

学位論文の内容の要旨

学位論文題目 エゾウコギの食－薬間相互作用および糖質吸収抑制作用に関する研究

指導教授 渡辺 一弘
学位申請者 高橋 恒久

近年、急速な高齢化や生活習慣病患者の増加に伴い、健康増進や疾病の予防、治療の目的からセルフメディケーションへの関心が高まり、健康食品を利用する機会が増えている。健康食品やサプリメントを摂取している多くの利用者が、医療関係者による安全性の確認を受けることなく処方薬と安易に併用している現状の中、思わぬ相互作用の発現を未然に防ぎ、健康食品を適正かつ安全に使用するためには、食－薬間相互作用のエビデンスの蓄積が急がれる。

北方系植物であるエゾウコギ (*Acanthopanax senticosus* Harms) は、抗疲労作用等を有し、そのエキス (ASE) は病中病後等の体力低下時の栄養補給あるいは疲労回復を目的としてOTC薬としても服用されるため、医薬品と併用される機会が少なくない。McRae (1996) は、ジゴキシン (DGX) を服用している74歳男性の心房細動患者がASEを併用して、血中DGX濃度が上昇した症例を報告したが、発現機序は不明である。P糖タンパク質 (P-gp) およびCYP3A4の基質であるDGXは、有効血中濃度範囲が狭く中毒域と近接しており、ASEの服用は有害事象発現につながる恐れがあり、その発現機序の解明は臨床上有益な情報を与える。本研究では、安全性の観点から、これら薬物動態規定因子に及ぼすASEの影響を検討し、食－薬間相互作用の可能性を評価した。

一方、ASEは糖尿病モデル動物における検討で血糖低下作用を示したとの報告があるが、作用機序は明らかでない。新規機能性食品素材の開発の観点から、北海道の希少な薬用資源であるASEの有効活用を目指して、抗糖尿病効果も併せて評価した。

1. 小腸薬物トランスポーター活性に与える影響

小腸管腔側刷子縁膜上に発現しているP-gpは幅広い基質認識性を示し、細胞膜を透過した薬物を小腸管腔側へと排出する役割を担う。経口投与された薬物の小腸からの吸収は、バイオアベイラビリティに影響を与えるため、P-gpによる薬物の排出は血中濃度を左右する重要な因子である。そこで、ヒト小腸上皮細胞モデルのCaco-2細胞を用い、P-gpを介した薬物輸送活性に対するASEの影響を検討した。

その結果、DGXの吸収輸送量（Apical-to-Basolateral）はASE添加により有意に増加し、濃度依存的であった（Fig.1）。蛍光測定により迅速かつ高感度な測定が可能なローダミン123を基質とした速度論的解析の結果、 K_d 値に変化が見られなかったことから、ASEは単純拡散による細胞内への取込みには影響を与えず、P-gpが関与する輸送のみに影響することが明らかになった。また、 K_m 値には変化がなく、 V_{max} 値のみが変化したことから、ASEのP-gpに対する非競合的な阻害機構が考えられた（Table 1）。

なお、他のトランスポーターについても検討した結果、ペプチドトランスポーターと有機カチオントランスポーターに影響が認められたのみであった。

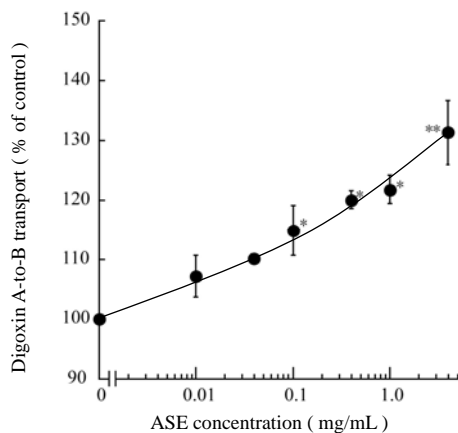


Fig. 1 Effects of ASE addition on Apical-to-Basolateral transport of digoxin in Caco-2 cell monolayers

