

博 士 論 文

免疫組織化学法による低分子医薬品の
薬物動態研究

令和元年度

崇城大学 大学院 工学研究科

応用生命科学専攻 博士課程

生命情報科学講座

1719D01

山本 祐太郎

目 次

第 1 章 緒論	1
第 2 章 抗 MRSA 薬に対する特異抗体の作製及び免疫組織化学的薬物動態研究	
緒言	5
第 1 節 ラット腎臓における Teicoplanin の免疫組織化学的薬物動態研究	
2-1-1. 材料および方法	7
2-1-2. 結果	
2-1-2-1. Dilution ELISA	14
2-1-2-2. Inhibition ELISA	16
2-1-2-3. Binding ELISA	18
2-1-2-4. 免疫組織化学法によるラット腎臓における Teicoplanin の薬物動態	20
2-1-3. 考察	22
第 2 節 ラット腎臓における Daptomycin の免疫組織化学的薬物動態研究	
2-2-1. 材料および方法	26
2-2-2. 結果	
2-2-2-1. Dilution ELISA	32
2-2-2-2. Binding ELISA	34
2-2-2-3. 免疫組織化学法によるラット腎臓における Daptomycin の薬物動態	36
2-2-3. 考察	41
第 3 章 免疫組織化学法を用いた 2 型糖尿病治療薬 Alogliptin の薬物動態解析	
緒言	44
3-1. 材料および方法	45
3-2. 結果	
3-2-1. 免疫組織化学法によるラット腎臓における Alogliptin の薬物動態	47

3-2-2. 免疫組織化学法によるラット肝臓における Alogliptin の薬物動態	49
3-3. 考察	51
第 4 章 免疫組織化学法を用いたがん分子標的治療薬の薬物動態研究	
緒言	54
第 1 節 免疫組織化学法による Afatinib-protein conjugate の局在解析	
4-1-1. 材料および方法	57
4-1-2. 結果	
4-1-2-1. 抗 Afatinib 抗体の交差反応試験	62
4-1-2-2. ELISA による Afatinib のマイケル付加反応の評価	64
4-1-2-3. Afatinib 投与ラットの腸管系における Afatinib-protein conjugate の局在	67
4-1-2-4. Afatinib 投与ラットの頭皮における Afatinib-protein conjugate の局在	70
4-1-3. 考察	72
第 2 節 免疫組織化学法による Dacomitinib-protein conjugate の局在解析	
4-2-1. 材料および方法	75
4-2-2. 結果	
4-2-2-1. 抗 Afatinib 抗体の Dacomitinib に対する交差反応性	78
4-2-2-2. Dacomitinib 投与ラットの腸管系における Dacomitinib-protein conjugate の局在及び蓄積性	81
4-2-2-3. Dacomitinib 投与ラットの頭皮における Dacomitinib-protein conjugate の局在及び蓄積性	83
4-2-3. 考察	86
第 5 章 総論	89
参考文献	94
謝辞	101

第1章 緒 論

我々は病気の治療のために様々な薬を使用するが、その時期待しているのは、その薬が効果を発揮して病気が回復すること、即ち「薬が効く」ことと共に、出来れば副作用に苦しめられずに済むことである。そのためには、薬物が適切な作用（働き・薬理作用）を持っていることが第一に重要であるが、体内で薬物がどのように振る舞うかも大切なポイントである。この体内での薬の振る舞いを研究する学問を「薬物動態学」と呼ぶ。

薬が「効く」ためにはまず、薬物が体内に入る必要がある。薬物の投与経路は様々であるが、最も一般的なものは経口投与である。口腔より摂取した薬物は胃を通りその大部分が小腸で吸収（Absorption）され血液中に入る。血流に乗った薬物は門脈を通過して肝臓へ送られ、薬物によってはここで代謝を受けた後（肝初回通過効果）、全身へと運ばれる。そして、特定の作用部位（臓器・組織・細胞）に到達し、薬物作用（薬効・薬理作用、副作用・有害作用）を現す。これを分布（Distribution）と呼ぶ。その後多くの薬物は肝臓で速やかに活性のない形に代謝（Metabolism）され、胆汁中や尿中に排泄（Excretion）される。この一連の流れを薬物動態（ADME）と言う[1]。

通常医薬品は治療効果を期待して、1日に1回～数回、数日間～数か月にわたり投与される。その際、血液中の薬物濃度が治療効果や副作用に相關することが知られているが、同量の薬物を服用しても血液中の薬物濃度は患者一人一人で異なることが、多くの薬物で明らかとなっている。これは患者それぞれの体質によるものであり、薬物代謝酵素の活性や基礎疾患の有無、体形、年齢、性別、遺伝的要因など様々な因子が絡んでいる。そのため、薬物投与後の薬効や副作用には個人差があり、適切な血中濃度に到達しているか、副作用域に到達していないかなど、個々の患者に適した投与量を設定し、適切な薬物療法を行う必要がある、

多くの薬物で薬物治療モニタリング (TDM: therapeutic drug monitoring) が実施されている。例えば、本研究でも取り扱うグリコペプチド系抗生物質の Teicoplanin の場合、トラフ値 (薬物を反復投与し定常状態に達した際の最低薬物血中濃度) が $10\text{ }\mu\text{g/mL}$ 以上でないと十分な治療効果が得られないが、一方 $40\text{ }\mu\text{g/mL}$ 以上で血小板減少、 $60\text{ }\mu\text{g/mL}$ 以上で腎障害の発現率が上昇することが報告されている[2, 3]。そのため TEIC の場合、血中濃度のトラフ値を $10\text{ }\mu\text{g/mL}$ 以上 $20\text{ }\mu\text{g/mL}$ 未満となるよう投与量を調節する必要がある、TDM が実施されている[4]。

このように薬物血中濃度に関するデータは臨床で安全かつ効果的に薬物療法を行う上で非常に重要である。しかしながら、薬物の作用部位や副作用の発現部位の解明や薬物の効果や副作用の機序解明などのためには、血中濃度を測定しただけでは薬物動態を完全に把握したとは言えないこともまた事実である。例えば、グリコペプチド系抗生物質 Vancomycin は、単回投与の場合、投与後 24 時間で血液中からはほぼ消失するが、腎臓組織中には 8 日後でも多量に蓄積していることが報告されている[5]。従って薬物動態のより正確な把握のためには、組織・細胞レベルでの薬物局在とその時間経過による変化を調べる必要がある。

薬物の組織・細胞内の局在や動態を解析するために以前から使われていた方法として autoradiography 法がある。Autoradiography 法では、放射性同位元素を含む試料を写真乳剤などの感光材料に密着させた後に現像することにより、試料中の放射性同位元素の分布を示す画像 (オートラジオグラム) を得ることができる。薬物の場合、薬物分子の一部の原子を放射性同位元素 (^3H , ^{14}C , ^{32}P など) に置き換えた薬物を合成し、これを投与した動物の試料からオートラジオグラムを作製して、その画像を解析することにより薬物動態に関する情報を得ることが可能である。しかしながら、この方法には、放射性同位元素を使用すること

による原理的デメリット、即ち、危険で高価なアイソトープ標識薬物を合成する必要がある、実験のための特別な区画（管理区域）を設置する必要がある、検出操作が煩雑で時間がかかる、親化合物とその代謝物の区別がつかない、などが存在する。その為 autoradiography 法を用いた薬物動態解析は一般研究室には殆ど普及していない。また、近年では Imaging Mass Spectrometry (MS)を用いて、組織・細胞レベルでの薬物動態を調べることも可能となっている。しかしこの方法にも、解像度を上げようとする試料をスキャンする時間が長くなり、データ量も膨大になるという欠点がある。さらに何より、装置が非常に高価で一般の研究室がおいそれと手を出せるようなものではないため、やはり普及しているとは言い難い。

そこで、私が所属する研究室では、「薬物をターゲットとする免疫組織化学法」を開発し、これまで種々の薬物局在について報告してきた。薬物の免疫組織化学法は、autoradiography 法や Imaging MS が持つ種々の欠点を克服し、安全、安価、簡便、そしてより直接的かつ正確に組織・細胞内の薬物局在を視覚化し解析することが可能である。

本研究では、未だ組織・細胞レベルでの薬物動態に関する詳細なデータが得られていない薬物を研究対象として、それらの組織・細胞内動態を免疫組織化学的方法により解析した。

本研究は以下の章によって構成されている。第 2 章では、2 種類の抗 MRSA 薬に対する特異抗体の作製と免疫組織化学法の開発、これを用いたラット腎臓における薬物動態解析について述べる。第 3 章では、2 型糖尿病治療薬 Alogliptin に対する特異モノクローナル抗体を用いた免疫組織化学法による、ラット腎臓及び肝臓における同薬の薬物動態について述べる。第 4 章では、がん細胞に多く出現している EGFR に共有結合を生じ、抗腫瘍効果を示す 2 種類の分子標的

治療剤に対する免疫組織化学法の開発と，これを用いたラット小腸及び皮膚における薬物動態解析について述べる。第5章はこれらをまとめた総論である。

第2章 抗MRSA薬に対する特異抗体の作製及び免疫組織化学的薬物動態研究

緒言

1928年、フレミングがペニシリンを発見したことにより、人類は初めて、感染症に対して“病気を引き起こしている本体”を直接攻撃するという治療手段を手に入れた。ペニシリンは1940年代に実用化され、第2次大戦で多くの負傷兵や戦傷者を救うなど、素晴らしい効果を発揮した。しかし、まもなくペニシリンの β ラクタム環を分解するペニシリナーゼを産生する耐性菌が出現し、この時から人類が開発する抗生物質とそれに対する耐性菌の出現という終わりのない戦いが始まった。

ペニシリナーゼ産生菌は、1960年に開発された第2世代ペニシリンであるメチシリンの登場により克服されたかのように見えたが、翌1961年には英国でメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA : methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) が出現した[6]。MRSAは、現在院内感染の最も重要な起因菌であり、接触により容易に周囲に広がっていくことに加え、新たな病原性や耐性株の出現が問題となっている[7]。このように次々と現れてくる耐性菌に対する対策の柱は、作用機序の異なる新たな抗菌薬の開発であるが、新規抗菌薬の開発は減少傾向にあるため、耐性菌の出現を抑制することの重要性が増してきている。そのためには抗菌薬の適正使用が必須であり、厚生労働省も『「適切な薬剤」を「必要な場合に限り」、「適切な量と期間」使用することを徹底するための国民運動を展開するなど、効果的な対策を推進していく』、としている[8]。また、抗菌薬の適正使用として、「薬物の体内動態 (pharmacokinetics, PK)」と「原因菌に対する抗菌活性 (pharmacodynamics, PD)」とを考慮した抗菌薬投与法も検討されている。

このような理由で、薬物動態に関するデータの重要性が高まっているが、一般的な薬物動態研究では血中濃度推移の把握に留まっており、多くの場合の作用部位である組織や細胞中での薬物動態に関する直接的な情報は乏しい。著者の所属する研究室では以前、本邦で臨床使用されている4系統5種類（グリコペプチド系：Vancomycin；VCM, Teicoplanin；TEIC, アミノグリコシド系：Arbekacin；ABK, オキサゾリジノン系：Linezolid；LZD, 環状リポペプチド系：Daptomycin；DAP）の抗MRSA薬のうち、バンコマイシンについて免疫組織化学法により腎臓における同薬の局在及び蓄積性を解析し、投与後8日経っても近位尿細管S1・S2分節、遠位尿細管、集合管に多量の薬物が蓄積していることを報告している[9]。そこで今回、Teicoplanin及びDaptomycinに対する特異抗体を作製し、免疫組織化学法を用いて腎臓における両薬の局在及び蓄積性を解析し、Vancomycinも含めた3薬の比較を行った。

第1節 ラット腎臓における Teicoplanin の免疫組織化学的薬物動態研究

2-1-1. 材料および方法

2-1-1-1. 試薬

Teicoplanin (Sanofi K.K., Tokyo, Japan)

Bovine Serum Albumin (BSA), *N*-(γ -maleimido-butyryloxy) succinimide (GMBS)
(Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan)

Modified Lowery Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)

Freund's complete adjuvant (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA)

Sodium pentobarbital (Abbott Laboratories, North Chicago, IL, USA)

Heparin sodium (AY Pharmaceuticals Co., Ltd. Tokyo, Japan)

Hydrogen peroxide (NACALAI TESQUE, Kyoto, Japan)

Protease (Type XXIV: Bacterial; Sigma-Aldrich Co. Inc., St. Louis, MO, USA)

Sodium borohydride (NaBH₄) (Sigma-Aldrich Co. Inc., St. Louis, MO, USA)

Simple Stain Rat MAX-PO (M) (Nichirei Bioscience Inc., Tokyo, Japan)

3, 3'-diaminobenzidine, tetrahydrochloride (DAB) (Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan)

Glutaraldehyde 25% in water (GA) (NACALAI TESQUE, Kyoto, Japan)

2-1-1-2. Teicoplanin (TEIC) 抗原の作製 (TEIC-GMBS-BSA複合体)

抗原は、Fujiwara らが以前抗 daunomycin 抗体の作製について報告した方法に従って、異反応性架橋剤 *N*-(γ -maleimido-butyryloxy) succinimide (GMBS) を用いて作製した[10] (Fig. 1)。即ち、TEIC (10 mg, 2.6 μ mol) を 1 mL の 0.1M PB (pH

7.0) に溶解し, GMBS (0.75 mg, 2.6 μ mol) を 0.5 mL の tetrahydrofuran に溶解し, これらを攪拌しながら室温で 1 時間反応させ, GMBS-アシル化 TEIC 溶液を作製した。次に, Acetylmercaptosuccinyl-BSA (AMS-BSA, 15 mg, 0.1 μ mol) からアセチル基を除くため, AMS-BSA 15 mg を 0.1 M PB (pH 7.0) 200 μ L に溶解し, 0.5 M hydroxylamine (pH 7.4) 50 μ L を加えて室温で 10 分間反応した。反応物である mercaptosuccinyl BSA (MS-BSA) に 1 mL の 0.1 M PB (pH 7.0) を加えて希釈し, 直ちに GMBS-アシル化 TEIC 溶液と混合させ, ゆっくり攪拌しながら室温で 1 時間反応させた。この複合体を 10 mM PB (pH 7.0) で平衡化した Sephadex G-75 カラムクロマトグラフィーで精製し, 溶出液を 3 mL ずつ分画しフラクションコレクターで回収した。複合体の濃度は Modified Lowery Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)を用いて求めた。

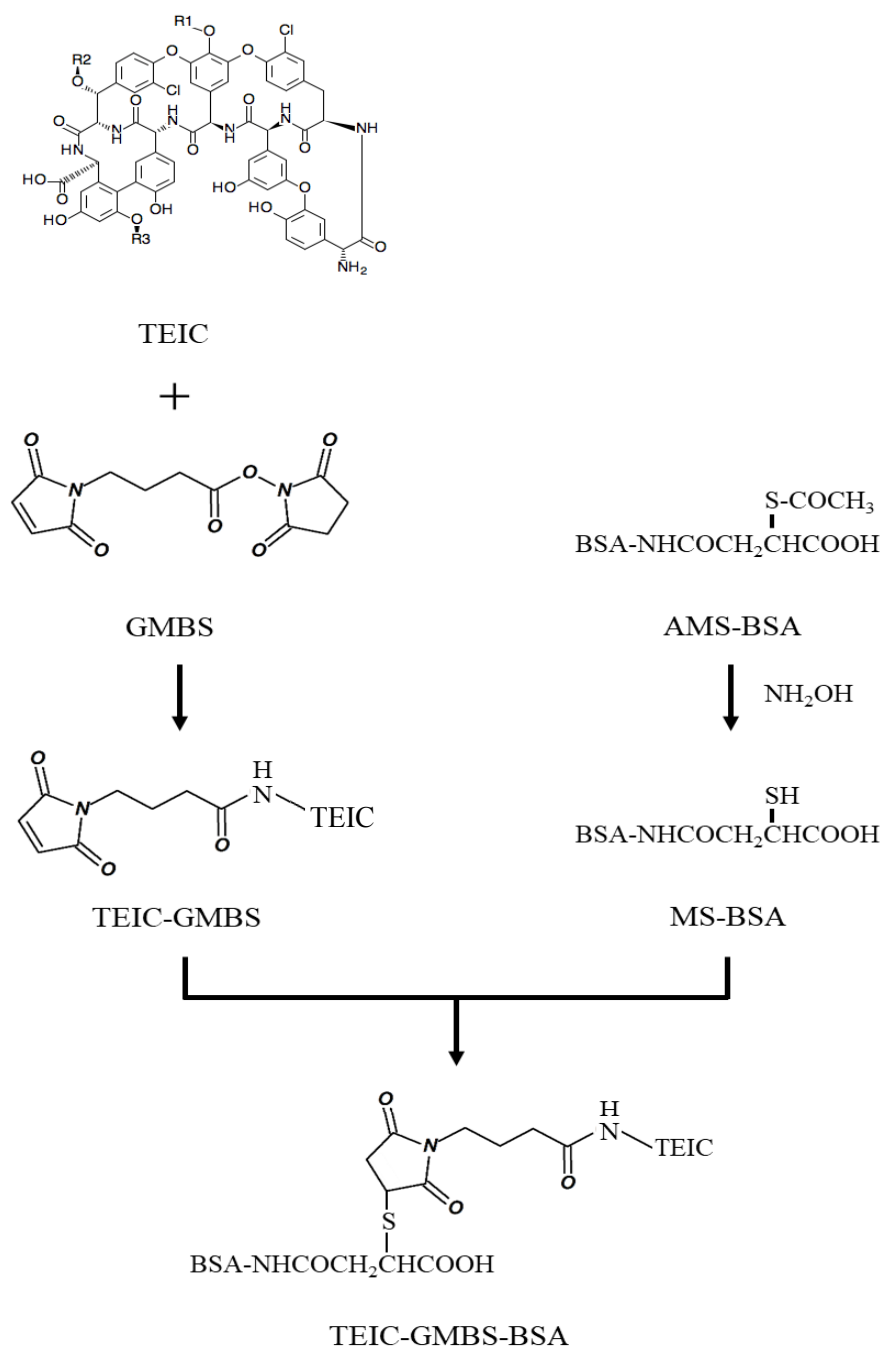


Fig. 1 Preparation of immunogen for TEIC

2-1-1-3. 抗Teicoplanin抗体の作製

5 週齢の BALB/c マウス (雌) 3 匹に, Freund's complete adjuvant と共に乳化した TEIC-GMBS-BSA 複合体 100 μg を腹腔内投与した。その後, 2 週間おきに 3 回, 初回の半分の蛋白質量で感作を繰り返した。4 回目の免疫 2 週間後に採血を行った。採血によって得られた血清は-20°Cで保存し, ELISA 法 (Dilution ELISA, Inhibition ELISA, Binding ELISA) により抗体力価, 特異性の確認を行った。

2-1-1-4. Dilution ELISA による抗 Teicoplanin 抗体の力価評価

Microtiter plate の well に 10 mM NaCl 及び 0.1% NaN_3 を含む 10 mM Tris-HCl buffer (TBS) (pH8.5) に溶解した Teicoplanin (TEIC)-GMBS-BSA (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 100 μL , または BSA (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を加え 37°Cで 60 分間固相化した後に, 1% skim milk を用いて, 室温で 30 分間 blocking を行った。抗 Teicoplanin 抗体を 1%BSA 含有 10 mM PBS を用いて 5 倍希釈系列を作製し, 各 well に 100 μL ずつ加え, 37°C, 90 分間 1 次反応を行った。0.1% BSA 含有 PBS で 3 回洗浄後, 2 次抗体として Simple stain MAX-PO (M) (1:1000) を用い 37°C, 60 分間反応させた。その後, o-phenylenediamine (OPD)基質溶液を 100 μL 加え 10 分間反応させ, 2N H_2SO_4 を加え酵素反応を停止後, ELISA analyzer (ImmunoMini NJ-2300, Nalje Nunc Int. Co. Ltd. Tokyo. Japan) を用いて 492 nm における吸光度を測定した (Fig.1)。

2-1-1-5. Inhibition ELISA による抗 Teicoplanin 抗体の特異性評価

上記の方法と同様に Microtiter plate の well に TEIC-GMBS-BSA (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 100 μL , または BSA (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を加え 37°Cで 60 分間固相化した後

に、1% skim milk を用いて、室温で 30 分間 bloking を行った。1 次抗体として抗 Teicoplanin 抗体 (1:50000) 50 μ L と、段階希釈した検体(TEIC-GMBS-BSA, TEIC, VCM, AMPC) 50 μ L ずつを加え、37°Cで 90 分間競合反応させた。その後、2 次抗体として Simple stain MAX-PO (M) (1:1000) を 100 μ L 加え 37°Cで 30 分間反応させた。続いて、OPD 基質溶液を 100 μ L 加え 10 分間反応させた。その後、2N H₂SO₄を加え酵素反応を停止させ ELISA analyzer を用いて 492 nm の吸光度を測定した (Fig.2)。

2-1-1-6. Binding ELISA による抗 Teicoplanin 抗体の特異性評価

Teicoplanin のような一級アミノ基をもつ化合物は、glutaraldehyde (GA)によってアミノ酸の一級アミノ基に固定することができる。Microtiter plate の well に Poly-L-Lysin (30 μ g/mL) を 100 μ L 加え、37°Cで 30 分間固相化し、100 mM ホウ砂 buffer (pH10.0) を用いて 2.5%に希釈した GA を 100 μ L 加え室温で 60 分間反応させた。続いて、種々の濃度の薬物を加えて室温で 1 時間反応させ、残ったアルデヒド基を 1% sodium borohydride で水酸基に還元した。非特異的なタンパク結合を抑えるため 1% skim milk でブロッキングを行い、1 次抗体反応として抗 Teicoplanin 抗体(1:5000) 100 μ L を加え 37°Cで 90 分間反応させた。その後 2 次抗体として Simple stain MAX-PO (M) (1:1000) 100 μ L 加え 37°Cで 60 分間反応させた。続いて、OPD 基質溶液を 100 μ L 加え 10 分間反応させた後、2N H₂SO₄を加え酵素反応を停止させ ELISA analyzer を用いて 492 nm の吸光度を測定した (Fig. 2)。

2-1-1-7. 組織試料

実験には成雄 Wistar ラット (体重 180~200 g) (Kyudo Exp. Animals; Kumamoto, Japan) を用いた。実験動物は、温度と光を調節した室内で飼育し、

自由に飼料と飲み水を摂取させた。9匹のラットに Teicoplanin (10 mg/kg) を単回静脈投与し 1, 3, 24 時間及び 7 日後にペントバルビタールナトリウム (60 mg/kg) で麻酔を施し、50 mL/min の流速で 2.5% ヘパリン/10 mM PBS を 2 分間、2.0 % GA/10 mM PBS を 4 分間、心臓から流し灌流固定を行った。腎臓を速やかに摘出し、2.0 % GA 固定液を用いて 4°C で一晩後固定を行い、その後、常法に従って脱水処理後パラフィンに包埋した。

2-1-1-8. 免疫組織化学

免疫組織化学法は基本的に Fuliwara らの方法に従って行った[9, 11, 12]。パラフィン包埋した組織をマイクロームで薄切し、5 µm 厚の切片を作製した。切片をシランコーティングしたスライドガラス (2%シラン/アセトンに 10 秒間浸漬、アセトンで 1 分間、3 回洗浄後、風乾) 上に貼付し、室温で一晩乾燥させた。60°C のパラフィオーブンで 60 分間パラフィンを融解した後、切片を、キシレン・エタノール系列 (Xylene, 100%, 90%, 70% ethanol) で脱パラフィン処理を行った。その後、10 mM PBS で 5 分間、2 回洗浄を行い、6% H₂O₂ 含有 10 mM PBS で室温 30 分間酸化処理した。10 mM PBS で 5 分間、3 回洗浄し、2N HCl で室温 30 分間処理した。10 mM PBS で 5 分間、3 回洗浄した後、ウォーターバスで 30°C に保温した 0.03 mg/mL protease/PBS 中で 120 分間処理した。10 mM PBS で 5 分間、3 回洗浄し、NaBH₄ (5 mg/mL) で室温、10 分間還元処理した。10 mM PBS で 5 分間、3 回洗浄後、0.9% sodium metabisulfite (SMB), 10% normal goat serum (NGS), 1% BSA, 0.1% saponin/50 mM TBS を用いて、室温で 1 時間 blocking を行った。1 次抗体として 0.9% SMB, 10% NGS, 10% BSA, 0.1% saponin/50 mM TBST (0.1% Triton X-100/TBS) で希釈した抗 Teicoplanin 抗体 (1 : 1, 000) と 4°C 一晩反応させた。なお、陰性対照実験として、抗体溶液に過剰量の TEIC-GMBS-BSA 複合体

