

平成 21 年 6 月 10 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19599023  
 研究課題名（和文） 抗インフルエンザ薬オセルタミビルの血液脳関門透過機構とその個人差の研究  
 研究課題名（英文） The mechanism and its inter-individual variability of the Blood-Brain Barrier penetration of anti-influenza drug, oseltamivir  
 研究代表者  
 森本 かおり (MORIMOTO KAORI)  
 高崎健康福祉大学・薬学部・講師  
 研究者番号：90401009

研究成果の概要：オセルタミビルの体内動態の変動要因として、血液脳関門でオセルタミビルの排出輸送に關与する P-糖タンパク質と、消化管吸収に關与するペプチドトランスポーター、PEPT1 を見出した。オセルタミビルの体内動態(脳内濃度)の個人差には、これらのトランスポーターの機能変化を伴う遺伝子多型、発現量の年齢差および併用する薬物や食物による相互作用等が關与する可能性が示唆された。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	0	2,100,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	390,000	3,790,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：応用薬理学

キーワード：トランスポーター、オセルタミビル、血液脳関門、P-糖タンパク質、消化管吸収、相互作用、PEPT1

## 1. 研究開始当初の背景

リン酸オセルタミビル(商品名：タミフル)は、ノイラミニダーゼ阻害剤である Ro64-0802 のエステル型プロドラッグであり、A 型および B 型インフルエンザウイルス感染症治療を目的に使用されている。この薬物の重大な副作用として、精神神経症状(意識障害、異常行動、せん妄、幻覚、妄想および痙攣等)が知られており、最近、若年患者においてこれらの症状が頻発したことから、10 代の患者への投与が原則的に禁止された。

一般的に中枢性副作用は薬物が血液脳関門を透過して中枢に移行することにより発

現する。タミフルのインタビューフォームには、安全性試験における未変化体の脳内暴露量は 7、14、24 日齢のラットでは 48 日齢のラットの 1540、650、2 倍であるが、活性本体である Ro 64-0802 の脳内濃度は血漿中濃度より低く、脳内未変化体濃度に応じた毒性が観察されたと記載されている。このことは、オセルタミビルそのものの中枢移行が毒性発現に關与しており、血液脳関門が未熟な幼若動物においてその傾向が顕著であることを示唆している。薬物の脳内濃度は、血液から脳実質細胞への受動拡散、脳組織への蓄積のみならず、血液脳関門を介した排出系の能

動輸送により規定されている。排出系輸送機能の一部は、脳毛細血管内皮細胞の管腔側に発現している P-糖タンパク質(P-gp)により維持されている。P-gp の機能を阻害剤などにより抑制または遺伝子をノックアウトすることにより、P-gp の基質薬物の脳内濃度は上昇することが知られている。本研究では、オセルタミビルとその活性本体である Ro 64-0802 が P-gp の基質であるかを先ず検討した。また、血液脳関門に発現しているその他の排出系および取り込み系トランスポーターが寄与する可能性についても検討を加えた。

また、研究の過程で、哺乳ラットにおける毒性は、絶食によって強く現れ、血漿中濃度の上昇を伴っていたことから、血中濃度の変動も中枢毒性の発現に寄与すると考え、その要因の一つとしてオセルタミビルの消化管吸収に關与するトランスポーターを同定し、食物成分との相互作用についても検討を加えた。

## 2. 研究の目的

オセルタミビルの中枢性副作用を惹起する毒性本体を特定し、その中枢移行を既定するメカニズムを明らかにすることにより、精神神経症状を伴う中枢性の副作用との関連性を明らかにする。中枢移行メカニズムの特定に際してはオセルタミビルおよび活性本体である Ro 64-0802 の脳移行に、各種トランスポーターが關与する可能性を精査する。

オセルタミビルおよび Ro 64-0802 の中枢移行と中枢性副作用に關連が認められた場合には、トランスポーターなどの中枢移行を既定するタンパクの遺伝子多型の情報を、頻度、機能への影響について明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) オセルタミビルおよび Ro 64-0802 の血液脳関門透過機構の解析

培養細胞による輸送実験 (P-gp の關与)

頂端膜上に P-gp を高発現している細胞 (LLC-PK1-GA5-COL150) および対照細胞 (LLC-PK1) を Transwell フィルター膜上に培養し、頂端膜側(A)から基底膜側(B)、および B から A の輸送を測定し、両者を比較することにより、P-gp の寄与を推定した。また非線形最少二乗法により輸送の速度論パラメータを算出した。

