

調査研究課題 薬物の腸管吸収に影響を与える漢方薬成分の解析

徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部臨床薬剤学分野 川添和義
(〒770-8503 徳島市蔵本町 2-50-1 徳島大学病院薬剤部 TEL 088-633-7471)

要旨

漢方薬成分が他の医薬品に与える影響について検討する目的で、小腸上皮モデルにおける CYP3A4 タンパク量が漢方薬成分によりどのような影響を受けるかを調べた。モデルとしてヒト結腸癌由来細胞である Caco-2 を用い、これに $1\alpha,25\text{-dihydroxyvitamin D}_3$ を 3 週間作用させることにより CYP3A4 を発現させて、この消失速度に対して漢方薬成分が銅のような影響を与えるか、その発現タンパク量を比較することにより評価した。チンピ、キジツ、ブクリョウ、タイソウ、サイコ、ビヤクシの各エキスについて検討した結果、キジツの他、これまで肝ミクロソーム CYP3A4 に対して大きな影響与えないと考えられてきたチンピエキスが本モデルにおいて小腸上皮に誘導した CYP3A4 タンパク量を著しく減少させていることが判明した。

1. 調査研究目的

OTC として入手可能な漢方薬と医療用医薬品を含む他の医薬品との併用がもたらす影響についてのエビデンスが少ないことは、一般用医薬品の適正利用の観点からも早急に解決されなければならない課題の 1 つである。天然物である漢方薬が薬物代謝に影響を与えている可能性は十分に考えられるものの、その詳細については十分に検討されていない。そこで、本研究では腸管における漢方薬の影響に焦点を絞り、薬物代謝に大きく影響を与えていると考えられているにもかかわらず、漢方薬ではこれまでほとんど検討されてこなかった腸管上皮における CYP3A4 に与える影響を指標として、漢方薬成分が他の薬剤の吸収、動態にどのような影響を与えるかを評価するものである。細胞モデルとしてヒト小腸上皮モデルである Caco-2 細胞を用い、これに近年開発された方法で CYP3A4 を発現させ、酵素タンパク量が漢方薬エキス（水および ethanol 抽出物）の併存でどのように変化するかについて検討を行うこととした。

Caco-2 細胞は小腸上皮細胞のモデルとして有用であるが、通常腸管において高レベルで発現している CYP3A4 がほとんど発現していない。しかし、最近、Caco-2 細胞に $1\alpha,25\text{-dihydroxyvitamin D}_3$ (calcitriol ; active vitamin D_3 ; 以下 AVD_3) を処理することで、CYP3A4 mRNA およびタンパク質レベルの上昇、並びにミダゾラム水酸化活性の増加が報告されている¹⁾。しかし、その量は AVD_3 非存在下において時間経過とともに消失する。生薬成分がこの消失速度に影響を与えるとすれば、すなわち生薬が腸管代謝において何ら

かの影響を与えると考えられる。報告によると、Caco-2 細胞は AVD₃ 処理により CYP3A4 を発現させた後、AVD₃ 非存在下で 72 時間後も代謝活性が検出可能であるとされている²⁾。そこで本調査研究では、生薬および漢方薬抽出液の長時間作用による影響を評価するモデルとして Caco-2 細胞に各抽出液を 72 時間作用させ発現した CYP3A4 タンパク質量の変動を解析することとした。今回調査対象とした漢方薬は、原料の生薬としてミカン科生薬のチンピ（陳皮 *Aurantii Nobilis Pericarpium*）とキジツ（枳実 *Aurantii Fructus Immatureus*）、およびこれまでに肝ミクロソームにおける CYP に影響を与えるとされてきたセリ科生薬のビャクシ（白芷 *Angelicae Dahuricae Radix*）³⁾、ならびにこれまでに CYP に対する影響の報告が少ないサイコ（柴胡 *Bupleuri Radix*）、ブクリョウ（茯苓 *Hoelen*）、タイソウ（大棗 *Zizyphi Fructus*）とした。