(50 $\mu\text{g/mL}$) を加えた吸収実験を行った。50 mM TBST 及び 50 mM TBS で各 5 分間、3 回洗浄した後、2 次抗体として Simple stain MAX-PO (M) を用いて室温 30 分間反応させた。50 mM TBST 及び 50 mM TBS で各 5 分間、3 回洗浄した後、3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) 反応液 (0.5 mg/mL DAB, 0.012% H_2O_2 /50 mM TBS) で室温 10 分間反応させ、抗体反応部位を可視化した。その後、水道水で 10 回ほど軽くすすいで反応を停止させた後、エタノール・キシレン系列 (70%, 90%, 100% ethanol, Xylene) で脱水後、封入し光学顕微鏡を用いて観察を行った。なお、本動物実験は崇城大学動物実験倫理委員会規則に基づき行った。

2-1-2. 結果

2-1-2-1. Dilution ELISA

Microtiter plate の well に TEIC-GMBS-BSA 複合体 (10 $\mu\text{g/mL}$) を固相化し、段階希釈した抗 Teicoplanin 抗体を反応させ、抗体の結合活性の評価を行った。その結果、Fig. 2 に示すように本抗体は 10,000 倍希釈しても TEIC-GMBS-BSA に対して高い結合活性を示した。

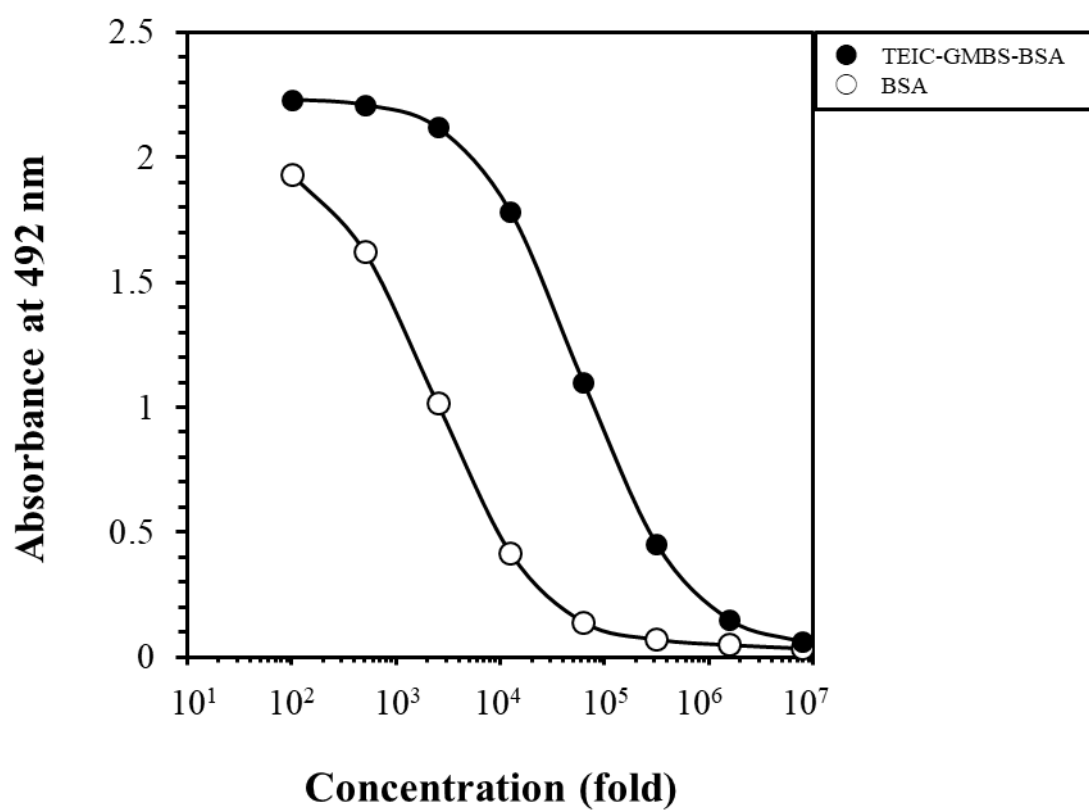


Fig. 2 ELISA measurements of the binding of serially diluted Anti-Teicoplanin (TEIC) serum to the solid phase coated with TEIC-GMBS-BSA (closed circles) or BSA (open circles).

2-1-2-2. Inhibition ELISA

Microtiter plate の well に一定量の抗原 (TEIC-GMBS-BSA) を固相化し、抗 Teicoplanin 抗体と種々の濃度の各検体 [TEIC-GMBS-BSA, TEIC, VCM, Amoxicillin (AMPC)]を同時に加え、抗体の特異性の評価を行った。その結果、Fig. 3 に示すように抗 Teicoplanin 抗体の結合活性は、TEIC-GMBS-BSA で最も阻害され 0.48~1500 pM の間で濃度依存的阻害曲線が得られた。その結合活性 50%阻害濃度 (IC₅₀) は 6 pM であった。Teicoplanin の添加によっても反応は強く阻害され、0.112~700 nM の間で濃度依存的阻害曲線が得られ、IC₅₀ は 20 nM であった。しかし Vancomycin 及び Amoxicillin は 700 nM まで添加しても反応は阻害されなかった。

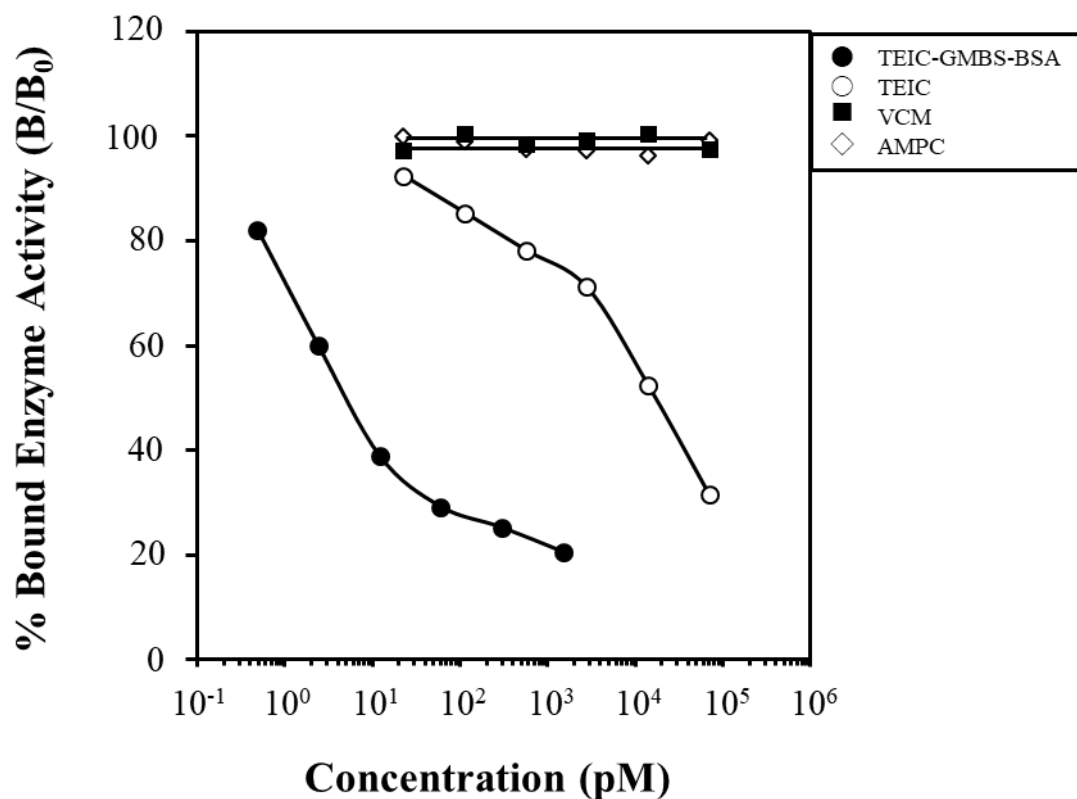


Fig 3 Evaluation of antibody specificity. ELISA measurements showing competition between conjugated TEIC, TEIC, VCM and AMPC coated to the solid phase for binding to the Anti-TEIC antibody. The curves show the amount (percentage) of bound enzyme activity (B) for various doses of TEIC-GMBS-BSA (closed circles), TEIC (open circles), VCM (closed squares) or AMP (open rhombuses) as a ratio of that bound using the HRP-labeled second antibody alone (B_0). The concentrations of TEIC conjugate were calculated assuming that the molecular weight of the conjugate was 66 kDa, which is that of BSA, because the molecular weight of the drug is smaller than BSA.

2-1-2-3. Binding ELISA

抗体の特異性を再確認すると共に，本抗体が免疫組織化学で使用可能か否かを評価するために，well にコートした poly-L-lysine に，GA を架橋剤として検体 (薬物) を結合させた後，抗体を反応させることにより，組織切片上での免疫組織化学法をシミュレートする Binding ELISA を行った。その結果，Fig.4 に示すように本抗体は Teicoplanin に 0.32～1000 nM の範囲で濃度依存的に強い結合活性を示したが Vancomycin, Amoxicillin とは全く反応しなかった。

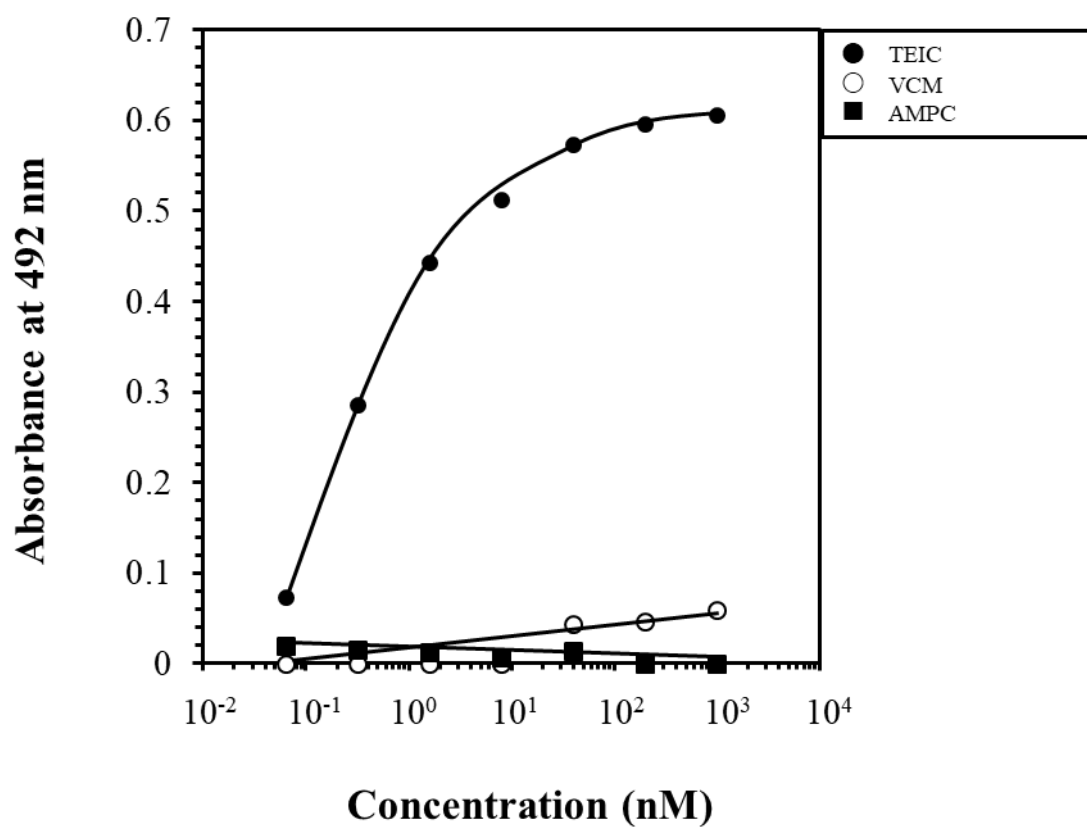


Fig. 4 Reactivity of the Anti-TEIC antibody as determined from its immunoreactivity in the binding ELISA. Activated wells prepared for the binding ELISA were incubated with various concentration of TEIC (closed circles), VCM (open circles), AMPC (closed rhombus). The wells were reacted with NaBH₄ and then with Simple stain MAX-PO (M) (1:1000).

2-1-2-4. 免疫組織化学法によるラット腎臓における Teicoplanin の薬物動態

Teicoplanin 投与後 1 時間の試料の低倍率観察では、皮質全体に種々の程度の陽性反応が認められたが、染色強度は腎皮質上層よりも下層でわずかに強かった (Fig. 5 a)。染色パターンと強度はネフロン各部分で異なり、糸球体は陰性であり、腎小体に続く近位尿細管 S1 分節では、上皮細胞の微絨毛とその直下の頂端側細胞質に弱い陽性反応が観察された (Fig. 5f)。S1 分節に続く S2 分節の染色パターンは S1 分節と類似していたが、染色強度は S1 分節に比べ著しく増強していた (Fig. 5f)。近位尿細管の最終部位である S3 分節では、上皮細胞の微絨毛およびその直下の頂端側細胞質で中程度の染色を示しただけでなく、細胞全体に弱陽性反応が見られた (Fig. 5g)。さらに、一部の細胞では核も染色されていた (Fig. 5g)。遠位尿細管では、ほぼ陰性の細胞も存在したが、管腔側の細胞膜、頂端側細胞質及び核に中程度から強い陽性反応を示す上皮細胞が観察された (Fig. 5f)。また、集合管では陽性細胞とほぼ陰性の細胞が混在していた (Fig. 5g)。

Teicoplanin 投与後 3 時間の腎臓での染色パターンは、投与後 1 時間の場合とほぼ同様であったが、染色強度は僅かに減弱していた (Fig. 5b)。投与後 24 時間で免疫反応性はほとんど消失したように見えたが (Fig. 5c)、高倍率観察により、近位尿細管 S3 分節、遠位尿細管、および集合管の上皮細胞の細胞質に微弱～弱い陽性反応が認められた (Fig. 5h, i)。投与後 7 日の腎臓では、陽性反応は完全に消失していた (Fig. 5d)。

陰性対称の吸収実験では陽性反応は完全に消失しており、これらの陽性反応が Teicoplanin に特異的であることが確認された (Fig. 5e)。

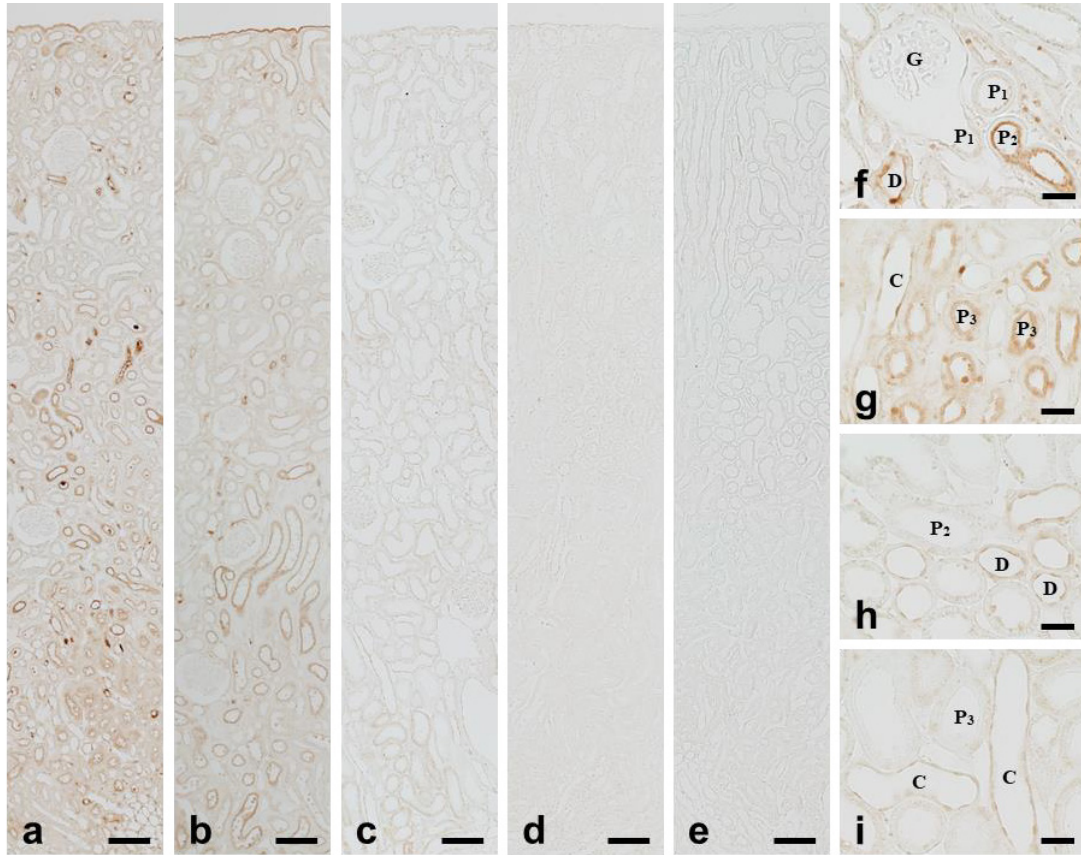


Fig. 5 Immunohistochemistry for TEIC in rat kidneys. Tissue samples are from 1 h (**a**, **e**, **f**, **g**), 3 h (**b**), 24 h (**c**, **h**, **i**) or 168 h (7 days, **d**) after the drug administration. **a-e** Low magnification images of kidney cortex. **f-i** High magnification images of upper layer (**f**, **h**) and lower layer (**g**, **i**) of kidney cortex. **e** The absorption control. G: glomerulus, P₁: S₁ segment of proximal tubules, P₂: S₂ segment of proximal tubules, P₃: S₃ segment of proximal tubules, D: distal tubules, C: collecting ducts. Bars: **a-e** = 100 μ m; **f-i** = 25 μ m

2-1-3. 考察

Autoradiography 法による動物組織での Teicoplanin の局在を調べた研究は少ないが, Zanolato らは $[^{14}\text{C}]$ Teicoplanin を用いた研究により, $[^{14}\text{C}]$ Teicoplanin の腎臓, 特に皮質領域への高い親和性を報告している[13]。しかし, この報告では, 方法論的な制約により細胞および組織での詳細な局在は不明であった。そこで今回, 抗 Teicoplanin 抗体を調製し, その特性を解析し, ラット腎臓における Teicoplanin の局在とその経時変化を免疫組織化学的に明らかにした。免疫組織化学法では, 明視野顕微鏡下で標本を観察可能なため, 薬物局在と細胞および組織構造との関係を検討することが容易である。

異反応性架橋剤 GMBS を用いて Teicoplanin とキャリアタンパクを結合させ TEIC-GMBS-BSA 複合体を作製し, マウスに免疫することで抗 Teicoplanin 抗体を得た。得られた抗体の特異性は ELISA 法により解析した。Inhibition ELISA より, 抗体の結合活性が TEIC-GMBS 及び Teicoplanin の添加では強く阻害されるが, Vancomycin と Amoxicillin の添加では阻害されないことが示された。また Binding ELISA では, 抗体が TEIC-GA-Lysine には結合するが Vancomycin 及び AMPC-GA-Lysine に結合しないことを示した。GA は生体内において Teicoplanin の固定に必要な不可欠な架橋剤であるため, これら結果は, 抗 Teicoplanin 抗体が Teicoplanin を非常に特異的に認識し, GA 固定組織での免疫組織化学に有用であることを強く示唆している。

その抗 Teicoplanin 抗体を用いて Teicoplanin (10 mg/kg)(臨床で 1 日に使用される量に相当)を単回静脈内投与したラットの腎臓での薬物動態を免疫組織化学法により解析した。

腎臓からの薬物排泄は, 糸球体濾過, 尿細管再吸収, 尿細管分泌の 3 つの過程のバランスによって決定される。したがって, 尿細管上皮で検出される陽性反応は, 原尿から再吸収される薬物と, 側底側から吸収されて管腔に分泌される薬物の合計を表

していると考えられる。一般に、尿細管再吸収は受動輸送により、尿細管分泌はトランスポーターによる能動輸送によると言われている。薬物投与後 1 時間の近位尿細管 S1 および S2 分節では、上皮細胞の微絨毛および頂端側細胞質でのみ陽性反応が観察された。染色強度は S1 分節では弱かったが、S2 分節では強かった。一方、S3 分節の上皮細胞は、微絨毛および頂端側細胞質でやや強い陽性反応を示しただけでなく、細胞全体に弱い染色を示し、一部の細胞では核も染色された。この染色パターンは、S1 および S2 分節が強く染色され、S3 分節の染色が弱かった **Vancomycin** のパターンとは対照的でした[5]。Teicoplanin や Vancomycin などのグリコペプチド系抗生物質の構造には、カルボキシ基やアミノ基が含まれているため、有機アニオンと有機カチオンの両方として振る舞うことが可能である。しかし、島田らは、腎臓の有機アニオン輸送体システムの強力な阻害剤であるプロベネシドは Vancomycin の排泄に影響を及ぼさなかったが、キニジンやシメチジンなどの有機カチオン輸送体システムを阻害する薬物は、Vancomycin の腎クリアランスを低下させる傾向があると報告している[14]。一方、ABC 輸送体は、*Amycolatopsis balhimycina* からのグリコペプチド系抗生物質バルヒマイシンの効率的な汲み出しに必要であるとの報告[15]や、Teicoplanin を生産する *Actinoplanes teichomyceticus* は、Teicoplanin 遺伝子クラスター中に ABC 輸送体をコードする領域を持つという報告がある[16]。したがって、本研究の結果は、1 種類以上のタイプのトランスポーターが近位尿細管からの Teicoplanin の分泌に関与しており、これらのトランスポーターの種類と発現レベルが尿細管の部位ごとに異なることを示唆している。さらに、Teicoplanin の輸送に関与するトランスポーターの種類と発現レベルは、Vancomycin のものとは異なる可能性がある。遠位尿細管と集合管の染色パターンは Vancomycin のそれに類似しており、Teicoplanin 陽性細胞と陰性細胞が一つの管の断面で観察された。遠位尿細管および集合管では、水は再吸収され、電解質は再吸収及び分泌されと考えられている。著者の知る限り、遠位尿細管

または集合管での薬物の再吸収または分泌に関する報告は、遠位尿細管からゲンタマイシンが排泄されるという上田らの報告のみである [17]。しかし、これらの領域での薬物輸送が受動輸送だけで行われるとすると、すべての上皮細胞が同様に染色され、陽性細胞と陰性細胞が尿細管の断面に共存することは無いと考えられる。したがって、本研究の結果は、Teicoplanin がこれらの領域から何らかのタイプのトランスポーターを介して再吸収および／または分泌され、トランスポーターの発現が細胞ごとに異なることを示唆している。遠位尿細管の一部と集合管は、主細胞と介在細胞の 2 種類の細胞で構成されているため[18]、Teicoplanin の蓄積性の違いは細胞の種類の違いを反映している可能性がある。したがって、本研究の結果は、これらの細胞間でトランスポーターの発現に違いがある可能性を示唆している。

