

**機能性食品又はサプリメントと医薬品の相互作用に関する研究. II.
ラットにおけるジルチアゼムの体内動態に及ぼす
アガリクス茸及びプロポリスエキス同時投与の影響**

Studies on Interactions between Functional Foods or Dietary Supplements and Medicines. II. Effects of *Agaricus blazei* Murill and Propolis Extract on the Pharmacokinetics of Diltiazem in Rats

大西 憲明

Noriaki Ohnishi
京都薬科大学薬学部
Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Kyoto Pharmaceutical University

中川 政人

Masato Nakagawa
京都薬科大学薬学部
Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Kyoto Pharmaceutical University

西川 翠

Midori Nishikawa
京都薬科大学薬学部
Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Kyoto Pharmaceutical University

山下 正行

Masayuki Yamashita
京都薬科大学薬学部
Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Kyoto Pharmaceutical University

太田 俊作

Shunsaku Ohta
京都薬科大学薬学部
Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Kyoto Pharmaceutical University

吉岡 睦展

Mutsunobu Yoshioka
宝塚市立病院薬剤部
Department of Pharmacy, Takarazuka
City Hospital

黒田 和夫

Kazuo Kuroda
宝塚市立病院薬剤部
Department of Pharmacy, Takarazuka
City Hospital

高良 恒史

Koji Takara
京都薬科大学薬学部
Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Kyoto Pharmaceutical University

横山 照由

Teruyoshi Yokoyama
京都薬科大学薬学部
Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Kyoto Pharmaceutical University

Studies on Interactions between Functional Foods or Dietary Supplements and Medicines. II. Effects of *Agaricus blazei* Murill and Propolis Extract on the Pharmacokinetics of Diltiazem in Rats

機能性食品又はサプリメントと医薬品の相互作用に関する研究. II. ラットにおけるジルチアゼムの体内動態に及ぼすアガリクス茸及びプロポリスエキス同時投与の影響

大西 憲明¹⁾ 中川 政人²⁾ 西川 翠²⁾ 山下 正行²⁾ 太田 俊作³⁾ 吉岡 健展³⁾ 黒田 和夫³⁾ 高良 恒史³⁾ 横山 照由³⁾
 Noriaki Ohishi Masato Nakagawa Miori Nishikawa Masayuki Yoshida Shunroku Ota Mitsunobu Yoshida Kazuo Kuraba Koji Takara Teruyoshi Yokoyama

¹⁾ 京都薬科大学薬学部病院薬学教室
 京都市山科区御陵中内町5

Department of Hospital Pharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyoto Pharmaceutical University
 5, Nakauchi-cho, Misasagi, Yamashina-ku, Kyoto 607-8414, Japan

²⁾ 京都薬科大学薬学部機能分子化学教室
 京都市山科区御陵中内町5

Department of Functional Molecular Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyoto Pharmaceutical University
 5, Nakauchi-cho, Misasagi, Yamashina-ku, Kyoto 607-8414, Japan

³⁾ 宝塚市立病院薬剤部
 兵庫県宝塚市小浜4-5-1

Department of Pharmacy, Takarazuka City Hospital
 4-5-1, Kohama, Takarazuka-shi, Hyogo 665-0827, Japan

Summary

The effects of *Agaricus blazei* Murill (ABM) and propolis extracts, two of the most widely used herbal functional foods or dietary supplements in Japan, on the pharmacokinetics of diltiazem (DTZ), a typical probe of cytochrome P450 (CYP) 3A, were examined in rats. The simultaneous addition of propolis extract to rat small intestine and liver microsomes competitively inhibited the formation of *N*-demethyl DTZ (MA), an active metabolite of DTZ produced by CYP3A, in a concentration-dependent manner, with an IC_{50} of about 0.3 and 1.3 mg/ml, respectively, but ABM extract seemed to have no inhibitory effect on CYP3A activity. The pharmacokinetics of DTZ and MA after oral administration of DTZ (30 mg/kg)

was not affected by simultaneous treatment of ABM extract at a normal dose of 40 mg/kg. However, the simultaneous oral administration of ABM extract (200 mg/kg) significantly decreased the peak plasma concentration of DTZ and tended to increase the time to reach the peak concentration of DTZ or MA after oral administration of DTZ. On the other hand, the concomitant treatment of a large amount of propolis extract (20 mg/kg) did not affect the pharmacokinetics of DTZ orally administered. Accordingly, it was suggested that the simultaneous oral administration of a large amount of ABM extract delayed the intestinal absorption of DTZ in rats.