In vivo 脳移行性実験 (P-gp の關与)

オセルタミビルを水に溶解し、30, 100, 300mg/10mL/kg を mdr1a/1b (P-gp 遺伝子) ノックアウトマウスおよび対照である FVB マウスに経口投与した。投与 1 時間後に全血を採取し、3mL の生理食塩水で全身かん流後、全脳を採取した。血液は、直ちに遠心分離して血漿を得た。血漿中および脳内のオセルタミビルおよび Ro 64-0802 濃度を定量した。

血液脳関門における P-gp 発現量とオセルタミビルおよび Ro 64-0802 の脳移行性の週齡差

2, 3, 4, 8 週齡のラットに絶食下、オセルタミビルを 300mg/kg 経口投与し、投与 1 時間後の血漿および脳内未変化体および Ro 64-0802 濃度を測定した。また、同週齡のラットの脳膜画分における P-gp の発現量をウェスタンブロッティング法により定量した。

P-gp 以外の排出系トランスポーターの關与

MRP1 (Multidrug Resistance Protein 1), MRP4 (Multidrug Resistance protein 4) または BCRP (Brest Cancer Resistance Protein) 発現 Sf9 昆虫細胞膜画分を用い、これらの特異的基質であるエストラジオール-17β グルクロニドの輸送に及ぼす高濃度(1mM)のオセルタミビルまたは Ro 64-0802 共存の影響を検討した。

オセルタミビルの脳への取り込みトランスポーターの關与

ラット不死化脳毛細血管内皮細胞(RBEC1)へのオセルタミビルの取り込みの温度および濃度依存性を検討し、速度論パラメータを算出した。また、各種阻害剤の影響を検討し、取り込みに關与するトランスポーターを推定した。

### (2) オセルタミビルおよび Ro 64-0802 の消化管吸収機構の解析

ヒト結腸がん由来消化管上皮細胞 (Caco-2) を用いた経細胞輸送実験および取り込み実験

オセルタミビルが P-gp およびカルボキシルエステラーゼの基質であるため、ベラパミル (P-gp 阻害剤) および bis(4-nitrophenyl) phosphate (エステラーゼ阻害剤) 共存下での刷子縁膜側から基底膜側へのオセルタミビルの輸送と、各種トランスポーターの基質による阻害効果を検討した。取り込み実験においては、時間、温度、濃度依存性 (速度論パラメータ算出) および各種阻害剤の効果を検討した。

PEPT1/HeLa および Mock 細胞への取り込み実験

オセルタミビルが PEPT1 の基質であることを確認する目的で、PEPT1 発現 HeLa 細胞および対照(Mock)細胞への未変化体および Ro 64-0802 の取り込みの温度および濃度依存性を検討し、速度論パラメータを求めた。

In vivo 薬物動態実験

30mg/kg のオセルタミビルをラットに PEPT1 阻害剤存在、非存在下、経口投与し、未変化体血漿中濃度推移を検討した。また、ミルクに溶解して投与した場合、ミルク中の主要タンパク質であるカゼイン共存下に投与した場合についても検討し、高蛋白食との相互作用の可能性について検討を加えた。

さらに、1週齢のラットを用い、哺乳した場合と母獣と隔離して絶食した場合におけるオセルタミビル投与後の血漿中および脳内濃度を比較した。

#### 4. 研究成果

##### (1) オセルタミビルおよび Ro 64-0802 の血液脳関門透過機構の解析

オセルタミビルおよび Ro 64-0802 の脳移行性を既定する要因を明らかにする目的で、まず、P-gp の関与について、P-gp 高発現細胞を用いた検討を行った。

P-gp 高発現細胞における基底膜(B)から頂端膜(A)方向の輸送速度は、反対方向の輸送に比較して有意に高かったが、P-gp を発現していない細胞ではこのような方向性は観察されなかった。また、P-gp 高発現細胞における輸送の方向性はP-gp 阻害剤であるシクロスポリン共存により消失した。この結果から、オセルタミビルはP-gp の基質であり、膜透過性はこの排出トランスポーターの影響を受けることが示唆された。B-to-A方向の輸送は飽和性を示し、KmおよびVmaxは各々、1.3mM、0.203 nmoL/min/cm<sup>2</sup>であった。このKmは、ヒト臨床血中濃度(50 nM)よりはるかに高いことから、P-gpは臨床投与量では飽和しておらず、オセルタミビルの脳移行性にP-gpが影響を及ぼしている可能性が推察された。一方、活性代謝物であるRo 64-0802の輸送には方向性は認められなかったことから、Ro 64-0802はP-gpの基質とはならないことが示唆された。

