

健康食品等のCYP3A4阻害作用スクリーニング試験について

大西美知代 望月美菜子 大倉敏裕 岡 裕三 土井光徳

Screening Test of Metabolic Inhibitory Effect of Health-promoting Food Components on CYP3A4

Michiyo OHNISHI*1, Minako MOCHIZUKI, Toshihiro OHKURA,
Yuzou OKA, Mitsunori DOI

To assess the possibility of pharmacokinetic drug interaction between health-promoting food components and drugs, we investigated the reversible and irreversible inhibitory effect of health-promoting food components on CYP3A4 activity.

In vitro, inhibition on the metabolism mediated by CYP3A4 is determined on the basis of the hydroxylation of testosterone by using HPLC analysis. Among 39 tested health-promoting food extracts, 7 extracts exhibited inhibitory effect higher than or equal to 50% on CYP3A4 activity. Three of them had inhibitory effect greater than or equal to that by grapefruit juice(GFJ). Compared with GFJ, none of those health-promoting foods by daily intake had higher inhibitory effect on CYP3A4 activity.

Residual CYP3A4 activity in any 28 of 39 solutions tested, each of which has one different health-promoting food component, decreased markedly depending on preincubation time. This result suggests that those health-promoting food components have mechanism based inhibition on CYP3A4.

Keywords : CYP3A4, inhibitory effect, health-promoting food, mechanism based inhibition

はじめに

健康食品とは、国が定めた安全性や有効性に関する基準等を満たした特定保健用食品や栄養機能食品のみではなく、広く健康の保持増進に資する食品として販売・利用され、多種多様な成分を含有した一般食品も含む。

近年、健康増進や補完・代替医療への関心が高まっており、医薬品とともにこれら健康食品を摂取する人の割合が増加し、医薬品との相互作用の可能性はますます高くなっている¹⁾。

しかし、医薬品間の相互作用に比べると、健康食品と医薬品の相互作用に関しては、科学的な検証データが少ないのが現状であり、この相互作用を検討する必要がある。

今回、市販の健康食品等と薬物の相互作用についての基礎資料を得ることを目的に、薬物代謝酵素の一つで、医薬品の代謝にかかわる割合が最も高い CYP3A4 に対し、*in vitro* における健康食品等との阻害作用スクリーニング試験を行い、可逆的阻害及び不可逆的阻害 (mechanism based inhibition :MBI) の有無等について検討したので報告する。

試料及び方法

1 試料

複数の健康食品販売サイトの2007～2009年の年間販売数上位の商品から表1に示す39品目の健康食品等を選定し、図1の方法で抽出したものを試験溶液とした。

試験に使用した試薬等は、リン酸緩衝液 (0.5M

potassium phosphate, pH7.4), NADPHジェネレーションシステムソリューションA液(NADP + glucose-6-phosphate·MgCl₂), NADPHジェネレーションシステムソリューションB液(glucose-6-phosphate dehydrogenase), 6β-hydroxytestosterone, CYP3A4(+リダクターゼ+b5:パキユロ系)は、日本BD社製を、testosteroneは、Sigma-Aldrich製を、dexamethasoneは日本メルク萬有(株)製を、アセトニトリル(HPLC用)、メタノール(HPLC用)、N,N-ジメチルホルムアミド(DMF; HPLC用)は関東化学(株)製を用いた。ろ過にはPTFE製0.2μmシリンジレスフィルターMini-UniPrep((株)ワットマン)を使用した。