1. はじめに

近年、わが国において、食生活の変化による生活習慣病罹患人口の増加や高齢化社会の進展に伴い、健康の維持向上が重要視されるようになってきた。この健康維持を目的として使用されているのがいわゆる健康食品・サプリメントであり、多数の国民の注目を集めている。そのため、様々な生活習慣病などを伴った患者や生体の調節機能が低下している高齢者が健康食品を摂取することは日常的となりつつあり、医薬品との相互作用が懸念さ

れている¹⁾。その代表的な例がセントジョーンズワート (SJW) による薬物代謝酵素シトクロムP450 (CYP) の誘導作用である。すなわち、SJWの摂取は、CYP 3A4の基質となる多くの薬物の体内動態に影響を及ぼすことが報告されている²⁾。しかしながら、これら健康食品と医薬品の相互作用、特に薬物動態学的相互作用に関する有益な情報はほとんどなく、病院、薬局、薬店等において、患者・消費者からの飲み合わせに関する質問に対して医師、薬剤師、栄養士等が十分答えきれていないのが現状である。したがって、このような相互作用情報の蓄積は、健康食品・サプリメントの適正使用を実現する上で必要

不可欠であり、かつ早急に求められている。

アガリクス茸 (*Agaricus blazei* Murrill; ABM) エキスは担子菌類の子実体製品であり、その主な薬理作用は、免疫賦活作用及び抗腫瘍作用などである。中でも痛を中心とした生活習慣病を改善するとして注目を集めており、本品の有用成分として、多糖類 (β -(1,3)-D-グルカン、 β -(1,6)-D-グルカン蛋白質複合体など)、ステロイド類、食物繊維などが知られている¹⁾。また、プロポリスエキスは、ミツバチが植物の花粉や樹脂などから集めてきた樹脂状物質と自らの唾液を混ぜ合わせて作った物質であり、その薬理作用として、抗アレルギー作用及び抗腫瘍作用などが知られている。また、本品はフラボノイド類 (ケルセチンなど)、カフェイン酸フェネチルエステル、クレロダン・ジテルペンなどの有用成分を含有していることが報告されている²⁾。これら2つの健康食品は日本において特に摂取人口が多く、そのため様々な医薬品と併用される頻度が最も高いと推測される。しかしながら、これら健康食品と医薬品との相互作用に関する報告は見当たらない。

一方、医薬品間の相互作用の機序としては、薬物動態学的相互作用が最も多く³⁾、中でも代謝過程における相互作用は重要であり、そのほとんどがCYPの阻害または誘導によるものと考えられている⁴⁾。CYPには多くの分子種が存在しており、中でもCYP3A4は、小腸及び肝臓に多く存在し、また、臨床で使用されている薬物の約50%の代謝に関与しているため、注意を要する分子種である⁵⁾。そこで、著者は、CYP3Aの基質としてジルチアゼム (DTZ) を選択し⁶⁾、ラットを用いて *in vitro* におけるDTZ代謝及びDTZの体内動態に及ぼすABM及びプロポリスエキスの影響について検討した。

2. 実験材料及び方法

2-1. 試料

ABMエキス (80mg/ml) 及びプロポリスエキス末 (超臨界抽出製品) は、協和エンジニアリング株式会社より提供を受けた。DTZ塩酸塩及びイミプラミン塩酸塩は和光純薬工業株式会社より購入した。N-脱メチルジルチアゼム (MA) 塩酸塩は本学機能分子化学教室において、DTZから合成されたものを用いた。ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸化型 (β -NADP⁺)、D-グルコース-6-リン酸二ナトリウム (G-6-P) 及びグルコ

ース-6-リン酸脱水素酵素酵母由来 (G-6-PDH) は、オリエンタル酵母工業株式会社より購入した。グリセロールは、SIGMA CHEMICAL CO. より購入した。エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム (EDTA) は、同人化学研究所株式会社より購入した。その他の試薬は試薬特級又は高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 用 (和光純薬) を使用した。