Caco-2 cell monolayers were incubated with digoxin at 37 °C for 60 min in the absence or presence of ASE (0 ~ 4.0 mg/mL). Each value represents the mean \pm S.D. for five experiments. Significantly different from the control, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Table 1 Kinetic parameters for rhodamine123 uptake in Caco-2 cell monolayers

| Parameter | Control | ASE (4.0 mg/mL) |
|-------------------------------------|---------------|-----------------|
| V_{\max} (nmol/mg protein/10 min) | 3.050 ± 0.155 | 4.537 ± 0.047* |
| K_m (mM) | 0.306 ± 0.026 | 0.313 ± 0.001 |
| K_d (mL/mg protein/10 min) | 0.585 ± 0.062 | 0.611 ± 0.040 |

Each value represents the mean ± S.D. for three monolayers. Significantly different from the control, * $p < 0.05$.

2. 薬物代謝酵素活性に与える影響

2-1. CYP3A4

CYP3A4 はP-gpと共通の基質を認識し、小腸上皮細胞においてP-gpと協働して機能することにより、薬物などの異物から生体を防御している。このことからASEとDGX間の相互作用発現の原因として、ASEによるP-gp阻害のみならず、小腸CYP3A4に対する何らかの関与も考えられる。そこで、ヒト小腸CYP3A4活性に対するASEの影響について検討した。また、ASEもしくはASE中の成分が消化管からの吸収過程を経て、薬物代謝の主たる器官である肝臓におけるCYP3A4に影響を与えるかについても検討した。

ヒト小腸(HIM)およびヒト肝ミクロソーム(HLM)を用いたテストステロン(TS) 6 β -水酸化活性は、ASEの添加により、いずれも濃度依存的に低下した。リコンビナントCYP3A4を用いたLineweaver-Burkプロット解析により、ASEは複数の成分が混在するエキスであるため一様な阻害形式を示さなかったが、ASE添加によって V_{\max} 値が有意に低下したことから、非競合型阻害が優勢であることが示唆された(Fig.2)。また、HLMを用いてASEに含まれる14成分のCYP3A4活性に対する影響を検討した。セサミン、ケルセチンおよびケルシトリンに強い阻害を認めしたが、各成分のASE中含量から、肝CYP3A4阻害はこれら成分の単独によるものではなく、複数成分の相加もしくは相乗効果であると推察された。

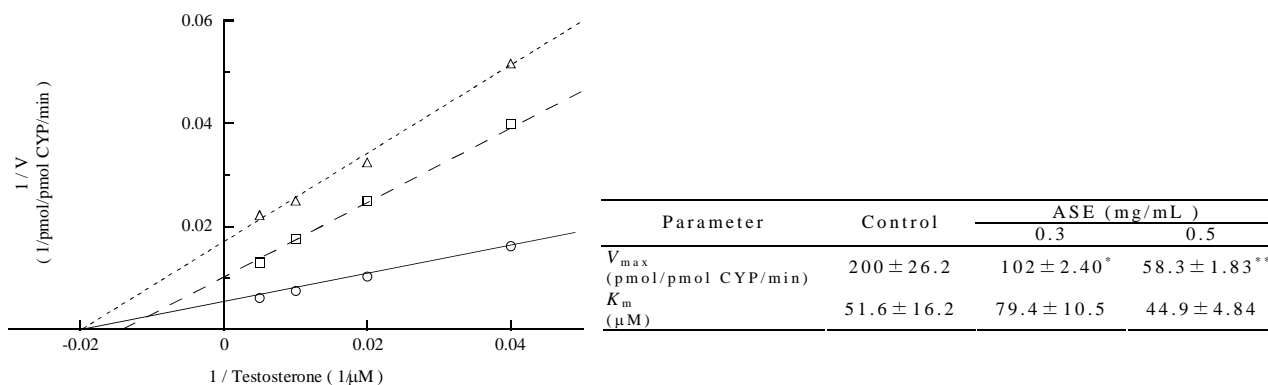


Fig. 2 Lineweaver-Burk plot on testosterone 6 β -hydroxylase activity in recombinant CYP3A4
 Recombinant CYP3A4 was incubated with testosterone (0~200 μ M) in the presence (\square ; 0.3 mg/mL, \triangle ; 0.5 mg/mL) or absence (\circ) of ASE for 10 min at 37 °C. Each value represents the mean \pm S.D. for three experiments. Significantly different from the control, * p < 0.05, ** p < 0.01.