2 方法

in vitro のCYP3A4阻害作用スクリーニング試験は、CYP3A4の基質にtestosteroneを用い、その代謝物で

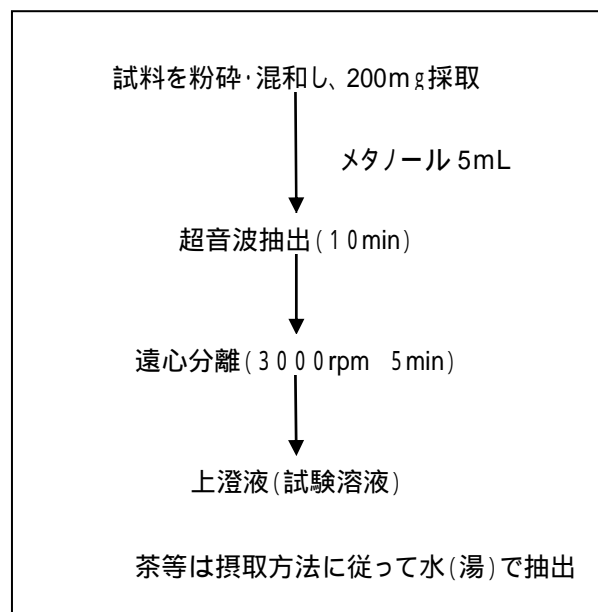


図1 試料の前処理方法

表1 調査対象健康食品等

健康食品等 No.	表示している主な原材料等	形態	表示している1日の摂取量
1	白インゲン豆	カプセル	3粒
2	プエラリアミリフィカ	錠剤型	1粒
3	ミルクカルシウム	錠剤型	5粒
4	ウコン	錠剤型	2粒
5	セージ	錠剤型	6粒
6	コンニャクイモ	粉末	1包
7	インスリーナ	錠剤型	6粒
8	プエラリアミリフィカ	錠剤型	6粒
9	カルコン	錠剤型	3粒
10	真珠層	錠剤型	3粒
11	脱脂ココアパウダー	錠剤型	2粒
12	コラーゲンペプチド	錠剤型	6粒
13	キビ種子	錠剤型	3粒
14	シャンピニオンエキス	錠剤型	6粒
15	緑茶末	粉末	2包
16	大豆胚芽抽出物	錠剤型	3粒
17	混合茶	ティーバッグ	1包 200mL(湯)
18	桑葉	錠剤型	8粒
19	プエラリアミリフィカ	カプセル	2粒
20	混合茶	ティーバッグ	1包 200mL(湯)
21	杜仲葉	粉末	1包 500mL(水)
22	混合茶	ティーバッグ	1包 300mL(湯)
23	金時しょうが	粉末	1包 120mL(湯)
24	クミスクチン	ティーバッグ	1包 200mL(湯)
25	混合茶	ティーバッグ	1包 1500mL(湯)
26	混合茶	ティーバッグ	1包 1000mL(湯)
27	混合茶	ティーバッグ	1包 200mL(湯)
28	葉酸	カプセル	1粒
29	フェルラ酸	顆粒	2包
30	ビルベリーエキス	カプセル	3粒
31	ビルベリーエキス	カプセル	1粒
32	マリーゴールド	カプセル	1粒
33	緑茶エキス	錠剤型	8粒
34	ブルーベリーエキス	ハードカプセル	1粒
35	野菜末	錠剤型	4粒
36	果実エキス	錠剤型	4粒
37	香酢粉末	ハードカプセル	3粒
38	DHA含有精製魚油	ハードカプセル	4粒
39	ビルベリーエキス	ハードカプセル	4粒

ある6 β -hydroxytestosteroneの生成過程における各試料の影響について検討した。反応は全量500 μ Lで100mol/Lリン酸緩衝液(pH7.4)の条件下で行い,表2の条件で,HPLCにより測定し,6 β -hydroxytestosteroneを内部標準法(内標準物質:dexamethasone)で定量した。検量線を図2に示した。

表2 HPLC 装置条件

装置	Alliance 2695 (Waters)
検出器	PDA 2996 (Waters) 240.0nm
カラム	Atlantis T3 (Waters) (2.1 \times 150 mm, 5 μ m)
移動相	A:H ₂ O B:CH ₃ CN A:B 60:40(0-3min) -25:75(5-10min) -60:40(10min)
流速	0.25mL/min
カラム温度	35
注入量	2.0 μ L

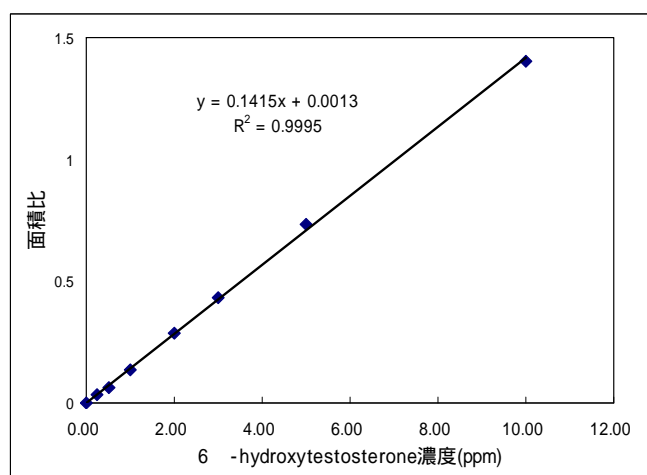


図2 6 -hydroxytestosterone の検量線

結果及び考察

1 スクリーニング試験方法の検討

反応時間(インキュベーション時間)の検討

薬物代謝酵素は,反応させる基質の種類により,反応時間 - 代謝物産生量の間直線性が成立する範囲が異なるため,実験系ごとに反応時間(インキュベーション時間)を検討する必要があることから,スクリーニング試験のインキュベーション時間について検討した。