2-2. 実験動物

Wistar系雄性ラット (8週齢、体重約250g、日本SLC) を1週間予備飼育後、実験に使用した。予備飼育時、ラットには自由給水で固形試料 (MF、オリエンタル酵母) を自由に摂取させた。なお、本研究におけるすべての動物実験は、京都薬科大学動物実験委員会で承認された。

2-3. 小腸マイクロソームの調製

Mohriらの方法⁷⁾ に準じて行った。すなわち、ラットを18時間絶食させた後、ジエチルエーテル麻酔下で小腸全体を摘出した。摘出小腸を幽門部より60cm切り取った後、小腸腔内を氷冷A液 (1.5mM KCl、96mM NaCl、27mMクエン酸ナトリウム、8mM KH₂PO₄、5.6mM Na₂HPO₄、0.23mMフェニルメチルスルホニルフルオリド (PMSF) ; pH7.3) で洗浄した。次に、A液を十二指腸側より注入した後、A液中で30stroke/min、37℃で15分間インキュベートした。A液を空腸側から捨てた後、十二指腸側より氷冷B液 (136.9mM NaCl、2.68mM KCl、1.47mM KH₂PO₄、8.1mM Na₂HPO₄、1.5mM EDTA、0.5mMジチオトレイトール (DTT)、0.23mM PMSF ; pH7.2) を注入し、タッピングして上皮細胞を得た。得られた上皮細胞含有B液を、遠心機 (RL-101 ; TOMY) を用いて4℃で2,400rpm、10分間遠心分離し、その沈査に氷冷C液 (5mMヒスチジン、0.25Mスクロース、0.5mM EDTA、0.23mM PMSF ; pH7.0) を加えてピペッティングを行い洗浄した。再び4℃で2,400rpm、10分間遠心分離し、再度洗浄操作を行った。得られた沈査を氷冷C液でホモジネート (SC-VS50W ; ナショナル) し、遠心機 (XL-90 ; BECKMAN) を用いて4℃で13,700rpm、15分間遠心分離し上清を得た。これを4℃で36,200rpm、65分間遠心分離した後、沈査として得られたマイクロソーム分画を氷冷D液 (100mMトリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン、20 (v/w) %グリセロール10mM EDTA ; pH7.4) 1.5mlでホモジネートした。この際得られたマイクロソーム懸濁液の蛋白質濃度は、約15mg/mlであった。

2-4. 肝ミクロソームの調製

Omura & Satoの方法²¹⁾に準じて行った。すなわち、ラットをジエチルエーテル麻酔下脱血し、氷冷1.15%塩化カリウム溶液を門脈より注入して灌流した後、肝臓を単離した。次に、摘出肝臓を氷冷1.15%塩化カリウム溶液で直ちにホモジネートし、超遠心分離機 (XL-90; BECKMAN) を用いて4℃で10,600rpm、15分間遠心分離した。その後、脂肪を除いた上清を4℃で36,200rpm、65分間超遠心分離し、沈査として得られたミクロソーム分画を再び、1.15%塩化カリウム溶液でホモジネートし、4℃で、36,200rpm、35分間超遠心分離を行い、得られた沈査をサスペンション用緩衝液 (pH 7.2) 約10mlに懸濁した。この際得られたミクロソーム懸濁液の蛋白質濃度は約7mg/mlである。