次に、P-gpの責任遺伝子であるmdr1a/1bをノックアウトしたマウス(KO)における脳移行性を、対照であるFVBマウスと比較した。30mg/kgから300mg/kgを経口投与1時間後のオセルタミビルのK<sub>p,app</sub>(脳/血液濃度比)の両系統マウスにおける比、K<sub>p,app,ratio</sub>(KOにおけるK<sub>p,app</sub>/FVBにおけるK<sub>p,app</sub>)は、30, 100, 300mg/kgの各々で、4.7, 4.9, 9.6であり、P-gpノックアウトにより脳移行性が有意に上昇することが分かった。このことから、in vivoにおいてオセルタミビルの脳移行性制御にP-gpが大きな役割を果たしていることが明らかとなった。なお、両系統のマウスで投与量に応じたK<sub>p,app</sub>の上昇が観察されていることから、P-gp以外の輸送系が関与している可能性も推察された。

一方、Ro 64-0802のK<sub>p,app</sub>値は両系統において、ほぼ0.005 - 0.022を示し、脳組織中の血管スペース容積にほぼ等しいことから、脳実質への移行は極めて低いと考えられた。また、K<sub>p,app</sub>に両系統間で差は認められなかったことから、Ro 64-0802の脳移行にはP-gpは関与しないと考えられ、in vitro輸送実験で得られた結果と一致した。

さらにラットにおける脳移行性とP-gp発現量の週齢差を検討したところ、週齢が低いほど脳におけるオセルタミビルの移行量(K<sub>p,app</sub>)が高い傾向が認められ(図1)、P-gpの発現量(図2)と逆相関していた。この結果は、若年層における中枢神経症状の発症との関連において重要であろうと推察された。

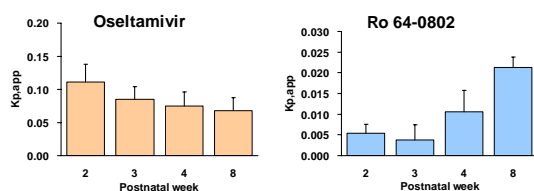


図1. 週齢の異なるラットにオセルタミビル 300mg/kg経口投与1時間後の脳内/血漿濃度比(K<sub>p,app</sub>)

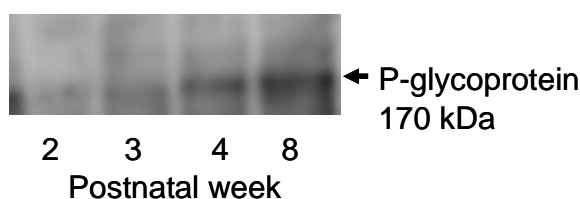


図2. 週齢の異なるラット脳粗膜画分におけるP-糖タンパク質(170kDa)のウェスタンブロッティング

Mdr1a/1b KO マウスでの脳移行性実験結果から、P-gp 以外の排出輸送系の関与が推察されたため、血液脳関門に発現している排出系トランスポーターであるMRP1, MRP4, BCRP発現ベシクルを用い、高濃度のオセルタミビルまたはRo 64-0802が、それぞれのトランスポーターの特異的基質の輸送を阻害するかどうかを検討した。その結果、オセルタミビルおよびRo 64-0802は、いずれの発現系においても阻害効果を示さなかったことから、これらのトランスポーターの基質にはないと推察された。

また、オセルタミビルの脳への取り込み方向に輸送系が関与する可能性について、不活化ラット脳毛細血管内皮細胞であるRBEC1細胞を用いて検討した。オセルタミビルのRBEC1細胞への取り込みは、温度依存性および飽和性を示し、KmおよびVmaxは各々、4.3 mM、82.2 pmol/sec/mgであった。各種阻害剤の影響を検討した結果、キニジンで有意に取り込みが阻害され、またテトラエチルアンモニウムでも低下傾向が認められたことから、これらの阻害剤と共通する何らかの輸送系がオセルタミビルの脳への取込方向の輸送に関与していることが示唆された。

