

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：32643

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K14978

研究課題名（和文）ケトン食による薬物動態変動に対する分子生物学的影響と薬物速度論的影響の解明

研究課題名（英文）Elucidation of pharmacokinetics fluctuation factors by ketogenic diet

研究代表者

赤下 学（Akashita, Gaku）

帝京大学・薬学部・助教

研究者番号：90781542

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究はケトン食によるフェニトインの薬物動態変動要因の解明を明らかにすること目的とした。代謝阻害試験により、ケトン食に含まれる α -リノレン酸、リノール酸、オレイン酸がフェニトインの代謝を阻害することが明らかとなった。なかでも、 α -リノレン酸はフェニトインの代謝阻害作用が強く、ラットを用いた薬物速度論的検討で α -リノレン酸同時投与によりフェニトインの経口クリアランスが低下し、体内暴露量が増加した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

フェニトイン薬物療法において α -リノレン酸は注意すべき薬物-飲食物間相互作用となる可能性が示され、てんかん治療においてケトン食療法を併用する際は、ケトン食を構成する脂肪酸の割合や摂取量に注意を払う必要があることが提起された。

研究成果の概要（英文）：The ketogenic diet is hyper high-fat/low-carbohydrate diet that helps to control seizures in patients with refractory epilepsy. Phenytoin is used for epilepsy, and phenytoin elimination is a saturable process obeying Michaelis-Menten kinetics. High-fat diet and high-fat/high-cholesterol diet may affect the expression and activity of drug-metabolizing enzymes. In this study, we clarified the effects of the ketogenic diet on phenytoin pharmacokinetics. In enzyme inhibition study, α -linolenic acid and linoleic acid contained in the ketogenic diet inhibited the metabolism of phenytoin. In vivo pharmacokinetic study, simultaneous administration of phenytoin and α -linolenic acid decreased the oral clearance of phenytoin. These results suggest that polyunsaturated fatty acids contained in the ketogenic diet are factors of the phenytoin pharmacokinetics fluctuation.

研究分野：医療薬学

キーワード：フェニトイン 抗てんかん薬 ケトン食 多価不飽和脂肪酸

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

てんかんの有病率は全人口の1%程度と推定され¹⁾、神経疾患の中で最も頻度の高い疾患のひとつと言われている。てんかん患者の約30%は複数の抗てんかん薬を用いてもてんかん発作がコントロールできない難治性てんかん患者と報告され¹⁾、薬物療法と並行し食事療法の導入が検討される。

ケトン食は難治性てんかん患者に対し導入される食事療法であり、熱量源としてグルコースの代わりにケトン体を供給する低糖質・超高脂質食である。薬物と飲食物間で相互作用が起こることは広く知られており、薬物療法を行う上で薬物-飲食物間での薬物動態学的相互作用および薬力学的相互作用に注意が必要である。近年、高脂質食や高脂質・高コレステロール食の摂取により薬物代謝酵素の発現・活性が変動することが報告された。加えて、ドコサヘキサエン酸やエイコサペンタエン酸などの多価不飽和脂肪酸が CYP3A4 などの薬物代謝酵素の活性を競合的に阻害することが報告されている。これらのことから、通常食と栄養成分組成が明らかに異なるケトン食は薬物動態変動を引き起こす可能性が考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、ケトン食による、てんかん治療薬のなかで非線形薬物に分類されるフェニトイン薬物動態に対する影響を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ケトン食モデル動物を用いた薬物動態変動要因の検討

ケトン食モデル動物の作製にはケトン食群としてケトジェニックダイエット固形飼料 (D10070801, Research Diets, Inc., USA)、コントロール食群としてコントロール固形飼料 (D10070802, Research Diets, Inc., USA) を用いた。7週齢 Wistar 系ラットを標準固形飼料 (CRF-1, オリエンタル酵母工業株式会社, 日本) にて1週間の馴化期間後、無作為にコントロール食群もしくはケトン食群に振り分け自由摂食・自由摂水にて3週間飼育した。モデル作成後、安楽死させ肝臓を摘出し、遺伝子発現レベルおよび代謝活性試験を実施した。

(2) 多価不飽和脂肪酸による *in vitro* フェニトイン代謝阻害試験

ラット肝ミクロソーム終濃度 0.5 mg/mL、反応時間 10 分とし、フェニトインの主代謝物である 4'-HPPH を高速液体クロマトグラフタンデム質量分析器を用いて定量した。

