

## 免疫抑制薬の中枢毒性：発現機序及び予測・回避対策

山内 淳史

福岡大学薬学部薬学疾患管理学教室, 814-0180 福岡市城南区七隈 8-19-1

An approach to establish the protection and avoidance management of immunosuppressant-induced neurotoxicity

Atsushi Yamauchi

Department of Pharmaceutical Care and Health Sciences,  
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Fukuoka University, Fukuoka 814-0180, Japan

### Abstract

Cyclosporine and tacrolimus (potent immunosuppressants) are used to prevent allograft rejection in solid organ transplantation and graft-versus-host disease after bone marrow transplantation and to treat various autoimmune diseases. Among the various adverse events, neurotoxicity (tremor, seizure and encephalopathy) frequently occurs and causes the interruption of the treatment. This reaction is difficult to be predicted by monitoring whole-blood concentrations. In the present study, (1) the genetic risk factors for the immunosuppressant-induced neurotoxicity, (2) an appropriate administration schedule to ameliorate adverse reactions, and (3) an involvement of nitric oxide (NO) in drug-induced convulsions were evaluated. Our pharmacogenomic analysis of patients with liver implantation demonstrated the positive correlation between mutation G2677[A,T] in the ABCB1 (MDR1) gene and neurotoxic events induced by tacrolimus. The administration of tacrolimus in the dark phase lowered neurotoxicity while maintaining its immunosuppressive effect in rats. Cyclosporine increased NO production in the rat dorsal hippocampus to induce convulsions. These findings suggest that the ABCB1 genotyping, an administration in the active phase, and an inhibition of the brain NO production may be the useful interventions to avoid the neurotoxicity associated with immunosuppressants.

## 緒言

近年の移植医療の発展には2つの強力な免疫抑制薬 cyclosporine および tacrolimus の発見と臨床応用が大きく貢献している。両薬物はそれぞれ FK-binding protein (FKBP)、cyclophilin A と呼ばれる細胞内蛋白 (イムノフィリン) と結合し、T 細胞活性化に重要な IL-2 の発現に関わる脱リン酸化酵素カルシニューリンを阻害することにより免疫抑制作用を発揮する (1)。

Cyclosporine、tacrolimus の有害作用回避を目的とした Therapeutic Drug Monitoring (TDM) が多くの施設で行われているが、中枢毒性は血中濃度が治療域であるにも関わらず発現するケースが少なくない (2,3)。現在両薬物は自己免疫疾患への適応が拡大しつつあり、有害作用の予測および軽減・回避対策がますます重要となっている。

免疫抑制薬の中枢毒性発現機序は十分に解明されていない。これまでに脳内移行性や神経活動性に関する検討が行われている。免疫抑制薬は薬物排出ポンプ P-糖蛋白質 (P-gp) の基質であるため、血液脳関門を通過できない (4)。最近、*in vitro* で免疫抑制薬が脳血管内皮細胞に対して細胞障害および P-gp 機能障害を惹起することにより脳内に移行する可能性が指摘された (5)。また、イムノフィリンは脳内に非常に多く分布しており (6)、NO や神経伝達物質の放出制御に関与している (7)。NO は中枢で、けいれん発現に関与しているとの報告もある (8,9)。

薬物療法の患者個別化に向け、薬理遺伝学および時間薬理学が注目されている。薬理遺伝学は、薬物動態や薬物応答性の個人差と代謝酵素やトランスポーターの遺伝子多型との関連を明らかにしつつある。また時間薬理学は、種々の生理機能の日周リズムを考慮し最適な投与タイミングを設定する時間薬物治療の基盤的情報を提供している。P-gp をコードする ABCB1(MDR1)遺伝子には多型があり、基質薬物の体内動態の変化との関連が明らかにされた (10,11)。一方、生体の免疫機能や中枢の神経伝達物質には日周リズムが認められる (12,13)。従って、免疫抑制薬の中枢毒性発現予測および軽減・回避対策構築に、薬理遺伝学的あるいは時間薬理学的視点を導入する必要があるだろう。

そこで本研究では、まず ABCB1 遺伝子多型と tacrolimus 中枢毒性発現との関連性について薬理遺伝学的検討を行った。また tacrolimus の中枢毒性、腎毒性および免疫抑制作用の時間薬理学的解析を行った。さらに、免疫抑制薬がマウス bicuculline 誘発けいれんおよび海馬 NO 産生量に及ぼす影響について検討した。

## Tacrolimus の中枢毒性に関する薬理遺伝学的研究

### 【方法】

**対象患者**：1996年から2000年の間に九州大学医学部附属病院で生体肝移植をうけ、文書にてインフォームドコンセントを取得した17名の患者を対象とした。17人中6人の患者(10-47歳)は、術後10日以内にけいれん、振戦、白質脳症といった中枢性副作用を発現したが、他の患者(4-65歳)は入院期間中にそのような副作用はなかった。