Teicoplanin の免疫反応性は時間経過とともに急速に減弱し、投与 24 時間後では近位尿細管 S3 分節、遠位尿細管、および集合管に弱い染色が認められただけで、7 日後には全く検出されなかった。これらの結果は、投与 8 日後でも近位尿細管、遠位尿細管、および集合管の S1 および S2 分節で中等度の染色を示した Vancomycin の結果とは大きく異なり[5]、Teicoplanin が生体から Vancomycin より迅速に排泄され、組織中に蓄積しないことを示している。即ち、Teicoplanin は Vancomycin に比べて血中濃度半減期は長い、組織蓄積性は低いことになり、2 つの薬物で血中濃度半減期と組織蓄積の間に矛盾がある。Teicoplanin の血中半減期が Vancomycin と比べて長いのは、おそらく血漿タンパク質結合率が Vancomycin の 2 倍以上であるためだと思われる[19]。一方、Teicoplanin が Vancomycin よりも細胞および組織からより迅速に排泄される理由については、現時点では明らかでない。とは言え、これらの結果は、「Vancomycin と比較して Teicoplanin の副作用のリスクが低いのは、組織内での Teicoplanin の蓄積性が Vancomycin よりも低いためである」という私たちの仮説を支持している。さらに、薬物間の組織蓄積性の違いは、各薬物の再吸収と尿細管分泌に関

与するトランスポーターの種類と発現レベルの違いによる可能性が考えられる。

結論として、Teicoplanin に対する特異抗体と、細胞および組織内の薬物動態を解析可能な免疫組織化学法の開発に成功した。本法により、腎臓における Teicoplanin の蓄積がネフロン領域によって異なること、また本薬物が Vancomycin よりも組織に蓄積しにくいことを明らかにした。Teicoplanin の副作用のリスクが Vancomycin よりも低いのは、組織への蓄積性が低いことがその理由である可能性が高い。さらに、薬物の組織蓄積性の違いは、各薬物の再吸収と尿細管分泌に関与するトランスポーターの種類と発現レベルの違いによる可能性がある。Teicoplanin を特異的に検出する新しい免疫組織化学的方法は、細胞および組織における薬物の局在とその経時変化を研究するための有用なツールであり、Teicoplanin の効果および／または副作用のメカニズムの理解に大きく貢献することが期待される。

第2節 ラット腎臓における Daptomycin の免疫組織化学的薬物動態研究

2-2-1. 材料および方法

2-2-1-1. 試薬

Daptomycin (Nichirei biosciences, Tokyo, Japan)

BSA, GMBS (Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan)

Modified Lowery Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)

Freund's complete adjuvant (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA)

Sodium pentobarbital (Abbott Laboratories, North Chicago, IL, USA)

Heparin sodium (AY Pharmaceuticals Co., Ltd. Tokyo, Japan)

Hydrogen peroxide (NACALAI TESQUE, Kyoto, Japan)

Protease (Type XXIV: Bacterial; Sigma-Aldrich Co. Inc., St. Louis, MO, USA)

NaBH₄ (Sigma-Aldrich Co. Inc., St. Louis, MO, USA)

Simple Stain Rat MAX-PO (M) (Nichirei Bioscience Inc., Tokyo, Japan)

DAB (Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan)

GA (NACALAI TESQUE, Kyoto, Japan)

2-2-1-2. Daptomycin (DAP)抗原の作製 (DAP-GMBS-BSA 複合体)

Daptomycin 抗原は、以前 Fujiwara らが報告した方法に従って作製した [20, 21]。まず Daptomycin (10 mg, 6.1 μmol) を 0.1 M Phosphate Buffer (PB) (pH 7.0) 1 mL に、GMBS (0.75 mg, 6.1 μmol) を tetrahydrofuran 0.5 mL に溶解させた。Daptomycin 溶液に GMBS 溶液を加えて混合し、室温 60 分間反応させ DAP-GMBS を作製した。次に Acetyl Mercapto Succinyl-BSA (AMS-BSA, 15 mg, approximately

0.1 μ mol) に 0.1 M PB (pH 7.0) 0.2 mL を加えて溶解し, 0.5 M Hydroxylamino hydrochloride (pH 7.0) 50 μ L を加えて, 室温 30 分間処理し脱アセチル化した。次に脱アセチル化により生じたフリーのチオール基を持つ Mercapto Succinyl-BSA (MS-BSA) 溶液に 0.1 M PB (pH 7.0) 1 mL を加えて, 先ほど作製した DAP-GMBS と混合し室温 60 分間反応させた。反応混合液は 0.1 M PB (pH 7.0) で平衡化した Sephadex G-75 column (2.0 x 30 cm) を用いてゲル濾過し, DAP-GMBS-BSA 複合体すなわち Daptomycin 抗原を得た (Fig. 1)。

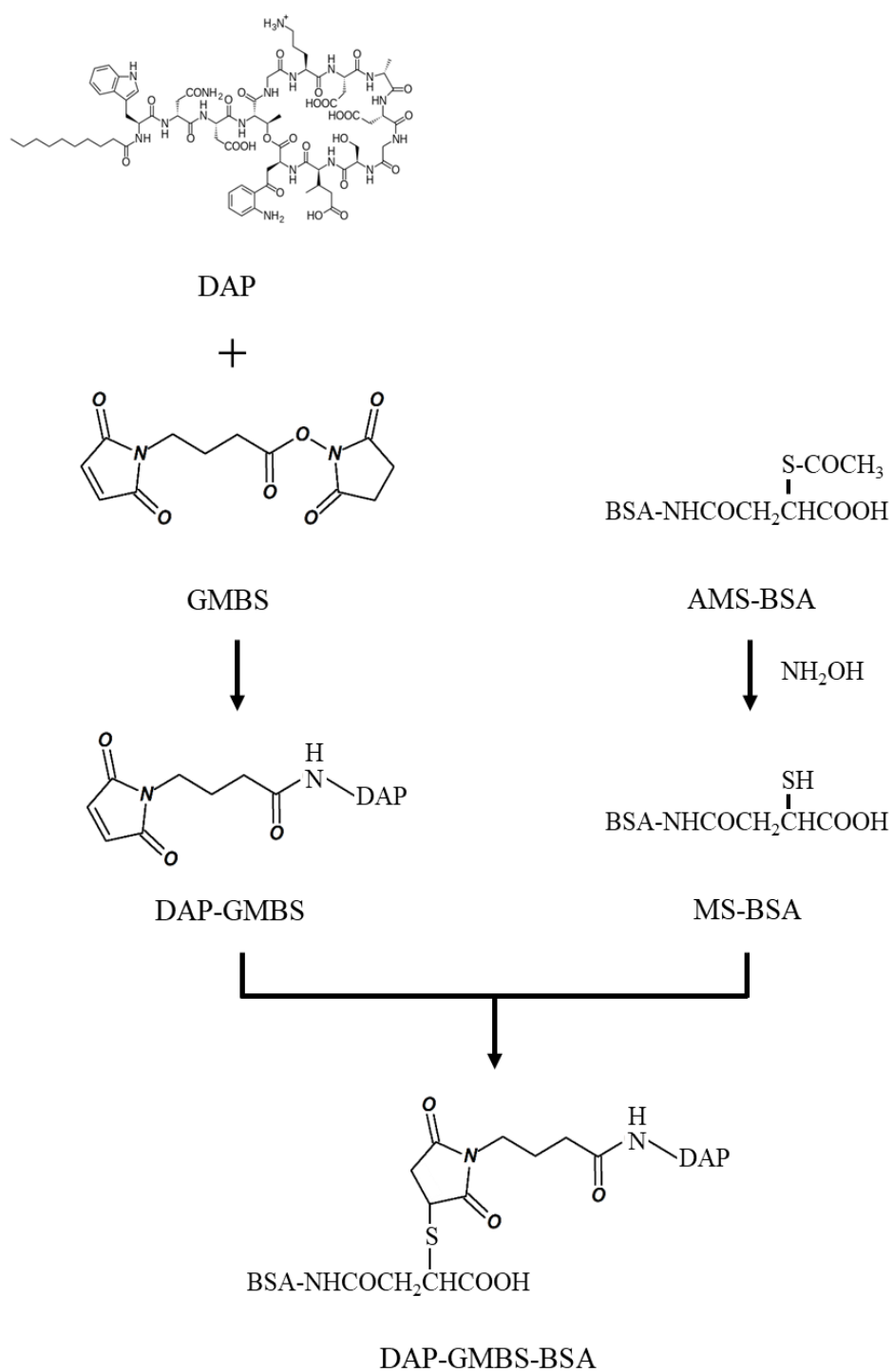


Fig. 1 Preparation of immunogen for Daptomycin.

2-2-1-3. 抗 Daptomycin 抗体の作製

5 週齢の BALB/c マウス (雌) 5 匹に, Freund's complete adjuvant と共に乳化した DAP-GMBS-BSA 複合体 100 μ g を腹腔内投与した。その後, 2 週間おきに 3 回, 初回の半分の蛋白質質量で感作を繰り返した。4 回目の感作の 2 週間後に採血を行った。採血によって得られた血清は-20°Cで保存し, ELISA 法 (Dilution ELISA, Binding ELISA) により抗体力価及び特異性の確認を行った。

2-2-1-4. Dilution ELISA による抗 Daptomycin 抗体の力価評価

ELISA は以前作製した anti-Alogliptin mAb と同様のプロトコルで行った[11]。Microtiter plate の well に 10 mM NaCl 及び 0.1% NaN₃ を含む 10 mM Tris-HCl buffer (TBS) (pH8.5) に溶解した DAP-GMBS-BSA (10 μ g/mL) 100 μ L または BSA (10 μ g/mL) 100 μ L を加え 37°Cで 60 分間固相化した後に, 1% skim milk を用いて, 室温で 30 分間 blocking を行った。抗 Daptomycin 抗体を 1%BSA 含有 10 mM PBS を用いて 5 倍希釈系列を作製し, 各 well に 100 μ L ずつ加え, 37°Cで 90 分間 1 次反応を行った。2 次抗体として Simple stain MAX-PO (M) (1:1000) を用い 37°Cで 60 分間反応させた。その後, OPD 溶液を 100 μ L 加え 10 分間反応させ, 2N H₂SO₄ を加え酵素反応を停止後, ELISA analyzer (ImmunoMini NJ-2300, Nalje Nunc Int. Co. Ltd. Tokyo. Japan) を用いて 492 nm における吸光度を測定した (Fig. 2)。

2-2-1-5. Binding ELISA による抗 Daptomycin 抗体の特異性評価

Daptomycin のような一級アミノ基を持つ化合物は, Glutaraldehyde (GA) によって生体内のアミノ酸の一級アミノ基に固定することができる[22, 23]。Microtiter plate の well に Poly-L-Lysin (30 μ g/mL) を 100 μ L 加え, 37°Cで 30 分間

固相化し、100 mM ホウ砂 buffer (pH10.0) により 2.5%に希釈した GA を 100 μ L 加え室温で 60 分間反応させた。続いて、種々の濃度の薬物 (Daptomycin, Vancomycin, Teicoplanin) を加えて室温で 1 時間反応させた。その後、未反応の GA のアルデヒド基を 1% NaBH₄ で水酸基に還元した。非特異的なタンパク結合を抑えるため 1% skim milk で blocking を行い、1 次抗体として抗 Daptomycin 抗体 (1:1000) 100 μ L を加え 37°C 90 分間反応させた。その後 2 次抗体として Simple stain MAX-PO (M) (1:1000) 100 μ L を加え 37°C 60 分間反応させた。続いて、OPD 溶液を 100 μ L 加え 10 分間反応させた後、2N H₂SO₄ を加えて酵素反応を停止し、ELISA analyzer を用いて 492 nm の吸光度を測定した(Fig.3)。

2-2-1-6. 組織試料

実験には成雄 Wistar ラット (6-8 週齢, 体重 180~200 g) (Kyudo Exp. Animals; Kumamoto, Japan) を用いた。実験動物は、温度と光を調節した室内 (21 \pm 1°C, 12 時間; 明, 12 時間; 暗) で飼育し、自由に飼料と飲み水を摂取させた。9 匹のラットに Daptomycin (12 mg/kg) を単回静脈投与し 1 時間, 24 時間, 及び 7 日後に ペントバルビタールナトリウムで麻酔を施し、50 mL/min の流速で 2.5% ヘパリン/10 mM PBS を 2 分間, 2.0 % GA/10 mM PBS を 6 分間, 心臓から流し灌流固定を行った。腎臓を速やかに摘出し、2.0 % GA 固定液を用いて 4°C で一晩後固定を行い、その後、常法に従って脱水処理後パラフィンに包埋した。なお、本動物実験は崇城大学動物実験倫理委員会規則に基づき行った。

2-2-1-7. 免疫組織化学

免疫組織化学法は基本的に Fujiwara らの方法に従って行った[5, 24]。パラフィン包埋した腎臓試料をマイクロトームで薄切し、5 μ m 厚の切片を作製した。切片

をシランコーティングしたスライドガラス上に貼付し、室温で一晩乾燥させた。60°Cのパラフィオーブンで60分間切片のパラフィンを融解した後、切片をキシレン・エタノール系列 (Xylene, 100%, 90%, 70% ethanol) で脱パラフィン処理を行った。その後、10 mM PBS で5分間、2回洗浄を行い、以下の前処理を行った。① 生体内に存在する内因性ペルオキシダーゼを不活化するため6% H_2O_2 /10 mM PBS で室温30分間酸化処理した。② DNAを変性させるために2N HCl で室温30分間塩酸処理した。③ 組織表面タンパクを分解し抗体の浸透性を上げるため、ウォーターバスで30°Cに保温した0.03 mg/mL protease/PBS 中で60分又は120分間処理した。④ 未反応のGAのアルデヒド基を水酸基に還元して不活化するため NaBH_4 (10 mg/mL) で室温、10分間還元処理した。また上記前処理間には10 mM PBS で5分間、3回洗浄を行った。ブロッキング溶液として0.9% SMB, 10% NGS, 1% BSA, 0.1% saponin/50 mM TBS を組織切片上に80 μL 滴下し、室温1時間ブロッキングを行った。1次抗体として0.9% SMB, 10% NGS, 10% BSA, 0.1% saponin/50 mM TBST により2,000倍希釈した抗Daptomycin抗体を組織切片上に80 μL 滴下し4°C一晩反応させた。なお陰性対照実験として、抗体溶液中に過剰量のDAP-GMBS-BSA 複合体 (100 $\mu\text{g/mL}$) を加えた吸収実験を行った。50 mM TBST 及び50 mM TBS で各5分間、3回洗浄した後、2次抗体として1% NGS, 0.25% BSA, 0.1% saponin/50 mM TBS により2倍希釈したSimple stain MAX-PO (M)を組織切片上に80 μL 滴下し、室温2時間反応させた。50 mM TBST 及び50 mM TBS で各5分間、3回洗浄した後、DAB 反応液 (0.5 mg/mL DAB, 0.012% H_2O_2 /50 mM TBS) で室温10分間反応させ、抗体反応部位を可視化した。その後、蒸留水で濯いで反応を停止した後、エタノール・キシレン系列 (70%, 90%, 100% ethanol, Xylene) で脱水後、封入し光学顕微鏡を用いて観察を行った。

2-2-2. 結果

2-2-2-1. Dilution ELISA

Microtiter plate の well に DAP-GMBS-BSA 複合体 (10 $\mu\text{g/mL}$) を固相化し，段階希釈した抗 Daptomycin 抗体を反応させ，抗体の結合活性の検定を行った。

その結果，本抗体は 20,000 倍希釈しても DAP-GMBS-BSA に対して高い結合活性を示し，BSA とは全く反応を示さなかった (Fig. 2)。

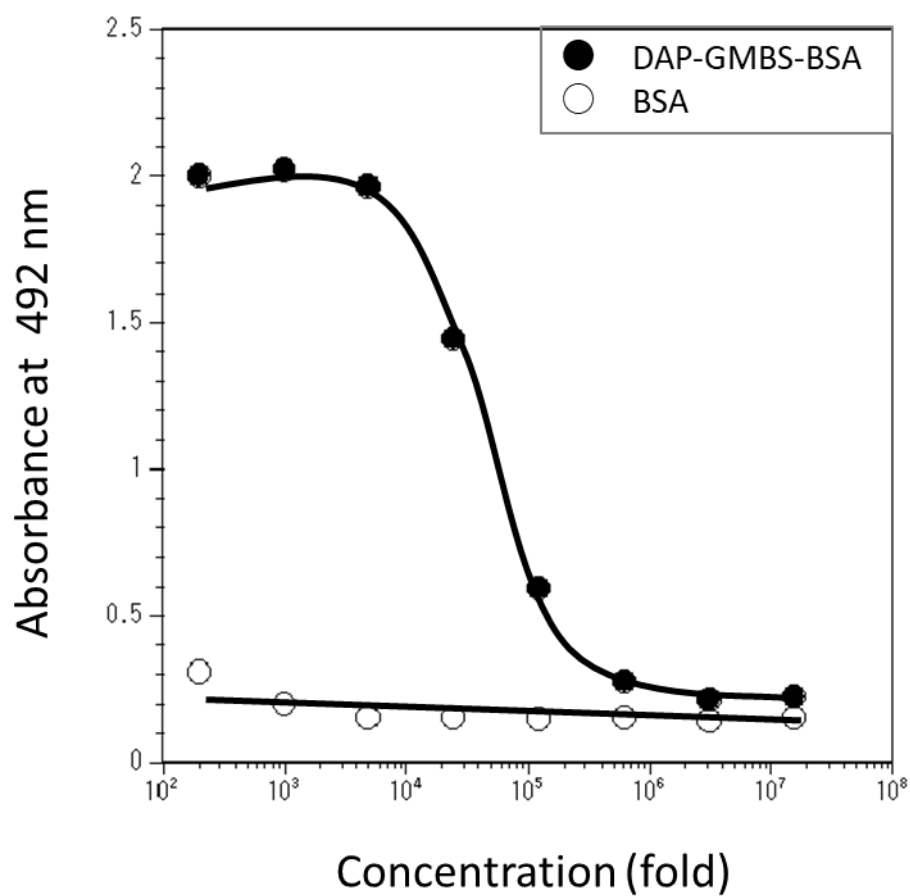


Fig. 2 ELISA measurements of the binding of serially Anti-Daptomycin (DAP) antiserum (antibody) to the solid phase coated with DAP-GMBS-BSA (closed circles) or BSA (open circles).

2-2-2-2. Binding ELISA

抗体の特異性を確認すると共に、本抗体が免疫組織化学で使用可能か否かを検討するために、wellにコートしたpoly-L-lysineにGAを架橋剤として検体（薬物）を結合させた後、抗体を反応させることにより組織切片上での免疫組織化学法をシミュレートするBinding ELISAを行った。その結果、本抗体はDaptomycinに10 nM～1 μ Mの範囲で濃度依存的に強い結合活性を示したが同じ抗MRSA薬であるVancomycin, Teicoplaninとは全く反応性を示さなかった(Fig. 3)。

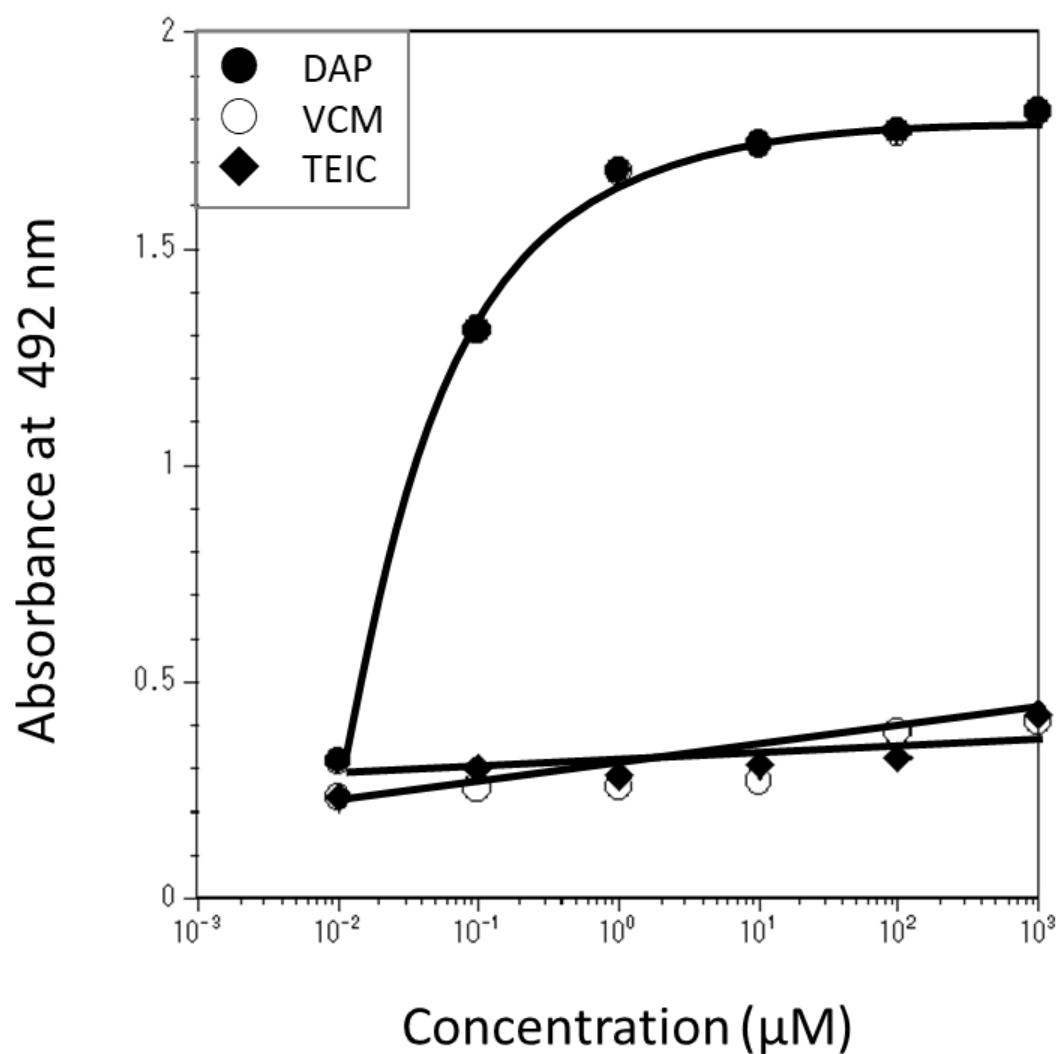


Fig. 3 Reactivity of the anti-Daptomycin antibody as determined from its immunoreactivity in the binding ELISA. Activated wells prepared for the binding ELISA were incubated with various concentration of Daptomycin (DAP; closed circles), Vancomycin (VCM; open circles), Teicoplanin (TEIC; closed rhombus). The wells were reacted with NaBH₄ and then with Simple stain MAX-PO (M) (1:1000).

