Ci/mL 及び 25 μ Ci/mL であることを確認した。

内頸動脈への投与

Alm ら、Toda らの方法に従った(Alm and Tornquist, 1981; Toda et al., 2011)。ラットにケタミン/キシラジン混液(125 mg/kg /1.22 mg/kg)を筋肉内投与することにより全身麻酔を施した後、頸動脈を露出させた。0.2 mL の投与液を内頸動脈に急速投与し、投与後 15 秒に断頭し、投与側の網膜、房水及び大脳を採取した。各組織に、組織溶解剤 Soluene-350 (PerkinElmer)を 2 mL 加えて溶解し、Hionic Fluor を加えて測定試料とした。各測定試料の放射活性を液体シンチレーションカウンター (TRI-CARB 2100TR) で測定した。

Uptake index(UI)の算出

[³H] 被験物質の場合は、以下の式に従い、UI (%) を算出した。

$$\text{Uptake index (UI, \%)} = \left(\frac{[^3\text{H}] / [^{14}\text{C}] \text{ (dpm in the tissue)}}{[^3\text{H}] / [^{14}\text{C}] \text{ (dpm in the injectate)}} \right) \times 100$$

[¹⁴C] 被験物質の場合は、以下の式に従い、UI (%) を算出した。

$$\text{Uptake index (UI, \%)} = \left(\frac{[^{14}\text{C}] / [^3\text{H}] \text{ (dpm in the tissue)}}{[^{14}\text{C}] / [^3\text{H}] \text{ (dpm in the injectate)}} \right) \times 100$$

In vivo integration plot 法を用いた被験物質の組織移行性解析

投与液の調製

循環血液からラット房水、網膜及び脳への BAB、BRB 及び BBB を介した verapamil 取り込み解析の際には、被験物質として、[³H]verapamil を用いた。[³H]verapamil を必要量分取し、減圧乾固後、ECF buffer に溶解した。調製した投与液は、[³H]の放射能が 25 µCi/mL であることを確認した。

静脈内への投与

Kubo らの方法に従った(Kubo et al., 2013)。ラットにケタミン/キシラジン混液(125 mg/kg /1.22 mg/kg)を筋肉内投与することにより全身麻酔を施した後、左大腿静脈から、0.4 mL の投与液を急速投与した。所定時間に右大腿静脈から約 0.25 mL 採血し、直ちに断頭して網膜(両眼)、房水(両眼)及び大脳(片側のみ)を摘出し、組織重量を測定した。血液は遠心分離し、血漿 0.1 mL を得た。血漿、大脳、網膜および房水に、組織溶解剤 Soluene-350 を 2 mL 加えて溶解し、Hionic Fluor を加えて測定試料とした。各測定試料の放射活性を液体シンチレーションカウンター (TRI-CARB 2100TR) で測定した。

見かけの組織透過クリアランス ($K_{in,tissue}$) の評価

各時間における被験物質の循環血液から網膜、房水及び脳への移行性の指標として、組織単位重量当たりの見かけの血漿-組織中濃度比 $C_{app}(t)/C_p(t)$ (mL/g tissue) を算出した。組織単位重量当たりの見かけの透過クリアランス($K_{in,tissue}$) は、以下の式に従い、 $C_{app}(t)/C_p(t)$ を縦軸、 $AUC(t)/C_p(t)$ を横軸にプロット(integration plot) したときの傾きから算出した。

$$C_{app}(t)/C_p(t) = K_{in,tissue} \times AUC(t)/C_p(t) + V_i$$

$C_{app}(t)$:	時間 t における組織中被験物質濃度
$C_p(t)$:	時間 t における血漿中被験物質濃度
$K_{in,tissue}$:	組織単位重量当たりの見かけの透過クリアランス
$AUC(t)$:	時間 0 から t までの被験化合物の血漿中濃度下面積
V_i :	被験化合物が瞬時に平衡状態になる分布容積

Microdialysis 法による硝子体から循環血液への BRB を介した被験物質排出の評価 トレーサー液の調製

ラット硝子体から循環血液への BRB を介した pravastatin 輸送解析の際には、 $[^3H]$ pravastatin を、bulk flow の指標として、 $[^{14}C]$ D-mannitol を用いた。 $[^3H]$ Pravastatin 及び $[^{14}C]$ D-mannitolを必要量分取し、減圧乾固後、Ringer-HEPES buffer に溶解した。投与液は、 $[^3H]$ 及び $[^{14}C]$ の放射能がそれぞれ $5 \mu Ci/\mu L$ 及び $1 \mu Ci/\mu L$ であることを確認した。

