

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 20 日現在

機関番号：32305
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22590505
 研究課題名（和文） ペプチドトランスポーター・PEPT1 を介した薬物-飲食物間相互作用の研究
 研究課題名（英文） Effect of Food on the Intestinal PEPT1-mediated Drug Absorption

 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（和文）：

PEPT1 の基質薬物であるオセルタミビルの消化管吸収は、ラットではミルクや大過剰量の非代謝性ペプチドで劇的に低下したが、ヒトにおけるミルクとの相互作用の程度はラットに比較すると小さくなく、PEPT1 を介した薬物-食品間相互作用は存在するものの、その程度に種差が存在することが明らかとなった。既知の PEPT1 基質薬物においてもラットで同様の相互作用が認められ、一般的な現象であると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

In the present study, we found that oseltamivir, an ester-type prodrug of neuraminidase inhibitor [3R,4R,5S]-4-acetamido-5-amino-3-(1-ethylpropoxy)-1-cyclohexene -1-carboxylic acid (Ro 64-0802), was effectively taken up by PEPT1 *in vitro* and that oseltamivir absorption in rats was greatly reduced by simultaneous administration of milk, casein, or glysylsarcosine. In addition, clinical studies in healthy volunteers showed that milk significantly reduced the maximum plasma concentrations (C_{max}) and the area under the plasma concentration-time curves from 0 to 2 hour (AUC_{0-2}) of both oseltamivir and Ro 64-0802. However, the extent of interaction was different between rats and humans, possibly because of species difference in the PEPT1 expression and its contribution. Same interactions for known PEPT1 substrates were also seen in rat *in vivo*. These might be a first finding that suggests clinical drug-food interaction via PEPT1.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・応用薬理学

キーワード：医薬品副作用・薬物相互作用

1. 研究開始当初の背景

食品成分は薬物の体内動態に大きな影響を及ぼし、薬効低下や副作用発現の原因となることがある。消化管上皮細胞に発現している PEPT1 は、栄養成分としてのジおよびトリペプチドのみならず、化学構造がジペプチドに類似した薬物の消化管吸収に役割を果たしている。PEPT1 の基質薬物であるセファレキシン、セフィキシム等の β -ラクタム系抗生物質、

抗ウイルス薬バラシクロビル、小児白血病薬ベスタチン等は、成人はもとよりは乳児や小児の薬物療法にも用いられる。一方、消化管内で生じる高タンパク食由来のペプチドやペプチド系サプリメント等も PEPT1 を介して吸収されることから、PEPT1 基質薬物を同時に服用した場合、PEPT1 を介した相互作用により薬物吸収が阻害される可能性がある。中でもミルクは摂取後速やかに小腸上部でペプ

チドあるいはアミノ酸にまで分解されて小腸上部より吸収される。乳児における主栄養源は母乳である。また小児への投薬時に苦味マスキングを目的にミルクを用いることがある。成人においても、消化管保護を目的にミルクで薬物を服用する場合がある。このことは、乳児では病態時に食欲不振となった場合の PEPT1 基質薬物の血中濃度が、非絶食で投与されるよりも高くなり、副作用が発現しやすい可能性を示唆している。あるいは逆に、PEPT1 基質薬物とミルクを併用すると期待していた薬効が発現しない可能性がある。

我々は、抗インフルエンザ薬オセルタミビル (タミフル[®]: 中外製薬) による中枢性副作用について研究する過程で、離乳前ラットでは絶食により毒性発現頻度が上昇する傾向を認め、消化管吸収機構を検討した結果、オセルタミビルが PEPT1 の良好な基質であることを発見した。この結果は、上述のような PEPT1 を介した薬物-食物間相互作用を推察させるものであった。

そこで本研究では、PEPT1 の基質薬物とミルクとの吸収過程における相互作用を一般化し、*in vitro* 試験から相互作用の有無と程度を予測できる系を提案することにより、特に乳児ならびに小児への有効で安全な投薬に資することを目的として検討を行った。

2. 研究の目的

本研究では、PEPT1 の基質薬物を幅広く探索するとともに、高タンパク食やミルク由来のペプチドと PEPT1 の基質薬物との相互作用を、ヒト結腸がん由来上皮細胞(Caco-2 細胞)を用いた *in vitro* 試験系およびラットを用いた *in vivo* 試験系を用いて複数の薬物について明らかにし、一般化する。さらにヒトにおける相互作用を *in vitro* 試験系で簡便に予測する系を構築し、医薬品の薬効や安全性確保に資することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 細胞を用いた *in vitro* 取込実験

