

総合感冒薬に含まれる
非ステロイド性抗炎症薬の薬物間相互作用の解析

北海道大学 大学院薬学研究院 臨床薬剤学研究室 助教

なるみ かつや
鳴海 克哉

総合感冒薬に含まれる非ステロイド性抗炎症薬の薬物間相互作用の解析

北海道大学 大学院薬学研究院 調査研究者氏名 鳴海 克哉

共同研究者：井関 健

(〒060-0812 札幌市北区北12条西6丁目 電話番号 011-706-3771)

要旨

小腸上皮には種々の薬物輸送タンパク質（トランスポータ）が発現しており、栄養物質や薬物の消化管吸収に関与している。その中でも有機アニオン輸送ポリペプチド (OATPs)、ペプチドトランスポータ (PEPTs) およびモノカルボン酸トランスポータ (MCTs) は、多くの薬物吸収に関わることが知られている。一般に経口薬の薬物濃度は、消化管において最も高濃度になっており、複数の医薬品が同じタイミングで共存する機会が多い消化管吸収過程は薬物間相互作用のリスクが最も高いと言える。本研究では消化管吸収過程における薬物間相互作用に着目し、総合感冒薬に含まれる解熱鎮痛薬が上記のトランスポータを介した薬物の消化管吸収に与える影響を評価した。ヒト腸管上皮細胞モデルとして汎用される Caco-2 細胞を用いて、解熱鎮痛薬がトランスポータ基質輸送に及ぼす影響を評価したところ、検討に用いた6種類すべての解熱鎮痛薬が阻害作用を示した。特にプロピオン酸系非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) であるロキソプロフェンおよびイブプロフェンは各トランスポータ基質の輸送に対し強い阻害効果を示し、MCTs の基質である乳酸やバルプロ酸の輸送を顕著に阻害した。しかしながら、算出された IC₅₀ からこれらの阻害作用は消化管吸収過程において临床上重要な結果をもたらさないことが示唆された。

1、調査研究目的

2009年に一般用医薬品 (OTC 薬) の販売制度が半世紀ぶりに改正されて以降、我々にとって OTC 薬はより身近なものとなった。特に総合感冒薬は OTC 薬の売り上げ上位を占めており、利便性・安全性の面から多くの人々が利用している。また、2014年に厚生労働省は「医薬品開発と適正な情報提供のための薬物相互作用ガイドライン」を公表し、医薬品の開発に際して薬物間相互作用リスクを検証する *in vitro* 試験を推奨している。しかしながら、OTC 薬はその効果や安全性が考慮されている一方で、他の医療用医薬品の吸収や効果に及ぼす影響、すなわち薬物間相互作用についてはほとんど評価がなされていない。

また、临床上、医薬品の組み合わせは膨大であり、健康食品・サプリメントを含めるとその数は無限に存在する。その中で臨床的に重要な薬物間相互作用を検証し、対策を含めた確かなエビデンスを構築していくことは適正な薬物治療を施行する上で必須である。本研究では、薬の消化管吸収過程に着目し、総合感冒薬に含まれる解熱鎮痛薬が、他の薬物の消化管吸収に与える影響を評価し、薬物相互作用マネージメントの観点から適正な総合感冒薬を選択するための一助となるエビデンスを構築する。

2、調査研究方法

2-1 使用細胞

実験にはヒト結腸癌由来 Caco-2 細胞を用いた。培養液には 10% ウシ胎児血清、100 IU/mL penicillin-100 μ g/mL streptomycin、1% NEAA (non-essential amino acids) を含む DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) を用い、37°C、5% CO₂-95% air インキュベーター内で培養した。細胞は 60.1 cm² デイッシュで培養し、培養液の交換は 2 日おきに行った。継代は播種後 6-7 日目にトリプシン処理により細胞を遊離させて行った。