硝子体内への microinjection

Katayama らの方法に従った(Katayama et al., 2006)。ラットにケタミン/キシラジン混液 (125 mg/kg /1.22 mg/kg)を筋肉内投与することにより全身麻酔を施した後、脳定位固定装置に固定した。オキシブプロカイン点眼により眼表面を麻酔し、上瞼に縫合糸を通して固定して開眼した。22G 針を用いて、角膜輪部から約 0.5 mm 強膜側に、深さ約 3 mm の穴を開け、 $5 \mu L$ 用マイクロシリンジ(Hamilton, Reno, NV, USA) を用いて、 $1 \mu L$ のトレーサー液を投与した。シリンジを抜いた後、あらかじめ Ringer-HEPES buffer で満たした SP10 (Natsume, Tokyo, Japan) 及び SP19 を接続した透析用プローブ (TEP-50; Eicom, Kyoto, Japan)を infusion pump (流速 $2.2 \mu L/min$)にて Ringer-HEPES buffer を流しながら、素早く挿入した。アロンアルファで透析プローブと強膜を固定し、透析液の回収を開始した。透析用プローブを挿入した時点をゼロとし、60 分までは 10 分毎に、60 分から 180 分までは 30 分毎に透析液を回収した。回収した透析液の重量を測定し、Hionic Fluor を加えて測定試料とした。各測定試料の放射活性を液体シンチレーションカウンター (TRI-CARB 2100TR) で測定した。

消失速度定数(β)の評価

各時間における被験物質の硝子体からの消失性を、投与量で補正した透析液中放射能濃度 $C_p(t)$ (% dose/mL) で示し、消失速度定数 (β) を以下の式に従い、Phoenix™ WinNonlin® V6.3 (Certara, Princeton, NJ) を用いて、2-コンパートメントモデル解析により算出した。

$$C_p(t) = C_T / \text{Dose}_{\text{tracer}} \times 100$$

$$C_p(t) = Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t}$$

C_T :	時間 t における単位重量当たりの透析液中放射能濃度
$\text{Dose}_{\text{tracer}}$:	投与量
A :	初期相における Y 軸切片
B :	消失相における Y 軸切片
α :	初期相の消失速度定数
β :	最終消失相の消失速度定数

透析用プローブからの回収率を測定するため、 $[^3\text{H}]$ pravastatin 及び $[^{14}\text{C}]$ D-mannitol を必要量分取し、減圧乾固後、Ringer-HEPES buffer に溶解した。試験溶液は、 $[^3\text{H}]$ の放射能が $1 \mu\text{Ci/mL}$ 、 $[^{14}\text{C}]$ D-mannitol が $0.2 \mu\text{Ci/mL}$ であることを確認した。180 分までの $[^3\text{H}]$ pravastatin 及び $[^{14}\text{C}]$ D-mannitol の回収率は、それぞれ $2.86 \pm 0.36\%$ 及び $6.63 \pm 0.73\%$ ($n = 3$) であった。

$$\text{Recovery (\%)} = C_T / C_V \times 100$$

C_T :	時間 t における単位重量当たりの透析液中放射能濃度
C_V :	試験溶液中放射能濃度

統計解析

実験データは、平均値 \pm 標準誤差 (mean \pm SE) で示した。比較検定には 2 群間の比較の場合には unpaired Student's t-test を、3 群以上の比較の場合には Bartlett's test を行い、Dunnett's test による多重比較を行った。