リン酸緩衝液中に,薬物代謝酵素CYP3A4(10pmol)及び,基質(testosterone 200 μ mol/L),NADPHジェネレーションシステムソリューションA・B液(1.3mmol/L NADP+,各3.3mmol/L MgCl₂, glucose-6-phosphate, 0.4U/mL glucose-6-phosphate dehydrogenase)を加え,5~50分の範囲で反応時間を変化させて,37でインキュベーションし,アセトニトリル(内標準物質:dexamethasone(30 μ g/mL))250 μ Lで反応停止させた。その後,遠心分離(10⁴ \times g 3min)を行い,上澄液をろ過し(PTFE 0.2 μ m),HPLCにより6 β -hydroxytestosteroneを測定した。その結果,図3に示したように,反応時間 - 代謝物産生量の間直線性が認められる10分をインキュベーション時間に設定した。

有機溶媒の検討

今回のスクリーニング試験で使用する基質や被検物質は,水に対する溶解性が低いものと想定され,通常,メタノール,アセトニトリル,DMSOなどの有機溶媒に溶解し,それを反応系に添加して実施している。

しかし,有機溶媒自身がCYP阻害効果を示すため,有機溶媒の影響については各反応系のCYP阻害試験ごとに検討する必要がある。

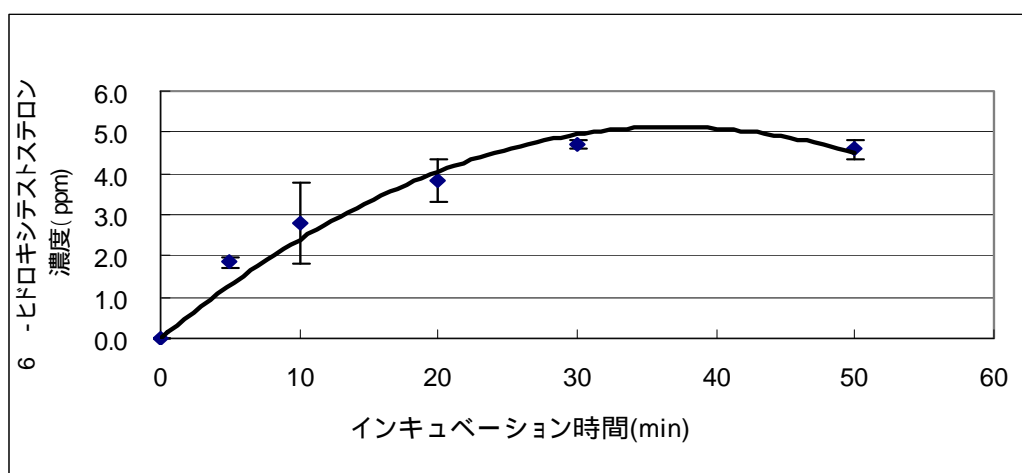


図3 6 β -hydroxytestosterone の生成量の経時的変化(n = 2)

CYP3A4に対する活性阻害作用は、アセトニトリル、DMSOに比較し、メタノールがもっとも小さいが³⁾、高濃度の試薬や被検物質等は、メタノールに完全に溶解しないおそれがことから、溶解性の高いDMF 使用について検討した。インキュベーション時間を10分とし、メタノールの添加濃度を2～9%、DMFの添加濃度を2～5%に変化させた時のCYP3A4活性阻害率を次式により求め、CYP3A4活性阻害作用を比較した。

CYP3A4阻害率(%) (to control) =

$$1 - \frac{\text{有機溶媒添加時の代謝物量(ppm)}}{\text{陰性コントロールの代謝物量(ppm)}} \times 100$$

その結果図4のとおりDMFは低濃度においてもメタノールよりも強いCYP3A4活性阻害作用が認められ、試薬溶解や被検物質の抽出に使用することにより、実験系に影響を与えるので、DMFは試験に使用する溶媒としては不適當であることが分かった。また、メタノールも濃度が高くなると、阻害率が高くなるため、試験溶液中のメタノール濃度は3%以下に設定することとした。