CYP3A4に対するASEの影響を明確にするため、ラットを用いた *ex vivo* 実験を行った。ASE経口投与後の肝TS 6 β -水酸化活性は、投与前に比べ用量依存的に低下しASE 200mg/kg以上の投与群において1時間で最低値を呈し、4時間で投与前のレベルにまで回復した (Fig.3 (A))。これは、小腸から吸収されて肝へ移行した代謝物を含むASE由来成分が、肝CYP3A 活性を阻害していることを示唆している。

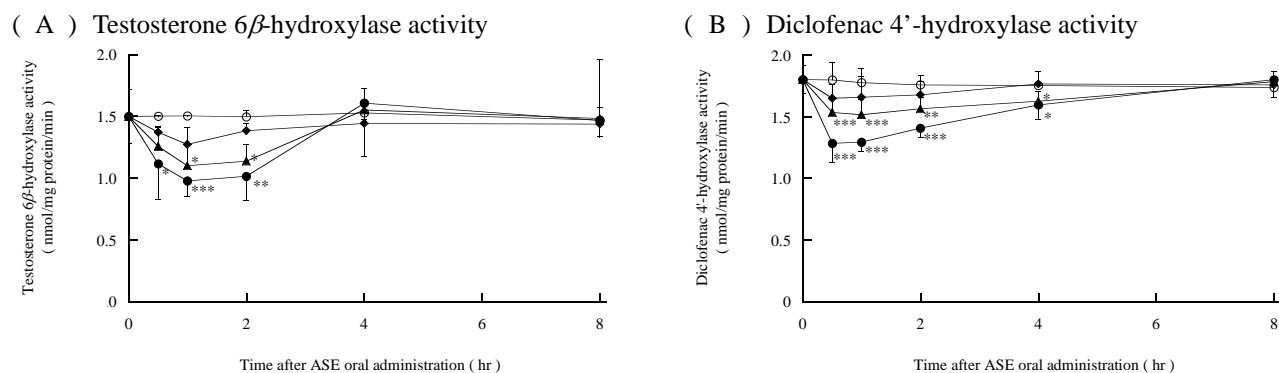


Fig. 3 Time courses of testosterone 6 β -hydroxylase (A) and diclofenac 4'-hydroxylase (B) activities in rat liver microsomes after ASE oral administration

After ASE oral administration, rat liver microsomes were incubated with testosterone (50 μ M) or diclofenac (50 μ M) in the presence of ASE (\circ ; 50 mg/kg, \blacklozenge ; 100 mg/kg, \blacktriangle ; 200 mg/kg, \bullet ; 400 mg/kg) for 10 min at 37 °C. Each value represents the mean \pm S.D. for six to seven rats. Significantly different from the control (0 hr), * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001.

CYP3A4 の典型的な基質であるニフェジピン (NFP) のラットにおける体内動態に対する ASE の影響を検討したところ、ASE 400 mg/kg の同時投与で 30 分後の血中濃度が 160 %、投与 0-6 時間の AUC が 130 % に上昇した (Fig.4)。このことは、ASE 由来成分が CYP3A を阻害していることを意味する。その後、NFP の血中濃度は、投与後 4 時間で投与前の値とほぼ同程度までに低下した。ASE 投与群の NFP 血中濃度が対照群と同等になるまでに要した時間は、ラット肝の TS 6 β -水酸化活性に与える ASE の挙動とほぼ一致した。