引用文献

- Akanuma S, Hirose S, Tachikawa M, and Hosoya K (2013) Localization of organic anion transporting polypeptide (Oatp) 1a4 and Oatp1c1 at the rat blood-retinal barrier. *Fluids Barriers CNS* **10**:29.
- Alm A and Tornquist P (1981) The uptake index method applied to studies on the blood-retinal barrier. I. A methodological study. *Acta Physiol Scand* **113**:73-79.
- Asashima T, Hori S, Ohtsuki S, Tachikawa M, Watanabe M, Mukai C, Kitagaki S, Miyakoshi N, and Terasaki T (2006) ATP-binding cassette transporter G2 mediates the efflux of phototoxins on the luminal membrane of retinal capillary endothelial cells. *Pharm Res* **23**:1235-1242.
- Bayerle-Eder M, Fuchsjager-Mayrl G, Sieder A, Polska E, Roden M, Stulnig T, Bischof MG, Waldhausl W, Schmetterer L, and Wolzt M (2002) Effect of pravastatin on responsiveness to N-monomethyl-L-arginine in patients with hypercholesterolaemia. *Atherosclerosis* **160**:177-184.
- Cha SH, Sekine T, Fukushima JI, Kanai Y, Kobayashi Y, Goya T, and Endou H (2001) Identification and characterization of human organic anion transporter 3 expressing predominantly in the kidney. *Mol Pharmacol* **59**:1277-1286.
- Chan T, Zhu L, Madigan MC, Wang K, Shen W, Gillies MC, and Zhou F (2015) Human organic anion transporting polypeptide 1A2 (OATP1A2) mediates cellular uptake of all-trans-retinol in human retinal pigmented epithelial cells. *Br J Pharmacol* **172**:2343-2353.
- Chen P, Chen H, Zang X, Chen M, Jiang H, Han S, and Wu X (2013) Expression of efflux transporters in human ocular tissues. *Drug Metab Dispos* **41**:1934-1948.
- Chidlow G, Wood JP, Graham M, and Osborne NN (2005) Expression of monocarboxylate transporters in rat ocular tissues. *Am J Physiol Cell Physiol* **288**:C416-428.
- Chien DS, Sasaki H, Bundgaard H, Buur A, and Lee VH (1991) Role of enzymatic lability in the corneal and conjunctival penetration of timolol ester prodrugs in the pigmented rabbit. *Pharm Res* **8**:728-733.
- Choi JS, Jin MJ, and Han HK (2005) Role of monocarboxylic acid transporters in the cellular uptake of NSAIDs. *J Pharm Pharmacol* **57**:1185-1189.
- Coca-Prados M (2014) The blood-aqueous barrier in health and disease. *J Glaucoma* **23**:S36-38.
- Cunha-Vaz JG (1997) The blood-ocular barriers: past, present, and future. *Doc Ophthalmol* **93**:149-157.
- Dahlin A, Geier E, Stocker SL, Cropp CD, Grigorenko E, Bloomer M, Siegenthaler J, Xu L, Basile AS, Tang-Liu DD, and Giacomini KM (2013) Gene expression

- profiling of transporters in the solute carrier and ATP-binding cassette superfamilies in human eye substructures. *Mol Pharm* **10**:650-663.
- Duvvuri S, Gandhi MD, and Mitra AK (2003) Effect of P-glycoprotein on the ocular disposition of a model substrate, quinidine. *Curr Eye Res* **27**:345-353.
- Emoto A, Ushigome F, Koyabu N, Kajiya H, Okabe K, Satoh S, Tsukimori K, Nakano H, Ohtani H, and Sawada Y (2002) H(+)-linked transport of salicylic acid, an NSAID, in the human trophoblast cell line BeWo. *Am J Physiol Cell Physiol* **282**:C1064-1075.
- Galic S, Schneider HP, Broer A, Deitmer JW, and Broer S (2003) The loop between helix 4 and helix 5 in the monocarboxylate transporter MCT1 is important for substrate selection and protein stability. *Biochem J* **376**:413-422.
- Gao B, Huber RD, Wenzel A, Vavricka SR, Ismail MG, Reme C, and Meier PJ (2005) Localization of organic anion transporting polypeptides in the rat and human ciliary body epithelium. *Exp Eye Res* **80**:61-72.
- Gao B, Stieger B, Noe B, Fritschy JM, and Meier PJ (1999) Localization of the Organic Anion Transporting Polypeptide 2 (Oatp2) in Capillary Endothelium and Choroid Plexus Epithelium of Rat Brain. *J Histochem Cytochem* **47**:1255-1263.
- Gao B, Vavricka SR, Meier PJ, and Stieger B (2015) Differential cellular expression of organic anion transporting peptides OATP1A2 and OATP2B1 in the human retina and brain: implications for carrier-mediated transport of neuropeptides and neurosteroids in the CNS. *Pflugers Arch* **467**:1481-1493.
- Gao B, Wenzel A, Grimm C, Vavricka SR, Benke D, Meier PJ, and Reme CE (2002) Localization of organic anion transport protein 2 in the apical region of rat retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **43**:510-514.
- Gordon B, Chang S, Kavanagh M, Berrocal M, Yannuzzi L, Robertson C, and Drexler A (1991) The effects of lipid lowering on diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol* **112**:385-391.
- Greenwood J and Mason JC (2007) Statins and the vascular endothelial inflammatory response. *Trends Immunol* **28**:88-98.
- Hagenbuch B and Meier PJ (2004) Organic anion transporting polypeptides of the OATP/ SLC21 family: phylogenetic classification as OATP/ SLCO superfamily, new nomenclature and molecular/functional properties. *Pflügers Arch* **447**:653-665.
- Han YH, Sweet DH, Hu DN, and Pritchard JB (2001) Characterization of a novel cationic drug transporter in human retinal pigment epithelial cells. *J Pharmacol Exp Ther* **296**:450-457.