(3) α -リノレン酸同時投与による *in vivo* フェニトイン薬物速度論的影響の解明

コントロールとして生理食塩水もしくは α -リノレン酸 400 mg/kg を経口投与した直後に超純水で懸濁したフェニトイン (アレピアチン散 10%) 20 mg/kg を経口投与した。頸静脈より採血し、得られた血漿を高速液体クロマトグラフで定量した。

4. 研究成果

(1) ケトン食モデル動物を用いた薬物動態変動要因の検討

飼育期間終了時のラット体重、肝臓および腎臓重量がコントロール食群と比較し、ケトン食群で有意に低下したが、体重あたりの肝臓重量は同等であった。(表1) 血漿中生化学パラメータは、ケトン食群がコントロール食群と比較しケトン体のアセト酢酸および 3-ヒドロキシ酪酸が有意に上昇し、総ケトン体としてケトン食群では $1633.3 \pm 482.0 \mu\text{mol/L}$ (mean \pm SD) となり (表2) ケトosisが惹起された。また、ケトン食群は、コントロール食群と同様に生化学パラメータから、肝機能異常、低血糖、高脂質血症や高コレステロール血症は認められなかった。

ケトン食群およびコントロール食群でフェニトインの主代謝酵素である CYP2C6 および CYP2C11 の肝臓中 mRNA 発現レベル

表1 ラットの体重および各組織重量

		Control diet	Ketogenic diet
Body Weight	(g)	286.3 \pm 12.6	246.0 \pm 9.2 *
Liver	(g)	10.6 \pm 1.02	7.70 \pm 0.49 *
Liver/Body Weight	(%)	3.72 \pm 0.36	3.42 \pm 0.09
Kidney	(g)	0.74 \pm 0.02	0.70 \pm 0.02 *
Epididymal fat	(g)	4.87 \pm 0.67	3.71 \pm 1.07

Values are expressed as means \pm SD (n = 3). * Significant differences from the control diet group at p < 0.05.

表2 生化学検査値

		Control diet	Ketogenic diet
Total protein	(g/dL)	5.4 \pm 0.2	4.8 \pm 0.3
Albumin	(g/dL)	4.0 \pm 0.2	3.6 \pm 0.3
Aspartate aminotransferase	(IU/L)	76.3 \pm 13.6	89.7 \pm 21.1
Alanine aminotransferase	(IU/L)	55.3 \pm 7.0	81.0 \pm 23.5
Total-Cholesterol	(mg/dL)	42.7 \pm 3.5	33.3 \pm 2.1
Triglyceride	(mg/dL)	93.3 \pm 55.0	53.3 \pm 11.9
Low density lipoprotein cholesterol	(mg/dL)	3.0 \pm 0.0	3.7 \pm 1.2
High density lipoprotein cholesterol	(mg/dL)	19.7 \pm 1.5	17.3 \pm 0.6
Glucose	(mg/dL)	175.7 \pm 24.8	168.3 \pm 16.4
Acetoacetic acid	($\mu\text{mol/L}$)	16.7 \pm 11.4	197.0 \pm 65.2 *
3-Hydroxybutyric acid	($\mu\text{mol/L}$)	96.0 \pm 12.1	1436.3 \pm 417.4 *

Values are expressed as means \pm SD (n = 3).

* Significant differences from the control diet group at p < 0.05.

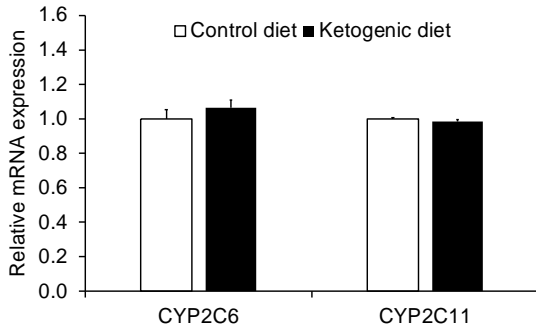


図1 ケトン食モデルラット肝臓における代謝酵素の発現変動

The mRNA was measured using real-time PCR, with expression normalized to the housekeeping gene mRNA (*β-actin*) and relative to the normalized ratio from the control rat. Values are expressed as means \pm SD (n = 3). White bar, control diet; Black bar, ketogenic diet.