2 可逆的阻害の検討

図5に示したように、リン酸緩衝液中に、薬物代謝酵素CYP3A4(10pmol)及び健康食品等から抽出した試験溶液を15μL添加後、基質(testosterone 200μmol/L)を添

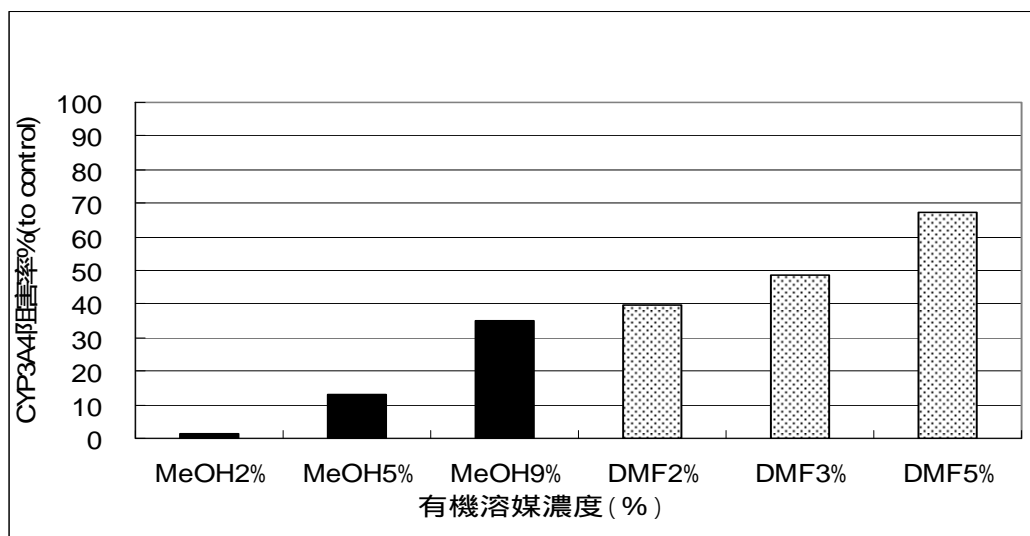


図4 有機溶媒によるCYP3A4活性阻害作用の影響について(n=2)