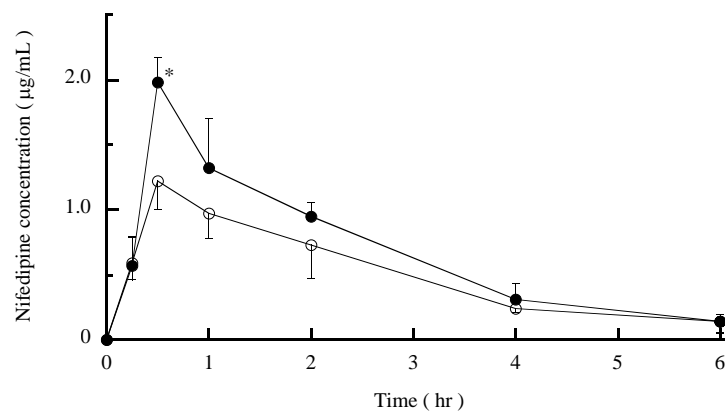


Fig. 4 Effects of ASE oral administration on plasma nifedipine concentration-time profile in rats
A 5 mg/kg dose of nifedipine was administered to male Wistar rats with (●) or without (○) ASE (400 mg/kg). Each value represents the mean \pm S.D. for four to five rats. Significantly different from the control, * $p < 0.05$.

2 - 2 . CYP2C9

ASE が CYP3A4 以外の CYP 活性に影響を及ぼすことも考えられたため、他の分子種についてもラットを用いた *ex vivo* 実験を行った。その結果、ラットに ASE を経口投与したときの CYP2C9 の典型的基質であるジクロフェナク (DFC) の肝 4'-水酸化活性は、投与前に比べ用量依存的に低下し、ASE 200 mg/kg 以上で 30 分にほぼ最低値を呈し、8 時間で投与前のレベルにまで回復した (Fig.3 (B))。なお、その他の CYP 活性に影響は認められなかった。

次に、HLM を用いて DFC 4'-水酸化活性を測定したところ、ASE の添加によりいずれも濃度依存的に阻害され、その形式は非競合型であった

(Fig.5) 。HIMを用いた場合も、同様の結果であった。

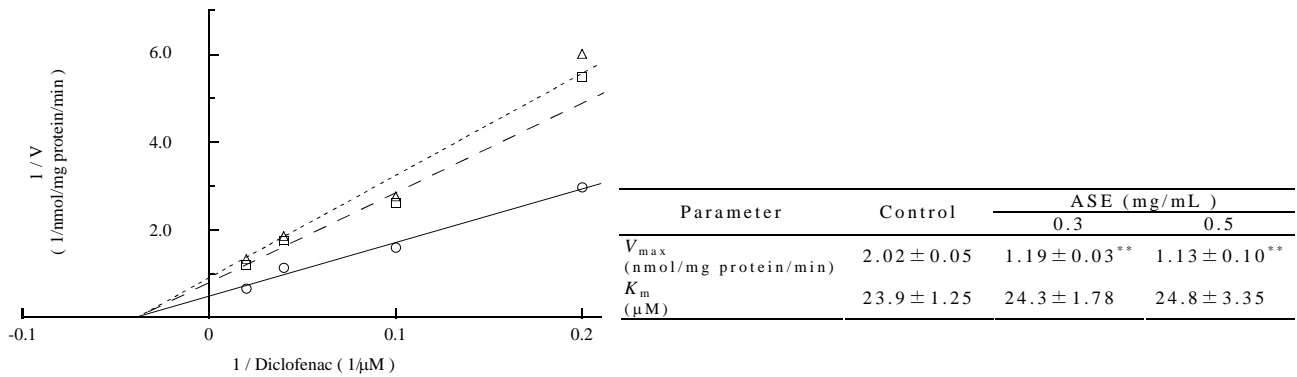


Fig. 5 Lineweaver-Burk plot on diclofenac 4'-hydroxylase activity in human liver microsomes

Human liver microsomes were incubated with diclofenac (0~50 μ M) in the presence (\square ; 0.3 mg/mL, \triangle ; 0.5 mg/mL) or absence (\circ) of ASE for 30 min at 37 °C. Each value represents the mean \pm S.D. for three experiments. Significantly different from the control, $**p < 0.01$.

