

論文の内容の要旨

論文題目 経口抗 influenza 薬 oseltamivir 及びその活性型分子 Ro64-0802
の体内動態を制御する分子機構の解明

氏 名 伊藤 元貢

Oseltamivir(Tamiflu®)は、世界初の経口抗インフルエンザ剤であり、A 型及び B 型インフルエンザウイルスの neuraminidase を選択的に阻害する Ro64-0802 のプロドラッグ体として開発された。インフルエンザの治療および予防効果への期待から、我が国では 2001 年 2 月の発売から全世界の 75.8%に相当する 3640 万件の処方が行われた。発売以後、必ずしも因果関係は立証されていないものの、oseltamivir の服用との因果関係が疑われる有害作用が報告され、精神神経異常の有害事象が 3051 件 (2466 人)、うち 2218 件 (1808 人)が 16 歳以下である。こうした背景の下、我が国においては 2007 年 3 月、厚生労働省が十代の未成年患者の使用制限を発表した。異常行動の報告以降、oseltamivir の中枢作用に広く関心が持たれ、種々の解析が実験動物を用いて行われた。その中にはラット培養海馬スライスにおいて、oseltamivir、Ro64-0802 暴露により神経の異常発火を誘起するなど、oseltamivir あるいは Ro64-0802 の中枢性作用が疑われる結果も報告されている。薬物動態学的には、oseltamivir は血液脳関門を透過するものの、血液脳関門のトランスポーター (P-糖蛋白) で能動的なくみ出しを受けるため、その移行は制限されている。また Ro64-0802 の血液脳関門透過性は非常に低いことが報告されている。両化合物の血中動態の支配要因としては、oseltamivir から活性体 (Ro64-0802) への変換に関わる肝 carboxylesterase (CES)1A1、Ro64-0802 の主排泄経路となる腎尿細管分泌機構が挙げられる。本研究では、これら諸要因の遺伝的要因による個体間変動が複数組み合わせられることで、脳内の oseltamivir あるいは Ro64-0802 暴露が異常に高くなり、その結果として異常行動等の中枢作用が誘起される可能性を考え、体内動態を支配するトランスポーター分子の解析を行った。さらに、個体間変動要因と中枢作用との関連性を明らかにすべくコンピューターシミュレーションにより検討した。

1. Oseltamivir 及び Ro64-0802 の体内動態を制御するトランスポーター及び代謝酵素の解明

1-1. Oseltamivir は OAT3, OCT1, OCT2 及び OATP1B3 の、Ro64-0802 は OAT1, OAT2, OAT3, OCT2 及び MRP4 の基質となる。

両薬物の膜透過過程・並びに oseltamivir の代謝過程に関与する体内動態制御因子の機能解析を行った。取り込みトランスポーターに関して、mock 細胞と各種トランスポーター過剰発現 HEK293 細胞への細胞内蓄積量を比較した結果、oseltamivir は有機アニオントランスポーター OATP1B3、OAT3、有機カチオントランスポーター OCT1、OCT2 の、Ro64-0802 は OAT1, OAT2, OAT3 及び OCT1, OCT2 の

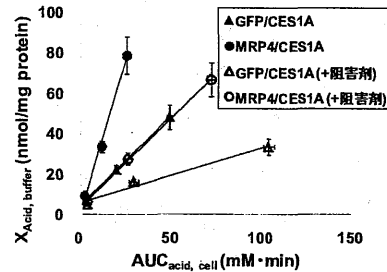


図1. CES1A1/MRP4共発現MDCKII細胞におけるRo64-0802の排泄に関するintegration plot

安定発現 HEK293 細胞において、それらの取り込みが control 細胞と比較して有意に増加することを明らかとした。一方で、排泄トランスポーターについては、CES1A1 並びに multi-drug resistance associated protein (MRP)4 の共発現 MDCKII 細胞を構築し、oseltamivir 暴露後一定時間後の Ro64-0802 の細胞外への排出を測定した。integration plot の傾きから算出した、CES1A/MRP4 発現細胞における Ro64-0802 の排泄クリアランスは対照群である CES1A/GFP 細胞に比べ有意に増加し、かつ MRP4 阻害剤である indomethacin 添加により有意にその排出が阻害された(図 1)。

1-2. Ro64-0802 の腎取り込みは OAT3 でほぼ説明可能である。

ヒト腎側底膜側トランスポーターとして OAT1, 2, 3 及び OCT2 が Ro64-0802 を基質にすることが明らかとなったので、Ro64-0802 の血液側からの腎取り込み過程における個々の相対的寄与率をヒト腎スライス法により検討した。Ro64-0802 の腎スライスへの取り込みは、過剰量の有機アニオントランスポーター阻害剤である *p*-アミノ馬尿酸、ベンジルペニシリン、プロベネシドによって阻害された。一方で、有機カチオントランスポーター阻害剤であるテトラエチルアンモニウムでは阻害されず、OCT2 の寄与は小さいものと判断した。また、臨床薬物間相互作用試験においてプロベネシドの併用により Ro64-0802 の尿細管分泌はほぼ完全に阻害されていることから、OAT1 及び OAT3 が主に関与している可能性が示唆された。そこで relative activity factor (RAF) 法を用いて、OAT1 及び OAT3 の寄与率を検討したところ、OAT1 を介した取り込みクリアランスは OAT3 に比べ著しく小さいことが明らかとなった。実際に、ヒト腎スライスで観察されたプロベネシド感受性の取り込みクリアランスの絶対値は RAF 法で見積もられた OAT3 依存的な取り込みクリアランス値とほぼ一致