- Hasegawa Y, Kishimoto S, Shibatani N, Inotsume N, Takeuchi Y, and Fukushima S (2010) The disposition of pravastatin in a rat model of streptozotocin-induced diabetes and organic anion transporting polypeptide 2 and multidrug resistance-associated protein 2 expression in the liver. *Biol Pharm Bull* **33**:153-156.
- Hernandez-Perera O, Perez-Sala D, Navarro-Antolin J, Sanchez-Pascuala R, Hernandez G, Diaz C, and Lamas S (1998) Effects of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors, atorvastatin and simvastatin, on the expression of endothelin-1 and endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. *J Clin Invest* **101**:2711-2719.
- Hirano M, Maeda K, Matsushima S, Nozaki Y, Kusahara H, and Sugiyama Y (2005) Involvement of BCRP (ABCG2) in the biliary excretion of pitavastatin. *Mol Pharmacol* **68**:800-807.
- Honjo M, Tanihara H, Nishijima K, Kiryu J, Honda Y, Yue BY, and Sawamura T (2002) Statin inhibits leukocyte-endothelial interaction and prevents neuronal death induced by ischemia-reperfusion injury in the rat retina. *Arch Ophthalmol* **120**:1707-1713.
- Hosoya K, Makihara A, Tsujikawa Y, Yoneyama D, Mori S, Terasaki T, Akanuma S, Tomi M, and Tachikawa M (2009) Roles of inner blood-retinal barrier organic anion transporter 3 in the vitreous/retina-to-blood efflux transport of p-aminohippuric acid, benzylpenicillin, and 6-mercaptopurine. *J Pharmacol Exp Ther* **329**:87-93.
- Hosoya K and Tomi M (2005) Advances in the cell biology of transport via the inner blood-retinal barrier: establishment of cell lines and transport functions. *Biol Pharm Bull* **28**:1-8.
- Hosoya K, Yamamoto A, Akanuma S, and Tachikawa M (2010) Lipophilicity and transporter influence on blood-retinal barrier permeability: a comparison with blood-brain barrier permeability. *Pharm Res* **27**:2715-2724.
- Hu RG, Lim JC, Kalloniatis M, and Donaldson PJ (2011) Cellular localization of glutamate and glutamine metabolism and transport pathways in the rat ciliary epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **52**:3345-3353.
- Ito A, Yamaguchi K, Tomita H, Suzuki T, Onogawa T, Sato T, Mizutamari H, Mikkaichi T, Nishio T, Suzuki T, Unno M, Sasano H, Abe T, Tamai M (2003) Distribution of rat organic anion transporting polypeptide-E (oatp-E) in the rat eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **44**:4877-4884.
- Ito K, Kato Y, Tsuji H, Nguyen HT, Kubo Y, and Tsuji A (2007) Involvement of organic anion transport system in transdermal absorption of flurbiprofen. *J Control*

Release **124**:60-68.

- Kaesemeyer WH, Caldwell RB, Huang J, and Caldwell RW (1999) Pravastatin sodium activates endothelial nitric oxide synthase independent of its cholesterol-lowering actions. *J Am Coll Cardiol* **33**:234-241.
- Kajikawa T, Mishima HK, Murakami T, and Takano M (1999) Role of P-glycoprotein in distribution of rhodamine 123 into aqueous humor in rabbits. *Curr Eye Res* **18**:240-246.
- Kaneko S, Ando A, Okuda-Ashitaka E, Maeda M, Furuta K, Suzuki M, Matsumura M, Ito S (2007) Ornithine transport via cationic amino acid transporter-1 is involved in ornithine cytotoxicity in retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **48**:464-471.
- Katayama K, Ohshima Y, Tomi M, and Hosoya K (2006) Application of microdialysis to evaluate the efflux transport of estradiol 17-beta glucuronide across the rat blood-retinal barrier. *J Neurosci Methods* **156**:249-256.
- Kawazu K, Fujii S, Yamada K, Shinomiya K, Katsuta O, and Horibe Y (2013) Characterization of monocarboxylate uptake and immunohistochemical demonstration of monocarboxylate transporters in cultured rabbit corneal epithelial cells. *J Pharm Pharmacol* **65**:328-336.
- Kawazu K, Midori Y, Shiono H, and Ota A (1999) Characterization of the carrier-mediated transport of levofloxacin, a fluoroquinolone antimicrobial agent, in rabbit cornea. *J Pharm Pharmacol* **51**:797-801.
- Kawazu K, Oshita A, Nakamura T, Nakashima M, Ichikawa N, and Sasaki H (2006) Transport of acebutolol through rabbit corneal epithelium. *Biol Pharm Bull* **29**:846-849.
- Kawazu K, Shiono H, Tanioka H, Ota A, Ikuse T, Takashina H, and Kawashima Y (1998) Beta adrenergic antagonist permeation across cultured rabbit corneal epithelial cells grown on permeable supports. *Curr Eye Res* **17**:125-131.
- Kennedy BG and Mangini NJ (2002) P-glycoprotein expression in human retinal pigment epithelium. *Mol Vis* **8**:422-430.
- Kido Y, Tamai I, Ohnari A, Sai Y, Kagami T, Nezu J, Nikaido H, Hashimoto N, Asano M, and Tsuji A (2001) Functional relevance of carnitine transporter OCTN2 to brain distribution of L-carnitine and acetyl-L-carnitine across the blood-brain barrier. *J Neurochem* **79**:959-969.
- Kikuchi R, Kusuhara H, Abe T, Endou H, and Sugiyama Y (2004) Involvement of multiple transporters in the efflux of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors across the blood-brain barrier. *J Pharmacol Exp Ther* **311**:1147-1153.