2-5. ミクロソーム中蛋白の定量

蛋白定量は、Lowryらの方法²²⁾に準じて行った。

2-6. ミクロソームにおけるDTZ N-脱メチル化反応の測定

DTZ N-脱メチル化反応の測定はMurrayらの方法²³⁾を改良して行った。すなわち、氷冷ガラス製丸底試験管 (10ml) に、3mM EDTA含有300mMリン酸緩衝液 (pH 7.4) 100 μ l [1mM, 100mM]、250 μ M DTZ水溶液30 μ l [25 μ M]、18mM NADP⁺ 10 μ l [0.6mM]、180mM G-6-P 10 μ l [0.6mM]、60Unit/ml G-6-P-DH 10 μ l [2Unit/ml] 及び種々の濃度のABM又はプロボリスエキス水溶液 (30, 60, 100 μ l) を添加した。プレインキュベーション直前に検体を5秒間攪拌し、5分間37℃の水浴 (Personal 11; TAITEC) 中でプレインキュベーションを行った。次に、5.0mg protein/mlラット小腸又は肝ミクロソーム30 μ l [0.5mg protein/ml] を添加し、1秒間攪拌後、37℃の水浴 (Personal 11; TAITEC) 中で反応を開始させた (最終容積: 300 μ l)。3分間インキュベーションを行った後、氷酢酸エチル500 μ lを添加し、10秒間攪拌して反応を停止させた。また、プロボリスエキス前処置実験は、氷冷ガラス製丸底試験管 (10ml) に、3mM EDTA含有300mMリン酸緩衝液 (pH 7.4) 100 μ l [1mM, 100mM]、18mM NADP⁺ 10 μ l [0.6mM]、180mM G-6-P 10 μ l [0.6mM]、60Unit/ml G-6-P-DH 10 μ l [2Unit/ml] 及び5.0mg protein/mlラット肝ミクロソーム30 μ l [0.5mg protein/ml] を添加し、その後、10mg/mlプロボリスエキス水溶液30 μ l [1mg/ml] (同

時添加実験より算出した50%阻害濃度を参考にした) 存在下又は非存在下において10分間37℃の水浴 (Personal 11; TAITEC) 中でプレインキュベーションすることにより検討した。なお、上記鍵かっ内は最終濃度を示す。

MA濃度はMurrayらの方法²³⁾を一部改良したHPLC法により測定した。すなわち、上記反応停止後の検体に、15 μ M塩酸イミプラミン (内標準物質) 水溶液200 μ l [10nmol/ml]、超純水200 μ l、炭酸水素ナトリウム1g及び酢酸エチル5mlを順次加え、30秒間攪拌した後、遠心機 (himac CT 5DL; 日立) を用いて3,000rpm、15分間遠心分離した。得られた上清4.5mlをガラス製スピッツ管に移し、10mM塩酸200 μ lを加え30秒攪拌した後、再度3,000rpmで15分間遠心分離した。得られた下層150 μ lを15mlプラスチック製マイクロ遠心チューブに移し、40℃で窒素気流下蒸発乾固した。さらに、2mM塩酸100 μ lを添加し、3秒間攪拌し、その20 μ lをオートインジェクター (SIL-9A; 島津) を用いてUV検出器付きHPLC装置 (SPD-6A 及びLC-6A; 島津) に注入し測定した。その際の分析条件を以下に示す。カラム、STR ODS-II (内径4.0mm×長さ25cm; 信和化工); 移動相、0.05M KH₂PO₄-アセトニトリル-トリエチルアミン (70:28.8:0.2, pH 5.9); 流速、1.0ml/min; カラム温度、40℃; 測定波長、238nm; 感度、0.00125 a.u.f.s. DTZ、MA及びイミプラミンの保持時間は、それぞれ約16、11及び21分であった。MAの検量線は最終濃度が0.2~5 μ Mの濃度範囲で作成し、いずれの検量線もほぼ原点を通る良好な直線性を示した ($r^2 > 0.999$)。なお、MAの定量限界は約0.02 μ Mであった。

2-7. 経口投与試験

試験前夜、左頸動脈にカニューレを施し18時間絶食させた無麻酔ラットに、精製水 (2.5ml/kg)、ABM (40又は200mg/2.5ml/kg) 又はプロボリスエキス水溶液 (20mg/2.5ml/kg) をDTZ水溶液 (30mg/2.5ml/kg) とともに同時経口投与した。採血は、カニューレより、DTZ投与直前、投与後0.05、0.083、0.167、0.333、0.5、0.75、1、1.5及び2時間に行い、1回あたりの採血量は0.25mlとした。採血後、血液は直ちに14,000rpm、1分間室温下で遠心分離し、得られた血漿 (約0.12ml) は測定時まで-80℃にて保存した。