ヒト結腸がん由来細胞株 Caco-2 細胞あるいはヒト PEPT1 安定発現 HeLa 細胞 (PEPT1/HeLa) およびその対照細胞 (Mock/HeLa) を 12 well plate に 1×10^5 cells/well の密度で播種後、10% 牛胎児血清含有 DMEM 中で confluent に到達するまで、37°C、95% O₂/5% CO₂ の条件下で培養したものを取込実験に用いた。

取込実験は、well 内の温度が 37°C に維持できるように設定したプレート上で行なった。細胞を 37°C の HBSS-MES (pH6.0) 1 mL で 2 回洗浄後、薬液を添加して取込を開始し、一定時間インキュベート後、氷冷した HBSS-MES (pH6.0) 1 mL で 3 回洗浄して反応を停止した。阻害実験は、薬液に阻害剤を添

加することにより行った。定量には、LC-MS/MS を用いた。

(2) ラットにおける *in vivo* 相互作用

17 時間絶食した Wistar 系雄性ラット (7 週齢) にオセルタミビル等の基質薬物を、30mg/10mL/kg の用量で経口投与後の血漿中濃度を経時的に測定した。*In vivo* における PEPT1 の関与を証明する目的で、125mM のグリシルサルコシン(Gly-Sar)、30mg/kg のカゼインを含む投与液、あるいはミルクに溶解した投与液を投与した場合の血漿中濃度推移についても検討を行った。血漿は適切な抽出操作後、溶媒を蒸発乾固し、LC 溶媒に再構築後ろ過して LC-MS/MS にて定量した。

(3) オセルタミビルとミルクの相互作用に関する臨床試験

健常日本人男性を対象としたクロスオーバー臨床試験を実施した。被験者は、オセルタミビル 75 mg カプセル (中外製薬株) を 400 mL の水またはミルクにより服用した。両投薬は 7 日間の休薬期間を設けて任意に行った。投与後、経時的に血液および尿を採取した。試料中のオセルタミビルおよび活性代謝物である Ro64-0802 の濃度を LC-MS/MS により測定した。

4. 研究成果

(1) オセルタミビルの消化管吸収機構

ヒト結腸がん由来細胞株 Caco-2 細胞単層膜を用いて、オセルタミビルの透過性を検討した。その際、オセルタミビルは P-糖タンパク質およびカルボキシルエステラーゼの基質であることから、各々の阻害剤としてベラパミルおよび bis(4-nitrophenyl)phosphate (BNPP) を共存させた時の影響を検討した。ベラパミルおよび BNPP は各々単独で共存させた場合にはオセルタミビルの透過係数に影響を及ぼさなかったが、同時に共存させると透過係数は約 2 倍に上昇した。従って以降の実験を BNPP 前処理およびベラパミル共存下で行った。オセルタミビルの Caco-2 単層膜透過係数は、ジペプチドである Trp-Gly、非代謝性ジペプチドであるグリシルサルコシン (Gly-Sar) 10mM の共存により有意に低下し、温度依存性が認められた。

次に Caco-2 細胞へのオセルタミビルの取り込みの時間および濃度依存性、PEPT1 基質による阻害および温度依存性を検討した。オセルタミビルの取り込みはインキュベーション 1 分まで直線的に上昇した。1 分間の取り込み速度は飽和性であり、Km, Vmax, Kd は各々、 6.54 ± 2.03 mM, 45.6 ± 12.0 nmol/min/mg protein および 0.470 ± 0.517 nmol/min/mg protein であった。その取り込みは 4°C でのインキュベーション、Gly-Sar,

Trp-Gly の共存によって有意に低下した。

オセルタミビルの取り込みがジペプチド共存により阻害されたことから、PEPT1 の関与を推定し、PEPT1 安定発現 HeLa 細胞 (HeLa/PEPT1) を用いた取り込み実験を行った。オセルタミビルの HeLa/PEPT1 細胞への取り込みは、HeLa/Mock 細胞に比較して大きく、温度、時間および濃度依存性が認められ、Km, Vmax は各々、 8.59 ± 1.98 mM, 11.4 ± 1.68 nmol/min/mg protein であった。これらは Caco-2 細胞への取り込みの速度論量とほぼ一致するものであった。また 20 mM の Gly-Sar および Trp-Gly による阻害が認められた。以上の結果より、オセルタミビルが PEPT1 の基質であることが示唆された。