- Kraft ME, Glaeser H, Mandery K, Konig J, Auge D, Fromm MF, Schlotzer-Schrehardt U, Welge-Lussen U, Kruse FE, and Zolk O (2010) The prostaglandin transporter OATP2A1 is expressed in human ocular tissues and transports the antiglaucoma prostanoid latanoprost. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **51**:2504-2511.
- Kubo Y, Kusagawa Y, Tachikawa M, Akanuma S, and Hosoya K (2013) Involvement of a novel organic cation transporter in verapamil transport across the inner blood-retinal barrier. *Pharm Res* **30**:847-856.
- Kubo Y, Obata A, Akanuma S, Hosoya K (2015) Impact of Cationic Amino Acid Transporter 1 on Blood-Retinal Barrier Transport of L-Ornithine. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **56**:5925-5932.
- Kuipers DP, Scripture JP, Gunnink SM, Salie MJ, Schotanus MP, Ubels JL, and Louters LL (2013) Differential regulation of GLUT1 activity in human corneal limbal epithelial cells and fibroblasts. *Biochimie* **95**:258-263.
- Kulkarni PS and Srinivasan BD (1985) Anti-inflammatory effects of ketoprofen in rabbit corneal epithelial wound model. *Exp Eye Res* **41**:267-273.
- Kusuhara H and Sugiyama Y (2004) Efflux transport systems for organic anions and cations at the blood-CSF barrier. *Adv Drug Deliv Rev* **56**:1741-1763.
- Kusuhara H and Sugiyama Y (2005) Active efflux across the blood-brain barrier: role of the solute carrier family. *NeuroRx* **2**:73-85.
- Li B, Lee MS, Lee RS, Donaldson PJ, and Lim JC (2012) Characterization of glutathione uptake, synthesis, and efflux pathways in the epithelium and endothelium of the rat cornea. *Cornea* **31**:1304-1312.
- Li B, Umapathy A, Tran LU, Donaldson PJ, and Lim JC (2013) Molecular identification and cellular localisation of GSH synthesis, uptake, efflux and degradation pathways in the rat ciliary body. *Histochem Cell Biol* **139**:559-571.
- Mannermaa E, Vellonen KS, Ryhänen T, Kokkonen K, Ranta VP, Kaarniranta K, Urtti A (2009) Efflux protein expression in human retinal pigment epithelium cell lines. *Pharm Res* **26**:1785-1791.
- Mannermaa E, Vellonen KS, and Urtti A (2006) Drug transport in corneal epithelium and blood-retina barrier: emerging role of transporters in ocular pharmacokinetics. *Adv Drug Deliv Rev* **58**:1136-1163.
- Manning Fox JE, Meredith D, and Halestrap AP (2000) Characterisation of human monocarboxylate transporter 4 substantiates its role in lactic acid efflux from skeletal muscle. *J Physiol* **529 Pt 2**:285-293.
- Miyahara S, Kiryu J, Yamashiro K, Miyamoto K, Hirose F, Tamura H, Katsuta H, Nishijima K, Tsujikawa A, and Honda Y (2004) Simvastatin inhibits leukocyte accumulation and vascular permeability in the retinas of rats with