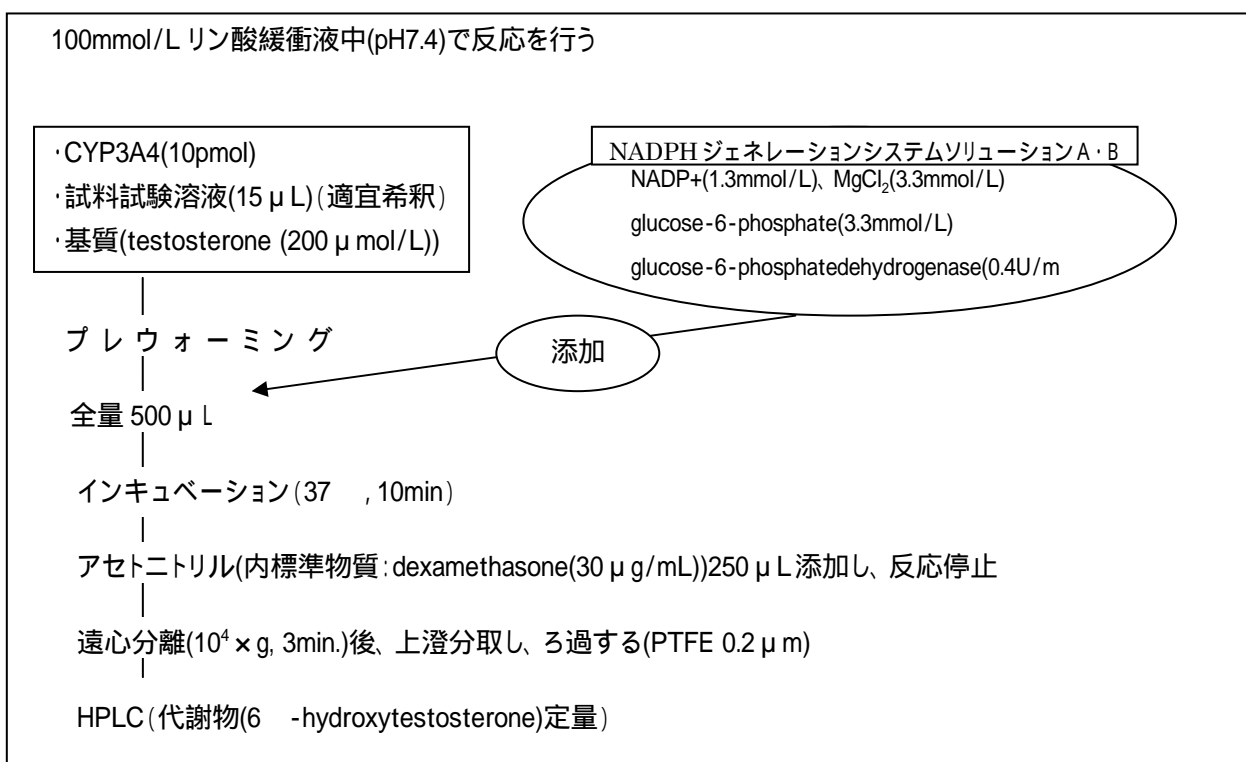


図5 可逆的阻害の試験方法

加して、37℃でプレウォーミングを行った。その後、NADPHジェネレーションシステムソリューションA・B液(1.3mmol/L NADP⁺, 各3.3mmol/L MgCl₂, glucose-6-phosphate, 0.4U/mL glucose-6-phosphate dehydrogenase)を加え、代謝反応を開始し、37℃で10分間反応させた後、アセトニトリル(内標準物質:dexamethasone(30μg/mL))250μLで反応停止させた。その後、遠心分離(10⁴×g 3min)を行い、上澄液をろ過(PTFE 0.2μm)してHPLCにより代謝物(6β-hydroxy testosterone)を測定し、これらの測定結果から、CYP3A4の阻害率を下記の式より求めた。また、CYP3A4阻害作用を持つことが知られているグレープフルーツジュース(GFJ)についても、市販のものを使用し、試料と同様に試験を行った。

$$\text{サンプルのCYP3A4阻害率(\%)} = (1 - A/B) \times 100$$

A = サンプルの代謝物濃度

B = 陰性コントロールの代謝物濃度

39品目の健康食品等について、CYP3A4に対する可逆的阻害のスクリーニング試験を行った結果(n=2)を、図6にまとめた。39品目中、33品目が10%以上のCYP3A4阻害率を示し、そのうち7品目が50%以上の阻害率を示し、3品目はGFJと同等又はそれ以上の高い阻害率を示した。

なお、阻害率の測定精度から10%未満は阻害作用なしとした。

3 IC₅₀値(50% inhibition concentration)の算出

可逆的阻害の検討において、50%以上の高い阻害率を示した7品目の試料及びGFJについて、CYP3A4に対する阻害強度を評価するために、IC₅₀値を算出した。試験方法は、基質(testosterone)濃度を一定にし、試料濃度を適宜変化させて(6濃度)、CYP3A4阻害率を求め、ロジステック回帰式(4パラメータ)によりIC₅₀値を算出した。