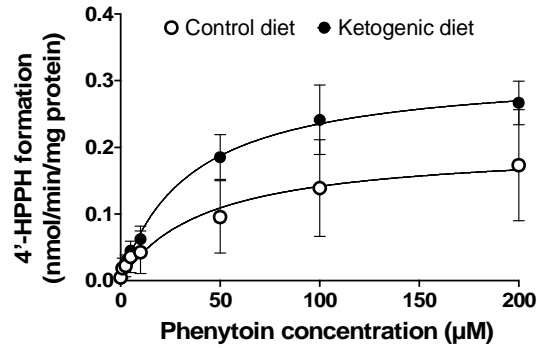


図2 ケトン食モデルラット肝ミクロソームの4'-HPPH生成速度

Values are expressed as means \pm SD (n = 3). Open circle, control diet; closed circle, ketogenic diet.

を測定したところ、有意な発現レベルの変化が認められず(図1)、ケトン食による薬物代謝酵素の発現変動の可能性は低いと考えられた。

コントロール食群とケトン食群で K_m が $52.8 \pm 42.4 \mu\text{M}$ 、 $35.1 \pm 5.75 \mu\text{M}$ (mean \pm SD)、 V_{max} が $0.2 \pm 0.08 \mu\text{M}$ 、 $0.32 \pm 0.05 \text{ nmol/min/mg protein}$ (mean \pm SD) であり(図2)、 K_m および V_{max} ともに両群間の有意な差は認められなかった。ラットのフェニトインから4'-HPPHへの V_{max} はおよそ0.2–0.4 nmol/min/mg proteinと報告されており²⁻⁴⁾、コントロール食およびケトン食の長期摂取によるフェニトインの代謝活性変動の可能性は低いと考えられた。遺伝子発現レベルおよび代謝活性試験の検討からケトン食により惹起されたケトーシスは、フェニトインの薬物動態に影響を与えないことが示唆された。

(2) 多価不飽和脂肪酸による *in vitro* フェニトイン代謝阻害試験

コントロールの K_m および V_{max} はそれぞれ 32.40 (95%信頼区間(CI) $29.21\text{--}35.58$) μM 、 0.22 (95%CI $0.21\text{--}0.24$) $\text{nmol/min/mg protein}$ であった(図3)。 α -リノレン酸とオレイン酸は濃度依存的にみかけの K_m が上昇し、みかけの V_{max} が低下した。リノール酸は $5,000 \mu\text{M}$ でみかけの K_m が上昇した。みかけの V_{max} は低下したが、濃度依存的な変化はみられなかった。ステアリン酸は溶媒に用いたジメチルスルホキシドの影響と考えられる V_{max} の低下がみられた。阻害定数は α -リノレン酸が 34.82 (95%CI $30.58\text{--}53.63$) μM 、リノール酸 $1,692$ (95%CI $1,312\text{--}2,590$) μM 、オレイン酸 $6,145$ (95%CI $4,310\text{--}9,490$) μM であり、ステアリン酸による4'-HPPHへの阻害は認められなかった。このことから、脂肪酸の不飽和度依存的なフェニトイン阻害定数の低下が示唆された。