2. 調査研究方法

MTS assay による漢方薬・生薬抽出物の Caco-2 細胞に対する細胞障害性の検討

Caco-2 細胞（American Type Culture Collection HTB-37）を 96 well plate に播き、維持培地（25 mM glucose, 4 mM L-Gln, 0.1 mM non-essential amino acids, 100 I.U. / mL ペニシリン, 100µg/mL ストレプトマイシン, 2.5µg/mL アムホテリシン B を含む Dulbecco's Modified Eagle Medium）に 10 % FBS を加えた培地中、37°C, 5% CO₂ 条件下でコンフルエントになるまで 2~3 日培養した。その後 5 % FBS 培地（維持培地に 45 nM (±)- α -トコフェロール, 100 nM 亜セレン酸ナトリウム, 3 nM 硫酸亜鉛, 5µM 硫酸鉄(II) を添加し, FBS を 5% の濃度で加えたもの）に生薬抽出液（水抽出は、刻み生薬 50 g に蒸留水 300 mL を加え、ハリオグラス株式会社製マイコン煎じ器で 40 分煎じ上げた。それを金網ろ過して刻み生薬を除き、20 mL 程度まで加熱濃縮した。得られた水抽出物から、生薬 1 g 相当量を分取し、蒸留水 1 mL で溶解した。10,000 ×g (r.t.), 30 分遠心後、上清を回収し 0.22µm フィルター（Millipore）を通しサンプルとした。一方、エタノール抽出は、刻み生薬 20 g に 98% ethanol 200 mL を加えウォーターバスで約 70°C, 1 時間加熱した。ろ紙でろ過後、ロータリーエバポレーターで濃縮乾固した。生薬 1 g 相当量を分取し、98% ethanol 500µL, 蒸留水 500µL で溶解し、水抽出物と同様に遠沈、濾過したものをサンプルとした）を培地中でのサンプルの最終濃度が 2 %, 0.2 %, 0.02 % となるよう添加し、72 時間インキュベートした。インキュベーションの後、上清を除き PBS で 3 回洗浄し、FBS free の維持培地 100µL に Cell Titer 96® Aqueous One Solution Reagent を 20µL 加え、4 時間インキュベート後、分光光度計を用いて 490 nm における吸光度を測定した。

生薬抽出液による CYP3A4 タンパク質の変動解析

Caco-2 細胞を 6 well plate に播き、維持培地に 45 nM (±)- α -トコフェロールを加えた 20 % FBS 培地で培養した。10 日後、培地に 100 nM 亜セレン酸ナトリウム, 3 nM 硫酸

亜鉛, 5 μ M 硫酸鉄(II), 250 nM AVD₃を加え FBS 濃度を 5%にした培地 (以下, 分化誘導培地) に交換し, 約 3 日ごとに培地を交換しながらさらに 3 週間培養した。3 週間後, AVD₃を除いて各生薬抽出液を加えた分化誘導培地で 72 時間インキュベートした。各生薬抽出液は前項で確認された細胞障害性のない濃度を添加した。

タンパク量の定量はウエスタンブロッティング法により以下の要領で行った。まず, 細胞を冷却した PBS で 2 回洗浄し, Cell Lysis Buffer (20 mM Tris-HCl(pH7.4), 150 mM 塩化ナトリウム, 1 mM Na₂EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton, 2.5 mM ニリン酸ナトリウム, 1 mM β -グリセロリン酸二ナトリウム, 1 mM Na₃VO₄, 1 μ g/mL ロイペプチン, 1 μ M PMSF) を 1 well あたり 300 μ L 加え, -80 $^{\circ}$ C で凍結後, 氷上で融解した。スクレーパーで細胞を回収し, 氷中で超音波処理し, 12,000 rpm (Roter ; F45-30-11), 4 $^{\circ}$ C, 20 分遠心し, 上清を回収した。得られた細胞抽出液のタンパク質濃度を BCA Protein Assay Reagent Kit

(Thermo SCIENTIFIC) により測定した。作成した細胞抽出液は assay を行うまで-80 $^{\circ}$ C で保存した。

10% ポリアクリルアミドゲルを作成し, 電気泳動装置にセットし細胞抽出液 (総タンパク質量 60 μ g) をアプライした。電極液 (0.025 M Tris, 0.192 M グリシン, 0.1% SDS) を満たし, SDS-PAGE (Stacking gel : 80 V constant, Running gel : 120V constant) を行った。タンパク質分離後, 転写装置 ミニトランスブロットセルに blotting buffer (0.025 M Tris, 0.192 M グリシン, 0.02% SDS, 20% methanol) を満たし, 80V constant で 2 時間, ゲル中のタンパク質を PVDF 膜に転写した。膜を SuperBlock[®] T20 (PBS) Blocking Buffer 中で室温, 1 時間以上振とうし, ブロッキングを行った。膜を 0.05% Tween 20-PBS で 100 倍希釈した Anti-CYP3A4 mouse monoclonal antibody (SantaCruz Biotechnology 社) で 4 $^{\circ}$ C, 一晚処理した。膜を 0.05% Tween 20-PBS 中で 5 分 \times 5 回 激しく振とうし洗浄した後, 2 次抗体として ECL[™] Anti-mouse IgG, HRP-linked sheep antibody (GE Healthcare 社) を 0.05% Tween 20-PBS で 2,000 倍希釈し室温で 1 時間処理した。膜を 0.05% Tween 20-PBS 中で 5 分 \times 5 回 激しく振とうし, 洗浄した後 Amersham[™] ECL[™] Western Blotting Analysis System (GE Healthcare 社) を用いた化学発光の系によりバンドを LAS-4000 EPUV mini (FUJI FILM) で検出した。