2-8. 血漿中DTZ及びMA濃度の測定

血漿中DTZ及びMAは、上記に示したHPLC法²⁴⁾に準じて測定した。

2-9. 薬物動態パラメータの算出

最高血漿中濃度 (C_{max}) 及び C_{max} 到達時間 (T_{max}) は、実測値より算出した。血漿中濃度-時間曲線の消失相の傾き (λ)、 λ を用いて無限大時間まで外挿したときの血漿中濃度-時間曲線下面積 (AUC) 及び平均滞留時間 (MRT) は、モーメント解析法²⁵⁾により算出した。

2-10. 統計学的処理

得られた実験値は、すべて平均値±標準誤差 (S.E.) で表示した。2群間並びに多群間の平均値の有意差検定には、それぞれUnpaired Student's *t*-test並びに分散分析 (Repeated又はNon-repeated Measures ANOVA) 及び Fisher's PLSD又はStudent-Newman-Keuls testを適用し、危険率5%未満 (両側検定) を有意差ありとした。

3. 結果

3-1. ミクロソームのCYP3A活性に及ぼすABM及びプロポリスエキス同時添加の影響

まず、小腸及び肝ミクロソームにおけるDTZ *N*-脱メチル化反応に及ぼすABMエキスの影響を検討した。その結果、ABMエキスは、1mg/ml以上の高濃度でのみ、小腸ミクロソームによるMA生成を有意に阻害し、その際の見かけの50%阻害濃度 (IC_{50} 値) は、 3.0 ± 0.5 mg/mlであった。一方、肝ミクロソームの場合、有意な阻害作用は、さらに高濃度の5mg/ml以上で観察され、そのときの IC_{50} 値は、 10.8 ± 0.7 mg/mlと算出された。

次に、両ミクロソームにおけるDTZ *N*-脱メチル化反応に及ぼすプロポリスエキスの阻害作用をFig. 1に示す。プロポリスエキスは、濃度依存的にMA生成を阻害し、それらの IC_{50} 値は、それぞれ 0.3 ± 0.02 及び 1.3 ± 0.1 mg/mlと算出された。さらに、Fig. 2は、プロポリスエキスの阻害機構について検討した結果である。NADPH生成系存在下において、肝ミクロソームをプロポリスエキスと共にプレインキュベーションしたときのMA生成速度は、プレインキュベーションしなかった場合と同等であった。

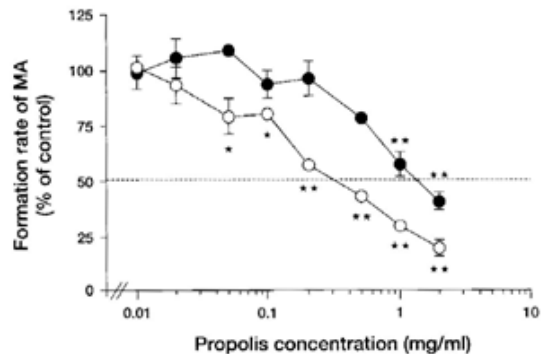


Fig. 1. Inhibitory Effects of Propolis Extract on the Formation of MA from DTZ by Rat Small Intestine and Liver Microsomes

Each point represents the mean \pm S.E. of 3 rats. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. each control (Repeated Measures ANOVA and Student-Newman-Keuls test). The reactions were performed in an NADPH-generating system containing microsomes (150 μ g protein) and DTZ (25 μ M) with or without various concentrations of propolis extract at 37°C for 3min. The formation rates of MA for the control in small intestine and liver microsomes were 0.18 ± 0.004 and 0.06 ± 0.03 nmol/min/mg protein, respectively. \circ , Small intestine; \bullet , Liver.

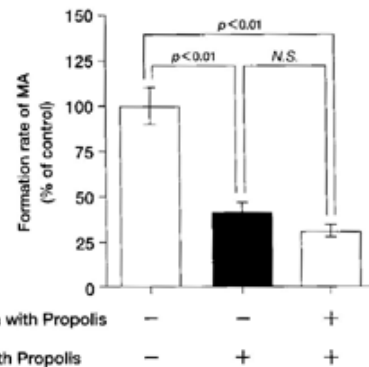


Fig. 2. Effects of the Preincubation with Propolis Extract on the Formation of MA from DTZ by Rat Liver Microsomes

Each column represents the mean \pm S.E. of 3 rats. N.S.: not significant (Repeated Measures ANOVA and Student-Newman-Keuls test). Liver microsomes (150 μ g protein) were preincubated in an NADPH-generating system without or with propolis extract (1mg/ml) at 37°C for 10min. After the preincubation, the incubations were initiated by addition of DTZ (25 μ M) and then were performed at 37°C for 3min.