**ABCB1(MDR1)遺伝子解析**：ゲノムDNAは、自動核酸抽出装置 (Toyobo) を用いてリンパ球より抽出した。ABCB1 遺伝子多型の同定は、既報 (11) に従い、PCR 後ダイレクトシー

クエンス法により塩基配列を決定した。遺伝子配列は GenBank に登録されている配列 (accession no. AC002457; AC005068) を“野生型”として比較した。

**判別関数分析：**患者の中枢毒性発現に関わる要因を解析するために、ステップワイズ判別関数分析を行った。検討した従属変数(要因)は、変異型、変異の数、年齢、移植肝重量、移植肝容量/レシピエント標準肝臓容量比(肝容量比)、tacrolimus 血中濃度、ヘマトクリット、AST、ALT および血清アルブミン濃度(脳への分布に影響すると考えられる)を用いた。

### 【結果】

**中枢毒性発現と ABCB1(MDR1)遺伝子多型との関連：**ステップワイズ判別関数分析の結果選択された要因は、2ヶ所の変異(G2677[A,T]、C3435T)、tacrolimus 血中濃度、AST、肝容量比であった(Table)。これらの要因を用いることで、95.5%の予測性を示した( $\chi^2=7.91$ ;  $P<0.005$ )。Exon 21 の G2677[A,T]は中枢毒性発現について陽性の予測因子であり、C3435T は陰性であった。毒性発現患者の tacrolimus 血中濃度と AST は有意に高かった(ウィルコクソン符号付順位和検定: 25.2 [SE 3.3] vs. 13.7 ng/mL [4.9],  $P<0.004$ ; 85.8 [9.8] vs. 63.0 U/L [10.6],  $P=0.05$ )。肝容量比は陰性の予測因子で、比が小さいと中枢毒性の危険因子であることが推察された。毒性発現患者群の G2677[A,T]のアレル頻度(0.50, 95%CI 0.10-0.89)は、有意ではないが、対照患者群(0.36, 0.08-0.64)と比較して高かった。

**TABLE Stepwise discriminant function analysis of tacrolimus induced neurotoxicity**

| Variable   | Coefficient | chi-square value | p     |
|--|-------------|------------------|-------|
| G2677[A,T]   | 8.35        |                  |       |
| C3435T   | -9.4        |                  |       |
| Tacrolimus concentration in blood                          | 0.78        |                  |       |
| AST  | 0.11        | 7.91             | 0.005 |
| Ratio of graft weight to recipient's standard liver volume | -0.31       |                  |       |
| (Intercept)  | -8.99       |                  |       |

Predictive accuracy = 95.5 %

### 【考察】

本研究成績では、tacrolimus 血中濃度と AST は中枢毒性の危険因子であった。しかしながら、血中濃度が治療域(5-20 ng/mL)であっても中枢毒性は発現し、血中濃度は危険因子となり得ないとする報告がある(2)。本検討においても、対照群の数人の患者では血中濃度が 20 ng/mL を超えても中枢毒性を発現しておらず、毒性発現群の患者 3 人は、治療濃度であるにも関わらず毒性が発現した。また正常な肝機能であってもしばしば中枢毒性は発現する(14)。すなわち中枢毒性発現にはこれら 2 つの要因とは別の危険因子が関与していると考えられる。

本研究では、P-gp をコードする ABCB1 遺伝子多型 G2677[A,T]および C3435T が危険因

子として抽出された。C3435Tはサイレント変異であり、日本人ではC3435Tと胎盤のP-gp発現量とに関連は認められていない(11)。C3435Tと異なり、G2677[A,T]はアミノ酸置換を伴う。Tanabeらは最近、2677位の変異が胎盤のP-gp発現量を低下させることを報告した(11)。従って2677位の変異によるBBBにおけるP-gp機能発現低下が中枢毒性発現に関わっている可能性が示唆される。

今回の成績より、症例数は少ないものの、ABCB1(MDR1)遺伝子変異とtacrolimus中枢毒性発現との関連性を見出すことができた。Tacrolimus血中濃度、肝機能そしてABCB1(MDR1)遺伝子多型はtacrolimus誘発中枢毒性発現の重要な関連因子である可能性が考えられる。

## Tacrolimusの時間薬理学的研究

### 【方法】

**実験動物**：実験には7週齢Wistar系雄性ラット(九動株式会社)を使用した。また、皮膚移植片のdonorとしてC57BL/6J雄性マウス(15-20g, 九動株式会社)を使用した。動物は自由摂食飲水・明暗12hr周期(明期7:00-19:00)、室温23°C±2°Cの条件下で2週間飼育した後、実験に供した。

**薬物および投与タイミング**：Tacrolimusはプログラフ注<sup>®</sup>(藤沢薬品工業)を用い、振戦誘発物質は、harmine(Sigma)を用いた。Tacrolimusの投与タイミングは、8:00(light group)と20:00(dark group)の2時点とした。