- streptozotocin-induced diabetes. *Am J Pathol* **164**:1697-1706.
- Mooradian AD, Haas MJ, Batejko O, Hovsepyan M, and Feman SS (2005) Statins ameliorate endothelial barrier permeability changes in the cerebral tissue of streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes* **54**:2977-2982.
- Morita N, Kusuhara H, Nozaki Y, Endou H, and Sugiyama Y (2005) Functional involvement of rat organic anion transporter 2 (Slc22a7) in the hepatic uptake of the nonsteroidal anti-inflammatory drug ketoprofen. *Drug Metab Dispos* **33**:1151-1157.
- Morita N, Kusuhara H, Sekine T, Endou H, and Sugiyama Y (2001) Functional characterization of rat organic anion transporter 2 in LLC-PK1 cells. *J Pharmacol Exp Ther* **298**:1179-1184.
- Nagaoka T, Hein TW, Yoshida A, and Kuo L (2007) Simvastatin elicits dilation of isolated porcine retinal arterioles: role of nitric oxide and mevalonate-rho kinase pathways. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **48**:825-832.
- Nagaoka T, Takahashi A, Sato E, Izumi N, Hein TW, Kuo L, and Yoshida A (2006) Effect of systemic administration of simvastatin on retinal circulation. *Arch Ophthalmol* **124**:665-670.
- Nagase K, Tomi M, Tachikawa M, Hosoya K (2006) Functional and molecular characterization of adenosine transport at the rat inner blood-retinal barrier. *Biochim Biophys Acta* **1758**:13-19.
- Noe B, Hagenbuch B, Stieger B, and Meier PJ (1997) Isolation of a multispecific organic anion and cardiac glycoside transporter from rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:10346-10350.
- Ohashi R, Tamai I, Yabuuchi H, Nezu JI, Oku A, Sai Y, Shimane M, and Tsuji A (1999) Na(+)-dependent carnitine transport by organic cation transporter (OCTN2): its pharmacological and toxicological relevance. *J Pharmacol Exp Ther* **291**:778-784.
- Ohtsuki S, Asaba H, Takanaga H, Deguchi T, Hosoya K, Otagiri M, and Terasaki T (2002) Role of blood-brain barrier organic anion transporter 3 (OAT3) in the efflux of indoxyl sulfate, a uremic toxin: its involvement in neurotransmitter metabolite clearance from the brain. *J Neurochem* **83**:57-66.
- Ohtsuki S, Yamaguchi H, Asashima T, and Terasaki T (2007) Establishing a method to isolate rat brain capillary endothelial cells by magnetic cell sorting and dominant mRNA expression of multidrug resistance-associated protein 1 and 4 in highly purified rat brain capillary endothelial cells. *Pharm Res* **24**:688-694.
- Ozkiris A, Erkilic K, Koc A, and Mistik S (2007) Effect of atorvastatin on ocular blood flow velocities in patients with diabetic retinopathy. *Br J Ophthalmol* **91**:69-73.

- Pelis RM, Shahidullah M, Ghosh S, Coca-Prados M, Wright SH, and Delamere NA (2009) Localization of multidrug resistance-associated protein 2 in the nonpigmented ciliary epithelium of the eye. *J Pharmacol Exp Ther* **329**:479-485.
- Phatchawan A, Chutima S, Varanuj C, and Anusorn L (2014) Decreased renal organic anion transporter 3 expression in type 1 diabetic rats. *Am J Med Sci* **347**:221-227.
- Rajan PD, Kekuda R, Chancy CD, Huang W, Ganapathy V, Smith SB (2000) Expression of the extraneuronal monoamine transporter in RPE and neural retina. *Curr Eye Res* **20**:195-204.
- Regina A, Koman A, Piciotti M, El Hafny B, Center MS, Bergmann R, Couraud PO, and Roux F (1998) Mrp1 multidrug resistance-associated protein and P-glycoprotein expression in rat brain microvessel endothelial cells. *J Neurochem* **71**:705-715.
- Rojanasakul Y and Robinson J (1989) Transport mechanisms of the cornea: characterization of barrier permselectivity. *Int J Pharm* **55**:237-246.
- Saghizadeh M, Soleymani S, Harounian A, Bhakta B, Troyanovsky SM, Brunken WJ, Pellegrini G, and Ljubimov AV (2011) Alterations of epithelial stem cell marker patterns in human diabetic corneas and effects of c-met gene therapy. *Mol Vis* **17**:2177-2190.
- Saheki A, Terasaki T, Tamai I, and Tsuji A (1994) In vivo and in vitro blood-brain barrier transport of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors. *Pharm Res* **11**:305-311.
- Sakurai T, Akanuma S, Usui T, Kubo Y, Tachikawa M, Hosoya K (2015) Excitatory Amino Acid Transporter 1-Mediated L-Glutamate Transport at the Inner Blood-Retinal Barrier: Possible Role in L-Glutamate Elimination from the Retina. *Biol Pharm Bull* **38**:1087-1091.
- Schlingemann RO, Hofman P, Klooster J, Blaauwgeers HG, Van der Gaag R, and Vrensen GF (1998) Ciliary muscle capillaries have blood-tissue barrier characteristics. *Exp Eye Res* **66**:747-754.
- Schoenwald RD and Huang HS (1983) Corneal penetration behavior of beta-blocking agents I: Physicochemical factors. *J Pharm Sci* **72**:1266-1272.
- Shirasaka Y, Suzuki K, Nakanishi T, and Tamai I (2010) Intestinal absorption of HMG-CoA reductase inhibitor pravastatin mediated by organic anion transporting polypeptide. *Pharm Res* **27**:2141-2149.
- Shitara Y, Sugiyama D, Kusuhara H, Kato Y, Abe T, Meier PJ, Itoh T, and Sugiyama Y (2002) Comparative inhibitory effects of different compounds on rat oatpl