した(表 1)。プロベネシドによる Ro64-0802 の取り込みに対する阻害効果は、それぞれ OAT3 過剰発現 HEK293 細胞並びにヒト腎スライスでほぼ一致しており、その臨床非結合型血漿中濃度から、プロ

| lot | Ratio of Uptake Clearance of Probe Substrate (CL _{kidney slice} /CL _{transporter}) | | Estimated Clearance of Ro64-0802 (µl/min/g kidney) | | Observed Clearance of Ro64-0802 (Probenecid-sensitive) (µl/min/g kidney) |
|-----------|---|-------|--|--------------|--|
| | OAT1 | OAT3 | OAT1 | OAT3 | |
| 20-Nov-07 | 0.005 | 0.029 | 0.838 (2.20%) | 37.2 (97.8%) | 47.9 |
| 20-Nov-07 | 0.005 | 0.053 | 0.933 (1.36%) | 67.8 (98.6%) | 56.7 |
| 17-Dec-07 | 0.010 | 0.051 | 1.77 (2.62%) | 65.7 (97.4%) | 47.2 |

表1. Ro64-0802の腎取り込みにおけるOAT1及びOAT3の寄与率

ベネシドは臨床投与量で OAT3 を介した腎取り込みを十分に阻害することが明らかとなった。さらに、日本人において発見された遺伝子変異の中から non-synonymous 変異体 (I175V 及び A389V) に関して、それぞれ安定発現系を構築し、これらアミノ酸置換が OAT3 輸送活性に与える影響を評価した。細胞膜上の OAT3 発現量を測定し、単位 OAT3 蛋白あたりの Ro64-0802 の輸送活性を野生型と比較したところ、野生型に比べ有意に低下する (I175V; 13.8, A389V; 9.62 % of control) ことを明らかとした。

1-3. Oat3 及び Mrp4 は Ro64-0802 の脳脊髄液並びに腎臓中濃度を制御する因子である。

浸透圧ポンプを用いて野生型マウス、Oat3 (-/-)マウス及び Mrp4 (-/-) マウスに Ro64-0802 を定速皮下投与し、投与開始 22 時間後の Ro64-0802 の血漿、腎臓、脳脊髄液中濃度を測定した。その結果、Oat3 (-/-) マウスにおいて Ro64-0802 の腎臓-血漿中濃度比は野生型マウスに比べ有意に低下し、脳脊髄液-血漿中濃度比は、野生型マウスに比べ上昇した。一方で、Mrp4 (-/-) マウスでは腎臓-血漿中濃度比及び脳脊髄液-血漿中濃度比はともに有意に増加することを明らかとし、Oat3 及び Mrp4 が腎臓、脳脈絡叢において Ro64-0802 の方向性輸送に関与していることを明らかにした(図 2)。

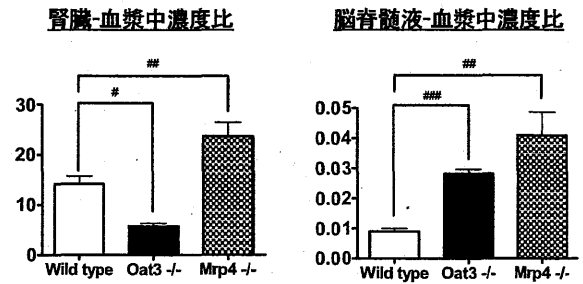


図2. Ro64-0802連続皮下投与22時間後の、Oat3 (-/-)、Mrp4 (-/-)及び野生型マウスにおけるRo64-0802の腎臓-血漿中濃度比及び脳脊髄液-血漿中濃度比 (#; p<0.05, ##, p<0.01, ###, p<0.001 vs wild type)

2. Oseltamivir 及び Ro64-0802 の末梢並びに中枢暴露の個人間変動に関する解析

これまで得られた知見に基づいて、oseltamivir の体内動態を制御する因子(P-糖蛋白並びに CES1A1)、Ro64-0802 の体内動態を制御する因子 (CES1A1, OAT3, MRP4)について、それぞれの遺伝子変異頻度並びに輸送活性/発現量の変化から推測される両化合物の体内動態の個人間変動をモンテカルロシミュレーションにより検討した。種々条件下でのシミュレーションを行ったところ、oseltamivir の脳内暴露のばらつきが最大となる条件は、脳における oseltamivir の代謝クリアランスと脳から血液側への排泄クリアランスが同程度と仮定した場合であり、50,000 人に 6 人程度の割合で、平均値から最大約 5 倍程度 oseltamivir の脳内暴露が増加する患者がいることが推測された(図 3)。一方で、Ro64-0802 の脳内暴露に関しては、ヒト脳内における oseltamivir の代謝の影響を無視できると仮定した場合に最大の個体間変動が観察され、50,000 人に 1 人の割合で平均値に対して 10 倍程度に脳内