PVDF 膜を 0.05% Tween 20-PBS 中で 5 分 \times 4 回 激しく振とうし, 洗浄した後 Restore[®] Western Blot Stripping Buffer 中で室温, 30 分間振とうした。膜を 0.05% Tween 20-PBS 中で 5 分 \times 6 回 激しく振とうし洗浄した後, 前項にしたがってブロッキングを行い, 1 次抗体として anti- β -actin, antibody produced in mouse (SIGMA) を 0.05% Tween 20-PBS で 10,000 倍希釈して膜に処理 (4 $^{\circ}$ C, 一晚) し, loading control とした。

なお, 統計処理として Control 群に対する群間の比較は Dunnett's 検定により有意差検定を行い, P 値を求めた。

3. 調査研究成果

AVD₃による CYP3A4 発現とグレープフルーツ精油の影響

Caco-2 細胞における CYP3A4 変動解析をするにあたり、今回の CYP3A4 発現 Caco-2 細胞における評価系が既報のように利用できるかどうかを調べるため、予備実験としてグレープフルーツ精油（グレープフルーツ果皮から圧搾法で得られた油、以下 GF oil）による Caco-2 細胞の CYP3A4 タンパク質の変動を調べた。

AVD₃ で 3 週間 Caco-2 細胞を培養後、AVD₃ 非含有培地に 10 v/v % GF oil in ethanol を 1/100 容量添加して（GF oil 最終濃度 0.1 v/v %）72 時間作用させた後、細胞抽出液を作製しウエスタブロットニングによる解析を行った。LAS-4000 EPUV mini で検出した CYP3A4 (50.5 kDa) のバンドを Fig. 1 に示す。AVD₃ 未処理群で検出されなかった CYP3A4 が 3 週間の AVD₃ 処理群では検出された。0.1% GF oil を作用させた場合、AVD₃ 処理群よりも CYP3A4 は減少しており、AVD₃ 未処理サンプルと同程度しかバンドが検出されなかった。

この検討から、AVD₃ 処理により CYP3A4 が発現し、72 時間後も検出が可能であることが確認された。

生薬抽出液の Caco-2 細胞に対する細胞障害性

生薬および漢方薬抽出液が Caco-2 細胞に及ぼす細胞障害性を検討するため、各抽出液の最終濃度が 2%、0.2%、0.02% の培地で 72 時間インキュベートし、MTS assay を行った。その結果、キジツ、サイコ、タイソウ、チンピ、ブクリヨウは水、ethanol 抽出エキス共に今回の作用濃度において 90% 以上の生存率が認められた (Fig. 2)。

生薬抽出液による CYP3A4 タンパク質の変動解析

AVD₃ 処理により Caco-2 細胞に CYP3A4 を発現させた後、AVD₃ 非存在下で各生薬抽出液を 72 時間作用させ、発現した CYP3A4 タンパク質がどのように変動するかをウエスタブロットニングにて解析した。LAS-4000 EPUV mini で検出したバンドは Multi Gauge (FUJI FILM) を用いて数値化した。なお、各バンド強度は β -actin (42 kDa) のバンド強度で補正した。

測定の結果、キジツおよびチンピ抽出液は AVD₃ 処理群と比較して CYP3A4 タンパク質を約 50% 減少させ、AVD₃ 未処理群とほぼ同程度であった。また、キジツおよびチンピ ethanol 抽出液処理においても CYP3A4 量は減少していた。また、サイコ、タイソウ、ブクリヨウ水抽出液においては、AVD₃ 処理群と比較して CYP3A4 タンパク質の減少は約 10% であった。一方、タイソウおよびブクリヨウ ethanol 抽出液では水抽出液よりもその作用が強く、約 20% 減少していた。以上の結果から、キジツおよびチンピ抽出液に強い CYP3A4 阻害効果があり、サイコ、タイソウ、ブクリヨウ抽出液では CYP3A4 阻害効果は弱いことがわかった (Fig 3 A-E)。

4. 考察

今回の結果から、キジツおよびチンピ抽出液を作用させることで CYP3A4 は顕著に減少することが判明した。一方、サイコ、タイソウ、ブクリョウ抽出液に関してはこのような顕著な減少はみられず、水抽出液においては約 10%減少し、ethanol 抽出液においても 20%程度減少しているにすぎなかった。