2-2 取り込み実験

Caco-2 細胞を 24 穴プレートに播種・培養し、検討に用いた。37°C に保った水浴上で、培養液を除去し、37°C の Hank's balanced salt solution (HBSS) (137 mM NaCl, 25 mM D-Glucose, 4.2 mM NaHCO₃, 5.4 mM KCl, 0.44 mM KH₂PO₄, 0.34 mM Na₂HPO₄, 1.3 mM CaCl₂, 0.81 mM MgSO₄, 10 mM HEPES; pH 7.4 adjusted with 1 M Tris) 0.5 mL で 1 回洗浄し、再度 HBSS 0.5 mL を添加し 10 分間静置した。HBSS を除去後、細胞に基質薬物と各種 NSAIDs を含む HBSS (pH 6.0 (MES/Tris)) を 0.5 mL 添加し、37°C で既定時間静置し、基質を取りこませた。基質溶液を除去後、氷冷した HBSS にて細胞を 2 回洗浄し、取り込みを停止させた。その後、0.2 N NaOH-1% SDS 溶液を 0.5 mL 加えて細胞を溶解させた。[³H]Estrone 3-sulfate、[³H]glycyl-sarcosine、[¹⁴C]L-lactic acid および [³H]valproic acid の定量は液体シンチレーションカウンター (ACS II, Amersham) でラベル化した基質の放射活性を測定することにより評価した。また、ロキソプロフェンの定量は、取り込み後の細胞を水に懸濁し、フィルトレーション (0.45- μ m pore size) 処理後、液体クロマトグラフィー (HPLC) にて行った。なお、タンパク質定量は bovine serum albumin (BSA) を標準タンパク質とした BCATM protein assay kit (Pierce) に準拠して行った。

2-3 ロキソプロフェンの定量

ロキソプロフェンの定量には HPLC 法を用いた。カラムは GL Science Inertsil ODS-4 (5 μ m particle size, 4.6 mm inside diameter \times 250 mm) を用い、カラム温度は 40°C とした。流速は 1.0 mL/min、移動相は 2.5 mM CH₃COONH₄:CH₃CN (3:1, v/v) とし、UV 検出器にて分析した。ロキソプロフェンは 264 nm にて検出し、定量はピーク面積を用いた絶対

検量線法により行った。

2.4 SDS-PAGE および Western blotting

培養後の Caco-2 細胞を、セルスクレーパーによりかきとり、遠心分離 (1,500 × g, 5 min) により細胞を回収した。回収した細胞を PBS で 2 回洗浄後、沈殿に lysis buffer (1% Triton X-100, 0.1% SDS, 4.5 M urea in PBS) 100 μL を加えて懸濁した。氷上で 5 分間静置した後、4° C で 15 分間超音波処理を行った。遠心分離 (12,000 × g, 15 min, 4° C) 後、得られた上清をサンプルとし、2 倍量 (v/v) の 2 × SDS sample buffer (0.1 M Tris-HCl (pH 6.8), 4% SDS, 10% 2-mercaptoethanol, 20% glycerol, 0.004% BPB) と混合した。Stacking gel (4.5% polyacrylamide, 125 mM Tris-HCl (pH 6.8), 0.1% SDS, 0.1% APS, 0.01% TEMED) および running gel (10% polyacrylamide, 250 mM Tris-HCl (pH 8.8), 0.1% SDS, 0.1% APS, 0.01% TEMED) を用いて電気泳動し、各タンパク質を分離した。続いて、ポリアクリルアミドゲルから methanol で親水処理した PVDF メンブレン (BIO-RAD) へタンパク質の転写を行った。転写は、towbin buffer (25 mM Tris, 192 mM glycine, 20% methanol, 3.47 mM SDS) に浸したろ紙にポリアクリルアミドゲルおよび PVDF メンブレンをはさみ、15 V の電圧を 90 分間かけて行った。転写後、メンブレンを blocking buffer (0.05% Tween 20, 10% スキムミルク in PBS) 中で 1 時間振盪した。Diluent buffer (0.05% Tween 20, 0.5% スキムミルク in PBS) で抗体価に応じて希釈した一次抗体液 1 mL とメンブレンを密封し、室温で一晩反応させた。その後、メンブレンを wash buffer (0.05% Tween 20 in PBS) で 10 分、3 回洗浄し、diluent buffer で抗体価に応じて希釈した HRP 標識二次抗体液 1 mL とメンブレンを密封し、室温で 1 時間反応させた。その後、メンブレンを wash buffer で 10 分、3 回洗浄し、ECLTM Western blotting detection reagent を 1 分間反応させ、Image Quant LAS 4000 (GE Healthcare Life Sciences) にて化学発光を検出した。