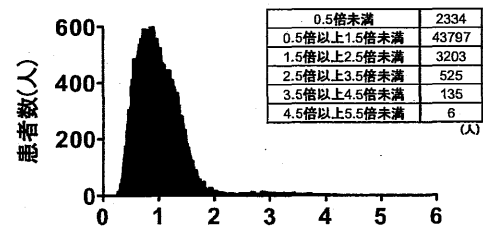


図3. Oseltamivir単回経口投与後のoseltamivirの脳内暴露に関する個人間変動 (図には脳内におけるoseltamivirの代謝の影響と排泄クリアランスの影響を同程度と仮定した際のヒストグラムを示す。)

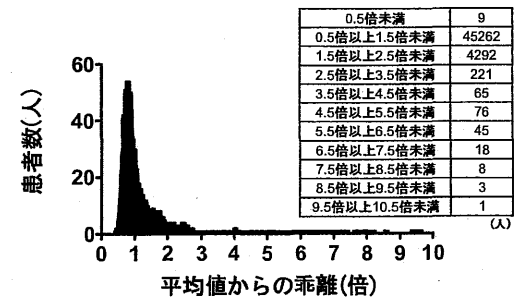


図4. Oseltamivir単回経口投与後のRo64-0802の脳内暴露に関する個人間変動 (図には脳内におけるoseltamivirの代謝の影響を無視した場合のヒストグラムを示す。)

暴露が高まると推定された (図 4)。

3. Oseltamivir 投与後の体温低下メカニズムに関する解析

2007 年日本厚生労働省は oseltamivir 服用後の体温低下を 44 件報告し、米国食品医薬品局 (FDA) も oseltamivir 服用後に体温が 34℃ まで低下した事例を 2 件報告し、体温低下は oseltamivir 服用後の重篤な副作用の一つであると考えられる。私はヒト及びマウスで共通して観察される数少ない *in vivo* 毒性マーカーであることに注目し、oseltamivir 服用後の体温低下作用機構に関して更なる検討を加えた。過去の報告通り *ddy* マウスに oseltamivir を単回腹腔内投与すると、oseltamivir 投与時では投与量依存的な一過性の体温低下が観察された。しかし、同用量の Ro64-0802 投与時には、有意な体温低下が観察されなかった (図 5)。上記試験における血漿、脳、脳脊髄液中の薬物濃度を測定したところ、有意な体温低下が観察された

oseltamivir 投与後、Ro64-0802 の脳内濃度は毛細血管内の残存で説明できる程度であり、Ro64-0802 投与後の血漿中 Ro64-0802 濃度は、oseltamivir 投与後の血漿中 Ro64-0802 濃度より高かった。以上の知見から、oseltamivir 投与後の体温低下は oseltamivir に起因していることが明らかとなった。

[結論]

本研究において私は、oseltamivir 及びその活性型分子 Ro64-0802 の体内動態制御因子の機能解析を通じて、特に服用者の遺伝的背景によって生じる両化合物の末梢・中枢暴露がどの程度変動するかに関して検討を行った。

Ro64-0802 の主要な排泄経路である腎排泄過程における分子機構を解明するとともに、oseltamivir の脳内暴露は CES1A や MDR1 の遺伝子変異の影響によって平均値から 4 - 6 倍に増加しうるが、その増加頻度は比較的高い可能性 (50000 人中数百~千人規模) が示され、Ro64-0802 の脳内暴露は主に OAT3、MRP4 の遺伝子変異によって平均値から大きく増加し、その頻度は oseltamivir の場合に比べ低いものである (50000 人中数人規模) 可能性が示された。さらに、臨床で軽視できない副作用の一つである体温低下について、薬物動態学的視点から Ro64-0802 ではなく oseltamivir 自身の副作用であることを解明した。

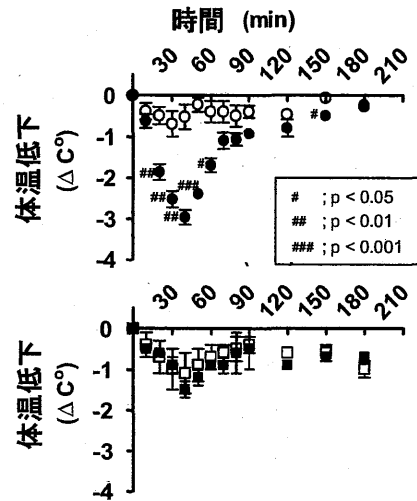


図5. Oseltamivir (上)、Ro64-0802 (下) 単回腹腔内投与 (300mg/kg) 後のマウス直腸体温の低下