サイコと同じ、セリ科生薬のビヤクシは肝ミクロソームにおいて CYP3A4 活性を強く阻害し、一方、サイコの活性阻害作用は約 30%と弱いことが報告されている³⁾。今回の結果から、サイコ成分は肝臓だけでなく腸管代謝においてもほとんど影響しない可能性が示唆された。またタイソウおよびブクリョウの水抽出液に関してもサイコと同様、腸管の CYP3A4 にはほとんど影響しない可能性が示唆された。しかしタイソウ、ブクリョウでは ethanol 抽出液において、弱いものの CYP3A4 タンパク質を減少させたことから、これらの生薬をアルコール抽出したものは腸管 CYP3A4 を阻害する可能性が示唆された。ethanol 抽出液は脂溶性成分を多く含むと考えられる。したがって今回の結果から、タイソウ、ブクリョウの脂溶性成分は CYP3A4 タンパク質を減少させる作用を有する可能性が示唆された。

一般にタンパク質を減少させるメカニズムとしては以下の 4 点が考えられる。

- i) DNA から mRNA への転写過程の抑制
- ii) mRNA の分解亢進に伴う mRNA の減少による発現の低下
- iii) mRNA からタンパク質への翻訳過程の抑制
- iv) タンパク質分解の亢進

グレープフルーツの成分のうち、bergamottin や 6',7'-dihydroxybergamottin (DHB) などのフラノクマリン類が示す不可逆的かつ持続する CYP3A4 阻害作用^{4,5)}は、酵素の分解促進および mRNA の翻訳の減少によって CYP3A4 タンパク質が減少することに起因し、mRNA への転写の段階には影響しないことが報告されている⁶⁾。本研究では、同じミカン科の生薬であるキジツおよびチンピの抽出液においても CYP3A4 タンパク質が顕著に減少することが判明した。今回は既に発現した CYP3A4 タンパク質を減少させていることから、上記 iv) CYP3A4 タンパク質分解を亢進する可能性が高いと考えられるが、キジツ、チンピ抽出液が CYP3A4 タンパク質を顕著に減少させたメカニズムを解明するためには更なる研究が必要である。

これまでの報告によると、肝ミクロソーム中の CYP3A4 に対するキジツの酵素活性阻害率は約 60%であったのに対し、チンピは約 10%程度であった³⁾。しかし今回の結果から、キジツおよびチンピの抽出液が小腸における CYP3A4 タンパク質を顕著に減少させることが明らかとなった。したがってチンピが腸管での吸収過程において CYP3A4 活性に影響を与える可能性は否定できない。これまでチンピが CYP3A4 タンパク質を減少させたという

報告はなく、活性阻害も前述のように低いと考えられてきた。しかし今回の研究により小腸代謝に対する影響が示唆されたことは、これまで肝ミクロソームのみを用いて行われてきた CYP3A4 に対する研究に限界のあることを示すものと考えられる。肝ミクロソームと小腸の CYP3A4 活性は相同性が高いと言われている⁷⁾が、今回の実験が示したように、今後予期しない相互作用発現を回避するためにも、本研究のような小腸における酵素に対する影響についても的確に評価されなければならないものとする。

5. まとめ

セルフメディケーションにおいて、医薬品の併用による有害事象の発生は最も注視しなければならない点である。しかし、漢方薬をはじめとする天然素材と他の医薬品との相互作用については、天然物が多成分系であるという困難さから未だに十分に検討されていないのが現状である。今回の研究ではこの問題を解決する一つの足がかりとして、腸管モデルとして一般に利用される Caco-2 細胞を用い、生薬および漢方薬抽出液の細胞障害性ならびに AVD₃ により発現させた CYP3A4 の変動を確認することができた。本研究から、これまで報告されてきた肝ミクロソームにおける CYP3A4 に対する影響とは異なる影響を与える生薬成分のあることが明らかになった。小腸は吸収における最初の関門であり、ここでの代謝は無視することができない。医薬品の吸収段階で影響を与える成分を漢方薬が含有していると、一般に長期に服用される漢方薬により、他の薬剤の吸収が影響を受ける可能性の高いことが考えられる。そのような観点からも、本研究結果は臨床において重要な知見の一つであると言える。今回の研究はあくまでも細胞モデルを用いたものであることから、実際のヒトの代謝においてどのような影響があるかは今後の検討を待つ必要があるが、少なくとも、OTC 薬として広く用いられる漢方薬の安易な利用に対する一つの警鐘となり得るものであると考えている。

6. 調査研究発表

東谷香奈，大上知妃呂，野口悠高，阿部真治，川添和義，水口和生，Caco-2 細胞に発現した CYP3A4 に及ぼす生薬抽出物の影響，第 48 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会（2009）

7. 引用文献

- 1) Schmiedlin-Ren P., Thummel KE., Fisher JM., Paine MF., Lown KS., Watkins PB. Expression of enzymatically active CYP3A4 by Caco-2 cells grown on extracellular matrix-coated permeable supports in the presence of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃. *Mol. Pharmacol.* **51**(5), 741-754 (1997).