2.5 Caco-2 細胞への siRNA 導入

12 well プレートに OPTI-MEM I Reduced Serum Medium を 196 μL 添加後、予め nuclease free water で 5 μM に希釈した MCT1 siRNA、MCT4 siRNA または negative control siRNA を 2 μL 加えた。次に、Lipofectamine™ RNAiMAX 2 μL を加え、室温で 15 分間インキュベートした。その後、penicillin および streptomycin を含まない DMEM に懸濁させた Caco-2 細胞懸濁液を 0.8 mL ずつ播種し、37° C -5% CO₂ インキュベーター内で 24 時間培養を行った。その後、培養液を交換し、72 時間培養後、アッセイに用いた。

3、調査研究結果

3-1 各トランスポータ典型基質の取り込みに及ぼす解熱鎮痛剤の影響

はじめに、OATPs、PEPTs および MCTs の典型基質の取り込みに対する解熱鎮痛薬

の影響について検討を行った。なお、各NSAIDsおよびアセトアミノフェンの検討濃度は、経口投与時における管腔内の予測最大濃度を考慮し、10 mM に設定した。各典型基質 ([3H] estrone 3-sulfate (E3S)、[3H]glycyl-sarcosine (Gly-Sar) および [14C]L-lactic acid (L-lactate)) の取り込みは、NSAIDs 存在下において有意に阻害された。特にロキソプロフェンおよびイブプロフェンは、MCTs の典型基質である L-lactate の取り込みを強く (20% 以下まで) 阻害した。NSAIDs 同様、アセトアミノフェンも各典型基質の取り込みを阻害したが、その阻害は NSAIDs と比較すると弱い傾向であった (Figure 1)。

3-2 バルプロ酸の取り込みに及ぼすロキソプロフェンおよびイブプロフェンの阻害効果

バルプロ酸は抗てんかん薬として汎用される薬物であり、いくつかの研究において、その輸送には MCTs が寄与することが示唆されている 1, 2。そこで、バルプロ酸の取り込みに及ぼすロキソプロフェンおよびイブプロフェンの阻害効果を検討した。[3H]Valproic acid の取り込みは、ロキソプロフェンおよびイブプロフェンの濃度依存的に阻害され、IC50 はそれぞれ 0.99 mM および 0.85 mM と算出された (Figure 2)。

3-3 バルプロ酸の取り込みに対するロキソプロフェンの阻害様式

Caco-2 細胞への [3H]valproic acid の取り込みは、基質濃度に対して飽和性が認められ、Eadie-Hofstee プロット (Figure 3 挿入図) は一相性を示した。また、Km および Vmax はそれぞれ 0.9 ± 0.1 mM、 37.2 ± 2.5 nmol/mg protein/15 s であった。一方、ロキソプロフェン存在下における [3H]valproic acid 取り込みも同様に一相性を示し、Km および Vmax はそれぞれ 3.0 ± 0.1 mM、 42.3 ± 1.0 nmol/mg protein/15 s であった。また、Eadie-Hofstee プロットからロキソプロフェンは [3H]valproic acid 輸送を競合的に阻害することが示唆された。