また、阻害率50%以下の試料については、GFJの測定結果から求めたロジステック回帰式(4パラメータ)により、IC₅₀値を推計した。

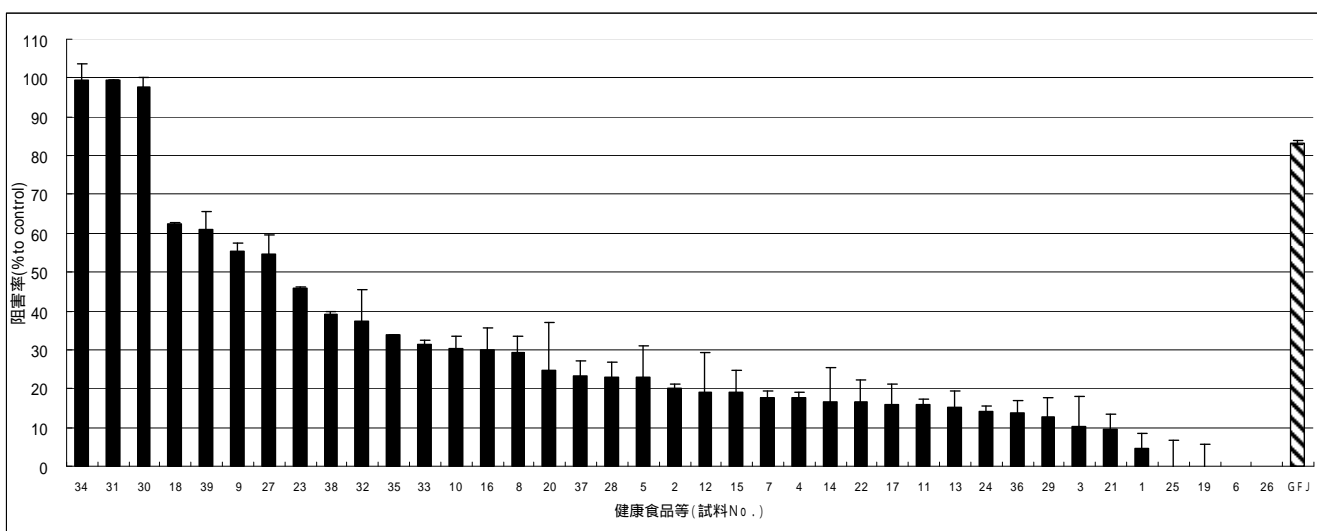


図6 健康食品等のCYP3A4可逆的阻害のスクリーニング試験結果(n=2)

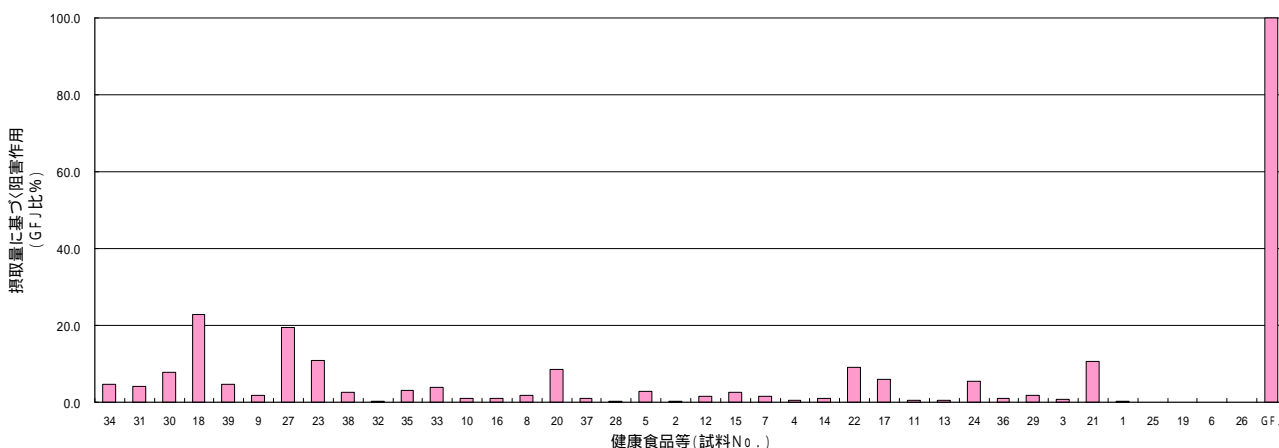


図7 1日摂取量におけるGFJと健康食品の阻害強度比較

基質の代謝が50%阻害されるときにの被検物質の濃度基質の代謝が50%阻害されるときにの被検物質の濃度を示すIC₅₀値は、値が小さいほど阻害強度は大きいことを示すが、健康食品等を試料とした今回の試験結果を評価するために、1日の摂取量を考慮した阻害作用の強度を下記の式により求めた。

その結果、図7に示したように、50%以上の阻害率を示した7品目の試料は1.8~22.7%であり、また、50%以下の阻害率を示した26品目の試料については、GFJ 200mLの阻害強度に対し0.3~10.9%であった。摂取量に基づく阻害作用の強度(GFJ比)(%) =

$$\frac{a / (b \times c) \times 100}{d / (e \times c)}$$

- a = 健康食品等の一日の摂取量(mg)
- b = 試料のIC₅₀値(mg/mL)
- c = 試験溶液量(mL)
- d = GFJ200mLの摂取量(mg)
- e = GFJのIC₅₀値(mg/mL)

3. 不可逆的阻害(MBL)の検討

ある種の物質は、薬物代謝酵素により代謝をうけて、より高い反応性を持つ代謝物に変換される。その代謝物が薬物代謝酵素と結合することにより、その酵素を不可逆的に不活性化させる。

このような代謝阻害を MBI (mechanism based inhibition) といい、MBI を引き起こす物質は、体内から消失しても、新たな CYP3A4 が生成されるまで阻害効果が持続するため、薬との併用により重篤な副作用を起こす可能性があると言われている⁽⁵⁾⁽⁶⁾。