- 2) Xiao-Long Hou, Kyoko Takahashi, Natsumi Kinoshita, Feng Qiu, Ken Tanaka, Katsuko Komatsu, Koichi Takahashi, Junichi Azuma. Possible inhibitory mechanism of *Curcuma* drugs on CYP3A4 in $1\alpha,25$ dihydroxyvitamin D₃ treated Caco-2 cells. *Int. J. Pharm.* **337**, 169-177 (2007).
- 3) Iwata, H., Tezuka, Y., Usia, T., Kadota, S., Hiratsuka, A., Watabe, T. Inhibition of human liver microsomal CYP3A4 and CYP2D6 by extracts from 78 herbal medicines. *Journal of traditional medicines.* **21**(1), 42-50 (2004).
- 4) Lian-Qing Guo, Katsuyuki Fukuda, Tomihisa Ohta, Yasushi Yamazoe. Role of furanocoumarin derivatives on grapefruit juice-mediated inhibition of human CYP3A activity. *Drug Metab. Dispos.* **28**, 766-771 (2000).
- 5) Kakar SM., Paine MF., Stewart PW., Watkins PB. 6'7'-Dihydroxybergamottin contributes to the grapefruit juice effect. *Clin. Pharmacol. Ther.* **75**(6), 569-579 (2004).
- 6) Lown KS., Bailey DG., Fontana RJ., Janardan SK., Adair CH., Fortlage LA., Brown MB., Guo W., Watkins PB. Grapefruit juice increases felodipine oral availability in humans by decreasing intestinal CYP3A protein expression. *J. Clin. Invest.* **99**(10), 2545-2553 (1997).
- 7) Oliver von Richter, Oliver Burk, Martin F. Fromm, Klaus P. Thon, Michel Eichelbaum, Kari T. Kivistö. Cytochrome P450 3A4 and P-glycoprotein expression in human small intestinal enterocytes and hepatocytes: a comparative analysis in paired tissue specimens. *Clin. Pharmacol. Ther.* **75**(3), 172-183 (2004).

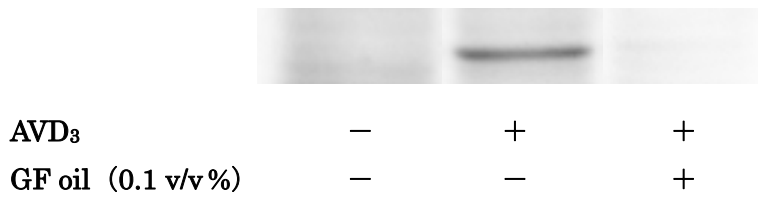


Fig. 1 AVD₃による CYP3A4 発現と GF oil による CYP3A4 タンパク質量の変動

AVD₃を3週間処理後、AVD₃を含まない培地でGF oilを終濃度0.1 v/v%で添加し72時間作用後、ウエスタンブロッティングにてCYP3A4タンパク質解析を行った。
 アプライした総タンパク量は60μgである。