3-4 ロキソプロフェンの輸送特性

Caco-2 細胞へのロキソプロフェンの取り込みは、基質濃度に対して飽和性が認められ、Eadie-Hofstee プロット (Figure 4 挿入図) は一相性を示した。これまで我々は、Caco-2 細胞へのロキソプロフェンの取り込みは H⁺ 依存性かつ Na⁺ 非依存性であることを示しており、その取り込みはモノカルボン酸構造を有する各種化合物および MCTs 阻害剤により阻害されることを明らかにしている 3。そこで、消化管に発現している MCTs に着目し、MCT1 および MCT4 ノックダウン条件下におけるロキソプロフェン輸送を評価した。MCT1 および MCT4 siRNA により Caco-2 細胞における MCT1 および MCT4 タンパク質は顕著に低下した一方で、ロキソプロフェンの取り込み量に変化はみられなかった (Figure 5)。また、Eadie-Hofstee プロットからロキソプロフェンは L-lactate 輸送を非競合的に阻害することが示唆された (Figure 6)。

4、考察

本研究では、pH 依存的な薬物輸送を担うことが知られている消化管トランスポータ OATPs、PEPTs および MCTs に着目し、各種解熱鎮痛薬による薬物間相互作用のリスクを *in vitro* レベルで評価した。各トランスポータの基質薬物の取り込みは検討に用いたすべての解熱鎮痛薬により阻害された (Figure 1)。特にプロピオン酸系 NSAIDs であるロキソプロフェンおよびイブプロフェンは MCTs 基質 (L-lactate) の取り込みを顕著に阻害した。また、L-lactate と同様、抗てんかん薬バルプロ酸の取り込みもロキソプロフェンおよびイブプロフェンにより顕著に阻害され、その IC₅₀ はそれぞれ 0.99 mM および 0.85 mM であった (Figure 2)。一般に消化管吸収過程における排泄型トランスポータを介した薬物相互作用の *in vitro* 試験において、IC₅₀ 値が 0.1 × 予測最高濃度 (管腔内) よりも大きい場合、すなわち「予測最高濃度 / IC₅₀ < 10」となる場合、消化管における *in vivo* での阻害を否定できるとされている⁴。ロキソプロフェンおよびイブプロフェンの 1 回投与量がそれぞれ 60mg、200mg であることから、管腔内での予測最高濃度はそれぞれ 1 mM、4 mM 程度と推定される。本検討は、消化管管腔から腸管上皮細胞への基質輸送 (吸収方向) のみを想定して行った実験系であるが、得られた IC₅₀ を考慮するとバルプロ酸の消化管吸収に対するロキソプロフェンおよびイブプロフェンの阻害効果は臨床的には重要でない可能性が示された。また、他の NSAIDs やアセトアミノフェン (NSAIDs に分類されない解熱鎮痛剤) も各トランスポータの典型基質の取り込みを阻害したものの、その阻害効果はロキソプロフェンやイブプロフェンと比較して弱いことが示唆された。以上、本検討で評価した解熱鎮痛剤は、OATPs、PEPTs および MCTs の基質輸送に対して阻害効果を有するものの、その阻害は消化管吸収過程において臨床上重要な結果をもたらさないと推察される。消化管吸収過程では他にも様々なトランスポータが薬物輸送に関わっており、今後は排泄 (分泌) 方向へのトランスポータを含む他のトランスポータの薬物輸送に及ぼす解熱鎮痛剤の影響を評価し、臨床的に重要な薬物間相互作用を検証していく。

Eadie-Hofstee プロットより、バルプロ酸取り込みに対するロキソプロフェンの阻害様式は競合阻害であることが示された (Figure 3 挿入図)。また、バルプロ酸およびロキソプロフェンの取り込みは一相性を示したことから、これらの薬物は少なくとも一つのトランスポータの基質認識部位を競合することが示唆された (Figure 3, 4)。これまでの報告から、ロキソプロフェンをはじめとした NSAIDs およびバルプロ酸の輸送には pH 依存的なトランスポータが寄与していることが示唆されているが、このトランスポータの同定には至っていない^{1, 2, 5, 6}。我々は、ロキソプロフェンが L-lactate の取り込みを強く阻害したことから (Figure 1)、消化管に発現している MCTs がロキソプロフェンの輸送に関与していると仮定し、ロキソプロフェン輸送における MCT1 および MCT4 の寄与を検討した。しかしながら、MCT1 および MCT4 ノックダウンにより、ロキソプロフェンの取り込み量に変化はみられず、ロキソプロフェンによる L-lactate 取り込みの阻害様式は非競合阻害であることが示された (Figure 5, 6)。したがって、ロキソプロフェンは、MCT1 および