3-2. DTZ経口投与後の体内動態に及ぼすABM及びプロポリスエキス同時投与の影響

Fig. 3は、ラットにDTZ水溶液 (30mg/kg) 及び精製水又はABMエキス (40又は200mg/kg) を同時経口投与したときの血漿中DTZ及びMA濃度推移を示したものである。ABMエキス40mg/kgを投与した場合、DTZ及び

Table 1. Pharmacokinetic Parameters of DTZ and MA after Oral Administration of DTZ without or with ABM Extract to Rats

Parameter	DTZ			MA		
	Control	ABM		Control	ABM	
		40mg/kg	200mg/kg		40mg/kg	200mg/kg
C_{max} ($\mu\text{g/ml}$)	0.56 ± 0.03	0.60 ± 0.09	$0.33 \pm 0.04^{a,b}$	1.81 ± 0.29	2.36 ± 0.22	1.63 ± 0.12
T_{max} (h)	0.11 ± 0.02	0.13 ± 0.02	0.18 ± 0.05	0.10 ± 0.01	0.12 ± 0.02	0.16 ± 0.05
λ (h^{-1})	0.80 ± 0.13	0.84 ± 0.08	0.84 ± 0.13	0.63 ± 0.10	0.79 ± 0.07	0.68 ± 0.12
$t_{1/2\beta}$ (h)	0.96 ± 0.13	0.89 ± 0.10	0.91 ± 0.14	1.22 ± 0.17	0.96 ± 0.12	1.14 ± 0.16
AUC($\mu\text{g} \cdot \text{h/ml}$)	0.35 ± 0.01	0.39 ± 0.05	0.31 ± 0.02	2.02 ± 0.34	2.32 ± 0.25	2.26 ± 0.35
MRT(h)	1.18 ± 0.12	1.07 ± 0.09	1.27 ± 0.17	1.68 ± 0.22	1.30 ± 0.16	1.64 ± 0.21

Each value represents the mean \pm S.E. of 6(Control), 8(ABM 40mg/kg) or 5(ABM 200mg/kg) rats. a) $p < 0.05$ vs. control. b) $p < 0.05$ vs. ABM 40mg/kg (Non-repeated Measures ANOVA and Fisher's PLSD test).

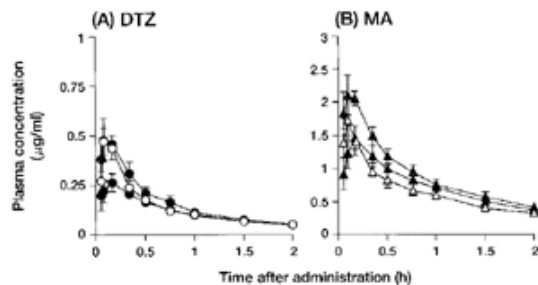


Fig. 3. Effects of Simultaneous Oral Administration of ABM Extract on the Plasma Concentrations of DTZ (A) and MA (B) after Oral Administration of DTZ to Rats. Each point represents the mean \pm S.E. of 5-8 rats. The DTZ solution (30mg/2.5ml/kg) was administered simultaneously with water (control, 2.5ml/kg) or ABM extract (40 or 200mg/2.5ml/kg) to unanesthetized rats. \circ , control (DTZ); \bullet , 40mg/kg ABM (DTZ); \blacktriangle , 200mg/kg ABM (DTZ); \triangle , control (MA); \bullet , 40mg/kg ABM (MA); \blacktriangle , 200mg/kg ABM (MA).