2-2-2-3. 免疫組織化学法によるラット腎臓におけるDaptomycinの薬物動態

30℃で 60 分間 protease 処理した Daptomycin 投与 1 時間後の腎臓切片の免疫組織化学法では、皮質全体に種々の程度の陽性反応が見られたが、深層に比べて浅層の方がやや強く染色されていた (Fig.4a)。ネフロン各部位の染色態度には差があり、糸球体は弱陽性、腎小体に続く近位尿細管 S1, S2 部位では、上皮細胞の微絨毛直下の頂端側細胞質中にリング状の強陽性反応が見られた。しかしながら、上皮細胞の微絨毛と細胞質はほとんど染色されなかった (Fig.5a, b)。遠位尿細管では、上皮細胞の一部が膨化し陽性反応を示すものと、陰性な細胞が混在しており、核や細胞質にも染色が見られた (Fig.5a)。protease 処理を 120 分間行くと腎臓全体の染色強度が僅かに増強し、近位尿細管の微絨毛が僅かに染色されたが染色パターンは protease 処理 60 分間のものと変わらなかった (Fig.4b)。近位尿細管 S3 部位では上皮細胞の微絨毛と細胞質の一部が染色され、細胞質中に小さい顆粒が確認された。集合管の核にも弱い染色が見られた (Fig.5d)。投与後 24 時間になると、低倍率観察では皮質の浅層に顆粒状に染色している管が観察された (Fig.4c)。高倍率で観察を行うと、低倍率で見られた皮質に存在する顆粒状の陽性反応が近位尿細管 S1, S2 部位の細胞質中に存在していることが確認された (Fig. 5e)。この顆粒状の陽性反応はサイズが大小様々であり、HE 染色と比較すると全てではないものの、一部の核に Daptomycin が蓄積していることが明らかとなった (Fig. 5f)。また遠位尿細管の核に弱い陽性反応が確認されたが糸球体、集合管には陽性反応は見られなかった。投与後 7 日の腎臓では、試料全体に陽性反応は認められなかった (Fig. 4d)。なお、陰性対称実験として抗体溶液中に 100 µg/mL の DAP-GMBS-BSA 複合体を加えた吸収実験では、染色は完全に消失していることが示された (Fig.4e)。また、Daptomycin を投与していない Normal rat の腎臓切片を用いた陰

性対照実験でも陽性反応は確認されなかった (Fig.4f)。

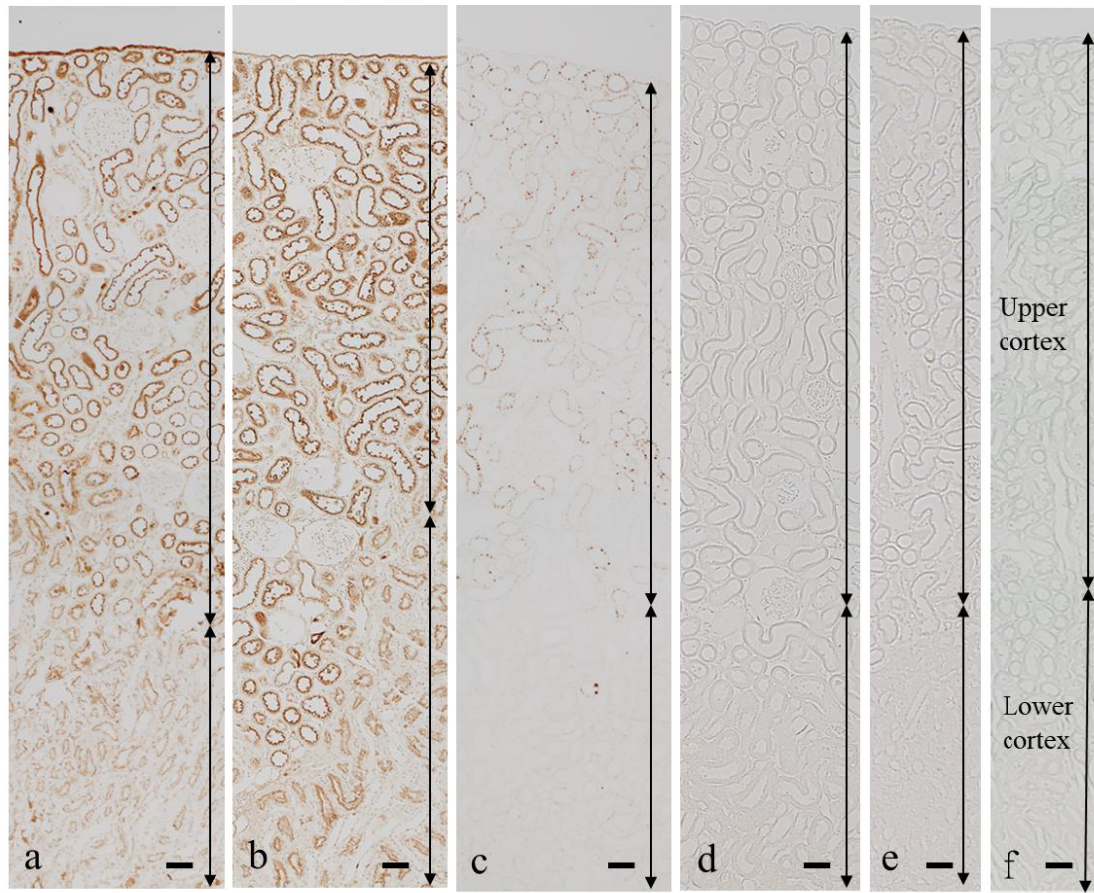


Fig. 4 Low magnification images of immunohistochemistry for Daptomycin in rat kidneys 1 h (a, b, and e), 24 h (c), 7 days (d) after the drug administration. In the conventional control (f). Immunohistochemistry was treated with 0.03 mg / mL protease at 30 ° C for 60 min (a) or 120 min (b to e). Bar = 50 μ m.

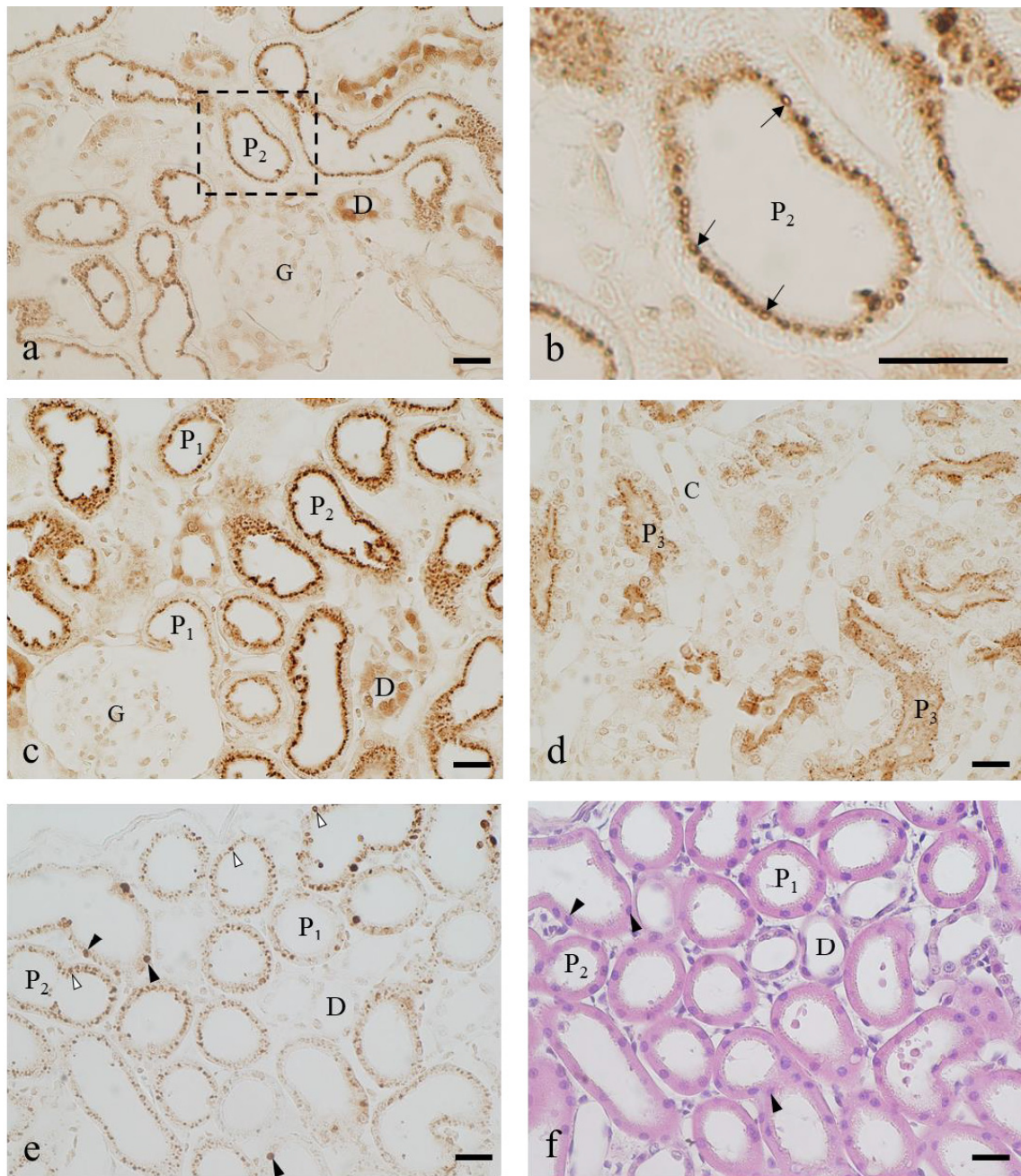


Fig. 5 High magnification image of immunohistochemistry for Daptomycin in rat kidneys 1 h (a to d), 24 h (e and f) after the drug administration. IHC was treated with 0.03 mg / mL protease at 30 ° C for 60 minutes (a and b) or 120 minutes (c to e). High images magnification of upper cortex (a, c, and d) and lower cortex (b) of kidney cortex. c: HE stain, G: glomerulus, P1:S1 segment of proximal tubules, P2: S2 segment of

proximal tubules, P3: S3 segment of proximal tubules, D: distal tubules, C: collecting ducts. (b) Ring-like positive reaction (arrows). (e and f) Nuclear (arrow head), Lysosome (open arrow head). Bar = 20 μ m.

2-2-3. 考察

Daptomycin は腎排泄型の薬物であり、78%が未変化体の状態で尿中に排泄される[6]。Daptomycin に関連した腎毒性についての研究はヒトや動物で行われてきたが、その正確なメカニズムは解明されていない。金コロイドを用いた Daptomycin の細胞内局在を研究した Beauchamp らの研究によると、100 mg/kg の高用量で投与された Daptomycin は、投与後 10 分で近位尿細管上皮細胞中のエンドサイトーシス液胞膜状に Daptomycin が存在していることを報告しており、投与 24 時間後に近位尿細管のリソソーム中に Daptomycin が蓄積することを報告している[26]。しかし、この研究は近位尿細管に限定されており Daptomycin の腎毒性をより良く理解するために我々は Daptomycin に対する特異抗体を作製し、光学顕微鏡レベルで腎臓全体の Daptomycin 局在を解析可能な免疫組織化学法を開発した。本研究では、Daptomycin 12 mg/kg を単回静脈内投与しているため Beauchamp 研究よりも、より臨床に近い結果を示している。本研究で作製した抗 Daptomycin 抗体は、Binding ELISA により GA により固定化された他の抗 MRSA 薬 (Vancomycin, Teicoplanin) とは反応せず Daptomycin にのみ特異的であることが示された。Daptomycin は尿中に 4 種類の代謝物が含まれることが報告されているが、現在のところ代謝部位の特定や化学構造は明らかとなっていない。その為本抗体が代謝物に交差反応性を示すかは確認できていないのが現状である[27]。GA は Daptomycin のような 1 級アミノ基を持つ低分子薬剤をその場所 (*in situ*) に不動化するための必須架橋剤であるため、本抗体が GA 固定組織での免疫組織化学法に有用であることが示唆された。しかし、GA による固定の場合薬物だけでなく組織蛋白質同士間の架橋が起こり、抗体が標的薬物まで浸透しにくくなる。そこで我々はタンパク分解酵素を用い、腎臓における Daptomycin の最適検出条件を確立した。Daptomycin

投与後 1 時間の近位尿細管 S1, S2 部位では、上皮細胞の細胞質は染色されず、微絨毛とその基部の細胞質中にリング状の強陽性反応が確認された (Fig. 5b)。近位尿細管 S1, S2 部位上皮細胞の微絨毛は、薬物相互作用の様々な輸送経路が存在する場所として知られているため、Daptomycin に対する未知の輸送体が存在する可能性が考えられる[28]。近位尿細管微絨毛基部のリング状の陽性反応は、Beauchamp らの報告と同様に、エンドサイトーシス経路により Daptomycin が細胞質内に取り込まれている過程を示唆している。

また、遠位尿細管において一部の細胞が膨化していたという新たな発見は、何故一部の細胞に限り薬物に取り込まれるのか理由は不明だが、Daptomycin が遠位尿細管上皮細胞に短時間の間に悪影響を与えている可能性が考えられる。また、我々が以前開発した Vancomycin に対する免疫組織化学法でも、投与後 3 時間において遠位尿細管上皮細胞に同様の膨化した細胞が観察されている (Data not shown)[5]。しかしながら、Vancomycin 同様に Daptomycin も投与後 24 時間で染色は消失し、通常サイズに戻っていることから細胞に対しそれほど強く悪影響を与えない可能性があることが示唆された。投与後 24 時間の近位尿細管上皮細胞中に見られた大小様々な顆粒状の陽性反応は、全てではないものの細胞の一部の核が強く染色されており、その他の小顆粒は Beauchamp ら同様に、近位尿細管 S1, S2 部位の管腔側より上皮細胞に取り込まれ、エンドサイトーシス経路によって運ばれた Daptomycin がリソソームに取り込まれているのを観察していると考えられる。以前 Fujiwara らは、Vancomycin は投与後 8 日経っても近位尿細管上皮細胞の細胞質、核、リソソームに薬物が長期蓄積しており、この蓄積が Vancomycin の腎毒性に関与していることを報告している (Data not shown)。本研究では Daptomycin が投与後 7 日において完全に腎臓から排出されており腎臓に長期蓄積せず、Vancomycin に比べ副作用である腎毒性が起こりに

くい可能性を光学顕微鏡レベルで初めて明らかにした[5]。

結論として、我々の研究は Daptomycin に対する特異抗体を使用して 12 mg/kg の Daptomycin (臨床の 2 倍量) を投与したラットの腎臓において Daptomycin が局在・蓄積性を解析できる免疫組織化学法の開発に初めて成功した。Daptomycin は腎毒性のほかに横紋筋融解症も重篤な副作用として挙げられているが、正確なメカニズムの解析や横紋筋への Daptomycin 蓄積性などは未だに明らかとなっていない。その為、今後副作用部位である横紋筋だけでなく、作用部位の皮膚など様々な組織で Daptomycin の局在・蓄積性を解明する上で本免疫組織化学法は有用なツールになるであろう。

第3章 免疫組織化学法を用いた2型糖尿病治療薬 Alogliptin の薬物動態解析 緒言

世界中の糖尿病患者の数は、ここ数十年で着実に増加している[29]。日本で糖尿病の治療を受けた患者の数は2017年に過去最高の330万人に到達し[30]、その90%以上が2型糖尿病である。Alogliptin (AG)はジペプチジルペプチダーゼIV (DPP-4) 阻害薬と呼ばれる2型糖尿病の治療薬である。食物が消化管に入ると、胃腸ホルモンの一種であるインクレチンが小腸から分泌され、すい臓からのインスリン分泌を促進する。しかし、インクレチンは血漿中のDPP-4により急速に分解されるため、インスリン分泌能が低下した2型糖尿病患者のすい臓を十分に刺激することができない。Alogliptin は、DPP-4 を阻害することでグルコース濃度依存的にインスリン分泌を増強させる[31]。しかし、重篤な副作用として肝機能障害が挙げられており、症例数は少ないものの慢性腎不全を含む腎障害も報告されている[32]。したがって、組織細胞レベルでのAlogliptin の局在及びその時間依存的変化に関する知見は、Alogliptin の作用や副作用のメカニズムや薬物の適切な使用法についての理解を深めるために有用であろうと期待される。しかしAlogliptin の細胞及び組織での局在に関する報告は少なく、全てautoradiography 法による研究であった[33, 34, 35]。著者は、以前Alogliptin に対する特異モノクローナル抗体を作製し、それを用いた免疫組織化学法によりAlogliptin 投与ラット小腸での薬物の局在を報告した[11]。今回Alogliptin 投与後1時間及び24時間のラット腎臓及び肝臓における薬物の局在と蓄積性について報告する。

4-2. 材料および方法

4-2-1. 試薬

Alogliptin (Takeda Pharmaceutical Co. Ltd., Osaka, Japan)

Sodium pentobarbital (Abbott Laboratories, North Chicago, IL, USA)

Heparin sodium (AY Pharmaceuticals Co., Ltd. Tokyo, Japan)

Hydrogen peroxide (NACALAI TESQUE, Kyoto, Japan)

Protease (Type XXIV: Bacterial; Sigma-Aldrich Co. Inc., St. Louis, MO, USA)

Sodium borohydride (NaBH_4) (Sigma-Aldrich Co. Inc., St. Louis, MO, USA)

Simple Stain Rat MAX-PO (M) (Nichirei Bioscience Inc., Tokyo, Japan)

3, 3'-Diaminobenzidine, tetrahydrochloride (DAB) (Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan)

Mouse IgG immunoassay kit (PerkinElmer Inc., Waltham, MA, USA)

4-2-2. 組織試料

本研究では、組織試料を得るために、成雄 Wistar ラット (体重 200~250 g) (Kyudo Exp. Animals; Kumamoto, Japan) を用いた。ラットは、温度と光を調節した室内で飼育し、自由に飼料と飲み水を摂取させた。6 匹のラットに 5 mg/kg の Alogliptin を単回経口投与し、投与後 1 時間及び 24 時間にラットをペントバルビタール (60 mg/kg, b.w.) で麻酔し、流速 50 mL/min でヘパリンを 2 分間、次いで 2% GA を 6 分間心臓から流し、灌流固定を行った。その後、腎臓、肝臓を速やかに摘出し、同様の固定液を用いて 4°C 一晩後固定した。

4-2-3. 免疫組織化学

免疫組織化学法はFujiwaraらの方法に従った[36, 37]。後固定後、腎臓及び肝臓の組織を常法によりパラフィンに包埋し、試料を厚さ 5 μm の切片に薄切しシランコートしたスライドガラスに貼付した。キシレン・エタノール系列を通して脱パラフィンした後、前処理として① 6% hydrogen peroxideで室温30分間、

② 2N hydrochlorideで室温30分間, ③ 0.03 mg/mL protease/PBSで30℃ 60分間 [38], ④ 5 mg/mL sodium borohydrideで室温10分間の処理を行った[39, 40]。なお, 試料の一部はprotease処理を省略した。その後, 10% 正常ヤギ血清, 1.0% BSA, 0.1% サポニン/TBS溶液を用いて室温1時間blockingした。次いで1次抗体としてTBST (0.1% Triton X-100含有TBS)で20倍希釈したAAG-78 mAb (以前の研究[11]で用いた抗Alogliptinと同じロットのモノクローナル抗体)を4℃で一晩反応させた。続いて, 2次抗体としてSimple Stain Rat MAX-PO (M) を室温2時間反応させ, TBSで洗浄した後, 3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) 溶液 (0.5 mg/mL DAB, 0.012% H₂O₂/50 mM TBS)と室温10分間反応し, 抗体反応部位を可視化した。

陰性対照実験として, 従来型対照実験と吸収実験の2種類を行った。従来型対照実験では, 一次反応時に抗体溶液の代わりに 0.5 µg/mL の濃度に調整した normal mouse IgG を切片に反応させた。また, 吸収実験では, 30 µg/mL となるよう AG-GMBS-BSA を抗体溶液に加えた後, 切片と反応させた。

4-2-3. 結果

4-2-3-1. 免疫組織化学法によるラット腎臓における Alogliptin の薬物動態

Alogliptin 投与後 1 時間の腎臓では, protease 処理を行わなかった場合, 近位尿細管 S3 分節に最も強い染色が観察された (Fig. 1a, i)。尿細管上皮細胞の微絨毛は中等度に, 核は強く染色されていたが, 細胞質の染色は尿細管の断面によって異なり中等度～強陽性を示すものが見られた (Fig. 1a)。一方, 近位尿細管 S1 及び S2 分節では, 上皮細胞の微絨毛に弱い染色が確認されたのみで, 細胞質も核も染色されなかった (Fig. 1b)。遠位尿細管は中等度の陽性反応を示し, 集合管では陽性細胞とほぼ陰性の細胞が混在していた (Fig. 1b)。1 時間の protease 処理によっても, 近位尿細管 S3 分節の染色パターンと染色強度はほとんど変化なかった (Fig. 1c, j)。しかし, 近位尿細管 S1 及び S2 分節では, 上皮細胞の微絨毛の染色強度が著しく増強され, 糸球体も陽性反応を示した (Fig. 1d, e)。また, 遠位尿細管, 集合管の染色強度も僅かに増強した (Fig. 1d, e)。

Alogliptin 投与後 24 時間の腎臓で, protease 処理を行わなかった場合, 近位尿細管 S3 分節の染色は投与後 1 時間のものとほとんど同じであった (Fig. 1f)。しかし, 近位尿細管 S1 及び S2 分節では, 上皮細胞は微絨毛を含めて全て陰性であった (Fig. 1g)。また, 遠位尿細管は弱陽性反応を示したが, 集合管はほぼ陰性であった (Fig. 1f)。protease 処理を 1 時間行っても, 染色パターンや染色強度には変化は見られず, 糸球体も陰性であった (Fig. 1k)。また, 2 種類の陰性対照実験は, 従来型 (data not shown), 吸収実験 (Fig. 1h)ともに染色されなかった。

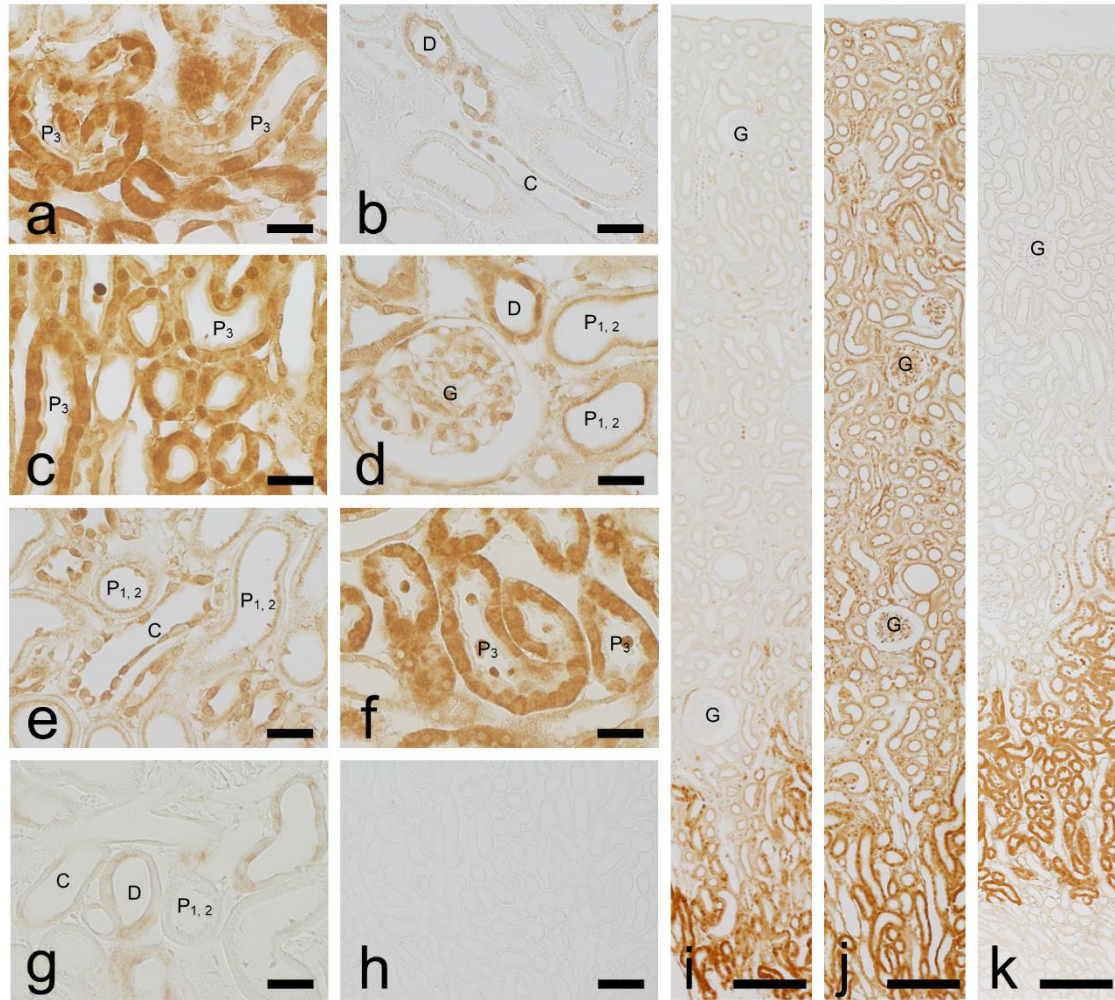


Fig. 1 Immunohistochemistry for Alogliptin in rat kidney.