MCT4の基質である可能性は低いことが示された。NSAIDsは、経口のみならず貼付（塗布）剤、点眼剤としても幅広く使用されており、その輸送に関わるトランスポータの同定は薬物間相互作用の予測のみならずDDS（ドラッグデリバリーシステム）の観点からも非常に重要であると考えられる。しかしながら、上述の通りNSAIDsの輸送に関しては、輸送特性に関する報告はあるもののトランスポータの同定には至っておらず、今後の研究が待たれるところである。現在、我々はこれまでに得られた知見からNSAIDs輸送に関わるトランスポータの同定を目指しさらなる検討を進めている。

5、まとめ

本研究により、NSAIDsを含む解熱鎮痛薬は、OATPs、PEPTsおよびMCTsの基質輸送に対して阻害効果を有することが明らかとなったが、その阻害による臨床的な影響は小さいものと予想された。また、ロキソプロフェンの輸送になんらかのトランスポータが寄与していることが示された一方で、MCT1およびMCT4はロキソプロフェンの取り込みに関与しないことが明らかとなった。

6、調査研究発表（口頭又は誌上発表）

1. 鳴海克哉 1、小林正紀 2、古堅彩子 1、高橋夏子 3、井関健 1,2

1 北海道大学 大学院薬学研究院、2 北海道大学病院 薬剤部、3 北海道薬科大学

「Caco-2細胞におけるロキソプロフェンの輸送特性」

日本薬学会第137年会（平成29年3月24日～27日）

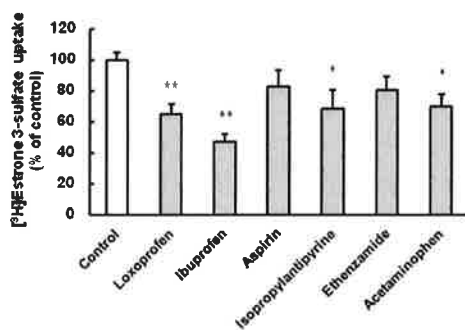
7、引用文献

1. Utoguchi N, Audus KL. Carrier-mediated transport of valproic acid in BeWo cells, a human trophoblast cell line. *Int J Pharm* 2000;195:115-24.
2. Fischer W, Praetor K, Metzner L, Neubert RH, Brandsch M. Transport of valproate at intestinal epithelial (Caco-2) and brain endothelial (RBE4) cells: mechanism and substrate specificity. *Eur J Pharm Biopharm* 2008;70:486-92.
3. Narumi K, Kobayashi M, Kondo A, Furugen A, Yamada T, Takahashi N, Iseki K. Characterization of loxoprofen transport in Caco-2 cells: the involvement of a proton-dependent transport system in the intestinal transport of loxoprofen. *Biopharm Drug Dispos* 2016; 37: 447-455.
4. U.S. Food and Drug Administration (FDA). Guidance for industry drug interaction studies: Study design, data analysis, implications for dosing, and labeling recommendations draft guidance. Available at: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm292362.pdf>. (2012)
5. Emoto A, Ushigome F, Koyabu N, Kajiya H, Okabe K, Satoh S, Tsukimori K, Nakano

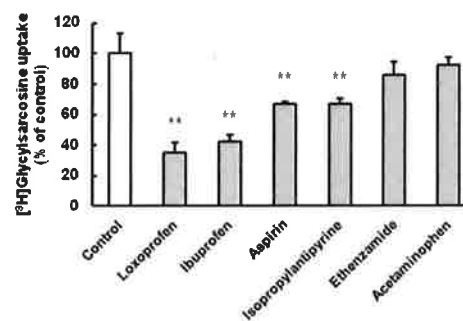
H, Ohtani H, Sawada Y. H(+)-linked transport of salicylic acid, an NSAID, in the human trophoblast cell line BeWo. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002;282:C1064-75.