(2) オセルタミビルの PEPT1 を介した消化管吸収に及ぼすミルクの影響

オセルタミビルの *in vivo* における消化管吸収への PEPT1 の関与と、食品由来ジペプチド同時投与の影響をラットを用いて検討した (Fig.1)。20 mM Gly-Sar 同時投与では、水に溶解して投与した場合に比較してオセルタミビル経口投与後の血中濃度は変化しなかったが、125 mM の Glr-Sar との同時投与により AUC が対照群の 18% にまで低下した。また、オセルタミビルをミルク 10 mL/kg に溶解して投与することにより C_{max}, AUC は各々対照群の 19% および 37% に低下した。さらに、ミルクの主要タンパク質であるカゼイン 30 mg/kg (ミルク 10mL/kg に相当) の同時投与でも、オセルタミビルの AUC は対照群の 18% にまで低下した。ミルク 10mL/kg 中のカゼインが完全に分解したことを仮定すると消化管内ペプチド濃度は 1.25 mmol/10mL/kg (125 mM) と算出される。125 mM Gly-Sar とカゼインによる消化管吸収抑制率は近似していた。以上より、オセルタミビルの消化管吸収に PEPT1 が役割を果たしており、食品由来タンパク質あるいはペプチドが、オセルタミビルの PEPT1 を介した消化管吸収に影響を及ぼすことが示唆された。

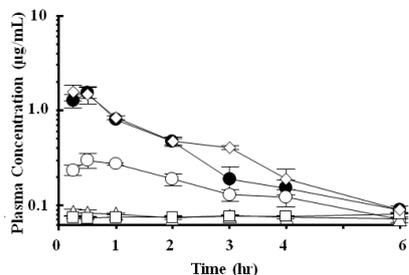


Fig.1 オセルタミビルをラットに経口投与後の血中濃度推移におけるペプチドの抑制効果
オセルタミビルは水 (●), ミルク (○), 20 mM Gly-Sar 溶液 (◇), 125 mM Gly-Sar 溶液 (□), or 300 mg/10 mL カゼイン溶液 (△) ②溶解して 30 mg/10mL/kg の用量で投与した。

(3) オセルタミビルとミルクの相互作用に関する臨床試験

オセルタミビルのヒトにおける消化管吸収への PEPT1 の関与と PEPT1 を介した薬物-ミルク間相互作用の大きさを明らかにするため、健康人に 75 mg のタミフル®カプセルを 400 mL の水またはミルクと共に経口投与後の体内動態を検討した (Fig.2)。ミルクとの投与により、オセルタミビルおよび活性代謝物である Ro 64-0802 の C_{max} および投与後 2 時間までの AUC₀₋₂ は有意に低下した (オセルタミビル; 68.9% および 34.5%, Ro64-0802; 69.5% および 14.2%, 対対照群比)。しかしながら、消失半減期および投与後無限大時間までの AUC_{0-∞} には両群間で差が認められなかった。オセルタミビルと Ro 64-0802 を合わせた尿中排泄率より、ミルクでの投与により消化管吸収率が 22.5% 低下したと推定されたが、ヒトでのオセルタミビル-ミルク間相互作用の程度は、ラットに比較して限定的であった。In vitro においてオセルタミビルが PEPT1 の良好な基質であったことや、ラット *in vivo* 実験において高濃度ジペプチドで吸収阻害が認められたことを合わせて考えると、ヒトにおけるオセルタミビル-ミルク間相互作用も PEPT1 の阻害によるものであろうと考えられる。ラット-ヒト間で認められた相互作用の種差は、PEPT1 の消化管内発現様式の種差やオセルタミビルの消化管吸収における PEPT1 の寄与率の種差に起因しているのではないかと推察した。ヒトにおける相互作用の程度の *in vitro* からの予測は、Caco-2 細胞へ取込みより算出した PEPT1 の寄与率を用いることにより、有る程度概算できると推察された。