Tissue samples are from 1 h (**a–e, h–j**) or 24 h (**f, g, k**) after drug administration. **a, b, f, g, i**: Without protease digestion. **c, d, e, h, j, k**: After digestion with protease for 1 h. **a, c, f**: High-magnification images of the lower layer of the renal cortex. **b, d, e, g**: High-magnification images of the upper layer of the renal cortex. **h**: Absorption control. G, glomerulus; P_{1,2}, proximal tubule S1 or S2 segment; P₃, proximal tubule S3 segment; D, distal tubule; C, collecting duct. Bars: **a–g** = 25 μm; **h–k** = 100 μm

4-2-3-2. 免疫組織化学法によるラット肝臓における Alogliptin の薬物動態

Alogliptin 投与後 1 時間の肝臓では、protease 処理を行わなかった場合、クッパー細胞及び小葉間結合組織で非常に弱い染色が観察されたのみで、肝細胞はほとんど染色されなかった (data not shown)。しかし、protease 処理を 1 時間行くと、組織全体に弱～中等度の染色が観察された (Fig. 2a)。染色強度は肝小葉のゾーンにより異なっており、ゾーンⅢ (中心静脈周辺) の肝細胞は、ゾーンⅠ (肝小葉周辺) の肝細胞よりも強く染色された (Fig. 2a, b, c)。また、ゾーンⅢの肝細胞では、細胞質の染色よりも核の方が強く染色された (Fig. 2b)。さらに、小葉間動脈、小葉間静脈、洞様毛細血管の内皮細胞、およびクッパー細胞は中等度陽性であり、小葉間胆管上皮細胞は強陽性であった (Fig. 2c)。投与後 24 時間で、肝臓の染色はほとんど消失し、ゾーンⅠの肝細胞に微弱な陽性反応が残存しているだけであった (Fig. 2d)。

また、2 種類の陰性対照実験は、従来型、吸収実験ともに染色されなかった (data not shown)。

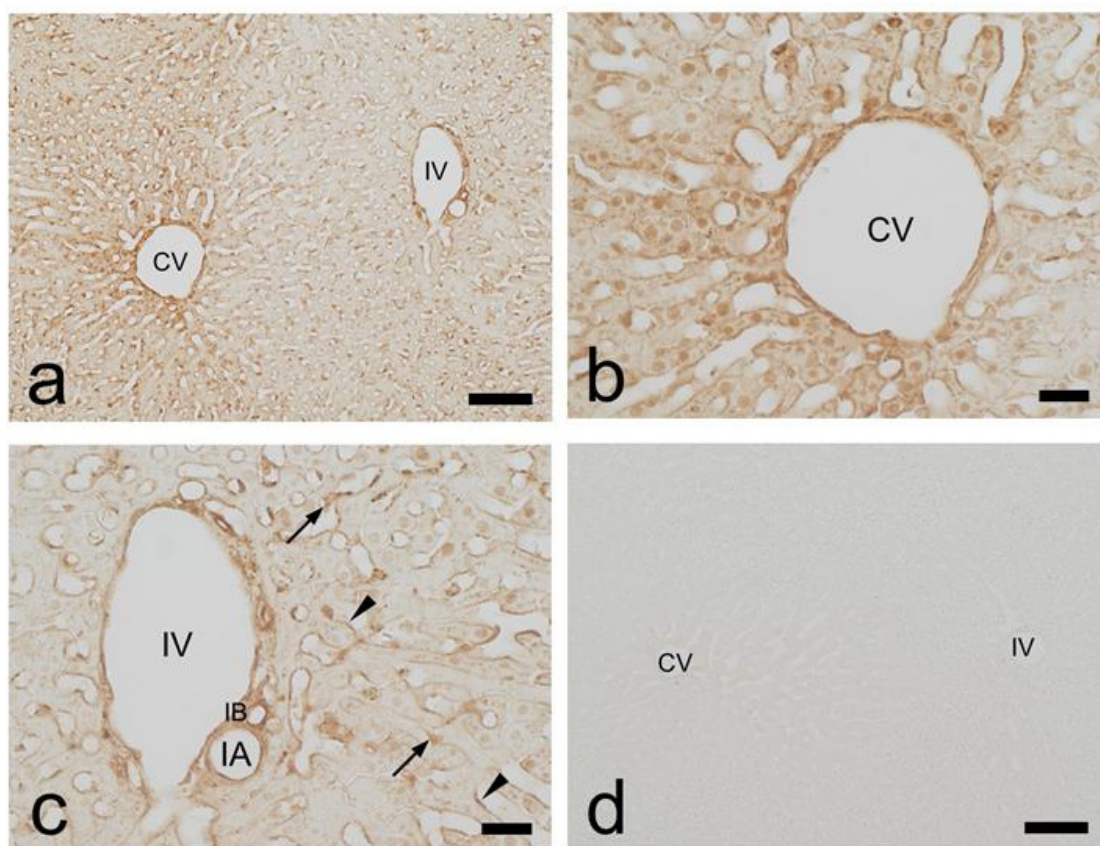


Fig. 2 Immunohistochemistry for Alogliptin in rat liver.

Tissue samples are from 1 h (a–c) or 24 h (d) after drug administration. a–d: After digestion with protease for 1 h.

CV, central vein; IV, interlobular vein; IA, interlobular artery; IB, interlobular bile duct; arrows, Kupffer cells; arrow heads, endothelial cells. Bars: a, d = 100 μ m; b, c = 25 μ m

4-3. 考察

腎臓からの薬物排泄は、糸球体濾過、尿細管再吸収、および尿細管分泌の3つの過程のバランスによって決定される。したがって、尿細管上皮細胞に見られる陽性反応は、原尿から再吸収される薬物から原尿へ排出される薬物を引いて残った薬物を表していると考えられる。一般に、尿細管再吸収は受動輸送により、尿細管分泌はトランスポーターによる能動輸送によると考えられている。しかし、ジペプチドおよびトリペプチドの輸送体である PEPT1 および PEPT2 は、 β -ラクタム系抗生物質の再吸収に関与している[1, 7, 13]。一方、尿細管分泌には多くのトランスポーターが関わっており、細胞の側底部から薬物を吸収するトランスポーター（有機アニオントランスポーター、有機カチオントランスポーターなど）や、細胞内から尿細管の管腔内に薬物を分泌するトランスポーター（P-糖タンパク質、multidrug and toxin extrusion など）が知られている[13, 19]。

本研究では、プロテアーゼ処理を行っても、Alogliptin 投与後1時間の腎臓で近位尿細管 S1 及び S2 分節の上皮細胞では微絨毛のみが染色されていた。しかし、S3 分節の上皮細胞では、微絨毛だけでなく、細胞質と核も染色された。著者の知る限り、Alogliptin を基質とする輸送体は報告されていない、本研究の結果は、薬物の再吸収に受動輸送だけでなく、1種類以上の輸送体に関与しており、輸送体は特に S3 分節上皮細胞で高発現している可能性を示唆している。また、大量の膜結合型 DPP-4 が近位尿細管上皮細胞の微絨毛に発現していることが報告されている[17]。したがって、微絨毛に見られる陽性反応は、輸送中の薬物だけでなく、膜結合型 DPP-4 に結合した薬物も検出している可能性が高いと思われる。

さらに、遠位尿細管は中程度の染色を示し、集合管上皮には陽性細胞とほぼ陰性の細胞が共存していた。著者らの知る限り、遠位尿細管または集合管での薬物の再吸収または分泌に関する唯一の報告は、上田らによる遠位尿細管からのゲンタマイシンの排泄に関する報告しかない [27]。しかし、本研究の結果は、Alogliptin の再吸収は遠位尿細管と集合管でも行われており、再吸収能は細

胞ごとに異なっている可能性が高いことを示唆している。これらの部位での薬物の再吸収が受動輸送によってのみ行われているとすると、すべての上皮細胞が同様に染色されると思われる。したがって、本研究の結果は、Alogliptin が 1 種類以上のトランスポーターを介してこれらの部位から再吸収され、トランスポーターの発現が細胞ごとに異なることを示唆している。集合管は 2 種類の細胞（主細胞と介在細胞）で構成されているため[16]、Alogliptin の蓄積性の違いは細胞種の違いを反映したものである可能性が考えられる。さらに、集合管での Alogliptin 免疫染色の結果は、バンコマイシンの結果と非常に似ていたが、バンコマイシンの場合に観察された膨化細胞は観察されなかった。膨化細胞は傷害を受けた細胞と考えられているので、Alogliptin が遠位尿細管と集合管を傷害する可能性は低いと考えられる[8]。

投与後 24 時間の腎臓では、近位尿細管 S3 分節以外の領域はほとんど染色されなかったが、S3 分節には強陽性反応が認められ、薬物が残留していることが示された。したがって、長期投与により S3 分節に大量の薬物が蓄積していき、蓄積された薬物が腎臓への副作用に関与している可能性が示唆された。

Alogliptin は、CYP2D6 および CYP3A4 によって部分的に代謝される。しかし、活性代謝物 MI（N-脱メチル化）は尿中 Alogliptin 濃度の 2%未満に過ぎず、6%未満を占める不活性代謝物 M-II（N-アセチル化）はアミノ基を失うためグルタルアルデヒドによって組織に固定することはできない[2, 23, 26]。したがって、組織で観察される陽性反応は、未変化体の薬物の局在を示していると考えられる。Alogliptin 投与後 1 時間の肝臓では、肝臓切片全体に陽性反応が観察されたが、ゾーン I よりもゾーン III の肝細胞の染色強度が強かった。さらに、ゾーン III の肝細胞の核が強く染色され、細胞内に顆粒状の陽性反応も認められた。これらの結果は、血中薬物濃度はゾーン I の洞様毛細血管の方が高いにもかかわらず、吸収された薬物の量はゾーン I の肝細胞よりもゾーン III の肝細胞の方が高いことを示している。より多くの Alogliptin が、薬物代謝酵素

を高発現しているゾーン III の肝細胞に取り込まれることは非常に合理的である。さらに、本研究の結果は、肝細胞への Alogliptin の取り込みは受動輸送によるものだけでなく、1 種類以上の輸送体が関与しており、輸送体は肝小葉中心部の肝細胞で高発現していることを示唆している。血管内皮細胞、毛細胆管、および小葉間胆管上皮細胞で観察される陽性反応は、これらの細胞の細胞膜上の DPP-4 に結合した Alogliptin を検出しているものと思われる。Alogliptin は主に腎臓から排泄されるが、胆汁中にもわずかに排泄される。しかし、肝細胞の陽性反応は投与後 24 時間でほぼ消失するため、長期間服用しても肝細胞の Alogliptin は血液中に戻り、細胞内に蓄積しないと考えられる。従って、Alogliptin 使用者の肝臓での副作用は、おそらく薬物の蓄積によるものではなく、他の理由による可能性が高いと考えられる。

結論として、本研究により Alogliptin 投与ラットの腎臓と肝臓における細胞・組織レベルでの Alogliptin の薬物動態を明らかにした。腎臓では、投与後 24 時間でも大量の薬物が近位尿細管 S3 部位に残存しており、薬物の蓄積が腎臓での副作用に関係している可能性がある。肝臓では、薬物代謝酵素を高度に発現するゾーン III 肝細胞がより多くの薬物を取り込んでいた。しかし、薬物は投与後 24 時間に肝細胞からほとんど消失していた。これは、肝臓での副作用が薬物の蓄積以外の理由によるものであることを示唆している。また、受動輸送に加えて、1 種類以上トランスポーターがこれらの器官での薬物の取り込みに関与していることも示唆された。

第4章 免疫組織化学法を用いたがん分子標的治療薬の薬物動態研究

緒言

抗がん剤の歴史はまだ浅く最初の抗がん剤が開発されたのは20世紀中頃である。これを境にがん薬物療法として様々な抗がん剤が開発されてきたが、その中心は殺細胞剤 (cytotoxic agents) であった。殺細胞剤の標的は、細胞が分裂するためのDNA合成阻害、修復阻害、転写阻害、蛋白合成阻害などである。その為殺細胞剤は細胞選択性が極めて低く、がん細胞だけでなく正常細胞にもダメージを及ぼし副作用の発現確率が高いことが問題であった。そこでその問題を解決すべく、がん細胞に対し特異的に傷害性を示す抗がん剤の開発が進められてきた。そして近年では、様々な分子標的薬が臨床の現場に登場し、いくつかのがん腫では標準治療として用いられている。

非小胞性肺がんの治療に用いられる分子標的薬である Gefitinib と Erlotinib は上皮成長因子受容体 (EGFR)変異陽性の非小胞性肺がんの EGFR チロシンキナーゼの ATP 結合部位に可逆的に結合し、血管新生や腫瘍増殖などのシグナル伝達系を阻害する第1世代の上皮成長因子受容体チロシンキナーゼ阻害薬 (EGFR-TKI) と呼ばれている。

今回研究対象とした Afatinib と Dacomitinib は第2世代の EGFR-TKI であり、分子構造中に α , β -不飽和ケトン部分 (4-[dimethylamino]-2-buteneamido 部位) が付加されており活性 ErbB ファミリー受容体 (EGFR, ErbB2, ErbB3, ErbB4) の ATP 結合部位の Cys797 に不可逆的に共有結合し阻害するように設計されている [42, 43, 44]。不可逆的に共有結合することで EGFR に対しての持続性を向上させている。しかし、副作用として下痢、発疹/皮膚炎、口内炎、爪周囲炎、乾燥肌、食欲減退などが高い頻度で起こり、減薬や休薬の原因となっている [45]。EGFR

は主に皮膚や胃腸管などの上皮細胞に多く発現しているため、EGFR-TKI で最も良く観察される有害事象は下痢と皮膚障害である[46]。しかしながら、Afatinib と Dacomitinib により誘発される下痢と皮膚障害の詳細なメカニズムは、未だ解明されていない。

Afatinib は ErbB ファミリー受容体により形成される全てのホモダイマー、ヘテロダイマーからのシグナル伝達をブロックする[38]。ヒト血漿中の Afatinib の主要代謝物は、マイケル付加反応を介して血漿タンパク質に共有結合した Afatinib の付加体である[47]。これらの知見は、Afatinib が EGFR だけでなく組織タンパク質と共有結合を形成することで、Afatinib が組織に局在していることを示している。しかしながら、組織中に存在する Afatinib-protein conjugate を特異的に検出する方法は現在開発されていない。このような conjugate の検出することができれば、Afatinib の作用や毒性研究に非常に有用であると期待される。

一般的に IHC で用いられる低分子化合物 (第一級アミノ基を有す) やタンパク質などは、ホルマリンや Glutaraldehyde などの架橋剤を用いて抗原のアミノ基と組織内タンパク質のアミノ基を結合させ組織内に固定する。しかし、Afatinib と Dacomitinib は 1 級アミノ基を持たないため架橋剤を用いても組織に固定することはできない。しかし、両薬は α , β -不飽和ケトン部分を有しているので生体内で ErbB ファミリー受容体や他のタンパク質とマイケル付加反応により共有結合を形成する。このようにして形成された Afatinib or Dacomitinib-protein conjugate は、架橋剤により組織内での固定が可能である。

そこで本研究は、以前 Sogawa らが作製した抗 Afatinib 抗体を用いて Afatinib or Dacomitinib-protein conjugate の局在を解析可能な IHC を開発し、Afatinib と Dacomitinib により誘発される下痢と皮膚障害の詳細なメカニズムを解析するために、ラット腸管及び皮膚における Afatinib or Dacomitinib-protein conjugate の局

在を解析した。

第1節 免疫組織化学法による Afatinib-protein conjugate の局在解析

4-1-1. 材料および方法

4-1-1-1. 試薬

Afatinib (ChemScene LLC, NJ, USA)

Gefitinib (TCI chemicals, Tokyo, Japan)

Paraformaldehyde (PFA) (Nacali Tesque, Tokyo, Japan)

Histofine Simple Stain MAX-PO (M) (Nichirei Bioscience, Tokyo, Japan)

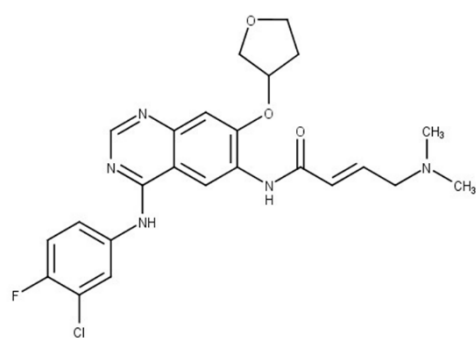
3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidine (TMB) (Sigma-aldrich, Ingelheim, Germany)

3, 3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) (Junsei Chemical, Tokyo, Japan)

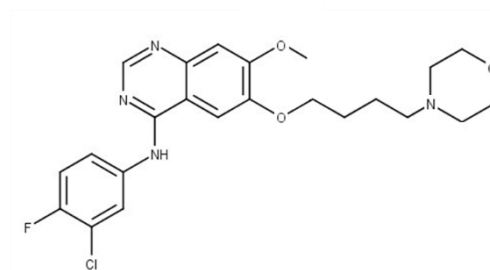
4-1-1-2. 抗 Afatinib 抗体の交差反応試験

抗 Afatinib 抗体は以前 Sogawa らが作製したものを使用した[48]。ELISA の原理は、固相化された抗体に対して酵素標識体と薬物を競合的に反応させ、抗体に結合した酵素標識体の酵素活性を測定する方法である。すなわち、microtiter plate の well に、10 mM Tris buffer (pH 8.5) で希釈した抗 Afatinib 抗体 (2 μ g/mL) を 100 μ L 加えて 4°C で 1 晩放置することにより固相化した。次に 1% skim milk を 100 μ L 加えて、37°C で 30 分間 blocking を行った。Well に既知濃度の Afatinib または Gefitinib 50 μ L と、0.1% BSA 含有 PBS で 500 倍希釈した Afatinib-HRP 50 μ L を加えて 37°C で 3 時間競合反応させた。洗浄後、結合した酵素標識体を定量するため、3% dimethyl sulfoxide (DMSO), 0.01% hydrogen peroxide を含む 0.05 M acetate citric acid buffer (pH 5.5) に溶解した 0.42 mM TMB を各 well に 100 μ L 添加し、37°C で 30 分間酵素反応させた。反応終了後、2 M sulfuric acid 100 μ L を加

えて反応を停止させた。ELISA analyzer (ImmunoMini NJ-2300, Nalje Nunc Int.Co. Ltd, Tokyo, Japan) を用いた分光分析により 450 nm の吸光度を測定した。



Afatinib



Gefitinib

Fig. 1 Chemical structure of Afatinib and Gefitinib.

4-1-1-3. ELISA による Afatinib のマイケル付加反応の評価

ELISA を用いて、Afatinib とタンパク質間のマイケル付加反応を *in vitro* で評価を行った。ELISA の原理は、固相化された蛋白質に対して Afatinib を時間経過毎に反応させ、抗体により薬物がタンパク質に結合しているかを確認する方法である。まず、microtiter plate の well に 10 mM Tris buffer (pH 8.5) で希釈した BSA (20 µg/mL) を 100 µL 加えて 4°C で 1 晩放置することにより固相化した。その後、10 mM PB (pH 7.5) で希釈した Afatinib (20 µg/mL) を時間経過毎 (5 分から 4 時間) に 100 µL 加え反応させた。次に 1% skim milk を 100 µL 加えて、37°C で 30 分間 blocking を行った。洗浄後、結合した Afatinib を定量するため、0.1% BSA 含有 PBS で 500 倍希釈した Anti-Afatinib serum 100 µL を加えて 37°C で 1 時間反応させ、洗浄後 0.1% BSA 含有 PBS で 1000 倍希釈した Histofine Simple stain MAX-PO (M) 100 µL を加えて 37°C で 1 時間反応させた。洗浄後、結合した酵素標識体を定量するため、3% dimethyl sulfoxide (DMSO), 0.01% hydrogen peroxide を含む 0.05 M acetate citric acid buffer (pH 5.5) に溶解した 0.42 mM TMB を各 well に 100 µL 添加し、37°C で 30 分間酵素反応させた。反応終了後、2 M sulfuric acid 100 µL を加えて反応を停止させた。ELISA analyzer (ImmunoMini NJ-2300, Nalge Nunc Int.Co. Ltd, Tokyo, Japan) を用いた分光分析により 450 nm の吸光度を測定した。

4-1-1-4. 組織試料

組織試料には、成雄 Wistar ラット (体重 200~250 g) (Kyudo Exp. Animals; Kumamoto, Japan) を用いた。ラットは温度と光を調節した室内で飼育し、自由に食料と飲み水を摂取させた。(i) 2 匹のラットに 10 mg/kg の Afatinib を単回経口投与した (n=2)。(ii) 2 匹のラットに 10 mg/kg の Gefitinib を単回経口投与した

(n=2)。それぞれ投与 24 時間後にラットをペントバルビタール (60 mg/kg, b.w.) で麻酔し、50 mL/min の流速でヘパリンを 2 分間、次いで 4%PFA を 6 分間心臓から流し、灌流固定を行った。その後、腸管系 (十二指腸, 空腸, 回腸, 結腸) と皮膚を速やかに摘出し、同様の固定液を用いて 4°C で一晩後固定した。なお、実験プロトコルは崇城大学の動物実験倫理委員会によって承認された。

4-1-1-5. 免疫組織化学法 (IHC) の開発

後固定した腸管系と皮膚は、脱水後常法に従ってパラフィンに包埋した。試料を厚さ 5 μ m の切片に薄切しスライドガラスに貼付した。続いて脱パラフィン後、1) 6% hydrogen peroxide で 30 分間 (内因性ペルオキシダーゼを不活化するため)、2) 2N hydrochloride で 30 分間 (DNA を変性させるため) の前処理を行った。その後、10% 正常ヤギ血清、1.0% BSA、および 0.1% サポニンを含む TBS 溶液を用いて室温で 1 時間 blocking した。次いで 1000 倍希釈した Anti-Afatinib serum を 4°C で一晩反応させた。反応後、Simple Stain Rat MAX-PO (M) を用いて室温で 2 時間反応させ、TBS で洗浄後に 0.5 mg/mL diaminobenzidine および 0.012% hydrogen peroxide を用いて反応部位を可視化した。

また、IHC の特異性を検証するため 3 種類の陰性対照実験を行った。(i) 一般的な対照実験：一次反応時に抗体溶液の代わりに 1000 倍希釈した normal mouse serum を切片に反応させた、(ii) 吸収実験：一次反応時の抗体溶液中に 1 μ g/mL の Afatinib を抗体溶液に加えた、及び(iii) Gefitinib 対照実験：Gefitinib 投与ラットの組織試料に一次反応として 1000 倍希釈した抗 Afatinib 抗体を反応させた。

4-1-2. 結果

4-1-2-1. 抗 Afatinib 抗体の交差反応試験

抗 Afatinib 抗体に対する Gefitinib の交差反応試験を行った。交差反応は、酵素活性を 50%阻害するのに必要な Afatinib 濃度を比較する Gefitinib のそれで除し, %として計算した。本抗体は Gefitinib に対して 20%の交差反応性を示した。

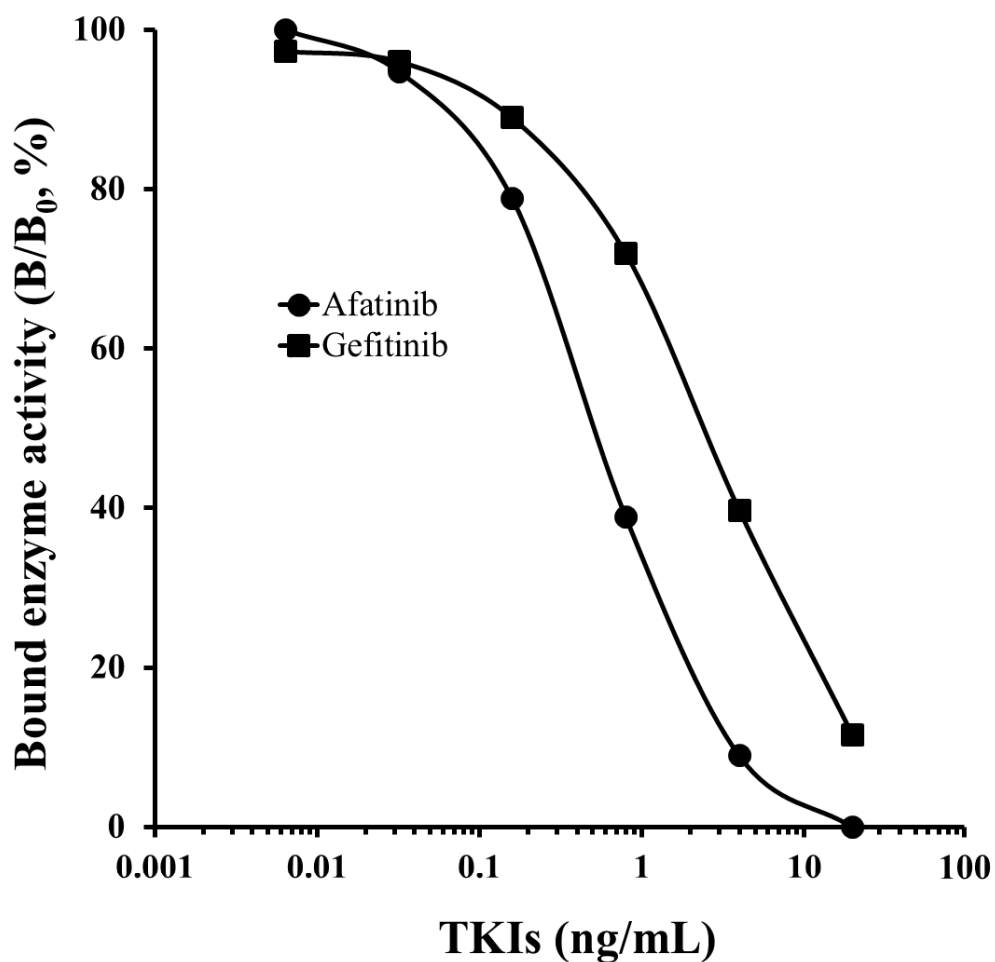


Fig. 2 Dose-response curves for TKIs with the Anti-Afatinib antibody.