6. Choi JS, Jin MJ, Han HK. Role of monocarboxylic acid transporters in the cellular uptake of NSAIDs. *J Pharm Pharmacol* 2005;57:1185-9.

a) Estrone 3-sulfate



b) Glycyl-sarcosine



c) L-Lactic acid

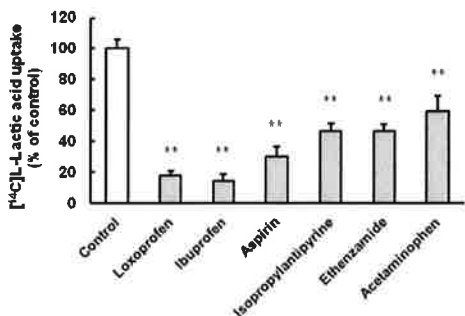
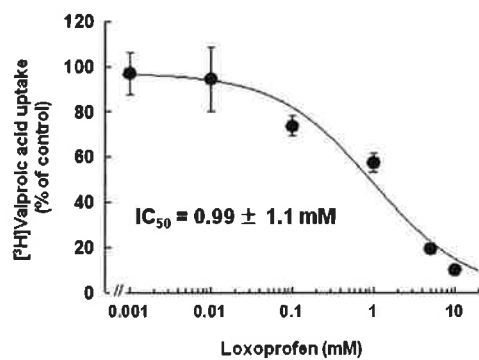


Figure 1 Influence of non-steroidal anti-inflammatory drugs on the uptake of [³H]estrone 3-sulfate (a), [³H]glycyl-sarcosine (b), and [¹⁴C]L-lactic acid (c) by Caco-2 cells

The uptake of [³H]estrone 3-sulfate (5 nM), [³H]glycyl-sarcosine (0.18 μM), and [¹⁴C]L-Lactic acid (0.67 μM) in Caco-2 cells was performed at 37°C, pH 6.0 in the absence or presence of inhibitors (0.001–10 mM). Each point represents the mean ± S.D. of 3 measurements. *: significantly different from control (p < 0.01), **: significantly different from the control (p < 0.001).

a) Loxoprofen



b) Ibuprofen

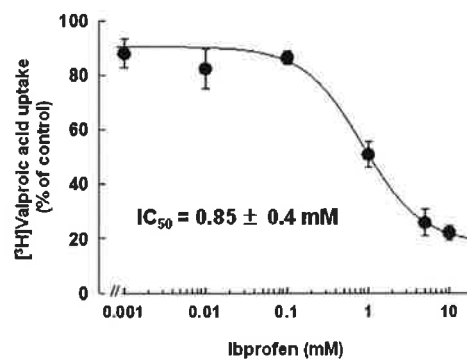


Figure 2 Concentration-dependent inhibition of [³H]valproic acid uptake in Caco-2 cells by loxoprofen (a) and ibuprofen (b)

The uptake of [³H]valproic acid (5.6 nM) in Caco-2 cells was performed at 37°C, pH 6.0 for 15 sec in the absence or presence of inhibitors (0.001–10 mM). Each point represents the mean ± S.D. of 3 measurements. The data are presented as the uptake values relative to the uptake in the absence of inhibitors (%). The IC₅₀ value was determined from the dose-response curve generated using SigmaPlot 12.5 (Systat Software, Inc.; San Jose, CA, USA).