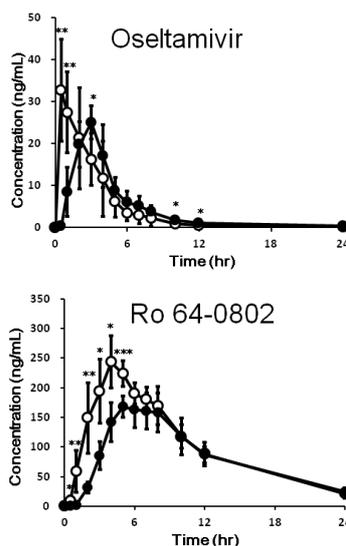


Fig.2 オセルタミビルカプセル (75mg) を 6 人の健康人ボランティアに水 (○) またはミルク (●) 400mL と共に経口投与後のオセルタミビルと活性代謝物 Ro64-0802 の血中濃度推移。Data are expressed as mean \pm S.D. *, p < 0.05; **, p < 0.01; ***, p < 0.001

(4) 新規 PEPT1 基質の探索

PEPT1 基質を非標識プローブを用いて簡便に探索する目的で、特異的プローブとしてオクラトキシンおよび Ψ -Phe-Ala を評価した。オクラトキシンは蛍光物質で測定が簡便であるため優先して検討したが、HeLa/PEPT1 細胞への特異的取込が確認できなかった。一方、非代謝性ペプチドである Ψ -Phe-Ala では HeLa/PEPT1 細胞への特異的取込が確認され、温度、時間および濃度依存性が認められた。Km, Vmax, Kd は各々、 $116 \pm 76 \mu\text{M}$, $2.3 \pm 0.9 \text{ nmol}/2 \text{ min}/\text{mg protein}$, $0.012 \pm 0.001 \text{ nmol}/2 \text{ min}/\text{mg protein}$ であった。以上より、 Ψ -Phe-Ala は PEPT1 特異的基質であると判断した。

Ψ -Phe-Ala を PEPT1 特異的プローブとして用い、構造中にペプチド結合を有する複数の医薬品高濃度による阻害実験を行った結果、一部のニューキノロン系抗菌薬が Gly-Sar と同等の阻害活性を示すこと確認した。しかし、その薬物を基質とした取込実験では PEPT1/HeLa 細胞への特異的取込を確認することができなかった。

(5) 考察

これまでに PEPT1 を介した明確な薬物-飲食物間相互作用の報告はなかったが、本研究で初めて PEPT1 を介した薬物-食品間相互作用を示すことができた。既に 1970 年代に McCracken らは、乳児および小児を対象とした臨床試験においてセファレキシン、ベンジルペニシリン、フェノキシメチルペニシリンをミルクと同時投与することにより吸収率の低下が起こることを報告しており、後に前者 2 薬物は PEPT1 の基質であることが明らかにされていることから、これらも PEPT1 を介した薬物-食品間相互作用であろうと推察される。前述以外の PEPT1 基質薬物においても、消化管吸収における PEPT1 の寄与が大きければ PEPT1 を介した薬物-食品間相互作用が認められる可能性がある。実際、 β -ラクタム系抗生物質であるセフィキシムについても、本報告(2)と同様の検討を行い、ミルク、Gly-Sar でラットに経口投与後の血中濃度が大きく低下することを確認した。従って、PEPT1 基質薬物と食品由来タンパク質あるいはペプチドとの相互作用は一般的な現象であることが推察され、投薬の際には注意が必要であると考えられる。

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 8 件)

- ① 森本かおり. 消化管吸収過程におけるペプチドトランスポーター・PEPT1 を介した薬物-食品間相互作用の解析, 薬学研究所の進歩 研究成果報告集 **29 巻**, 査読無,