以上より、血液脳関門におけるオセルタミビルの排出方向の輸送においては、P-gpが中心的な役割を果たしており、Ro 64-0802の排

出方向の輸送にはトランスポーターは関与しないことが推察された。P-gp の機能に影響を与える要因（遺伝子多型、年齢、病態、発現量の変化、薬物間相互作用等）がオセルタミビルの脳移行性に影響を及ぼし、中枢症状の発現に関与する可能性が推察された。

## (2) オセルタミビルおよび Ro 64-0802 の消化管吸収機構の解析

オセルタミビルの幼若ラットにおける脳移行性を検討した過程で、絶食により血中濃度と毒性が増大する傾向を見出した。そこで、食事由来成分の吸収に関与するトランスポーターがオセルタミビルの吸収にも関与しているのではないかと考えた。離乳前のラットは常に母乳を摂取しているので、消化管内には常に多量のジ、トリペプチドが存在していると考えられる。そこで、まず消化管に発現するペプチドトランスポーターである PEPT1 がオセルタミビルの吸収に関与する可能性について検討した。

Caco-2 細胞単層膜を用いた透過性実験において、オセルタミビルの刷子縁膜側(A)から基底膜側(B)への輸送は、PEPT1 の基質であるグリシルサルコシン(Gly-Sar)およびトリプトフィルグリシン(Trp-Gly)により有意に低下した。Caco-2 細胞への初期取り込み速度は温度依存性で飽和性を示し、Km および Vmax は各々、6.5 mM、45.6 nmol/min/mg protein であった。Gly-Sar および Trp-Gly は有意に濃度依存的にオセルタミビルの取り込みを抑制した。

そこで、PEPT1 安定発現 HeLa 細胞 (PEPT1/HeLa 細胞)へのオセルタミビルの取り込みを検討した。取り込みは、時間、温度依存性であり、Gly-Sar などの PEPT1 基質により阻害された。またオセルタミビルの取り込みは飽和性で、Km および Vmax は各々、8.6 mM、11.4 nmol/10min/mg protein であり、Km は Caco-2 細胞を用いた場合と同等であった。なお、Ro 64-0802 の PEPT1/HeLa 細胞への取り込みは、PEPT1 を発現していない mock 細胞への取り込みと差がなかったことから、Ro 64-0803 は PEPT1 の基質とはならないことが推察された。

PEPT1 の寄与と乳汁成分との相互作用を in vivo で検討する目的で、オセルタミビルを水またはミルク、ミルク相当量のカゼイン、ミルクペプチド相当量の Gly-Sar と共にラットに経口投与し、血中濃度推移を検討した。その結果、オセルタミビルの血中濃度は、ミルク、カゼイン、Gly-Sar 共存により劇的に低下することが分かった(図 3)。

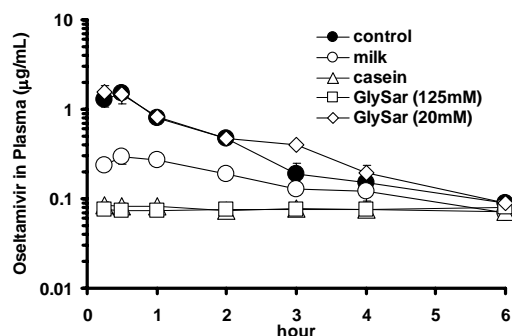


図 3 ラットにオセルタミビル 30 mg/kg 経口投与後の血中濃度推移に及ぼすミルク、カゼイン、グリシルサルコシンの影響

さらに、同母由来の幼若ラットを、一昼夜母獣から隔離した絶食群と、非絶食群に分け、オセルタミビルを 30mg/kg 経口投与 30 分後の血漿中および脳内濃度を比較した。絶食群における血漿中および脳内未変化体濃度は、13.4 – 15.3 µg/mL および 0.83 – 1.34 µg/g brain、非絶食群では、0.344 – 0.884 µg/mL および 0.0483 – 0.172 µg/g brain であり、脳内濃度は血漿中濃度に比例して増大しており、絶食群の血漿中および脳内濃度は、非絶食群の約 10 倍高い値を示した。