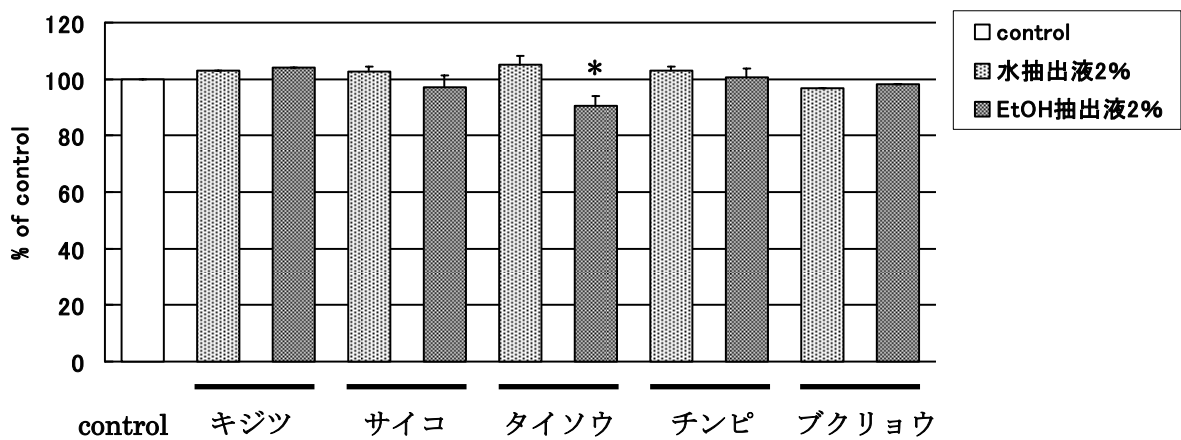


Fig. 2 生薬抽出液の細胞生存率

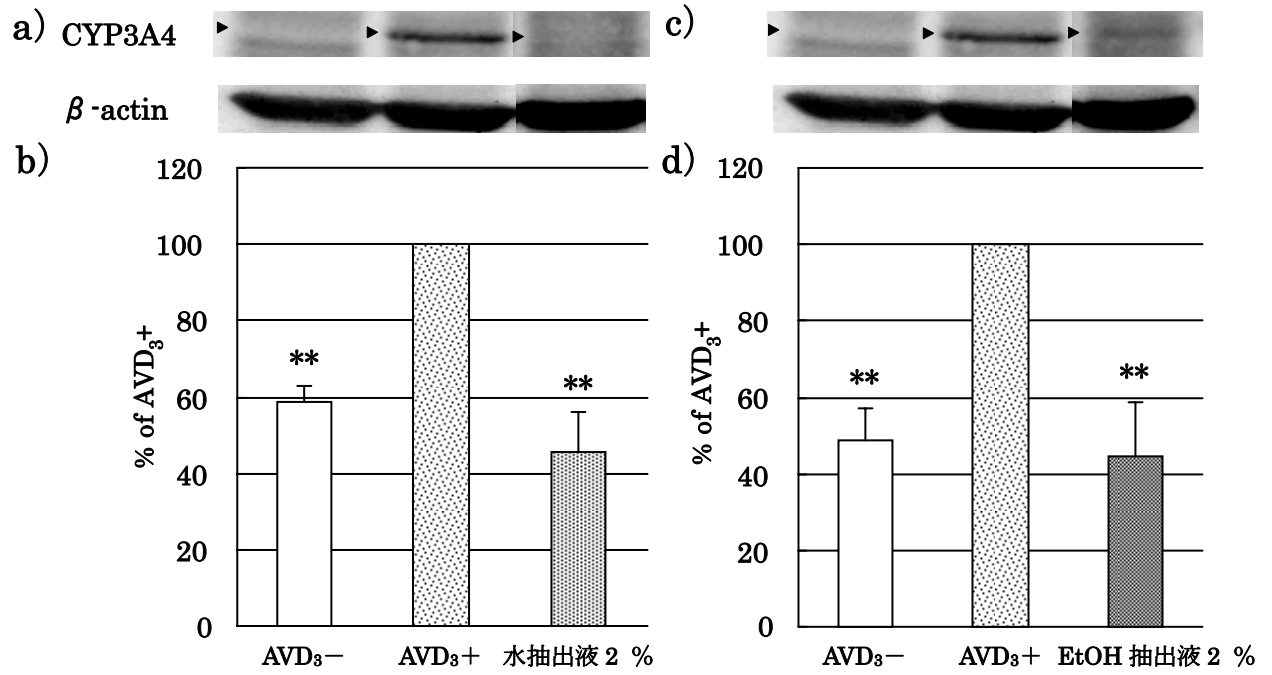
生薬水抽出液および生薬 ethanol 抽出液をそれぞれ2%、0.2%、0.02%の濃度でCaco-2細胞に72時間作用させ、MTS assayを行った。controlは生薬抽出液を含まない培地で72時間インキュベートしたもの。