2013, 87-91

- ② Wada S, Kano T, Mita S, Idota Y, Morimoto K, Yamashita F, Ogihara T. The Role of Inter-segmental Differences in P-glycoprotein expression and activity along the rat small intestine in causing the double-peak phenomenon of substrate plasma concentration. *Drug Metab Pharmacokinet.* **Vo.28**, 査読有, 2013, 98-103
https://www.jstage.jst.go.jp/article/dmpk/28/2/28_DMPK-12-RG-005/_article
- ③ Morimoto K, Nagami T, Matsumoto N, Wada S, Kano T, Kakinuma, Ogihara T, Developmental changes of brain distribution and localization of oseltamivir and its active metabolite Ro 64-0802 in rats, *J Toxicol Sci.* **Vol.37**, 査読有, 2012, 1217-1223
https://www.jstage.jst.go.jp/article/jts/37/6/37_1217/_pdf
- ④ Kobayashi S, Nagai T, Konishi Y, Tanabe S, Morimoto K, Ogihara T, Transport mechanism of flavanone aglycones across Caco-2 cell monolayers and artificial PAMPA membranes, *J Pharm Pharmacol*, 査読有, **Vol.61**, 2012, 52-60 DOI: 10.1111/j.2042-7158.2011.01374.x
- ⑤ Bahar F.G, Ohura K., Ogihara T., Imai T. Species difference of esterase expression and hydrolase activity in plasma, *J. Pharm. Sci.*, 査読有, **Vol. 101**, 2012, 3979-3988 DOI: 10.1002/jps.23258
- ⑥ 森本かおり. 有機アニオントランスポーターの遺伝子多型による前立腺がんの再燃予測. *ファルマシア*, 査読無, **Vol.48**, 2012, 556
- ⑦ Morimoto K, Kishimura K, Nagami T, Kodama N, Ogama Y, Yokoyama M, Toda S, Chiyoda T, Shimada R, Inano A, Kano T, Tamai I, Ogihara T. Effect of milk on the pharmacokinetics of oseltamivir in healthy volunteers, *J. Pharm. Sci.*, 査読有, **Vol.100**, 2011, 3854-3861 DOI: 10.1002/jps.22627
- ⑧ 小林彰子, 森本かおり, 荻原琢男, 食品成分と薬物の相互作用, *BIOINDUSTRY*, 査読無, **28 巻**, 2011, 30-35
<http://www.fujisan.co.jp/product/1281680662/b/691304/>

[学会発表] (計 10 件)

- ① 一場紀子, グルコースと PEPT1 基質薬物の消化管吸収過程における相互作用, 日本薬剤学会第 28 年会, 2013 年 5 月 25 日, 名古屋
- ② 小川真奈, フラボノイドの胆汁酸腸管再吸収阻害機構の解析, 日本農芸化学会,

- 2013年3月24日, 仙台
- ③ 齋藤早知, Evaluation of a thiodipeptide, Ψ -Phe-Ala, as a PEPT1 probe to investigate of new PEPT1 substrate and inhibitors, 第27回日本薬物動態学会年会, 2012年11月20日, 千葉
 - ④ 浅水秀明, Oseltamivir 服用により精神症状をきたした一症例における薬物動態学および薬理遺伝学的原因解析, 第39回日本毒性学会, 2012年7月17日, 仙台
 - ⑤ 岸村梢江, Interaction of milk and oseltamivir on the intestinal PEPT1-mediated absorption in rats and humans. 第26回日本薬物動態学会年会, 2011年11月16日, 広島
 - ⑥ Kaori Morimoto, Interaction of milk with the intestinal PEPT1-mediated absorption of oseltamivir in rats and humans. 17th NORTH AMERICAN MEETING OF ISSX, 2011年10月16日, Atlanta, USA
 - ⑦ 永見高輝, オセルタミビルおよび活性代謝物 Ro64-0802 の脳内移行性および局在性の解析, 第38回日本トキシコロジー学会学術年会, 2011年7月11日, 横浜
 - ⑧ 当田達也, アムロジピンはペプチドトランスポーター1 (PEPT1) の基質である, 第55回日本薬学会関東支部大会 若手シンポジウム, F12, 2011年10月8日, 船橋
 - ⑨ 我妻瑶恵, ペプチドトランスポーター (PEPT1) の基質となる薬物の消化管吸収に与えるミルクの影響, 日本農芸化学会2010年度大会, 2010年3月18日, 東京
 - ⑩ 小林彰子, 消化管吸収過程における薬物とミルクのペプチドトランスポーター (PEPT1) を介した相互作用の解析, 日本薬剤学会第25年会, 2010年5月12日, 徳島

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

叶 隆 (KANO TAKASHI)

高崎健康福祉大学・薬学部・助教

研究者番号: 70509257

井戸田 陽子 (IDOTA YOKO)

高崎健康福祉大学・薬学部・研究員

研究者番号: 90629594