The curves show the amount (%) of bound enzyme activity for various doses of TKIs (B) as a ratio of that bound using an enzyme-labeled drug alone (B₀). ●, Afatinib; ■, Gefitinib. Each point represents the mean \pm standard deviation (n = 3).

4-1-2-2. ELISA による Afatinib のマイケル付加反応の評価

Microtiter plate に固相化された BSA と生理的条件下で Afatinib をマイケル付加反応させ、続いて抗 Afatinib 抗体と反応させた。Fig. 4 に示すように、マイケル付加反応は 5 分以内に始まり約 2 時間後には完結した。しかしながら、マイケル付加反応のアクセプター部位を持たない Gefitinib は BSA とは結合を示さなかった。

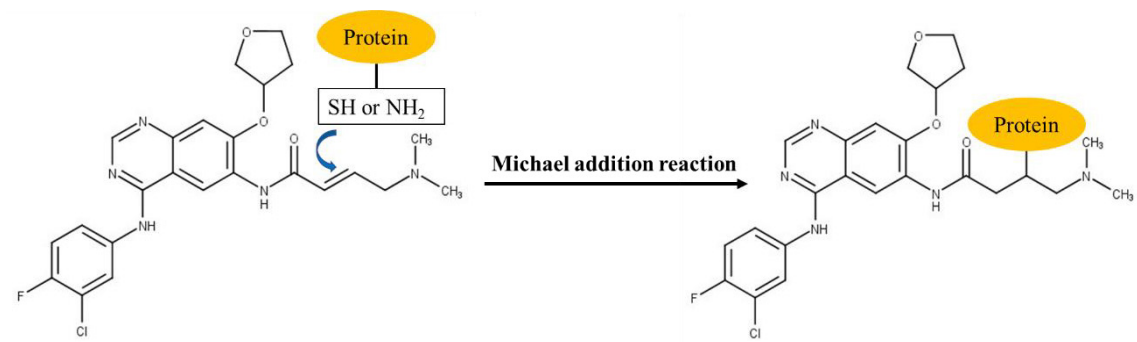


Fig. 3 Michael addition reaction between the α , β -unsaturated carbonyl group of Afatinib and the thiol or amino group of protein.

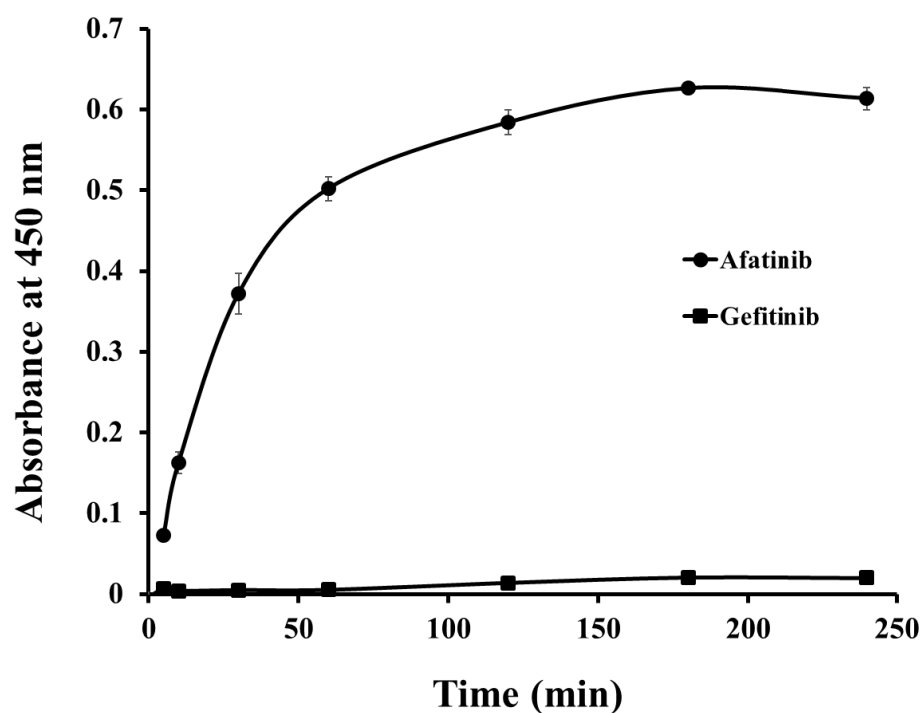


Fig. 4 Evaluation of the Michael addition reaction by ELISA.

BSA-coated wells were incubated with Afatinib (20 $\mu\text{g/mL}$) or Gefitinib (20 $\mu\text{g/mL}$) at 37°C for 5, 10, 30, 60, 120, 180, and 240 min. The wells were reacted with Anti-Afatinib serum (1:500), followed by Histofine Simple Stain (1:1000). ●, Afatinib; ■, Gefitinib. Each point represents the mean \pm standard deviation ($n = 3$).

4-1-2-3. Afatinib 投与ラットの腸管系における Afatinib-protein conjugate の局在

IHC は、Afatinib 経口投与後 24 時間の腸管系 (十二指腸, 空腸, 回腸, 結腸) の試料を用いて行った。Fig. 5 に示すように、腸管系では、強い陽性反応が回腸と結腸で観察されたが、十二指腸と空腸はほとんど染色されなかった。回腸では、絨毛上部の吸収上皮細胞の核と細胞質、粘膜固有層の線維芽細胞、筋層間のアウエルバッハ神経叢に強い染色が見られた。結腸では、頂端側の吸収上皮細胞の細胞質とアウエルバッハ神経叢に強い染色が見られた。また Fig. 6 に示すように 3 種の陰性対照は染色されず、Fig. 5 で示す陽性反応が特異的であることが確認された。

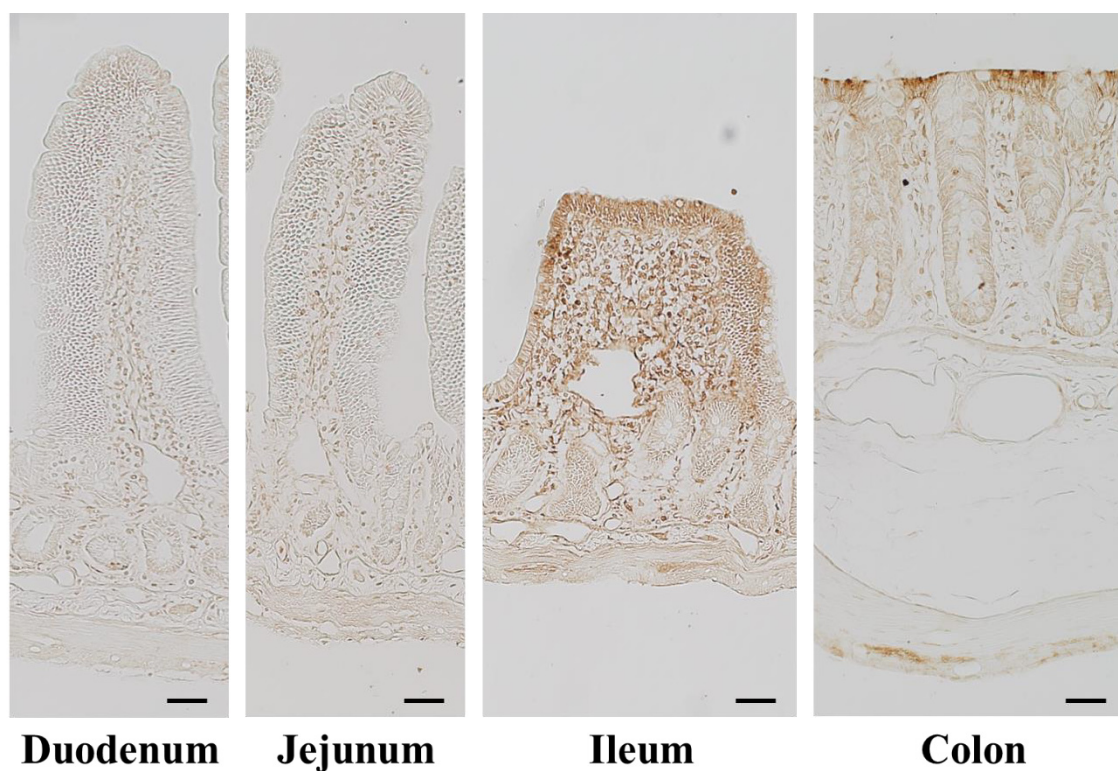


Fig. 5 Localization of Afatinib-protein conjugate in the rat intestinal tract.

Immunostaining was performed with rat intestinal sections (duodenum, jejunum, ileum, and colon) collected at 24 h after a single oral administration of Afatinib (10 mg/kg).

Bar = 50 μm.

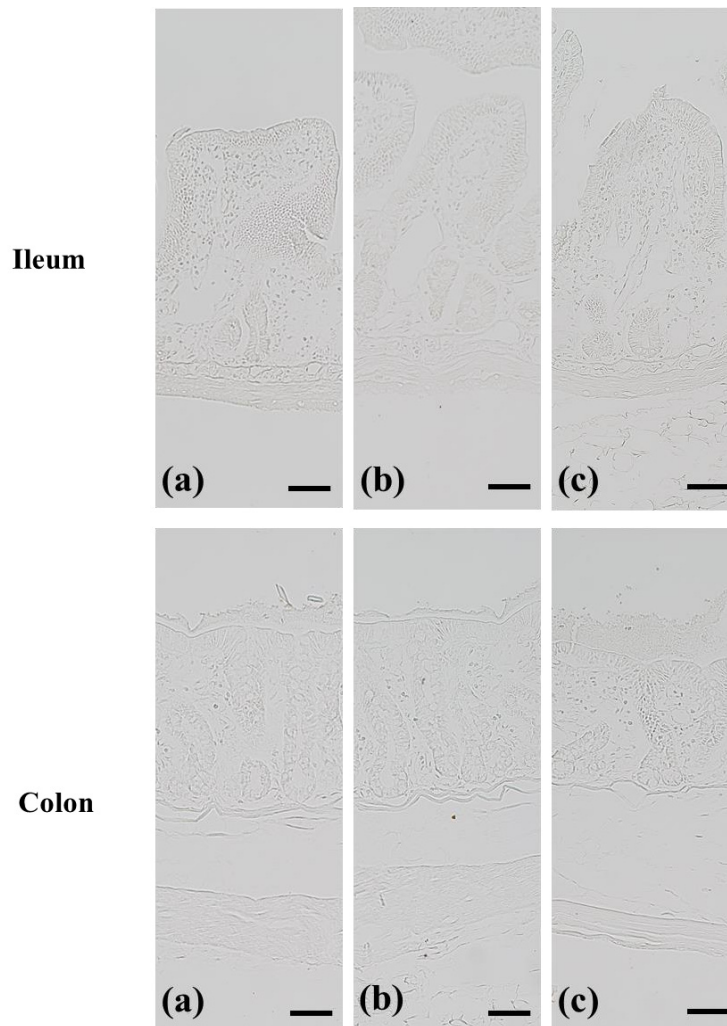


Fig. 6 Three types of negative control experiments in the ileum and colon.

Three different negative control experiments, *i.e.*, conventional control experiment, Gefitinib administration control experiment, and absorption control experiment, were performed in the ileum and colon. (a) In the conventional controls, the sections were exposed to normal mouse serum (1:1000) instead of primary Anti-Afatinib serum. (b) In the Gefitinib administration controls, sections from animals that were orally administered Gefitinib instead of Afatinib were subjected to immunostaining. (c) In the absorption controls, diluted primary anti-serum was preabsorbed with 1 $\mu\text{g/mL}$ Afatinib before reacting with the sections. Bar = 50 μm .

4-1-2-4. Afatinib 投与ラットの皮膚における Afatinib-protein conjugate の局在

IHC は、Afatinib 経口投与後 24 時間の皮膚の試料を用いて行った。Fig. 7 に示すように、皮膚に関しては表皮、皮脂腺、毛包及び横紋筋に強い陽性反応が確認され、真皮の線維芽細胞に中程度の陽性反応が見られた。また、Fig. 6 と同様の陰性対照実験を行ったところ、陽性反応は確認されず、反応が特異的であることが示された。

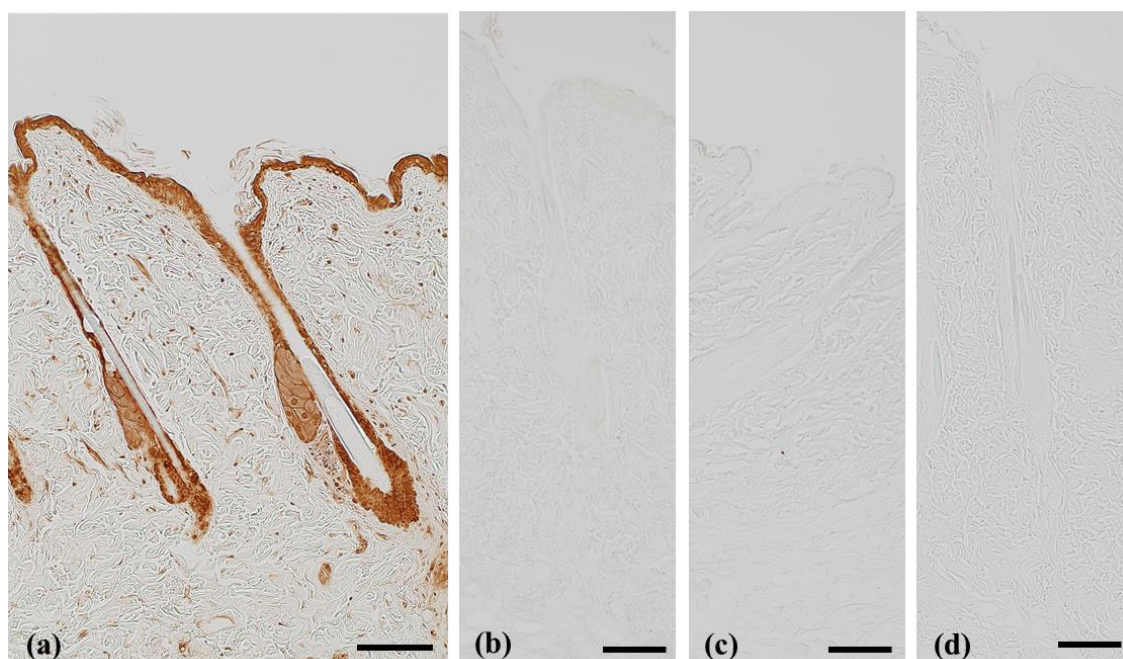


Fig. 7 Localization of Afatinib-protein conjugate in the rat skin.

(a) Immunostaining was performed with rat skin sections (corium and tela subcutanea) collected at 24 h after a single oral administration of Afatinib (10 mg/kg). Three types of negative control experiments in the skin. Three different negative control experiments, *i.e.*, conventional control experiment, Gefitinib administration control experiment, and absorption control experiment, were performed in the ileum and colon. (b) In the conventional controls, the sections were exposed to normal mouse serum (1:1000) instead of primary Anti-Afatinib serum. (c) In the Gefitinib administration controls, sections from animals that were orally administered Gefitinib instead of Afatinib were subjected to immunostaining. (d) In the absorption controls, diluted primary anti-serum was preabsorbed with 1 $\mu\text{g/mL}$ Afatinib before reacting with the sections. Bar = 50 μm .

4-1-3. 考察

Afatinib は第一級アミノ基を持たない薬物であるため組織内に固定することはできない。その為、IHC による Afatinib の組織局在を解析する事は通常不可能である。しかしながら、Afatinib は α , β -不飽和ケトン部分 (4-[dimethylamino]-2-buteneamido 部位) を有しているため、マイケル付加反応により ErbB ファミリー受容体や他のタンパク質と不可逆的に共有結合体を形成することが知られている [42, 49, 50]。その共有結合した Afatinib-protein conjugate は、タンパク質として組織に固定することが可能となる。抗 Afatinib 抗体を用いて Afatinib-protein conjugate の局在を解析可能な IHC を開発し、Afatinib の副作用として問題となっている下痢及び皮膚障害の解明のためラット腸管系と皮膚における IHC を試みた。

Fig. 1 に示すように Afatinib は他の EGFR 阻害薬である Gefitinib と非常によく似た構造をしているため、抗 Afatinib 抗体は Gefitinib と約 20%の交差反応性を示した (Fig. 2)。この結果は、本抗体が Gefitinib の分析研究に利用可能であることが示唆された。従って、Afatinib と非常に類似した構造を持つがマイケル付加反応を起こさない Gefitinib を対照薬として研究に用いた。

Afatinib とタンパク質間のマイケル付加反応を *in vitro* で評価を行った。Fig. 4 に示すように、Afatinib のマイケル付加反応は開始数分で始まり約 2 時間で完結した。対照薬の Gefitinib は α , β -不飽和ケトン部分を有さないためタンパク質と共有結合をしなかった。これらの結果は、抗 Afatinib 抗体が Afatinib-protein conjugate の局在を解析可能な IHC に応用可能であることを示しており、Afatinib は経口投与後に体内に取り込まれ、マイケル付加反応を介して生体内のタンパク質と共有結合体を迅速に形成することが示唆された。

Afatinib 誘発性下痢は投与開始後 7 日以内に起こるリスクが高いと報告されて

いる[44]。しかしながらこの下痢の詳細なメカニズムは未だ解決されていないのが現状である[51, 52]。Afatinib 誘発性下痢の機序を解明するため Afatinib 単回投与 24 時間後に採取したラット腸切片で Afatinib-protein conjugate を IHC により局在解析を行った。IHC の結果、Afatinib-protein conjugate の局在は腸管系では回腸と結腸に限られたものであった。Van Seville らの研究では、腸管系の中で回腸に最も ErbB ファミリーが発現していると報告されている[53]。我々の IHC の結果は腸管系における免疫染色の強度が腸管における ErbB ファミリーの発現に比例することが示唆された。したがって、これらの Afatinib-protein conjugate の染色はおそらく Afatinib-ErbB ファミリー受容体 conjugates の局在を示していると考えられる。Dacomitinib は Afatinib と非常に類似した化学構造を有する第 2 世代の非小胞性肺がんに対する不可逆的 TKI である[54]。Afatinib と Dacomitinib は、遺伝子変異した EGFR 分子の同一部位にマイケル付加反応を利用して共有結合することが報告されている[42, 55]。Van Seville らの報告によると、Dacomitinib はラットの MCP1 発現と胃腸透過性の増加を伴う重度の回腸損傷を誘発し、組織学的変化は回腸で最も顕著であると報告した[53]。これらの知見と本研究の回腸における IHC の結果は、Dacomitinib と同様に Afatinib が回腸に損傷を引き起こすことが強く示唆された。

また、EGFR-TKI で最もよく観察される有害事象は皮膚毒性である[46]。これらの皮膚毒性は TKI による皮膚の EGFR の阻害が原因で誘発されと考えられている。そこで Afatinib 誘発性皮膚毒性の機序を解明するため Afatinib 単回投与 24 時間後に採取したラット皮膚切片で IHC を行った。Fig. 7 に示すように、皮膚に関しては表皮、皮脂腺および毛包に強陽性反応、真皮中の線維芽細胞で中程度の陽性反応が観察された。また、本 IHC の特異性を検証するために 3 つの異なる陰性対照実験を実施したが、その全てが陰性であった。ラット皮膚における

EGFR は表皮，皮脂腺，毛包の基底膜を覆う上皮細胞に局在することが報告されている[56]。本 IHC で強く染色された部位は，EGFR 発現部位と概ね一致しており，Afatinib が皮膚の正常 EGFR を不可逆的に阻害することにより，Afatinib 誘発性皮膚毒性を引き起こすことが強く示唆された。

本 IHC の結果より，腸管及び皮膚における Afatinib-protein conjugate の局在は，各組織の EGFR 発現部位とほぼ一致していた。しかしながら，Afatinib は EGFR 以外の様々なタンパク質と不可逆的に共有結合する可能性が考えられる。その為，ウェスタンブロッティング法などを用い，Afatinib が共有結合している組織タンパク質を特定する更なる研究が必要である。

本研究は今回開発した IHC が，Afatinib-ErbB ファミリー受容体 conjugate の局在を検出するための有用なツールとなり得ることが示唆された。Afatinib-ErbB ファミリー受容体 conjugate の局在の観察は，Afatinib の作用と毒性に関する研究において重要なデータになることが期待される。本研究は，ラットの腸管系及び皮膚における Afatinib-protein conjugate の局在を解明した最初のものであり，Afatinib 誘発性下痢や皮膚毒性のメカニズムを解明するために大いに役立つと予測される。更に本 IHC は，Afatinib と同様にマイケル付加反応を用い共有結合を形成する Dacomitinib, Osimertinib, Ibrutinib など他の不可逆的な TKI にも応用可能である。

第2節 免疫組織化学法による Dacomitinib-protein conjugate の局在解析

4-2-1. 材料および方法

4-2-1-1. 試薬

Dacomitinib (TCI chemicals, Tokyo, Japan)