controlを100%とした2%濃度処理における細胞生存率。

0.2%、0.02%は2%処理と同様に生存率はほぼ100%であった。

means ± S.D. * : $P < 0.01$

A キジツ水抽出液およびEtOH (ethanol) 抽出液



B サイコ水抽出液およびEtOH抽出液

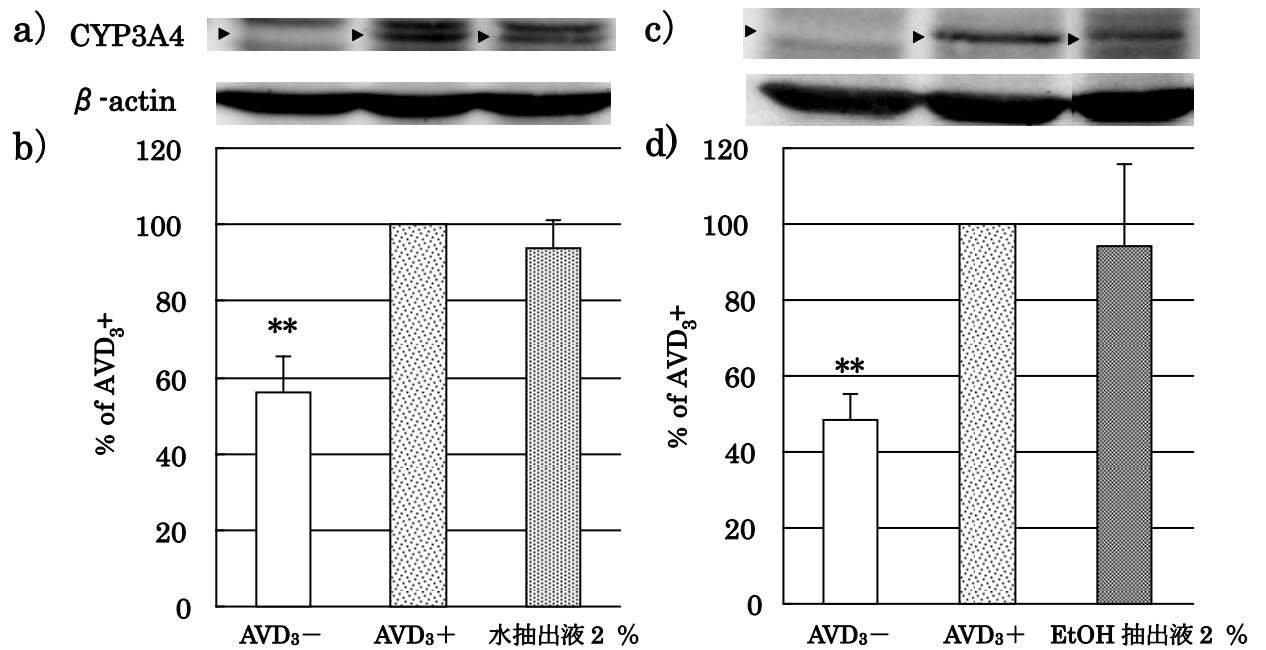


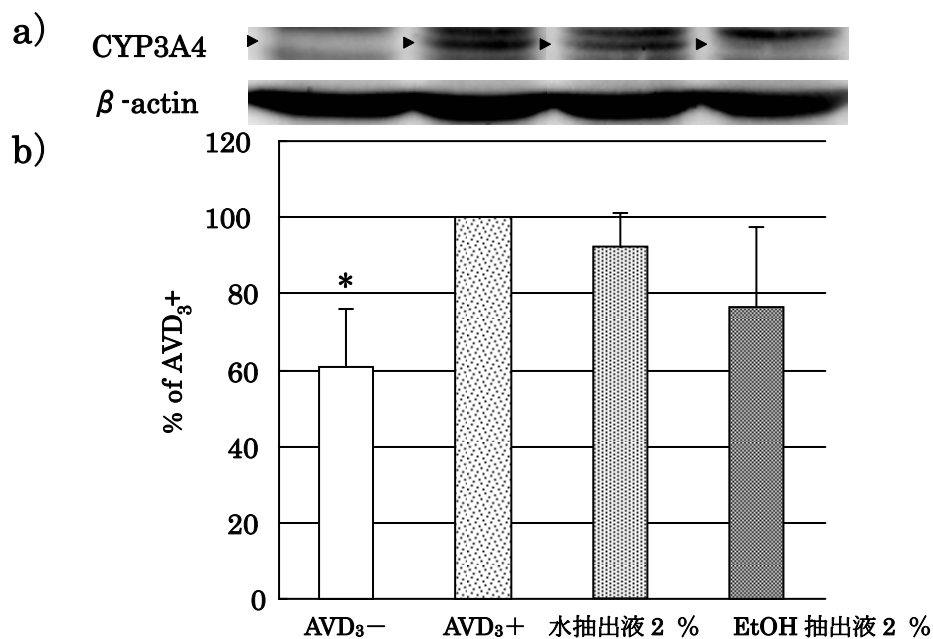
Fig. 3 A, B キジツおよびサイコ抽出液処理による CYP3A4 タンパク質解析

a)およびc) : LAS-4000 mini で検出した各バンド ▶ : CYP3A4 (50.5 kDa)