MBIの試験方法は、図8に示したように、リン酸緩衝液中に、CYP3A4(10pmol)、及び試験溶液15μLを添加し

37 でプレウォーミングを行った後、NADPHジェネレーションシステムソリューションA・B液を加え、代謝反応を開始し、プレインキュベーションを、0分、15分、30分実施した。その後、基質(testosterone 200μmol/L)を添加し、37 で10分間反応させた後、アセトニトリル(内標準物質:dexamethasone (30μg/mL))250μLで反応を停止させ、

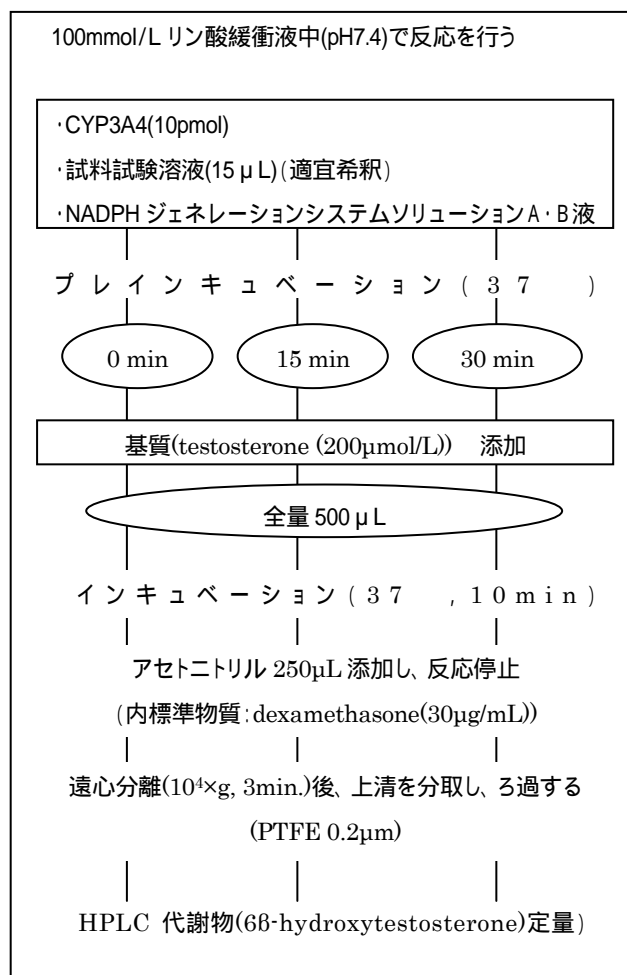


図8 不可逆的阻害(MBI)の試験方法

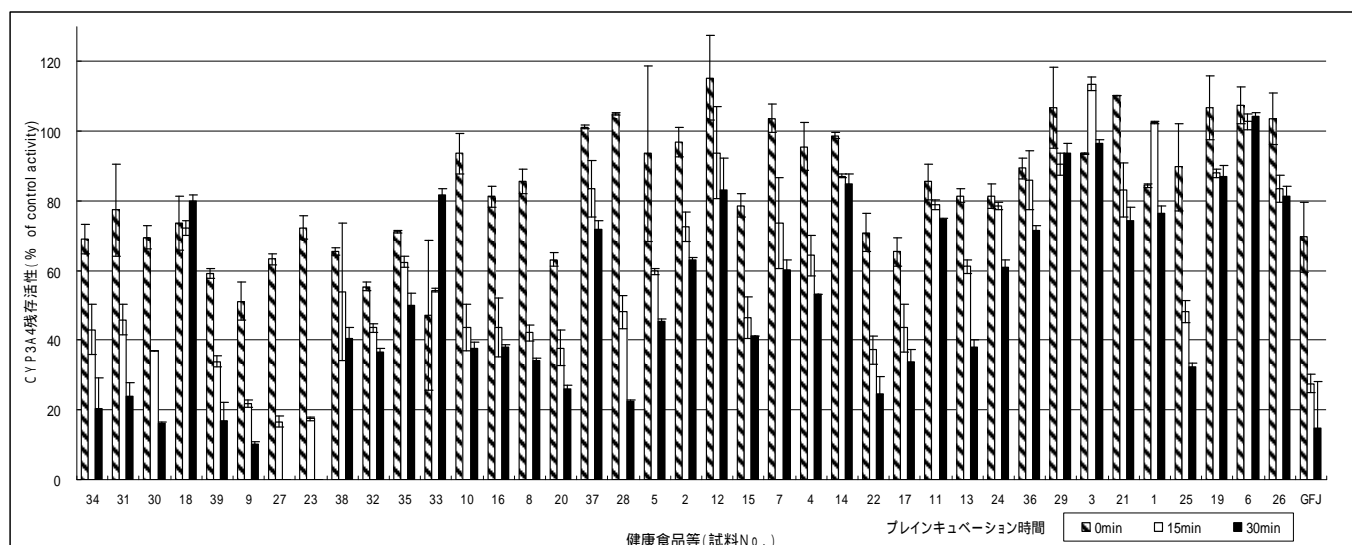


図9 健康食品等の不可逆的阻害(MBI)のスクリーニング試験結果(n = 2)

遠心分離(10⁴×g 3min)を行い、上澄液をろ過(PTFE 0.2μm)しHPLCにより代謝物(6β-hydroxytestosterone)を測定した。

以下の式により、CYP3A4活性残存率を求めた。

$$\text{CYP3A4 活性残存率 (\%)} = (\alpha/\beta) \times 100$$

$$\left(\begin{array}{l} \alpha = \text{サンプルの代謝物濃度} \\ \beta = \text{陰性コントロールの代謝物濃度} \end{array} \right)$$

また、CYP3A4不可逆的阻害作用がある⁶⁾と言われていたGFJについても試料と同様に試験を行った。可逆的阻害のスクリーニング試験において、阻害率の高かった5品目及びGFJについては、IC₅₀値を参考にし、プレインキュベーション30分におけるCYP3A4活性残存率が0%にならないよう適宜希釈して試験を行った。

不可逆的阻害試験の結果(n=2)を図9に示した。市販の健康食品等39品目中、28品目はプレインキュベーション時間に依存してCYP3A4活性残存率が顕著に低下しており、MBIの存在が示唆された。

阻害強度については、今後さらに詳細な試験が必要であるが、これらの中には、可逆的阻害のスクリーニング試験において、阻害率が非常に低かったものや、阻害が認められなかったものも含まれていた。