Afatinib (ChemScene LLC, NJ, USA)

Paraformaldehyde (PFA) (Nacali Tesque, Tokyo, Japan)

Histofine Simple Stain MAX-PO (M) (Nichirei Bioscience, Tokyo, Japan)

3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidine (TMB) (Sigma-aldrich, Ingelheim, Germany)

3, 3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) (Junsei Chemical, Tokyo, Japan)

4-2-1-2. Dacomitinib または Afatinib の ELISA

抗 Afatinib 抗体は以前 Sogawa らが作製したものを使用した[48]。ELISA の原理は、固相化された抗体に対して酵素標識体と薬物を競合的に反応させ、抗体に結合した酵素標識体の酵素活性を測定する方法である。すなわち、microtiter plate の well に、10 mM Tris buffer (pH 8.5)で希釈した抗 Afatinib 抗体 (2 μ g/mL) を 100 μ L 加えて 4°C で 1 晩放置することにより固相化した。次に 1% skim milk を 100 μ L 加えて、37°C で 30 分間 blocking を行った。Well に既知濃度の Dacomitinib または Afatinib 50 μ L と、0.1% BSA 含有 PBS で 500 倍希釈した Afatinib-HRP 50 μ L を加えて 37°C で 3 時間競合反応させた。洗浄後、結合した酵素標識体を定量するため、3% dimethyl sulfoxide (DMSO), 0.01% hydrogen peroxide を含む 0.05 M acetate citric acid buffer (pH 5.5) に溶解した 0.42 mM TMB を各 well に 100 μ L 添加し、37°C で 30 分間酵素反応させた。反応終了後、2 M sulfuric acid 100 μ L を加

えて反応を停止させた。ELISA analyzer (ImmunoMini NJ-2300, Nalge Nunc Int.Co. Ltd, Tokyo, Japan) を用いた分光分析により 450 nm の吸光度を測定した。

4-2-1-3. 組織試料

本研究では、組織試料に成雄 Wistar ラット (体重 200~250 g) (Kyudo Exp. Animals; Kumamoto, Japan) を用いた。ラットは、温度と光を調節した室内で飼育し、自由に食料と飲み水を摂取させた。各群 2 匹のラットに 10 mg/kg の Dacomitinib を単回経口投与し 24 時間及び 72 時間後にラットをペントバルビタール (60 mg/kg, b.w.) で麻酔し、50 mL/min の流速でヘパリンを 2 分間、次いで 4%PFA を 6 分間心臓から流し、灌流固定を行った。その後、腸管系 (十二指腸, 空腸, 回腸, 結腸) と皮膚を速やかに摘出し、同様の固定液を用いて 4°C で一晩後固定した。なお、実験プロトコルは崇城大学の動物実験倫理委員会によって承認された。

4-2-1-4. 免疫組織化学法 (IHC) の開発

Dacomitinib の IHC は、Afatinib の IHC と同様のプロトコルで行った。後固定した腸管系と皮膚は、脱水後常法に従ってパラフィンに包埋した。試料を厚さ 5 μ m の切片に薄切しスライドガラスに貼付した。続いて脱パラフィン後、1) 6% hydrogen peroxide で 30 分間 (内因性ペルオキシダーゼを不活化するため), 2) 2N hydrochloride で 30 分間 (DNA をほどくため) の前処理を行った。その後、10%正常ヤギ血清, 1.0% BSA, および 0.1%サポニンを含む TBS 溶液を用いて室温で 1 時間 blocking した。次いで 1000 倍希釈した Anti-Afatinib serum を 4°C で一晩反応させた。反応後、Simple Stain Rat MAX-PO (M) を用いて室温で 2 時間反応させ、TBS で洗浄後に 0.5 mg/mL diaminobenzidine および

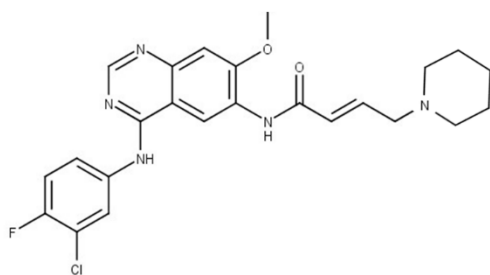
0.012% hydrogen peroxide を用いて反応部位を可視化した。

また、IHC の特異性を検証するため 2 種類の陰性対照実験を行った。(i) 一般的な対照実験：一次反応時に抗体溶液の代わりに 1000 倍希釈した normal mouse serum を切片に反応させた。(ii) 吸収実験：一次反応時の抗体溶液中に 1 $\mu\text{g/mL}$ の Dacomitinib を抗体溶液に加えた。

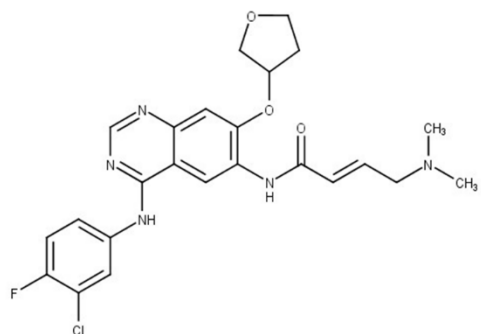
4-2-2. 結果

4-2-2-1. 抗 Afatinib 抗体の Dacomitinib に対する交差反応性

抗 Afatinib 抗体に対する Dacomitinib の交差反応試験を行った。交差反応は、酵素活性を 50%阻害するのに必要な Afatinib 濃度を比較する Dacomitinib のそれで除し，%として計算した。本抗体は Dacomitinib に対して 15%の交差反応性を示した。



Dacomitinib



Afatinib

Fig. 1 Chemical structure of Dacomitinib and Afatinib.

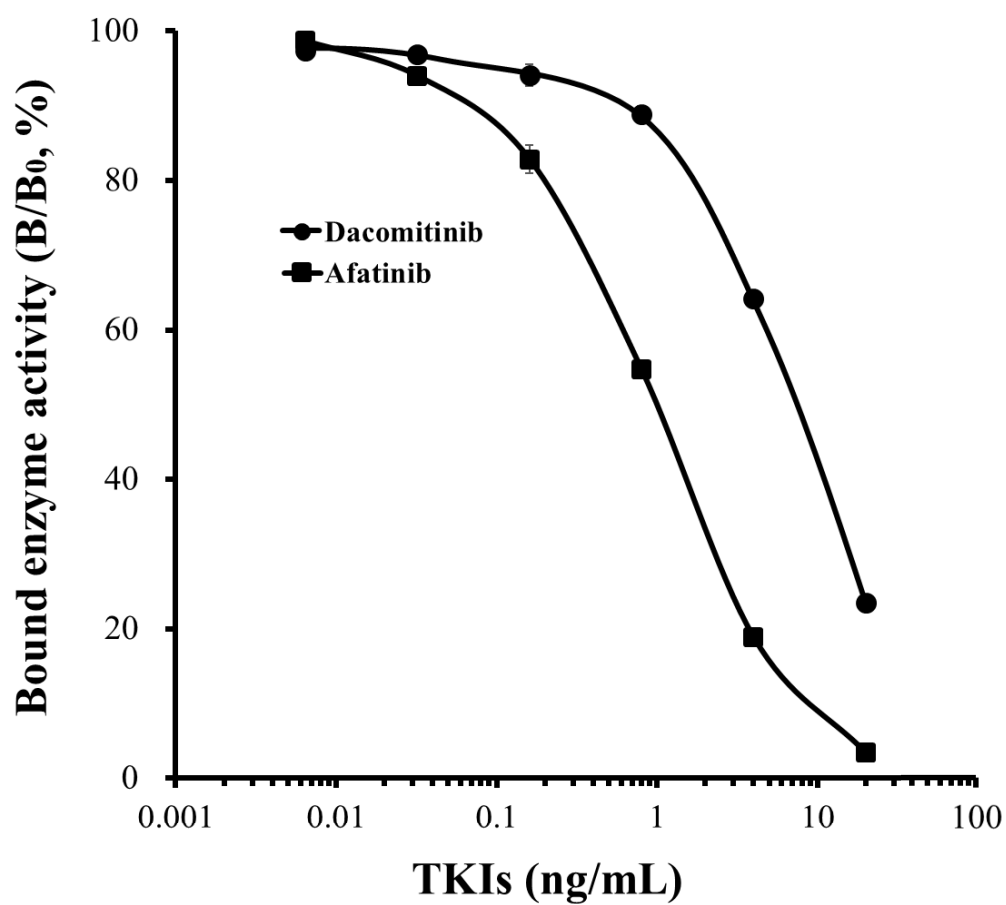


Fig. 2 Dose-response curves for TKIs with the Anti-Afatinib antibody.

Dose-response curves for TKIs with the Anti-Afatinib serum. The curves show the amount (%) of bound enzyme activity for various doses of TKIs (B) as a ratio of that bound using an enzyme-labeled drug alone (B_0). ●, Dacomitinib; ■, Afatinib. Each point represents the mean \pm standard deviation ($n = 3$).

4-2-2-2. Dacomitinib 投与ラットの腸管系における Dacomitinib-protein conjugate の局在及び蓄積性

IHC は、Dacomitinib 経口投与後 24 時間の腸管系 (十二指腸, 空腸, 回腸, 結腸) の試料を用いて IHC を行った。Fig. 3 に示すように、腸管系では、強い陽性反応が回腸と結腸で観察されたが、十二指腸と空腸はほとんど染色されなかった。回腸では、絨毛上部の吸収上皮細胞の核と細胞質、粘膜固有層の線維芽細胞、筋層間のアウエルバッハ神経叢に強い染色が見られた。結腸では、頂端側の吸収上皮細胞の細胞質とアウエルバッハ神経叢に強い染色が見られた。

更に Dacomitinib 経口投与後 72 時間の腸管系 (十二指腸, 空腸, 回腸, 結腸) の試料を用いて Dacomitinib の組織蓄積性を解析した。経口投与後 24 時間で回腸と結腸において観察された特異的な染色は投与後 72 時間経っても、全体的に僅かに染色強度が減弱した程度で同一部位に Dacomitinib の蓄積性が観察された。また Fig. 5 に示すように 2 種の陰性対照は染色されず、Fig. 3 で示す陽性反応が特異的であることが確認された。

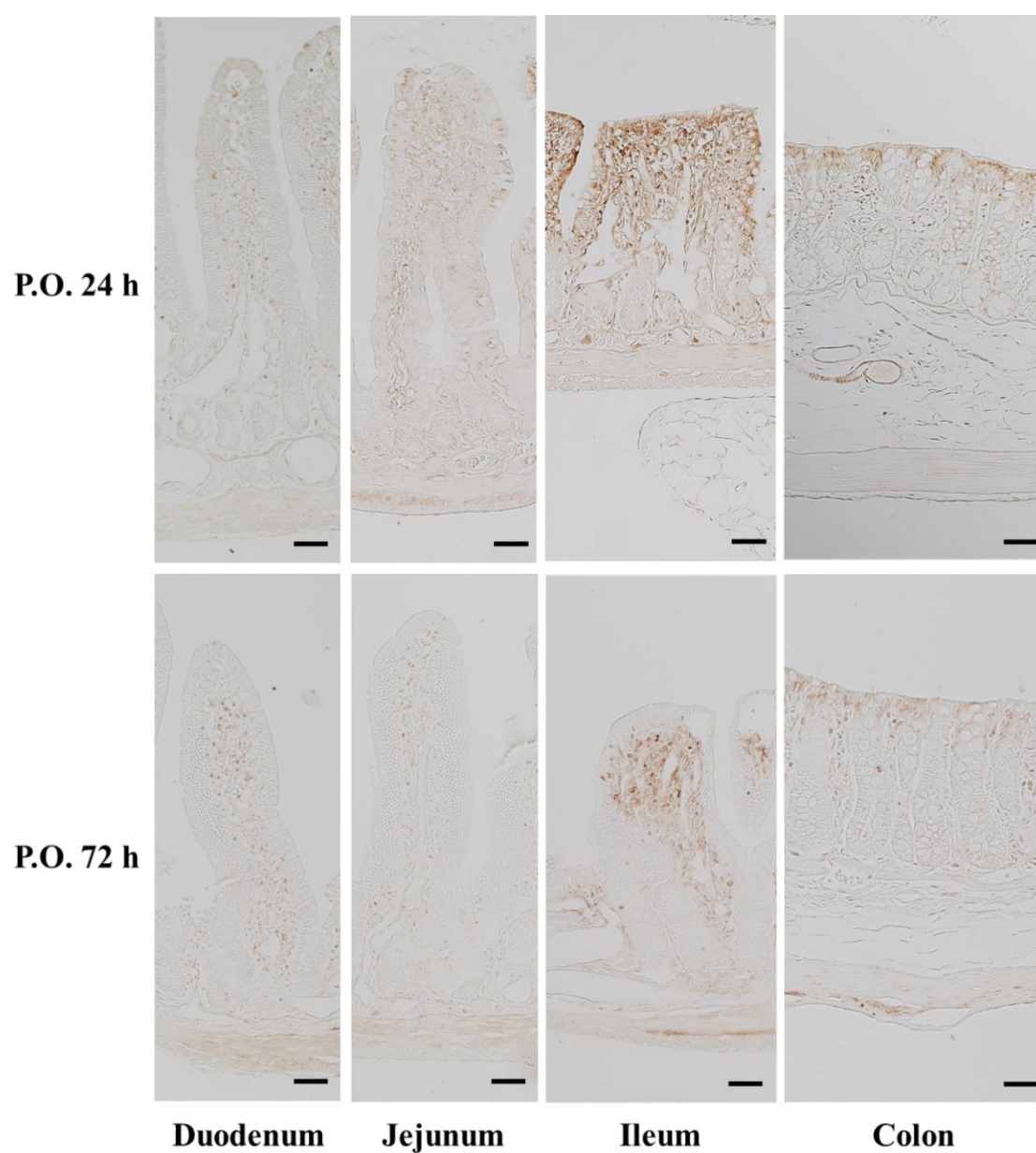
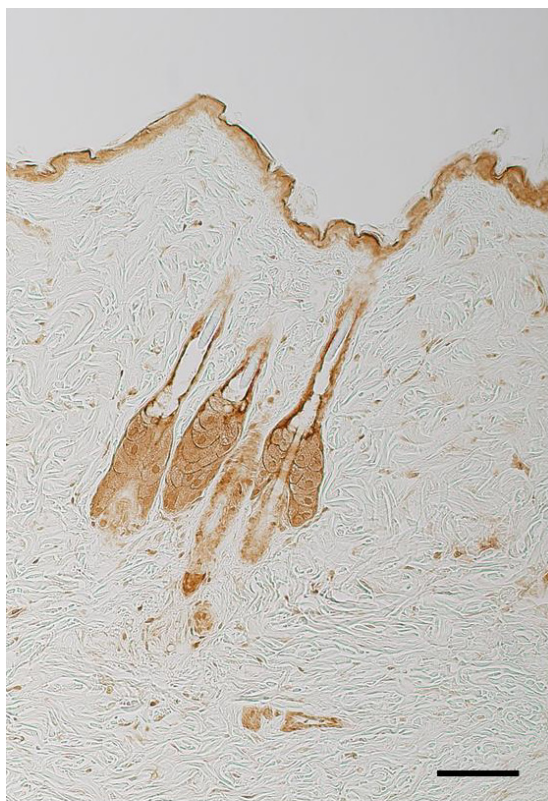


Fig. 3 Localization and accumulation of Dacomitinib in the rat intestines.

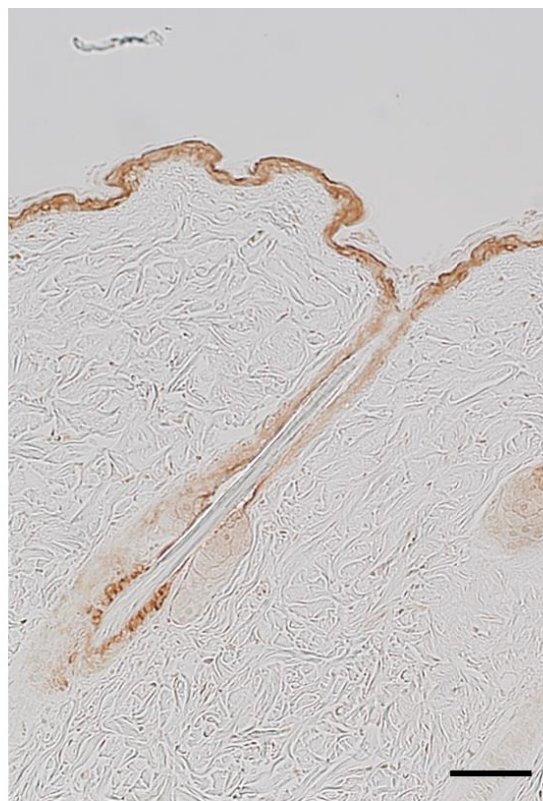
Immunostaining was performed with rat intestinal sections (duodenum, jejunum, ileum, and colon) collected at 24 or 72 h after a single oral administration of Dacomitinib (10 mg/kg). Bar = 50 μ m.

4-2-2-3. Dacomitinib 投与ラットの頭皮における Dacomitinib-protein conjugate の局在及び蓄積性

IHC は、Dacomitinib 経口投与後 24 時間の皮膚の試料を用いて行った。Fig. 4 に示すように、皮膚に関しては表皮、皮脂腺、毛包に強い陽性反応が確認され、真皮の線維芽細胞に中程度の陽性反応が見られた。さらに投与後 72 時間経っても毛包、脂腺、真皮の線維芽細胞、表皮に強い染色が残存していた。また Fig. 5 に示すように 2 種の陰性対照は染色されず、Fig. 4 で示す陽性反応が特異的であることが確認された。



P.O. 24 h



P.O. 72 h

Fig. 4 Localization and accumulation of Dacomitinib in rat skin. Immunostaining was performed with rat skin collected at 24 or 72 h after a single oral dose of Dacomitinib (10 mg/kg). Bar = 50 μ m.

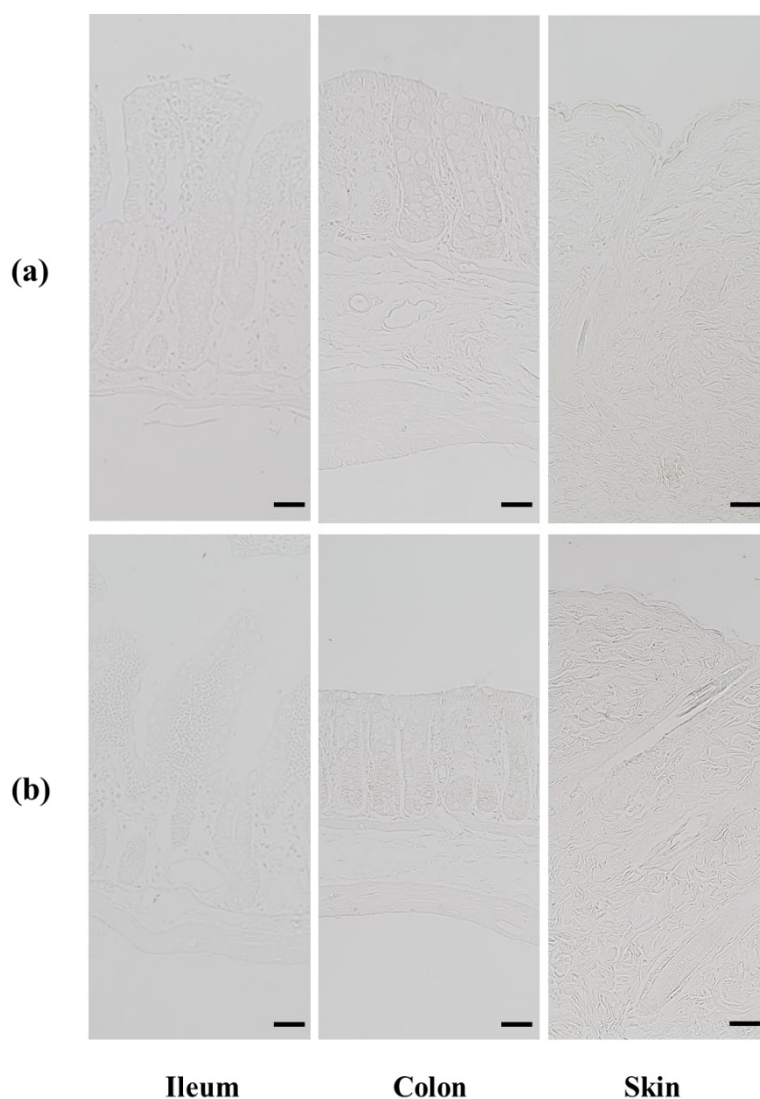


Fig. 5 Two types of negative control experiments in the ileum, colon and skin.

Two different negative control experiments (conventional control experiment and absorption control experiment) were performed in the ileum, colon, and skin 24 h after a single oral administration of Dacomitinib. (a) In the conventional controls, the sections were exposed to normal mouse serum (1:1000) instead of primary Anti-Afatinib serum. (b) In the absorption controls, diluted primary Anti-serum was preabsorbed with 10 µg/mL Dacomitinib before the reactions with the sections. Bar = 50 µm.