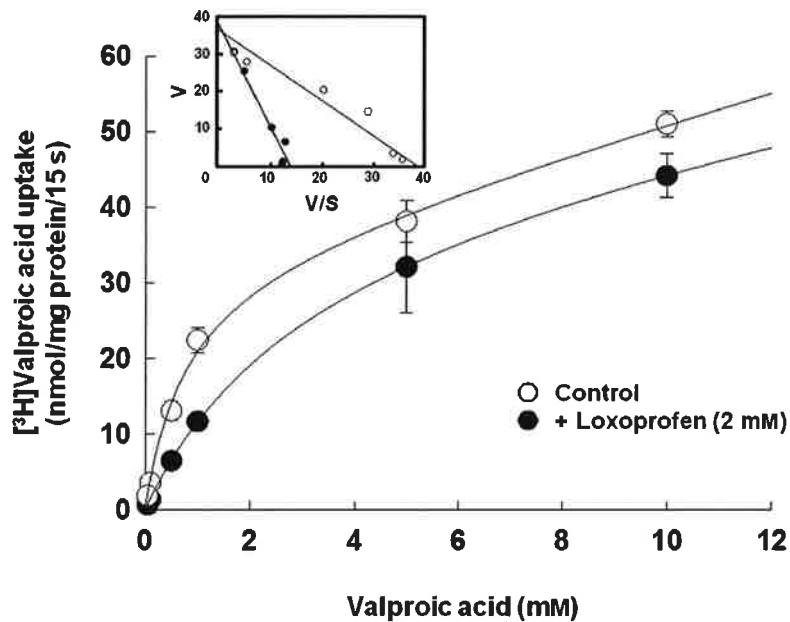


Figure 3 Saturation kinetics of valproic acid uptake by Caco-2 cells in the absence (○) and presence (●) of loxoprofen

The uptake of valproic acid (0.05–10 mM) was examined in the absence or presence of 2 mM loxoprofen. Each point represents the mean \pm S.D. of 3 measurements.

Inset: Eadie-Hofstee plot of the data after subtraction of non-saturable valproic acid uptake.

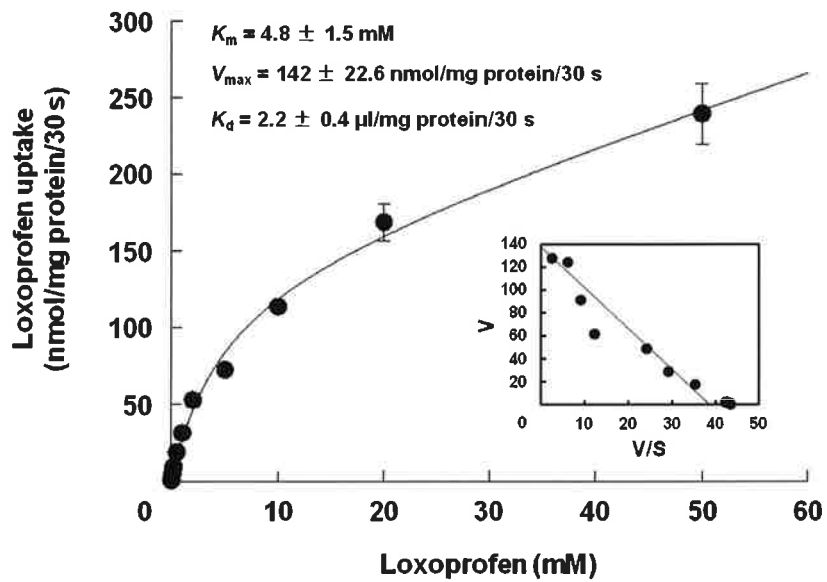
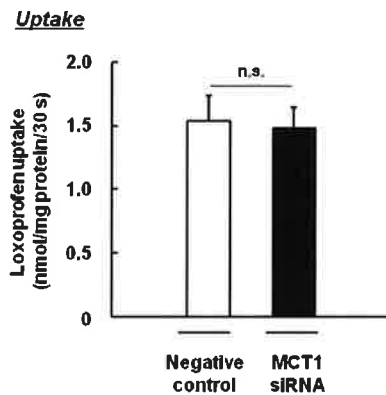
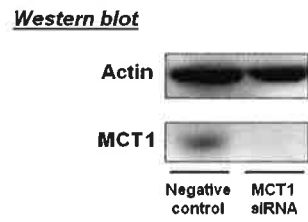