**血清BUNおよびcreatinine値の測定**：Tacrolimus 2 mg/kgを各時点にそれぞれ1日1回14日間腹腔内投与後、尾静脈より採血し、BUN、creatinine値をvisionアナライザー(Abbot Laboratories)を用いて測定した。

**Harmine誘発振戦持続時間の測定**：振戦持続時間の測定はShutoらの方法に準じて行った(15)。Tacrolimus 2 mg/kgを各時点にそれぞれ1日1回7日間腹腔内投与した。7日目投与終了後個別のケージに移し、55分後にharmine 10 mg/kgを腹腔内に投与した。Harmine投与5分後から20分後までの15分間に発現した振戦時間を測定し、総振戦時間を算出した。

**異種間皮膚移植モデル**：皮膚移植はShapiraらの方法に準じ、Wistarラットをrecipient、C57BL/6Jマウスをdonorとして行った。移植後は1日1回各時点に薬物を投与し、皮膚移植片の脱落をもって拒絶反応とした(16)。

**Tacrolimus血中濃度の測定**：Tacrolimus 2 mg/kgを各時点にそれぞれ腹腔内投与した。投与0.5、1、2、4、8、12、24時間後に腹部大動脈から採血した。また、同様に1日1回7日間投与後24時間目に採血を行った。血中濃度はMEIA法で測定した。

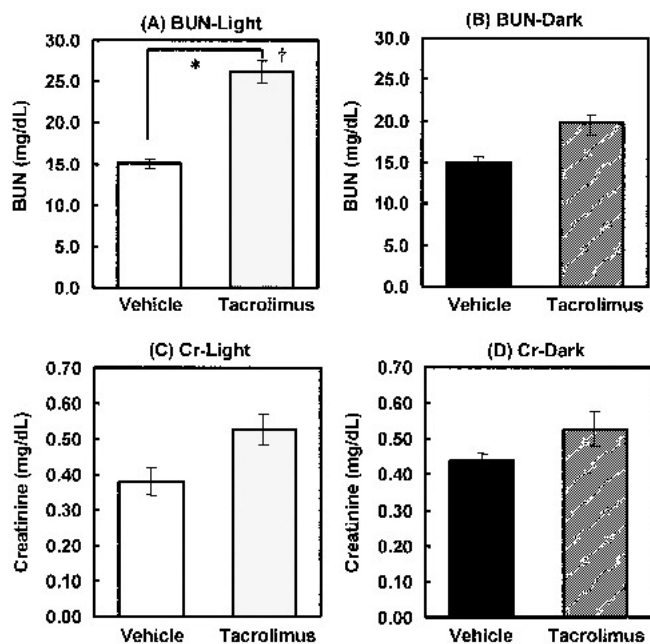
### 【結果】

#### ●Tacrolimusによる有害作用発現に及ぼす投与タイミングの影響

##### 血清中BUNおよびcreatinine値に対する影響

Light groupでは、tacrolimus投与によりvehicle投与と比較して、有意なBUN値の上昇

(74.7%) が認められた (Fig. 1(A),  $P<0.01$ )。Creatinine 値は有意ではないが 39.5% 上昇した (Fig. 1(B))。それに対して Dark group では、いずれもわずかな上昇しか認められなかった (Fig. 1(B), (D))。Light group の血清 BUN 値は、Dark group より有意に高かった ( $P<0.05$ )。

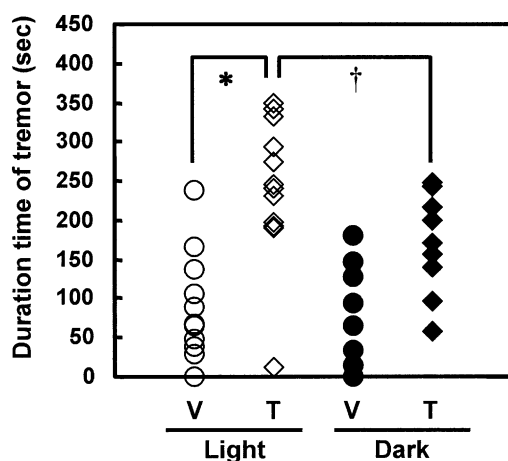


**Fig. 1. Influence of the dosing time (8:00 or 20:00) of tacrolimus on the BUN and creatinine concentrations in rats.**

(A) The BUN concentrations in the light group (BUN-light); (B) The BUN concentrations in the dark group (BUN-dark); (C) The creatinine concentrations in the light group (creatinine-light); (D) The creatinine concentrations in the dark group (creatinine-dark). \*\* $P<0.01$ ; significantly different from the vehicle-treated group. † $P<0.05$ ; significantly different from the tacrolimus-treated group in the dark phase.