以上の結果から、オセルタミビルは PEPT1 の基質であり、オセルタミビルの消化管吸収において PEPT1 が大きな役割を果たしていることが示唆された。また、高濃度の食事由来ペプチドはオセルタミビルの消化管吸収を阻害することが明らかとなった。このことは、インフルエンザ罹患時、食欲減退などにより絶食状態となった乳児における血中および脳内濃度は、非絶食で行われている臨床試験から予想されるよりもはるかに高い可能性があることを示唆しており、絶食時の投薬に注意が必要であると考えられる。

## (3) まとめ

オセルタミビルの脳内濃度の変動要因として、血液脳関門で排出輸送に関与する P-gp と、消化管吸収に関与するペプチドトランスポーター、PEPT1 を見出すことができた。既にこれらのトランスポーターには機能変化を伴う遺伝子多型が報告されている。脳内濃度の個人間差を生じ得るその他の要因として、P-gp の場合は、血液脳関門における発現量の年齢差、PEPT1 の場合は、食事由来ペプチドによる吸収阻害に関与する可能性があることを示すことができた。これらはいずれも実験動物における結果であり、血液脳関門に関してはヒトで実証することが困難であるが、消化管吸収における PEPT1 上での相互作用に関しては、ヒトで検証する必要がある。

あると考えられた。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Ogihara T, Kano T, Wagatsuma T, Wada S, Yabuuchi H, Enomoto S, Morimoto K, Shirasaka Y, Kobayashi S, Tamai I. Oseltamivir (Tamiflu<sup>TM</sup>) is a substrate of PEPT1. *Drug Metab Dispos in press* 査読有

Morimoto K, Nakakariya M, Shirasaka Y, Kakinuma C, Fujita T, Tamai I, Ogihara T. Oseltamivir (Tamiflu) Efflux Transport at the Blood-Brain Barrier via P-glycoprotein. *Drug Metab Dispos* 36: 6-9 (2008) 査読有

〔学会発表〕(計 7 件)

我妻瑤恵ら . オセルタミビル の PEPT1 基質認識性と消化管吸収における食事由来ペプチドの影響 . 日本薬学会第 24 年回 . 平成 21 年 5 月 23 日 . (静岡)

小林彰子ら . 食事由来ペプチドがヒトペプチドトランスポーター PEPT1 に基質認識される薬物の消化管吸収に及ぼす影響 . 平成 21 年 5 月 21 日 . (長崎)

Ogihara T, et al. Oseltamivir (Tamiflu<sup>TM</sup>) is a substrate of PEPT1. 3rd Asia Pacific Regional ISSX Meeting. 平成 21 年 5 月 21 日 (Bangkok, Thailand)

荻原琢男ら . オセルタミビルはヒトペプチドトランスポーター PEPT1 の基質である . 日本薬学会第 129 年会 . 平成 21 年 3 月 26 日 (京都)

Morimoto K, et al. Controlled Brain Exposure of Oseltamivir by Drug Transporters. 2<sup>nd</sup> Asia Pacific Regional ISSX Meeting. 平成 20 年 5 月 13 日 (Shanghai, China)

Morimoto K, et al.. Oseltamivir (Tamiflu) Efflux Transport at the Blood-Brain Barrier via P-glycoprotein. 第 29 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム 平成 19 年 11 月 27 日 (仙台)

白坂義之ら . P 糖タンパク質による抗インフルエンザウイルス薬オセルタミビルの中枢移行性制御 . 第 1 回トランスポーター研究会東北支部会 . 平成 19 年 11 月 25 日 (仙台)

〔図書〕(計 2 件)

荻原琢男、森本かおり、玉井郁巳 . 創薬支援研究の展望 . 株式会社シーエムシー

出版 . 28-39 (2008)

荻原琢男、森本かおり . トランスポーター科学最前線 . 京都廣川書店 . 321-343 (2008)

〔その他〕

<http://www.takasaki-u.ac.jp/dept/yaku/labo/news/details.htm>

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

森本 かおり (MORIMOTO KAORI)

高崎健康福祉大学・薬学部・講師

研究者番号 : 90401009

(2)研究分担者

荻原 琢男 (OGIHARA TAKUO)

高崎健康福祉大学・薬学部・教授

研究者番号 : 80448886

(3)連携研究者

玉井 郁巳 (TAMAI IKUMI)

金沢大学・自然科学研究科・教授

研究者番号 : 20155237