今後、より詳細に評価するためには、可逆的阻害における阻害定数(K_i)や、MBIにおける見かけの阻害定数(K_{i,app})、最大不活性定数(K_{inact})等のパラメーターを求める調査が必要と思われる。

まとめ

1 市販の健康食品等39品目について、CYP3A4の可逆的阻害作用スクリーニング試験を行ったところ、39品目中7品目において50%以上の高い阻害率を示した。そ

のうち3品目は、GFJと同等又は、それ以上の高い阻害率を示した。

- 2 50%以上の高い阻害率を示した7品目について、IC₅₀値を求め、健康食品の1日摂取量を考慮した上で、GFJ 200mLとCYP3A4阻害作用の強度を比較すると、いずれの試料もGFJの阻害作用強度の1.8~22.8%と小さい値であった。
- 3 可逆的阻害作用スクリーニング試験において、阻害率50%以下の試料について、GFJの測定結果から求めたロジステック回帰式(4パラメータ)によりIC₅₀値を推計し、1日摂取量に基づく阻害作用の強度を求めたところ、GFJ 200mLの阻害強度に対し、0.3~10.9%であった。
- 4 市販の健康食品等39品目について、不可逆的阻(MBI)のスクリーニング試験を行ったところ、可逆的阻害スクリーニング試験において阻害率が非常に低かったものや、阻害が認められなかったものを含む、28品目についてMBIの存在が示唆された。

文献

- 1) 内田信也 ほか:ぶんせき, 2007, 454
- 2) 佐藤哲男 ほか:薬物動態研究ガイド-創薬から臨床へ-, (株)エル・アイ・シー (2003)
- 3) Chauret et al: Drug Metab Dispos, 26 1-4(1998)
- 4) Busby et al: Drug Metab Dispos, 27, 246-249 (1999)
- 5) 熊谷真希 ほか: SCAS NEWS 2009-I, 29, 7-10
- 6) 吉成浩一: 日薬理誌, 134, 285-288 (2009)
- 7) 中川俊人: 日薬理誌, 135, 84-86 (2010)
- 8) CDER CBER: Guidance for Industry, Drug Interaction Studies –Study Design, Data Analysis, and Implications for Dosing and Labeling Draft Guidance (September 2006)