### Harmine 誘発振戦持続時間に対する影響

Light group の tacrolimus 投与群の振戦持続時間は、vehicle 投与群の 2.7 倍となり有意に延長した ( $P<0.05$ )。この延長作用は、Dark group では認められなかった。Tacrolimus の harmine 誘発振戦増悪作用は、Light group で有意に強かった ( $P<0.05$ )。



**Fig. 2. Influence of the dosing time (8:00 (light) or 20:00 (dark)) of tacrolimus on harmine-induced tremors in rats.**

$n = 10-12$  per group. \* $P<0.05$ ; significantly different from the vehicle-treated group. † $P<0.05$ ; significantly different from the tacrolimus-treated group in the dark phase.

### Tacrolimus の免疫抑制効果に及ぼす投与タイミングの影響

Fig. 3 に、Light (A) および Dark group (B) の異種間皮膚移植の移植片生着率を示した。移植片生着率には移植時刻による差が認められた (vehicle 投与群)。明期での移植の平均生着日数は  $14.8 \pm 0.6$  日で、暗期で行った場合 ( $12.3 \pm 0.5$  日) より長かった。Dark group では、

tacrolimus は平均生着日数を 20%有意に延長し ( $P<0.05$ )、Light group の平均生着日数と同程度となった。Light group の vehicle 投与群と tacrolimus 投与群の平均生着日数には有意な差はなかった。

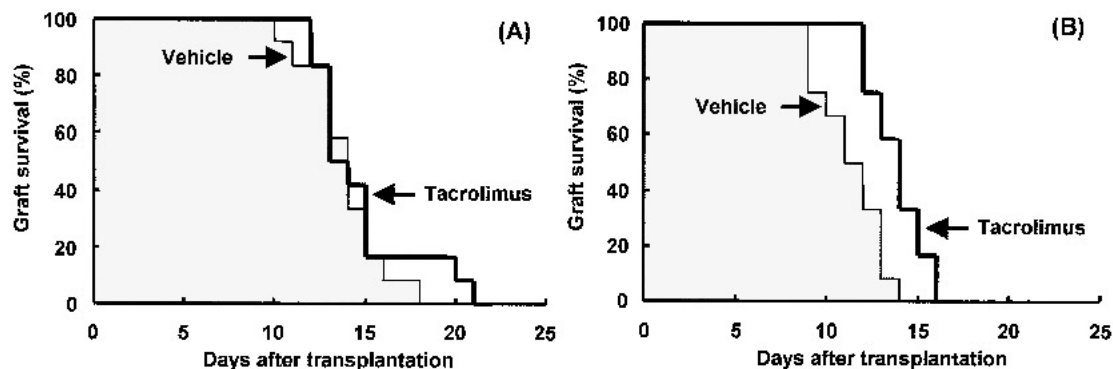


Fig. 3. Influence of the dosing time (8:00 (A) and 20:00 (B)) of tacrolimus on the survival of skin xenograft in the mouse-to-rat skin xenotransplantation model.

n=12 per group. \* $P<0.05$ ; significantly different from the vehicle-treated group.

#### ● Tacrolimus 薬物動態に及ぼす投与タイミングの影響

Fig. 4 (A)に tacrolimus 単回投与時の血中濃度の時間変化を示した。血中濃度推移には、投与タイミングによる差は認められなかった。しかし、tacrolimus 投与後 1、4、8 時間目の血中濃度は、Light group で高く、0-12 h の薬物血中濃度曲線下面積 (area under the concentration-time curve : AUC) は、Light group が  $411.5 \text{ ng}\cdot\text{h}/\text{mL}$ 、Dark group が  $354.5 \text{ ng}\cdot\text{h}/\text{mL}$  であった。

Fig. 4(B)には tacrolimus 7 日間投与 24 時間後の血中濃度を示した。Light group および Dark group の平均血中濃度はそれぞれ  $2.9 \pm 0.19$ 、 $2.4 \pm 0.14 \text{ ng/mL}$  であり、Light group でやや高かったが、有意な差はなかった。

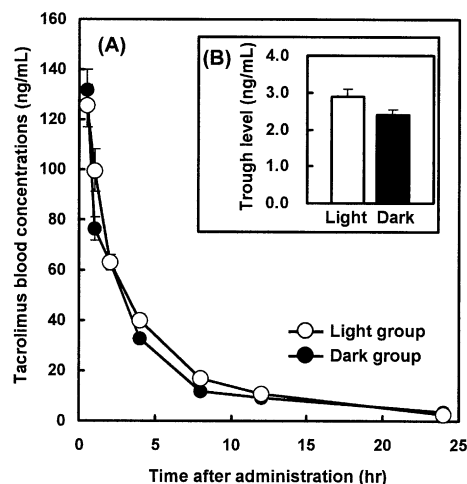


Fig. 4. The pharmacokinetic influence of the dosing time (8:00 (light) and 20:00 (dark)) of tacrolimus (2 mg/kg i.p.) after single (A) or repeated (B) injection.

Values represent means  $\pm$  S.E.M. for 5 to 6 rats.