- (slc21a1)- and Oatp2 (Slc21a5)-mediated transport. *Pharm Res* **19**:147-153.
- Sugiyama D, Kusahara H, Shitara Y, Abe T, Meier PJ, Sekine T, Endou H, Suzuki H, and Sugiyama Y (2001) Characterization of the efflux transport of 17beta-estradiol-D-17beta-glucuronide from the brain across the blood-brain barrier. *J Pharmacol Exp Ther* **298**:316-322.
- Tachikawa M, Takeda Y, Tomi M, and Hosoya K (2010) Involvement of OCTN2 in the transport of acetyl-L-carnitine across the inner blood-retinal barrier. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **51**:430-436.
- Tachikawa M, Toki H, Tomi M, and Hosoya K (2008) Gene expression profiles of ATP-binding cassette transporter A and C subfamilies in mouse retinal vascular endothelial cells. *Microvasc Res* **75**:68-72.
- Tagami M, Kusahara S, Honda S, Tsukahara Y, and Negi A (2009) Expression of ATP-binding cassette transporters at the inner blood-retinal barrier in a neonatal mouse model of oxygen-induced retinopathy. *Brain Res* **1283**:186-193.
- Takata K, Kasahara T, Kasahara M, Ezaki O, and Hirano H (1991) Ultracytochemical localization of the erythrocyte/HepG2-type glucose transporter (GLUT1) in the ciliary body and iris of the rat eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **32**:1659-1666.
- Takata K, Kasahara T, Kasahara M, Ezaki O, and Hirano H (1992) Ultracytochemical localization of the erythrocyte/HepG2-type glucose transporter (GLUT1) in cells of the blood-retinal barrier in the rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **33**:377-383.
- Takeda M, Noshiro R, Onozato ML, Tojo A, Hasannejad H, Huang XL, Narikawa S, and Endou H (2004) Evidence for a role of human organic anion transporters in the muscular side effects of HMG-CoA reductase inhibitors. *Eur J Pharmacol* **483**:133-138.
- Takeuchi T, Yoshitomi S, Higuchi T, Ikemoto K, Niwa S, Ebihara T, Katoh M, Yokoi T, and Asahi S (2006) Establishment and characterization of the transformants stably-expressing MDR1 derived from various animal species in LLC-PK1. *Pharm Res* **23**:1460-1472.
- Talluri RS, Katragadda S, Pal D, and Mitra AK (2006) Mechanism of L-ascorbic acid uptake by rabbit corneal epithelial cells: evidence for the involvement of sodium-dependent vitamin C transporter 2. *Curr Eye Res* **31**:481-489.
- Tamai I, Sai Y, Ono A, Kido Y, Yabuuchi H, Takanaga H, Satoh E, Ogihara T, Amano O, Izeki S, and Tsuji A (1999) Immunohistochemical and functional characterization of pH-dependent intestinal absorption of weak organic acids by the monocarboxylic acid transporter MCT1. *J Pharm Pharmacol* **51**:1113-1121.

- Toda R, Kawazu K, Oyabu M, Miyazaki T, and Kiuchi Y (2011) Comparison of drug permeabilities across the blood-retinal barrier, blood-aqueous humor barrier, and blood-brain barrier. *J Pharm Sci* **100**:3904-3911.
- Tomi M and Hosoya K (2004) Application of magnetically isolated rat retinal vascular endothelial cells for the determination of transporter gene expression levels at the inner blood-retinal barrier. *J Neurochem* **91**:1244-1248.
- Tomi M and Hosoya K (2010) The role of blood-ocular barrier transporters in retinal drug disposition: an overview. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **6**:1111-1124.
- Tomi M, Kitade N, Hirose S, Yokota N, Akanuma S, Tachikawa M, Hosoya K (2009) Cationic amino acid transporter 1-mediated L-arginine transport at the inner blood-retinal barrier. *J Neurochem* **111**:716-725.
- Uchida Y, Kamiie J, Ohtsuki S, and Terasaki T (2007) Multichannel liquid chromatography-tandem mass spectrometry cocktail method for comprehensive substrate characterization of multidrug resistance-associated protein 4 transporter. *Pharm Res* **24**:2281-2296.
- Umapathy A, Donaldson P, and Lim J (2013) Antioxidant delivery pathways in the anterior eye. *Biomed Res Int* **2013**:207250.
- Usui T, Kubo Y, Akanuma S, and Hosoya K (2013) Beta-alanine and L-histidine transport across the inner blood-retinal barrier: potential involvement in L-carnosine supply. *Exp Eye Res* **113**:135-142.
- Wu J, Zhang JJ, Koppel H, and Jacob TJ (1996) P-glycoprotein regulates a volume-activated chloride current in bovine non-pigmented ciliary epithelial cells. *J Physiol* **491 Pt3**:743-755.
- Yabuuchi H, Tamai I, Nezu J, Sakamoto K, Oku A, Shimane M, Sai Y, and Tsuji A (1999) Novel membrane transporter OCTN1 mediates multispecific, bidirectional, and pH-dependent transport of organic cations. *J Pharmacol Exp Ther* **289**:768-773.
- Yamazaki M, Akiyama S, Ni'inuma K, Nishigaki R, and Sugiyama Y (1997) Biliary excretion of pravastatin in rats: contribution of the excretion pathway mediated by canalicular multispecific organic anion transporter. *Drug Metab Dispos* **25**:1123-1129.
- Zamek-Gliszczyński MJ, Bedwell DW, Bao JQ, and Higgins JW (2012) Characterization of SAGE Mdr1a (P-gp), Bcrp, and Mrp2 knockout rats using loperamide, paclitaxel, sulfasalazine, and carboxydichlorofluorescein pharmacokinetics. *Drug Metab Dispos* **40**:1825-1833.
- Zamek-Gliszczyński MJ, Goldstein KM, Paulman A, Baker TK, and Ryan TP (2013) Minor compensatory changes in SAGE Mdr1a (P-gp), Bcrp, and Mrp2 knockout