Figure 4 Saturation kinetics of loxoprofen transport in Caco-2 cells

The uptake of loxoprofen was measured over a concentration range of 0.01–50 mM at 37°C, pH 6.0. Each point represents the mean \pm S.D. of 3–6 measurements.

Inset: Eadie–Hofstee plot of the data after subtraction of non-saturable loxoprofen uptake.

a) MCT1



b) MCT4

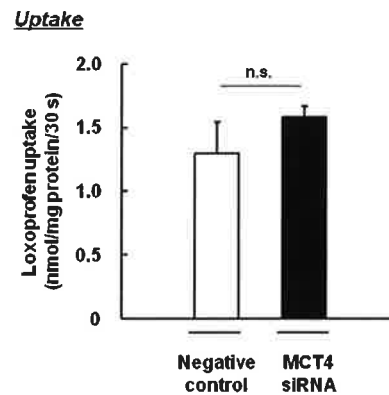
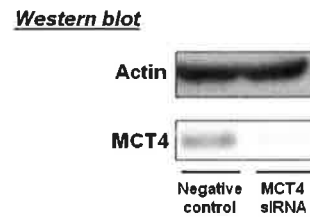


Figure 5 Effects of MCT1 siRNA (a) and MCT4 siRNA (b) on loxoprofen transport in Caco-2 cells

The expression analysis and uptake study were performed using siRNA targeting the MCT1 gene (siRNA ID no.: HSS109934) or MCT4 gene (siRNA ID no.: s17416); the non-targeting siRNA was used as negative control. The uptake of loxoprofen (100 μ M) was evaluated at 37°C, pH 6.0 for 30 s.

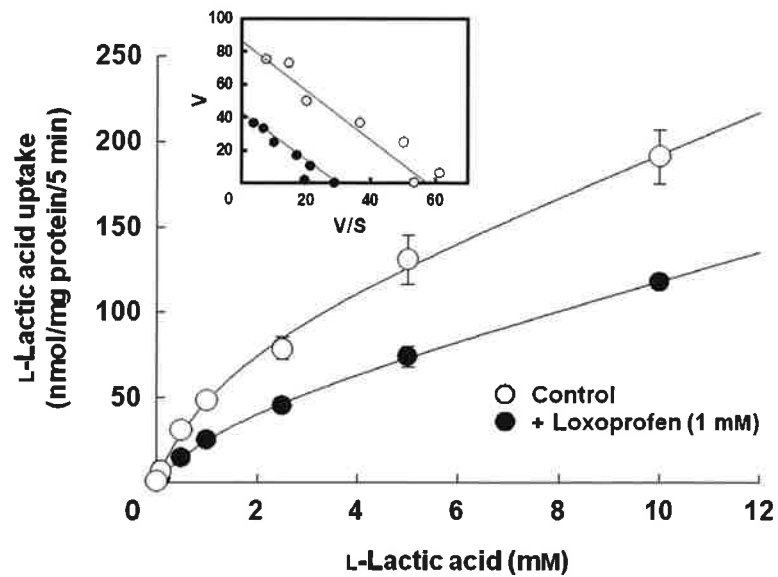


Figure 6 Saturation kinetics of L-lactic acid uptake by Caco-2 cells in the absence (○) and presence (●) of loxoprofen

The uptake of L-lactic acid (0.01–10 mM) was examined in the absence or presence of 1 mM loxoprofen. Each point represents the mean \pm S.D. of 3 measurements.

Inset: Eadie-Hofstee plot of the data after subtraction of non-saturable L-lactic acid uptake.