#### 【考察】

免疫抑制薬の中枢毒性に関する時間薬理学的研究はこれまで報告されていない。本研究

は、tacrolimus の harmine 誘発振戦延長作用に日周リズムが存在し、ラット明期投与で暗期投与と比較して、より増悪することを示した。Shuto らは、tacrolimus と同じカルシニューリン阻害薬である cyclosporine が、セロトニン神経活動を活性化させ harmine 誘発振戦を増悪させることを示している (15)。この増悪作用には、GABA 神経活動および受容体の抑制も関与していると考えられる (17, 18)。Tacrolimus の振戦増悪作用が、投与タイミングにより異なる機序に、これらの神経活動性のリズムが関与していることが予測されるが、詳細な点は今後の検討課題である。

ラットにおける tacrolimus 投与タイミング依存性の腎毒性については、Fujimura らの研究がある (19)。本研究と異なり、彼らは tacrolimus による BUN および creatinine の上昇が暗期投与でより増悪し、それは暗期で血中濃度が高いためであると報告している。Fujimura らは、経口投与で実験を行っており、その場合、摂食、胃内容排出速度、消化管運動、胆汁排泄、血流および消化管内容移動速度などに日周リズムがある影響で、投与タイミングにより吸収速度あるいは吸収量が異なる。本研究は tacrolimus を腹腔内投与しているため吸収過程の影響がなく、異なる結果となったと推察される。

IL-2 の分泌および T-cell の数には日周リズムがあるので、免疫抑制効果は投与タイミング依存的であることが予測される。実際本研究では、tacrolimus のラット暗期投与で、異種間皮膚移植モデルの移植片生着率が有意に上昇した。心臓移植モデルを用いた cyclosporin の免疫抑制効果について同様の結果が報告されている (20)。すなわちげっ歯類においては、カルシニューリン阻害薬の免疫抑制効果は暗期投与で増強すると考えられる。

以上、tacrolimus のラット暗期（活動期）投与では、免疫抑制作用が低減することなく腎毒性および中枢毒性が軽減することが判った。これは、tacrolimus を使用した免疫抑制作用が、その有害作用回避対策として「投与タイミング」を考慮することの有用性を示唆するものである。

## 免疫抑制薬のけいれん発現機序に関する研究

### 【方法】

**実験動物：**Bicuculline 誘発けいれんの実験には、体重 23-28 g の ddY 系雄性マウス(セアック吉富)を用いた。マイクロダイアリシス法による海馬 NO 産生量測定には、7 週齢雄性 Wistar 系ラット(九動)を用いた。動物は恒温、恒湿および明暗 12 時間周期(7:00-19:00 点灯)の条件下で飼育し、固形飼料および水は自由に摂取できるようにした。

**薬物：**Cyclosporine はサンディミュン注®(ノバルティス ファーマ)、けいれん誘発薬物は (-)bicuculline methobromide(Sigma)、NOS 阻害薬は、nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME; Sigma)、その不活性体には nitro-D-arginine methyl ester (D-NAME; Sigma)を用いた。

**Bicuculline 誘発けいれん：**Cyclosporine (200 mg/kg)を腹腔内投与し、45 分後に L-NAME (10 mg/kg) あるいは D-NAME (10 mg/kg) を腹腔内投与した。その 15 分後に bicuculline を脳室内投与した。その後、マウスを 1 匹ずつケージ(10 x 20 x 15 cm)に入れ、2 分間行動を観察した。けいれん強度は Shuto らの方法に準拠し、5 段階評価を行った (17)。

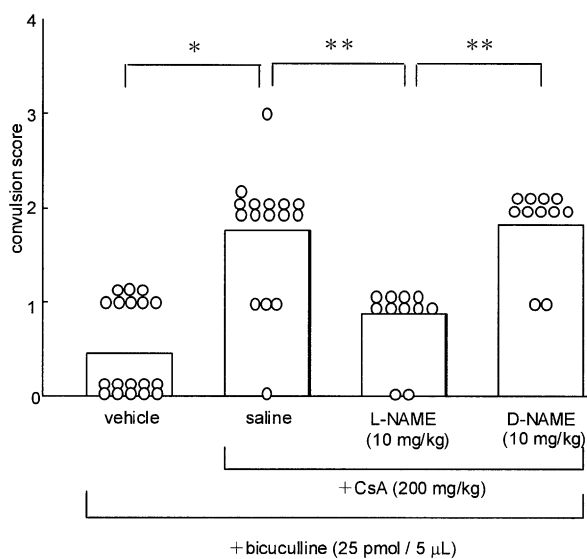
**マイクロダイアリシス法：**ラット背側海馬に挿入したガイドカニューレにマイクロダイア