rats do not detract from their utility in the study of transporter-mediated pharmacokinetics. *Drug Metab Dispos* **41**:1174-1178.

Zhang T, Xiang CD, Gale D, Carreiro S, Wu EY, and Zhang EY (2008) Drug transporter and cytochrome P450 mRNA expression in human ocular barriers: implications for ocular drug disposition. *Drug Metab Dispos* **36**:1300-1307.

中江公裕、増田寛次郎、妹尾正、澤充、金井淳、石橋達朗 (2008) 厚生労働省難治性疾患克服研究事業 網膜脈絡膜・視神経委縮症に関する研究班 平成 19 年度研究報告書、99-103

謝辞

本研究を進めるにあたり、終始あたたかい激励とご指導、ご鞭撻をいただいた、富山大学大学院医学薬学研究部 薬剤学研究室 教授 細谷 健一 先生に深く感謝いたします。

本研究の遂行について、ご指導、ご協力をいただきました、富山大学大学院医学薬学研究部 薬剤学研究室 准教授 久保 義行 先生、ならびに同助教 赤沼 伸乙 先生に厚くお礼申し上げます。

また、本研究の遂行、本論文の作成にあたり、ご指導、ご助言いただきました、参天製薬株式会社 河津 剛一 博士、共に研究を遂行いただきました、同社 瀬戸口 尋子 氏ならびに同社 薬物動態部門の皆様、心から感謝の意を表します。

博士後期課程進学以前より、現在にわたり、ご指導いただきました静岡県立大学大学院 薬食研究推進センター長 特任教授 山田 静雄 先生、帝京大学 薬学部 薬物動態学研究室 教授 出口 芳春 先生、ならびに岐阜薬科大学 実践社会薬学研究室 准教授 林 秀樹 先生に心より感謝申し上げます。

本研究のなかで RT-PCR 実験を実施いただいた富山大学大学院医学薬学研究部 薬剤学研究室 山本 正和 氏、マイクロダイアリシス実験技術の習得に際して、ご指導、ご助言いただいた同研究室 富瀬 彩加 氏に感謝いたします。

ここにお名前を記させていただいた他にも、数多くの方々に支えていただいたおかげで本論文が完成できましたことに、改めまして心よりお礼申し上げます。

最後に、これまでの長い研究生活をあたたかく見守り、経済的にも精神的にも支えてくださった両親に深い感謝の意を表して、謝辞といたします。

本学位論文は、下記の原著論文を基に作成され、富山大学大学院医学薬学教育部に提出されたものである。

1. **Fujii S**, Hayashi H, Itoh K, Yamada S, Deguchi Y and Kawazu K.
Characterization of the carrier-mediated transport of ketoprofen, a nonsteroidal anti-inflammatory drug, in rabbit corneal epithelium cells. **J Pharm Pharmacol.** 65: 171-180 (2013).
2. **Fujii S**, Setoguchi C, Kawazu K, Hosoya K. Impact of P-glycoprotein on blood-retinal barrier permeability: Comparison of blood-aqueous humor and blood-brain barrier using mdr1a knockout rats. **Invest Ophthalmol Vis Sci.** 55: 4650-4658 (2014).
3. **Fujii S**, Setoguchi C, Kawazu K, Hosoya K. Functional characterization of carrier-mediated transport of pravastatin across the blood-retinal barrier in rats. **Drug Metab Dispos.** 43: 1956-1959 (2015).