4-2-3. 考察

Dacomitinib は, Afatinib 同様に α , β -不飽和ケトン部分 (4-[dimethylamino]-2-buteneamido 部位) を有しているため, マイケル付加反応により EGFR ファミリー受容体や他のタンパク質と不可逆的に共有結合体を形成することが知られている[47]。そこで, Afatinib と同様に抗 Afatinib 抗体を用いて Dacomitinib-protein conjugate の局在を解析可能な IHC を開発し, Dacomitinib の副作用として問題となっている下痢及び皮膚障害の解明のためラット腸管系と皮膚における IHC を試みた。

Fig. 1 に示すように Dacomitinib と Afatinib の構造が非常に類似しているため, 我々は以前 Sogawa らが作製した抗 Afatinib 抗体を用いて, Dacomitinib-protein conjugate の局在を解析可能な IHC の開発を検討した。抗 Afatinib 抗体の特異性を ELISA により確認した結果, 本抗体は Dacomitinib に約 15%の交差反応性を示した (Fig. 2) 。この結果は, 抗 Afatinib 抗体が Dacomitinib の IHC に利用できることが示唆された。Dacomitinib は Afatinib 同様, 副作用として下痢や皮膚障害が問題となっているが, その詳細な機序は, 未だに解明されていない。そこで Dacomitinib 誘発性下痢の機序を解明するため Dacomitinib 単回投与 24 時間及び 72 時間後に採取したラット腸管切片で Dacomitinib-protein conjugate の局在解析を行った。IHC の結果, Dacomitinib-protein conjugate の局在は腸管系では回腸と結腸に限られたものであり, 十二指腸と空腸には殆ど局在していなかった。更に投与後 72 時間経っても染色強度はほとんど減少しておらず回腸と, 結腸に蓄積していることが明らかとなった。Van Sebille らの研究では, 腸管系の中で回腸に最も ErbB ファミリーが発現しており, Dacomitinib はラットの MCP1 発現と胃腸透過性の増加を伴う重度の回腸損傷を誘発し, 組織学的変化は回腸で最も顕著であると報告した[53]。これらの知見と本研究の回腸における IHC の結果は,

Dacomitinib が回腸に損傷を引き起こすことが強く示唆された。更に回腸と結腸の ErbB ファミリー受容体にマイケル付加反応を介して共有結合した Dacomitinib の蓄積が、副作用である下痢の長期化に影響していることが示唆された。

また、EGFR-TKI で最もよく観察される有害事象は皮膚毒性である[46]。これらの皮膚毒性は TKI による皮膚の EGFR の阻害が原因で誘発され则认为られている。そこで、Dacomitinib 誘発性皮膚毒性の機序を解明するため Dacomitinib 単回投与 24 時間、72 時間後に採取したラット皮膚切片で IHC を行った。Fig. 4 に示すように、皮膚に関しては投与 24 時間後において表皮、皮脂腺および毛包、真皮中の線維芽細胞で強陽性反応が観察された。また、投与 72 時間後においても表皮に強陽性反応、皮脂腺および毛包、真皮中の線維芽細胞で中程度の陽性反応が観察された。本 IHC の特異性を検証するために 2 つの異なる陰性対照実験を実施したが、どちらも陰性であった。ラット皮膚における EGFR は表皮、皮脂腺、毛包の基底膜を覆う上皮細胞に局在することが報告されている[56]。本 IHC で強く染色された部位は、EGFR 発現部位とほぼ一致しており、Dacomitinib が皮膚の正常 EGFR を不可逆的に阻害することにより、Dacomitinib 誘発性皮膚毒性を引き起こすことが強く示唆された。更に表皮や皮膚付属器の ErbB ファミリー受容体にマイケル付加反応を介して共有結合した Dacomitinib の蓄積が、副作用である皮膚毒性の長期化に影響していることが示唆された。

本 IHC の結果より、腸管及び皮膚における Dacomitinib-protein conjugates の局在は、各組織に局在する EGFR 発現部位とほぼ一致していた。しかしながら、Dacomitinib は EGFR 以外の様々なタンパク質と不可逆的に共有結合する可能性が考えられる。その為、ウェスタンブロッティング法などを用い、Dacomitinib が共有結合している組織タンパク質を特定する更なる研究が必要である。

本研究は今回開発した IHC が、Dacomitinib-ErbB ファミリー受容体 conjugate の局在を検出するための有用なツールとなり得ることが示唆された。Dacomitinib-ErbB ファミリー受容体 conjugate の局在の観察は、Dacomitinib の作用と毒性に関する研究において重要なデータになることが期待される。本研究は、ラットの腸管系及び皮膚における Dacomitinib-protein conjugate の局在を解明した最初のものであり、Dacomitinib 誘発性下痢や皮膚毒性のメカニズムを解明するために大いに役立つと期待される。

第5章 総 論

薬物の組織・細胞内局在及び蓄積性を解析する事は、薬物の適正使用や基礎研究において、極めて重要である。そこで本研究では、本研究では、未だ組織・細胞レベルでの薬物動態に関する詳細なデータが得られていない薬物を研究対象として、それらの組織・細胞内動態を免疫組織化学的方法により解析した。

第1章では、副作用として腎毒性が問題となっている2種類の抗MRSA薬に対する特異抗体の作製及び免疫組織化学法を用いてラット腎臓における薬物動態研究について述べた。第1節では、グリコペプチド系抗生物質のTeicoplaninについて報告した。今回作製した抗Teicoplanin抗体は、Inhibition ELISAとBinding ELISAにより、Teicoplaninに対し特異的であることが確認された。抗Teicoplanin抗体を用いてTeicoplanin(10 mg/kg) (臨床で1日に使用される量に相当) を単回静中投与したラットの腎臓での薬物の取り込み部位を解析できるIHCを開発した。Teicoplanin投与後1時間の腎臓において近位尿細管，遠位尿細管，集合管などが染色され，近位尿細管では微絨毛に強陽性反応が確認され，微絨毛の基部にも陽性反応が見られた。これは尿中のTeicoplaninを微絨毛より再吸収されているものと考えられる。染色強度は時間と共に減弱していき，投与24時間後に近位尿細管S3部位，遠位尿細管及び集合管に弱い染色のみが残存し，投与7日後には染色は確認されなかった。この結果は，投与8日後でも近位尿細管S1，S2部位，集合管で中程度の染色が残存していたVancomycinの結果とは大きく異なり，Teicoplaninは迅速に腎臓から排泄され，腎組織に長期間蓄積しないことを示している。更に両薬の組織蓄積性の違いは各薬物の尿細管による再吸収と分泌に関与するトランスポーターの種類と発現レベルの違いによる可能性が考えられる。

第2節では、環状リポペプチド系抗生物質の Daptomycin について報告した。今回作製した抗 Daptomycin 抗体は、Binding ELISA により、Daptomycin に対し特異的であることが確認された。抗 Daptomycin 抗体を用いて Daptomycin (12 mg/kg) (臨床で1日に使用される2倍量に相当) を単回静中投与したラットの腎臓での薬物の取り込み部位を解析できる IHC を開発した。Daptomycin 投与後1時間の腎臓において近位尿細管、遠位尿細管、集合管などが染色された。近位尿細管では微絨毛及び基部にリング状の強陽性反応が確認され Daptomycin が尿細管内腔側からエンドサイトーシス経路により上皮細胞内に取り込まれている過程だと考えられる。エンドサイトーシス経路により取り込まれた Daptomycin は投与後24時間においてリソソーム中に蓄積していた。投与後7日では、染色は確認されず、Daptomycin が長期間腎臓に蓄積しにくいことを確認した。しかしながら、Daptomycin は臨床では2週間程度毎日投与されるため、近位尿細管上皮細胞中のリソソームに高濃度蓄積する可能性が示唆された。

第3章では、2型糖尿病治療薬 Alogliptin に対する特異モノクローナル抗体を用いた免疫組織化学法によりラット腎臓及び肝臓における薬物動態解析を行った。腎臓では、投与の24時間後でも大量の薬物が近位尿細管 S3 部位に残存しており、薬物の蓄積が腎臓での悪影響に関係している可能性がある。肝臓では、薬物代謝酵素を高度に発現するゾーン III 肝細胞がより多くの薬物を吸収する。しかし、薬物は投与の24時間後に肝細胞からほとんど消失しました。これは、肝臓への悪影響が薬物の蓄積以外の理由によるものであることが示唆された。また、受動輸送に加えて、1つまたは複数の種類のトランスポーターがこれらの器官での薬物取り込みに関与していることが示唆された。

第4章では、がん細胞に多く出現している EGFR に共有結合を生じ、抗腫瘍

効果を示す 2 種類の分子標的治療剤に対する免疫組織化学法の開発と、これを用いたラット小腸及び皮膚における薬物動態解析を行った。今回研究対象とした Afatinib 及び Dacomitinib は第 2 世代の EGFR-TKI であり、構造中に第一級アミノ基を持たない薬物であるため組織内に固定することはできない。その為、IHC による Afatinib 及び Dacomitinib の組織局在を解析する事は通常不可能である。しかしながら、両薬は α , β -不飽和ケトン部分（4-[dimethylamino]-2-buteneamido 部位）を有しているため、マイケル付加反応により組織中の EGFR ファミリー受容体や他のタンパク質と不可逆的に共有結合体を形成することが報告されている[42, 43, 44]。その共有結合した Afatinib or Dacomitinib-protein conjugate は、タンパク質として組織に固定することが可能となる。抗 Afatinib 抗体を用いて Afatinib or Dacomitinib-protein conjugate の局在を解析可能な IHC を開発し、Afatinib 及び Dacomitinib の副作用として問題となっている下痢及び皮膚障害の解明のためラット腸管系と皮膚における IHC を試みた。

第 1 節では、Afatinib-protein conjugate の局在解析を報告した。まず Afatinib とタンパク質間のマイケル付加反応を *in vitro* で評価を行い、Afatinib のマイケル付加反応は開始数分で始まり約 2 時間で完結することを確認した。この結果は、抗 Afatinib 抗体が Afatinib-protein conjugate の局在を解析可能な IHC に応用可能であることと、Afatinib は経口投与後に体内に取り込まれ、マイケル付加反応を介して生体内のタンパク質と共有結合体を迅速に形成することが示唆された。Afatinib 単回投与 24 時間後に採取したラット腸切片で Afatinib-protein conjugate を IHC により局在解析を行った。IHC の結果、Afatinib-protein conjugate の局在は腸管系では回腸と結腸に限られたものであった。腸管系の中で回腸に最も ErbB ファミリーが発現しているとの報告があるため、我々の IHC での Afatinib-protein conjugate の染色はおそらく Afatinib-ErbB ファミリー受容体 conjugate の

局在化を示していると考えられた。更に Afatinib 誘発性皮膚毒性の機序を解明するため Afatinib 単回投与 24 時間後に採取したラット皮膚切片で IHC を行った。皮膚に関しては表皮、皮脂腺および毛包に強陽性反応、真皮中の線維芽細胞で中程度の陽性反応が観察された。ラット皮膚における EGFR は表皮、皮脂腺、毛包の基底膜を覆う上皮細胞に局在すると報告がある。

本 IHC で強く染色された部位は、EGFR 発現部位と概ね一致しており、Afatinib が皮膚の正常 EGFR を不可逆的に阻害することにより、Afatinib 誘発性皮膚毒性を引き起こすことが強く示唆された。

第 2 節では、Dacomitinib-protein conjugate の局在解析を報告した。Dacomitinib と Afatinib の構造が非常に類似しているため、抗 Afatinib 抗体を用いて、Dacomitinib-protein conjugate の局在を解析可能な IHC の開発を検討した。Dacomitinib は Afatinib 同様、副作用として下痢や皮膚障害が問題となっているが、その詳細な機序は、未だに解明されていない。そこで Dacomitinib 誘発性下痢の機序を解明するため Dacomitinib 単回投与 24 時間及び 72 時間後に採取したラット腸管切片で Dacomitinib-EGFR conjugate の局在解析を行った。IHC の結果、Dacomitinib-EGFR conjugate の局在は腸管系では回腸と結腸に限られたものであり、十二指腸と空腸には殆ど局在していなかった。更に投与後 72 時間経っても染色強度はほとんど減少しておらず回腸と、結腸に蓄積していることが明らかとなった。回腸と結腸の ErbB ファミリー受容体にマイケル付加反応を介して共有結合した Dacomitinib の蓄積が、副作用である下痢の長期化に影響していることが示唆された。更に Dacomitinib 誘発性皮膚毒性の機序を解明するため Dacomitinib 単回投与 24 時間及び 72 時間後に採取したラット皮膚切片で IHC を行った。皮膚に関しては投与 24 時間後において表皮、皮脂腺および毛包、真皮中の線維芽細胞で強陽性反応が観察された。また、投与 72 時間後においても表

皮に強陽性反応，皮脂腺および毛包，真皮中の線維芽細胞で中程度の陽性反応が観察された。

本 IHC で強く染色された部位は，EGFR 発現部位とほぼ一致しており，Dacomitinib が皮膚の正常 EGFR を不可逆的に阻害することにより，Dacomitinib 誘発性皮膚毒性を引き起こすことが強く示唆された。更に表皮や皮膚付属器の ErbB ファミリー受容体にマイケル付加反応を介して共有結合した Dacomitinib の蓄積が，副作用である皮膚毒性の長期化に影響していることが示唆された。

参考文献

- [1] 高島英伍, 薬学概論, 廣川書店
- [2] Wilson A P R, Gruneberg R N: Safety. In Teicoplanin: The first decade, The Medicine Group, Abingdon. 137-44, (1997)
- [3] 早川太朗, 岸本仁文, 瀧野敦子, 中山英夫, 門田孝子, 芝田信人, 他, MRSA 感染症治療におけるテイコプラニン投与設計の留意点。TDM 研究. 18, 328-36, (2001)
- [4] 高倉俊二, 竹末芳生, 大曲貴夫, 笠原敬, 関雅文, 高橋佳子, 時松一成, 松元一明, 三鴨廣繁, テイコプラニンにおける血中トラフ濃度 20 $\mu\text{g/mL}$ 以上の臨床的効果, 安全性. 501-505, (2012).
- [5] Fujiwara K, Yoshizaki Y, Shin M, Miyazaki T, Saita T, Nagata S, Immunohistochemistry for vancomycin using a monoclonal antibody that reveals accumulation of the drug in tat kidney and liver. Antimicrob. Agents Chemother. 56, 5883-5891, (2012).
- [6] "Celbenin"-resistant staphylococci. Br Med J, 14 (1), 113-114, (1961)
- [7] Ken K, Epidemiology and Control of Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA). 62, 313-319, (1994).
- [8] 厚労省 HP
- [9] Fujiwara K, Yoshizaki Y, Shin M, Miyazaki T, Saita T., Anti age. **56**, 5883-5891, (2012).
- [10] Fujiwara K, Yasuno M, Kitagawa T, Novel preparation method of immunogen for hydrophobic hapten, enzyme immunoassay for daunomycin and adriamycin. J. Immunol. Methods. 45, 195-203, (1981).
- [11] Yamamoto Y, Yamamoto Y, Saita T, Shin M., Immunohistochemistry for anti-

- diabetes drug, alogliptin using a newly prepared monoclonal antibody: Its precise localization in rat small intestine. *Acta Histochem. Cytochem.* 52, 27-34, (2019).
- [12]Fujiwara K, Shin M, Miyazaki T, Maruta Y., Immunocytochemistry for amoxicillin and its use for studying uptake of the drug in the intestine, liver, and kidney of rats. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 62-71, (2011).
- [13]Zanolo G., Bernareggi A., Cavenaghi L., Giachetti C., Tognolo C. Distribution and excretion of teicoplanin in rats after single and repeated intravenous administration. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 3, 85-93, (1991).
- [14]Shimada I, Iwata C, Taga S, Teramachi H, Nomura M, Miyamoto K, Tsuciya H, Wada T, Kimura K, Matsushita R. Enhanced renal clearance of vancomycin in rats with carcinogen-induced osteosarcoma. *Anticancer Res.*, 32, 823-830, (2012).
- [15]Menges R, Muth G, Wohlleben W, Stegmann E. The ABC transporter Tba of *Amycolatopsis balhimycina* is required for efficient export of the glycopeptide antibiotic balhimycin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 77, 125-134, (2007).
- [16]Sosio M, Bianchi A, Bossi E, Donadio S. Teicoplanin biosynthesis genes in *Actinoplanes teichomyceticus*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 78, 379-384, (2000).
- [17]Ueda Y, Nakamura N, Matsumoto F, Tadokoro H, Saito A, Yamagata M, Noda K, Shimada J, Omori M, Furuya H, Nakamura Y. Studies on gentamicin absorption, excretion, mechanism of renal excretion and nephrotoxicity. *Chemotherapy*, 15, 275-281 (1967)
- [18]Madsen KM, Tisher CC. Structural-functional relationship along the distal nephron. *Am. J. Physiol.*, 250, F1-F15, (1986).
- [19]Sanofi K.K. Targocid (teicoplanin), Interview Form (2012), SHIONOGI & CO., LTD. Vancomycin, Interview Form. (2019).

- [20]Fujiwara K., Shin M., Hougaard D.M., Saita T., *Histochem Cell Biol.*, **135**, 93-101. (2010).
- [21]Fujiwara K, Masuyama Y, Kitagawa T. Immunocytochemical localization of polyamines in the gastrointestinal tracts of rats and mice. *Histochem Cell Biol*, 106, 465–471, (1996).
- [22]Fujiwara K, Takatsu H, Tsukamoto K. Immunocytochemistry for drugs containing an aliphatic primary amino group in the molecule, anticancer antibiotic daunomycin as a model. *J Histochem Cytochem*, 53, 467–474, (2005).
- [23]Fujiwara K, Shin M, Hougaard DM, Larsson L-I Distribution of anticancer antibiotic daunomycin in the rat heart and kidney revealed by immunocytochemistry using monoclonal antibodies. *Histochem Cell Biol*, 127, 69–77, (2007).
- [24]Fujiwara K, Shin M, Matsunaga H, Saita T, Larsson L-I Light-microscopic immunocytochemistry for gentamicin and its use for studying uptake of the drug in kidney. *Antimicrob Agents Chemother*, 53, 3302–3307, (2009).
- [25]Interview form CUBICIN® IV 350 mg
<http://image.packageinsert.jp/pdf.php?mode=1&yjcode=6119402D1021>. (2019).
- [26]Beauchamp D., Gourde P., Simard M., Bergeron M.G. Subcellular distribution of daptomycin given alone or with tobramycin in renal proximal tubular cells. *Antimicrob Agents Chemother*, 38, 189-194, (1994).
- [27]Attach document CUBICIN® IV 350 mg. MSD., **5**, (2015).
- [28]Dabson P.D, Kell D.B. Carrier-mediated cellular uptake of pharmaceutical drugs: an exception or the rule? *Nat Rev Drug Discov.*, 3, 205-220. (2008).
- [29]WHO. Global Report on Diabetes, World Health Organization, Geneva. (2016).
- [30]Ministry of Health , Labour and Welfare Summary of Patient Survey.

<https://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/kanja/17/index.html>. (2017).

- [31] Saisho, Y. Alogliptin benzoate for management of type 2 diabetes. *Vasc. Health Risk Manag.*, 11, 229-243. (2015).
- [32] Takeda Pharmaceutical Co., Ltd. Nesina (alogliptin), Interview Form. (2019).
- [33] Greischel, A., Binder, R. and Baierl, J. The dipeptidyl peptidase-4 inhibitor linagliptin exhibits time- and dose-dependent localization in kidney, liver, and intestine after intravenous dosing: Results from high resolution autoradiography in rats. *Drug Metabo. Dispos.*, 38, 1443-1448. (2010).
- [34] Klein, T., Fujii, M., Sandel, J., Shibazaki, Y., Wakamatsu, K., Mark, M. and Yoneyama, H. Linagliptin alleviates hepatic steatosis and inflammation in a mouse model of non-alcoholic steatohepatitis. *Med. Mol. Morphol.*, 47, 137-149. (2014).
- [35] Nakamaru, Y., Akahoshi, F., Iiima, H., Hisanaga, N. and Kume, T. Tissue distribution of teneligliptin in rats and comparisons with data reported for other dipeptidyl peptidase-4 inhibitors. *Biopharm. Drug Dispos.*, 37, 142-155. (2016).
- [36] Shin, M., Larsson, L.-I., Hougaard, D. M. and Fujiwara, K. Daunomycin accumulation and induction of programmed cell death in rat hair follicles. *Cell Tissue Res.*, 337, 429-438. (2009).
- [37] Fujiwara K, Shin M, Miyazaki T, Maruta Y Immunocytochemistry for amoxicillin and its use for studying uptake of the drug in the intestine, liver, and kidney rats. *Antimicrob Agents Chemother*, 55, 62–71. (2011).
- [38] Finley J. C., Grossman, G. H., Dimeo, P. and Petrusz, P. Somatostatin- containing neurons in the rat brain: widespread distribution revealed by immunocytochemistry after pretreatment with pronase. *Am. J. Anat.* 153, 483-488. (1978).

- [39]Clancy, B. and Cauller, L. J. Reduction of background autofluorescence in brain sections following immersion in sodium borohydride. *J. Neurosci. Methods* , 83, 97-102. (1998).
- [40]Haraguchi, C. M. and Yokota, S. Immunofluorescence technique for 100-nm-thick semithin sections of Epon-embedded tissues. *Histochem. Cell Biol.*, 117, 81-85. (2002).
- [41]Madsen KM, Tisher CC. Structural-functional relationship along the distal nephron. *Am. J. Physiol.*, 250, F1-F15. (1986).
- [42]Solca, F., Dahl, G., Zoephel, A., Bader, G., Sanderson, M., Klein, C., Kraemer, O., Himmelsbach, F., Haaksma, E., Adolf, G.R. Target binding properties and cellular activity of afatinib (BIBW 2992), an irreversible ErbB family blocker. *J Pharmacol Exp Ther*, 2, 342-350. (2012).
- [43]Soria, J.C., Felip, E., Cobo, M., Lu, S., Syrigos, K., Lee, K.H., Göker, E., Georgoulas, V., Li, W., Isla, D., Guclu, S.Z., Morabito, A., Min, Y.J., Ardizzoni, A., Gadgeel, S.M., Wang, B., Chand, V.K., Goss, G.D. Afatinib versus erlotinib as second-line treatment of patients with advanced squamous cell carcinoma of the lung (LUX-Lung 8): an open-label randomised controlled phase 3 trial. *Lancet Oncol*, 8, 897-907. (2015).
- [44]Yang, J.C., Shih, J.Y., Su, W.C., Hsia, T.C., Tsai, C.M., Ou, S.H., Yu, C.J., Chang, G.C., Ho, C.L., Sequist, L.V., Dudek, A.Z., Shahidi, M., Cong, X.J., Lorence, R.M., Yang, P.C., Miller, V.A. Afatinib for patients with lung adenocarcinoma and epidermal growth factor receptor mutations (LUX-Lung 2): a phase 2 trial. *Lancet Oncol*, 5, 539-548, (2012).
- [45]FDA broadens afatinib indication to previously untreated, metastatic NSCLC with

other non-resistant EGFR mutations. <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-broadens-afatinib-indication-previously-untreated-metastatic-nslcl-other-non-resistant-egfr>, Last Accessed 03 May, (2018).

- [46] Hirsh, V. Managing treatment-related adverse events associated with EGFR tyrosine kinase inhibitors in advanced non-small-cell lung cancer. *Curr Oncol*, 18, 126–138. (2011).
- [47] Wang, J.I., Li-Chan, X.X., Atherton, J., Deng, L., Espina, R., Yu, L., Horwatt, P., Ross, S., Lockhead, S., Ahmad, S., Chandrasekaran, A., Oganessian, A., Scatina, J., Mutlib, A., Talaat, R. Characterization of HKI-272 covalent binding to human serum albumin *Drug Metab. Dispos*, 7, 1083-1093, (2010).
- [48] Sogawa, R., Saita, T., Yamamoto, Y., Kimura, S., Narisawa, Y., Kimura, S., Shin, M. Development of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for therapeutic drug monitoring of afatinib. *J Pharm Anal*, 1, 49-54, (2019).
- [49] Roskoski, R.Jr. Small molecule inhibitors targeting the EGFR/ErbB family of protein-tyrosine kinases in human cancers. *Pharmacol Res*, 139, 395-411, (2019).
- [50] Stopfer, P., Marzin, K., Narjes, H., Gansser, D., Shahidi, M., Uttreuther-Fischer, M., Ebner, T. Afatinib pharmacokinetics and metabolism after oral administration to healthy male volunteers. *Cancer Chemother Pharmacol*, 4, 1051-1061, (2012).
- [51] Harandi, A., Zaidi, A.S., Stocker, A.M., Laber D.A. Clinical efficacy and toxicity of anti-egfr therapy in common cancers. *J Oncol*, 567486, (2009).
- [52] Loriot, Y., Perlemuter, G., Malka, D., Penault-Llorca, F., Boige, V., Deutsch, E., Massard, C., Armand, J.P., Soria, J.C. Drug insight: gastrointestinal and hepatic adverse effects of molecular targeted agents in cancer therapy. *Nature Clin Pract*

Oncol, 5, 268-78, (2008).

- [53] Van, Seville. Y.Z.A., Gibson, R.J., Wardill, H.R., Secombe, K.R., Ball, I.A., Keefe, D.M.K., Finnie, J.W., Bowen, J.M. Dacomitinib-induced diarrhoea is associated with altered gastrointestinal permeability and disruption in ileal histology in rats. *Int J Cancer*, 12, 2820-2829, (2017).
- [54] Brzezniak, C., Carter, C.A., Giaccone, G. Dacomitinib, a new therapy for the treatment of non-small cell lung cancer, *Expert Opin. Pharmacother*, 14, 247-253., (2013).
- [55] Girard, N. Optimizing outcomes in EGFR mutation-positive NSCLC, which tyrosine kinase inhibitor and when? *Future Oncol* 14, 1117-1132, (2018).
- [56] Green, M. R., Basketter, D. A., Couchaman, J. R., Rees, D. A. Distribution and number of epidermal factor receptors in skin is related to epithelial cell growth. *Dev. Biol.* 100, 506-512, (1983).

謝 辞

本研究を行うに際し，終始ご懇切にご指導を賜りました進正志教授に心より感謝申し上げます。

本研究を遂行する過程で適切な実験指導，ご助言を賜りました齋田哲也教授に心より御礼申し上げます。

本論文を作成するにあたり，ご校閲ならびに有益なご助言をいただき，副査をご快諾くださいました安藤祥司教授に厚く御礼申し上げます。