リシス用直管型透析プローブ (A-I-8-02, EICOM) を挿入し、Ringer 液 (140 mM NaCl, 4 mM KCl, 1.26 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.15 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7.4) をマイクロシリンジポンプ (EICOM) を用いて流速 2 μL / min で灌流した。実験中ラットは free moving とした。灌流液採取開始初めの 30 分間の平均 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> を基礎産生量とした。その後各薬物を腹腔内投与し、90 分間 10 分毎に灌流液を採取した。灌流液中の NO<sub>2</sub><sup>-</sup> の測定は、spectrophotometer-HPLC system (NOx analyzer ENO-20, EICOM) を用いて行った。

## 【結果】

### Bicuculline 誘発けいれんに及ぼす Cyclosporine の影響

Fig.5 に Cyclosporine 投与による bicuculline 誘発けいれんのけいれん強度の変化およびそれに対する NOS 阻害剤 L-NAME の影響を示した。けいれん強度は vehicle 群 0.4±0.1、Cyclosporine+saline 群 1.8±0.2、Cyclosporine+L-NAME 群 0.9±0.1、Cyclosporine+D-NAME 群 1.8±0.1 であった。bicuculline 誘発けいれんは Cyclosporine 投与により有意に増悪した (P<0.01)。増悪作用は L-NAME 併用投与により有意に抑制した (P<0.01) が、D-NAME 併用投与では抑制作用は認められなかった (P=0.87)。



**Fig. 5 Effects of L-NAME and D-NAME on bicuculline (BIC) plus cyclosporine(CsA)-induced convulsions in mice.**

Values represent means ± S.E.M. for the number of rats shown in the parentheses at the top of each column. \*\*  $p < 0.01$  vs. BIC plus vehicle-treated group. ##  $p < 0.01$  vs. BIC plus CsA plus saline-treated group.

### 海馬における Cyclosporine の一酸化窒素産生作用

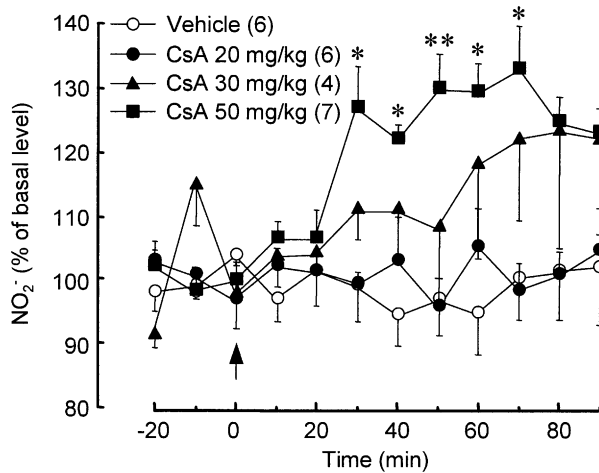
Cyclosporine を腹腔内投与した時の背側海馬灌流液中における NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 産生量の経時変化を Fig.6 に示した。Cyclosporine 投与により海馬 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 産生量は時間経過とともに増加した (p<0.01)。

Fig.7 には、vehicle および cyclosporine 投与後 50 分間 (20-70 分) の平均 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 産生量を基礎産生量に対する割合で示した。Cyclosporine 50 mg/kg 投与時の平均 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 産生量は 128.1 ± 2.9 % であった (p<0.01)。

また、L-NAME、D-NAME 50 mg/kg 投与時の平均 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 産生量は 100.5 ± 2.7、121.0 ± 4.5 % であった。NOS 阻害剤である L-NAME を併用投与すると cyclosporine 単独投与時に比べて

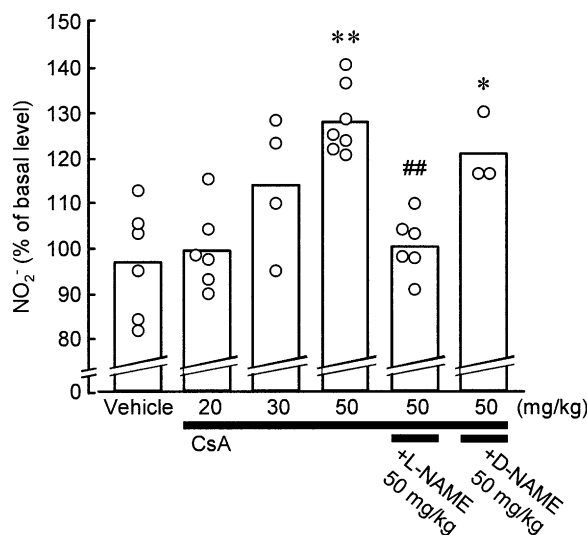


海馬平均 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>産生量は有意に減少した (Fig.7,  $p < 0.05$ )。また D-NAME は、cyclosporine による NO<sub>2</sub><sup>-</sup>産生量増加に影響しなかった。



**Fig. 6 Effect of CsA on NO<sub>2</sub><sup>-</sup> levels in dialysates obtained with microdialysis in rat dorsal hippocampus.**

Vehicle or CsA (20, 30 and 50 mg/kg, i.p.) was injected at time zero (as shown by vertical arrow). Values are expressed as % of basal levels (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>: 17.5 ± 2.3 pmol/20 μl). Values represent means ± S.E.M. for the number of rats shown in the parentheses. \*\*  $p < 0.01$ , \*  $p < 0.05$  vs. vehicle-treated group.