さらに、CYP2C9 の典型的な基質であるトルブタミドのラットにおける体内動態に対するASEの影響を検討したところ、ASE 400 mg/kg の同時投与で最高血中濃度到達時間の遅延が認められ、投与 0-6 時間のAUC が約165% に上昇した (Fig. 6)。

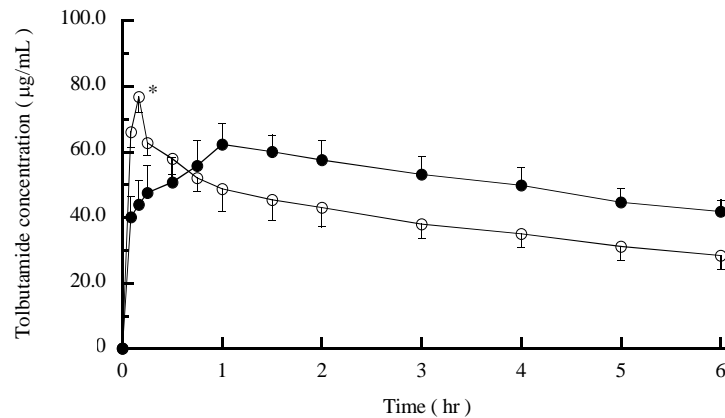


Fig. 6 Effects of ASE oral administration on plasma tolbutamide concentration-time profile in rats

A 10 mg/kg dose of tolbutamide was administered to male Wistar rats with (\bullet) or without (\circ) ASE (400 mg/kg). Each value represents the mean \pm S.D. for four to five rats. Significantly different from the control, $*p < 0.05$.

3. 糖質吸収抑制作用

糖質吸収関連酵素である α -アミラーゼ (AM) および α -グルコシダーゼ (GH) に対するASEの影響について検討した。AM活性に対する影響は認められなかったが、GH活性はGH阻害剤のアカルボースと同様に濃度依存的かつ有意な阻害が認められた (Fig. 7)。速度論的解析の結果、 V_{max} 値に変化はなく、 K_m 値が有意に増加したことから、競合的な阻害形式が考えられた。

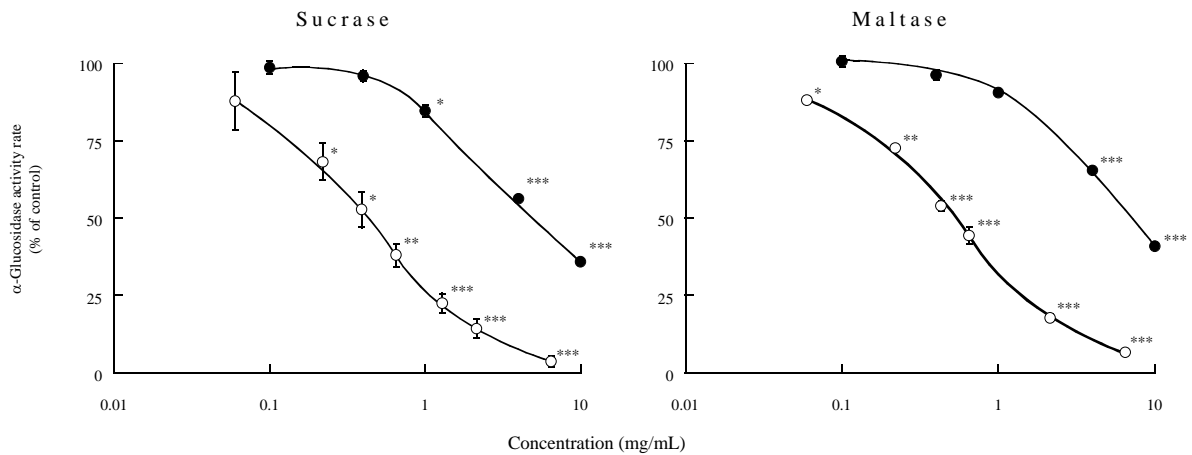


Fig. 7 Effects of ASE and acarbose addition on α -glucosidase activity

Each value represents the mean \pm S.D. for four data ((●) ASE and (○) acarbose). Significantly different from the control, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

次に、グルコーストランスポーター (GLUT) 2介在のグルコース取込みに対するASEの影響を、特異的基質である2'-デオキシグルコース (DG) を用いて検討した。ASEの添加により、Caco-2細胞内へのDG取込みはGLUT2阻害剤のフロレチンと同様に濃度依存的かつ有意に阻害された (Fig. 8)。速度論的解析の結果、 K_d 値に変化はなく、単純拡散による細胞内取込みに対するASEの影響はないと考えられた。一方、 K_m 値に変化はなく、 V_{max} 値に有意な低下が見られたことから、この阻害は非競合的な阻害機構であると考えられた。