b)およびd) : バンド強度を β -actin (42 kDa) で補正し AVD₃⁺を 100%としたグラフ

means \pm S.D. **: $P < 0.01$ vs. AVD₃⁺

C タイソウ水抽出液およびEtOH抽出液



D チンピ水抽出液およびEtOH抽出液

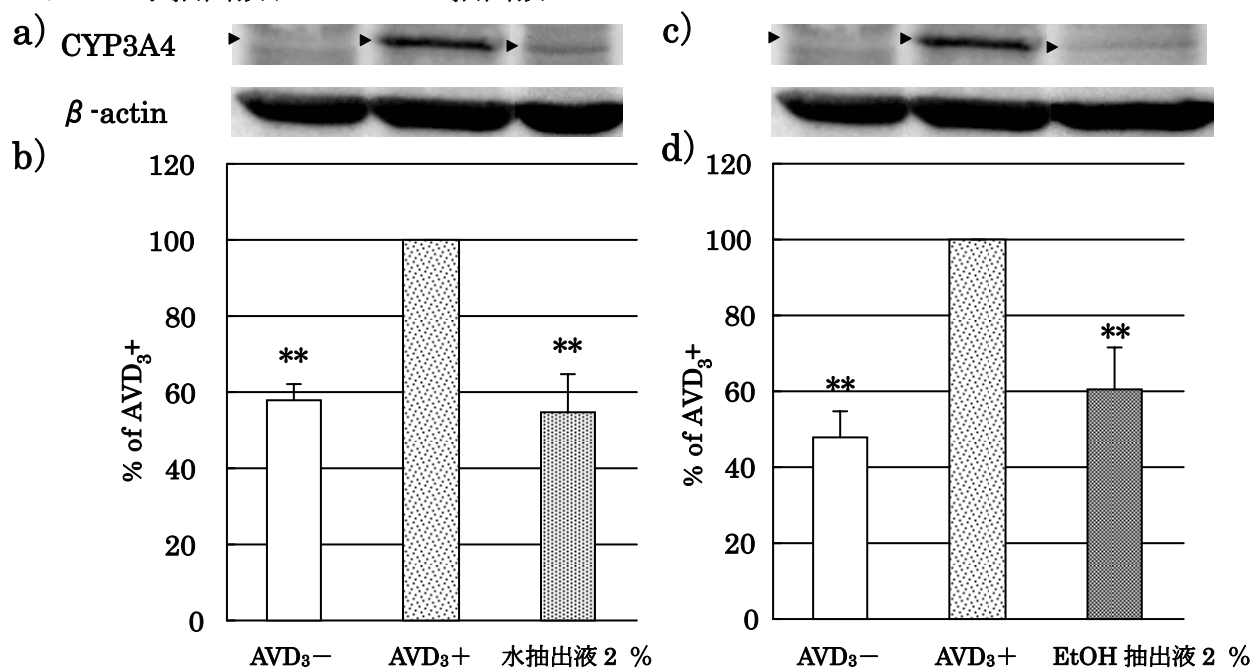


Fig. 3 C, D タイソウおよびチンピ抽出液処理による CYP3A4 タンパク質解析

a)および c) : LAS-4000 mini で検出した各バンド ▶ : CYP3A4 (50.5 kDa)

b)および d) : バンド強度をβ-actin (42 kDa) で補正し AVD₃⁺を 100%としたグラフ

means ± S.D. ** : $P < 0.01$ vs. AVD₃⁺, * : $P < 0.05$ vs. AVD₃⁺

E ブクリヨウ水抽出液およびEtOH抽出液

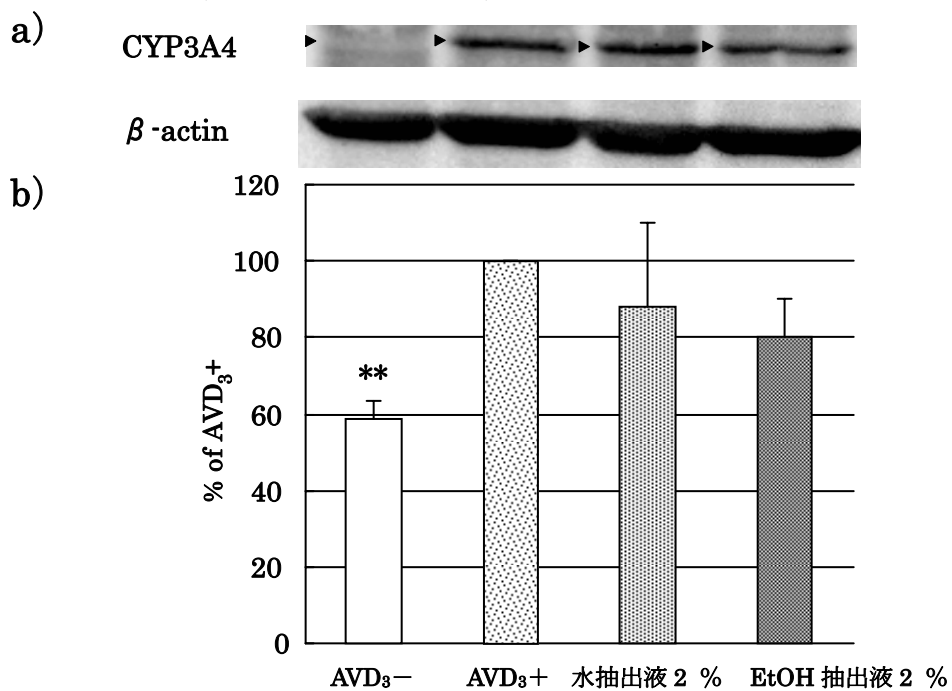


Fig. 3 E ブクリヨウ抽出液処理による CYP3A4 タンパク質解析

a) : LAS-4000 mini で検出した各バンド ▶ : CYP3A4 (50.5 kDa)

b) : バンド強度を β -actin (42 kDa) で補正し AVD₃⁺を 100%としたグラフ

means \pm S.D. ** : $P < 0.01$ vs. AVD₃⁺