**Fig. 7 Effects of various treatments on the average level of NO<sub>2</sub><sup>-</sup> in dialysates obtained with microdialysis in the rat dorsal hippocampus from 20 to 70 min after the injection of CsA or vehicle.**

Values represent as the average in % of basal (10 min) for 5 dialysates collected during 50 min of perfusion from 20 to 70 min after injection of CsA or vehicle. Open circles in the bar graph indicate the average in % of basal observed in each rats. \*\*  $p < 0.01$ , \*  $p < 0.05$  vs. vehicle-treated group. ##  $p < 0.01$  vs. CsA 50 mg/kg-treated group.

### 【考察】

本研究結果は、cyclosporine のけいれん発現に、海馬 NO 産生増大が関与することを強く示唆する。中枢で NO は、内皮細胞、神経細胞、グリア細胞の cNOS および iNOS により合成されるが、cNOS は細胞内 Ca<sup>2+</sup>の上昇で活性化することが知られている (21)。Cyclosporine の NO 産生機構として、細胞内プールからの Ca<sup>2+</sup>放出を制御しているイノシトール 1,4,5-三リン酸 (IP<sub>3</sub>) 受容体の関与を示唆する報告がある (22)。IP<sub>3</sub> 受容体はリン酸化により高活性状態となり、Ca<sup>2+</sup>を細胞内へ遊離する。脱リン酸化酵素であるカルシニューリンは、IP<sub>3</sub> 受容体を低活性状態に維持している。すなわち cyclosporine のカルシニューリン活性阻害作用により IP<sub>3</sub> 受容体の高活性状態が持続し、Ca<sup>2+</sup>の放出が惹起される。細胞内 Ca<sup>2+</sup>の上昇は NOS を活性化し、NO 産生量が増加する。

NO は GABA 神経活動を抑制しけいれんを惹起するとの報告がいくつかある。Shuto らは

cyclosporine が、GABA 神経活動を阻害してけいれんを誘発することを示した (17)。これらの報告からも、cyclosporine によるけいれん発現機序の一因として、海馬における NO 産生が重要な役割を担っていることが推察される。

## 総括

免疫抑制薬 tacrolimus および cyclosporine は、移植臓器の生着を促進し移植医療発展の契機となった画期的な医薬品である。しかし、有害作用、特に中枢毒性に関して、その発現機序解明および予測・回避対策構築の隘路を克服できていない。本研究では、この解決を目指し3つの異なる視点から研究を行った。その結果、①P-gp をコードする ABCB1 (MDR1) 遺伝子 exon 21 の G2677[A,T]の変異が、中枢毒性発現の関連遺伝子である可能性を指摘した。また、②tacrolimus の免疫抑制作用を保持しつつ、有害作用を軽減する至適投与タイミングはラット暗期（活動期）であることが判った。さらに、③cyclosporine によるけいれん発現には NO 産生作用が寄与している可能性を示した。

以上、免疫抑制薬の中枢毒性予測・回避対策として、(1) ABCB1(MDR1)遺伝子解析によりハイリスク患者を予測する、(2) 活動期を至適投与タイミングとし投与スケジュールを再設計する、方法が提案できる。また、中枢毒性の発現機序として新たに NO 産生増大が指摘されたので、この点からハイリスク疾患を探索する必要がある。

本研究は、免疫抑制療法の安全性向上を目指した実践的な戦略の構築を可能にするものであり、今後の臨床応用が期待される。

## 謝辞

本研究をまとめるにあたり、終始御懇篤な御指導、御鞭撻、御校閲を賜りました福岡大学薬学部薬学疾患管理学教室 片岡泰文 教授に心より深く感謝の意を表します。

本論文を査読していただき、貴重な御意見と御校閲を賜りました福岡大学薬学部 藤原道弘 教授、添田泰司 教授ならびに高橋三津雄 教授に深く感謝致します。

本研究の多くは、九州大学医学部附属病院薬剤部で行われたものであり、その機会を与えて下さいました薬剤部長 大石了三 教授に感謝の意を表します。また、共同研究者として多大な御助力を賜りました鳥取大学医学部附属病院薬剤部 副薬剤部長 家入一郎 助教授に心より感謝いたします。

最後に、研究途上ならびに本論文執筆にあたり、種々の便宜を図ってくださり、激励していただいた九州大学医学部附属病院薬剤部の諸先生方、九州大学大学院薬学府医薬品情報解析学講座の皆様、江川 孝 助手、道具伸也 博士をはじめとする福岡大学薬学部薬学疾患管理学教室の皆様に深く感謝致します。