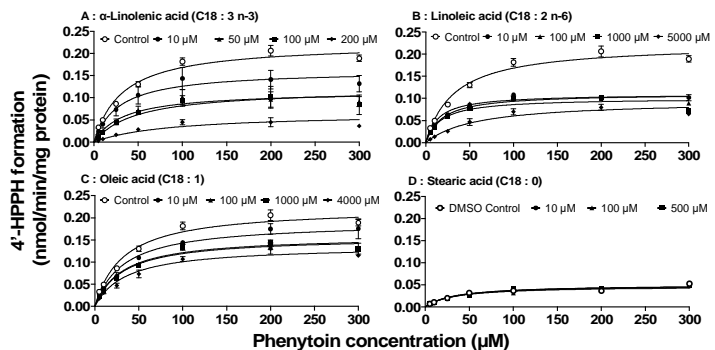


図3 ラット肝ミクロソームを用いた4'-HPPH生成に対する α -リノレン酸、リノール酸、オレイン酸およびステアリン酸の影響

Values are expressed as means \pm SD (n = 3–6). Panel A represents α -linolenic acid (C18 : 3 n-3). Open circle, control; closed circle, 10 μM ; closed triangle, 50 μM ; closed square, 100 μM ; closed rhombus, 200 μM . Panel B represents linoleic acid (C18 : 2 n-6). Open circle, control; closed circle, 10 μM ; closed triangle, 100 μM ; closed square, 1,000 μM ; closed rhombus, 5,000 μM . Panel C represents oleic acid (C18 : 1). Open circle, control; closed circle, 10 μM ; closed triangle, 100 μM ; closed square, 1,000 μM ; closed rhombus, 4,000 μM . Panel D represents stearic acid (C18 : 0). Open circle, Dimethyl sulfoxide (DMSO) control; closed circle, 10 μM ; closed triangle, 100 μM ; closed square, 500 μM .

(3) α -リノレン酸同時投与による *in vivo* フェニトイン薬物速度論的影響の解明

生理食塩水もしくは α -リノレン酸同時投与時のフェニトインの C_{max} がそれぞれ $0.76 \pm 0.23 \mu\text{g/mL}$ 、 $4.62 \pm 0.61 \mu\text{g/mL}$ (平均 \pm SD)、 $AUC_{0-\infty}$ が $4.20 \pm 1.02 \mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ 、 $41.0 \pm 4.47 \mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ 、 CL/F が $0.78 \pm 0.16 \text{ L/h}$ 、 $0.06 \pm 0.01 \text{ L/h}$ であり(図4)、 α -リノレン酸同時投与により C_{max} および AUC の有意な上昇、経口クリアランスの有意な低下が認められた。

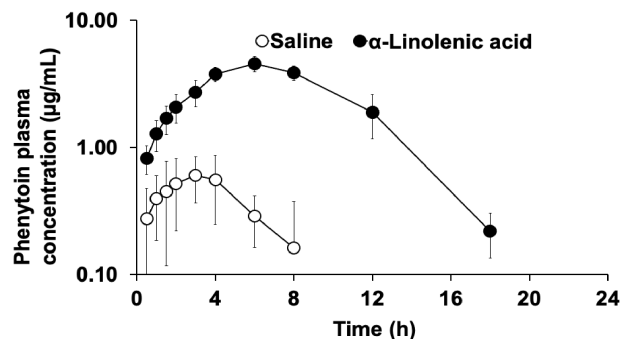


図4 フェニトイン (20 mg/kg) および生理食塩水 (400 mg/kg) または α -リノレン酸 (400 mg/kg) の経口投与後のフェニトイン血漿中濃度推移

Values are expressed as means \pm SD (n = 5–6). Open circle, Saline; closed circle, α -linolenic acid.

総括

本研究により、 α -リノレン酸、リノール酸、オレイン酸がフェニトインの代謝を阻害することが明らかとなった。なかでも、 α -リノレン酸はフェニトインの代謝阻害作用が強く、ラットを用いた *in vivo* での検討で α -リノレン酸とフェニトインを同時投与することにより、経口クリアランス

スが低下し、フェニトインの体内暴露量が増加した。フェニトイン薬物療法において α -リノレン酸は注意すべき薬物-飲食物間相互作用となる可能性が示され、てんかん治療においてケトン食療法を併用する際は、ケトン食を構成する脂肪酸の割合に注意を払う必要がある。

<引用文献>

- 1) Kwan P., Brodie M. J., *N Engl J Med.*, **342**, 314–319 (2000).
- 2) Blake D. A., Cohen F., Miyasaki B.C., *Drug Metab Dispos.*, **6**, 240–245 (1978).
- 3) Blake D. A., Collins J. M., Miyasaki B. C., Cohen F., *Drug Metab Dispos.*, **6**, 246–250 (1978).
- 4) Yamazaki H., Komatsu T., Takemoto K., Saeki M., Minami Y., Kawaguchi Y., Shimada N., Nakajima M., Yokoi T., *Drug Metab Dispos.*, **29**, 427–434 (2001).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 赤下 学、橋本美紀恵、宮川雄一、嶋田 努、崔 吉道
2. 発表標題 難治性てんかんに対しケトン食（低糖質・高脂質食）導入後、フェニトイン中毒を来した一例
3. 学会等名 第26回クリニカルファーマシーシンポジウム医療薬学フォーラム2018
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------