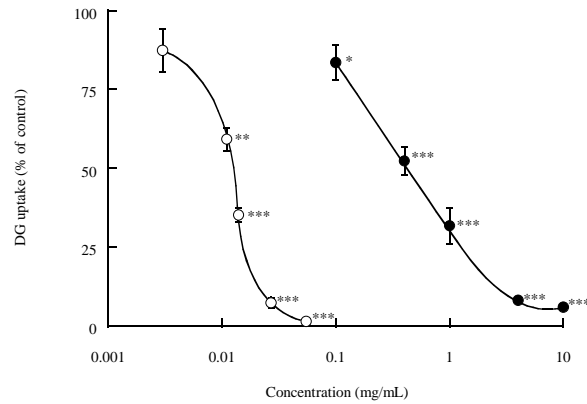


Fig. 8 Effects of ASE and phloretin on DG uptake in Caco-2 cell monolayers

Each value represents the mean \pm S.D. for four data ((●) ASE and (○) phloretin). Significantly different from the control, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

さらに、2型糖尿病モデル動物である *db/db* マウスを用いて、スクロース負荷後の耐糖能および小腸GH活性に対するASE投与の影響について検討した。スクロース負荷による耐糖能試験では、3日間のASE経口投与群は対照群と比較して低い血糖値を示し、負荷30分後の血糖値がインスリン抵抗性に影響することなく有意に減少した (Fig. 9)。また、ASE投与群の摘出小腸におけるGH活性は、対照群と比較して有意に低かった。

以上より、ASEは小腸GH活性およびGLUT2活性を阻害することにより、グルコースの吸収過程を阻害して血糖値の上昇を抑制していることが判明した。

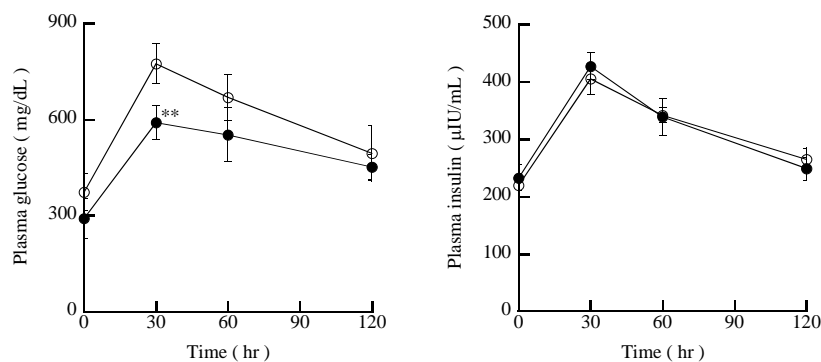


Fig. 9 Effects of ASE oral administration for 3 days on plasma glucose and insulin levels after oral administration of sucrose in *db/db* mice

Each value represents the mean \pm S.D. for four data ((●) ASE and (○) control). Significantly different between the groups, ** $p < 0.01$.

4. まとめ

McRaeが報告したエゾウコギの摂取によるジゴキシンの血中濃度の上昇は、エゾウコギによるP-gpを介した薬物輸送活性の阻害作用によるジゴキシンの消化管への排出抑制に加え、小腸CYP3A4活性を阻害することによるジゴキシンの吸収率の増加、さらに肝CYP3A4活性を阻害することによる肝代謝の遅延により誘発されたものと結論づけられた。一方、CYP2C9についても、その活性を阻害することが示唆されたが、その他のCYPが関与する食-薬間相互作用の可能性は否定された。一度に大量のエゾウコギを摂取しないこと、もしくはエゾウコギを内服薬と同時摂取する場合は少なくとも4時間以上の間隔を空けるなど、薬剤師による適切な服薬指導を受ければ、エゾウコギを含有する健康食品やサプリメントによる有害事象は防げるものと考えられる。

また、ASEは弱いながらも小腸GHおよびGLUT2活性を阻害することにより、糖負荷後の血糖値の上昇を抑制したことから、糖質吸収抑制作用に起因する食後高血糖の是正を機序とする2型糖尿病の予防あるいは予後改善を目的とした機能性食品素材として有用であると考えられた。

以上