## 参考文献

- 1) Wiederrecht G, Lam E, Hung S, Martin M, Signal N. The mechanism of action of FK-506 and cyclosporin A. *Ann NY Acad Sci* 1993; 696: 9-19.
- 2) Backman L, Nicar M, Levy M. FK506 trough levels in whole blood and plasma in liver transplant recipients. *Transplantation* 1994; 57: 519.
- 3) Gijtenbeek JMM, van den Bent MJ, Vecht ChJ. Cyclosporine neurotoxicity: a review. *J Neurol* 1999; 246: 339-46.
- 4) Tsuji A, Tamai I, Sakata A, Tenda Y, Terasaki T. Restricted transport of cyclosporin A across the blood-brain barrier by a multidrug transporter, P-glycoprotein. *Biochem Pharmacol* 1993; 46: 1096-1099.
- 5) Kochi S, Takanaga H, Matsuo H, Naito M, Tsuruo T, Sawada Y. Effect of cyclosporin A or tacrolimus on the function of blood-brain barrier cells. *Eur J Pharmacol* 1999; 372: 287-95.
- 6) Dawson TM, Steiner JP, Lyons WE, Fotuhi M, Blue M, Snyder SH. The immunophilins, FK506 binding protein and cyclophilin, are discretely localized in the brain: relationship to calcineurin. *Neuroscience* 1994; 62: 569-80.
- 7) Steiner JP, Dawson TM, Fotuhi M, Snyder SH. Immunophilin regulation of neurotransmitter release. *Mol. Med* 1996; 2: 325-333.
- 8) Proctor MR, Fornai F, Afshar JKB, Gale K. The role of nitric oxide in focally-evoked limbic seizures. *Neuroscience* 1997; 76: 1231-1236.
- 9) Han D, Yamada K, Senzaki K, Xiong H, Nawa H, Nabeshima T. Involvement of nitric oxide in pentylentetrazole-induced kindling in rats. *J Neurochem* 2000; 74: 792-798.
- 10) Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Nat Acad Sci USA* 2000; 97: 3473.
- 11) Tanabe M, Ieiri I, Nagata N, et al. Expression of P-glycoprotein in human placenta: relation to genetic polymorphism of the multidrug resistance (MDR)-1 Gene. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 297: 1137.
- 12) Brunel S, de Montigny C. Diurnal rhythms in the responsiveness of hippocampal pyramidal neurons to serotonin, norepinephrine,  $\gamma$ -aminobutylic acid and acetylcholine. *Brain Res Bull* 1987; 18: 205-212.
- 13) Cardinali DP, Golombek DA. The rhythmic GABAergic system. *Neurochem Res* 1998; 23: 607-14.
- 14) Hauben M. Cyclosporine neurotoxicity. *Pharmacotherapy* 1996; 16: 576-583.

- 15) Shuto H, Kataoka Y, Kanaya A, Matsunaga K, Sueyasu M, Oishi R. Enhancement of serotonergic neural activity contributes to cyclosporine-induced tremors in mice. *Eur J Pharmacol* 1998; 341: 33-37.
- 16) Shapira M, Rene H, Hen O. Prolongation on rat skin and Cardiac allograft survival by low molecular weight heparin. *J Surg Res* 1999; 85: 83-87.
- 17) Shuto H, Kataoka Y, Fujisaki K, Nakao T, Sueyasu M, Miura I, Watanabe Y, Fujiwara M, Oishi R. Inhibition of GABA system involved in cyclosporine-induced convulsions. *Life Sci.* 1999; 65: 879-887.
- 18) Tominaga K, Yamauchi A, Shuto H, Niizeki M, Makino K, Oishi R, Kataoka Y. Ovariectomy aggravates convulsions and hippocampal  $\gamma$ -aminobutyric acid inhibition induced by cyclosporin A in rats. *Eur J Pharmacol* 2001; 430:243-249.
- 19) Fujimura A, Ebihara A. Administration time-dependent toxicity of a new immunosuppressive agent, tacrolimus (FK-506). *Life Sci* 1994; 55: 485-490.
- 20) Cavallini M, Magnus G, Halberg F, Tao L, Field MY, Sibley R, Najarian JS, Sutherland DER. Benefit from circadian timing of cyclosporine revealed by delay of rejection of murine heart allograft. *Transplant Proc* 1983; 15 Suppl 1: 2960-2966.
- 21) Knowles RG, Palacios M, Palmer RM, Moncada S. Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for simulation of the soluble guanylate cyclase. *Proc Nat Acad Sci USA.* 1989; 86: 5159-5162.
- 22) Cameron AM, Steiner JP, Roskams AJ, Ali SM, Ronnett GV, Snyder SH. Calcineurin associated with the inositol 1,4,5-triphosphate receptor-FKBP12 complex modulates  $Ca^{2+}$  flux. *Cell* 1995; 83: 463-472.