MA濃度推移に変化はみられなかった。一方、ABMエキス200mg/kgの同時投与により、投与後20分までの血漿中DTZ濃度はコントロール群と比較して低下傾向を示し、若干の吸収遅延も認められた。このときの薬物動態パラメータを示したものが、Table 1である。ABMエキス40mg/kgの同時投与により、DTZ及びMAのすべての動態パラメータは有意に変化しなかった。しかしながら、ABMエキス200mg/kgの併用により、DTZの C_{max} 値は41%減少した ($p < 0.05$)。なお、この際、DTZの T_{max} 、

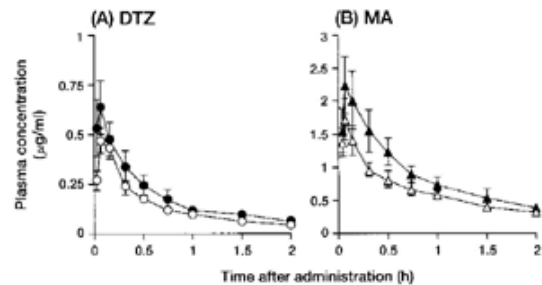


Fig. 4. Effects of Simultaneous Oral Administration of Propolis Extract on the Plasma Concentrations of DTZ (A) and MA (B) after Oral Administration of DTZ to Rats. Each point represents the mean \pm S.E. of 5 or 6 rats. The DTZ solution (30mg/2.5ml/kg) was administered simultaneously with water (control, 2.5ml/kg) or propolis extract (20mg/2.5ml/kg) to unanesthetized rats. \circ , control (DTZ); \bullet , 20mg/kg propolis (DTZ); \triangle , control (MA); \bullet , 20mg/kg propolis (MA).

λ 、 $t_{1/2\beta}$ 、AUC及びMRT値、並びにMAのいずれのパラメータにおいても有意な変化はみられなかった。

さらに、ラットにDTZ (30mg/kg) 及び精製水又はプロポリスエキス (20mg/kg) を同時経口投与したときの血漿中DTZ及びMA濃度推移をFig.4に示す。プロポリスエキス併用により、DTZ及びMA濃度推移に顕著な変化は認められなかった。また、DTZ及びMAのすべてのパラメータも有意に変化しなかった (Table 2)。

Table 2. Pharmacokinetic Parameters of DTZ and MA after Oral Administration of DTZ without or with Propolis Extract to Rats

Parameter	DTZ		MA	
	Control	Propolis	Control	Propolis
C_{max} ($\mu\text{g/ml}$)	0.56 ± 0.03	0.69 ± 0.10	1.81 ± 0.29	2.55 ± 0.35
T_{max} (h)	0.11 ± 0.02	0.09 ± 0.02	0.10 ± 0.01	0.09 ± 0.02
λ (h^{-1})	0.80 ± 0.13	0.77 ± 0.08	0.63 ± 0.10	0.68 ± 0.10
$t_{1/2\beta}$ (h)	0.96 ± 0.13	0.94 ± 0.08	1.22 ± 0.17	1.10 ± 0.15
AUC($\mu\text{g} \cdot \text{h/ml}$)	0.35 ± 0.01	0.47 ± 0.10	2.02 ± 0.34	2.45 ± 0.47
MRT(h)	1.18 ± 0.12	1.13 ± 0.10	1.68 ± 0.22	1.42 ± 0.16

Each value represents the mean \pm S.E. of 6(Control) or 5(Propolis 20mg/kg) rats.

4. 考察

ヒト及びラットにおけるDTZのバイオアベイラビリティはそれぞれ44.9及び3.5%と低く、初回通過効果を受けやすいことから、肝血流量依存型薬物に分類されている^{17,20}。また、DTZの主な代謝経路は、ヒト及びラットにおいて共通しており、DTZからMAへのN-脱メチル化反応と、DTZから脱アセチル体(M1)への脱アセチル化反応に大別され、前者にはCYP3Aが関与している^{17,18,20}。一方、CYP3Aは生体内に幅広く分布しているが、特に肝臓や小腸に多く存在している^{10,16}。したがって、経口投与されたDTZの体内動態は、肝臓のみならず、小腸における初回通過代謝の影響も強く受けることが知られている。

そこでまず、小腸及び肝臓マイクロソームを用いて、DTZ N-脱メチル化酵素活性に及ぼすABM及びプロポリスエキス同時添加の影響について検討した。その結果、ABMエキスの同時添加は小腸及び肝臓マイクロソームのCYP3A活性を見かけ上阻害したものの、その際のIC₅₀値は、それぞれ3.0±0.5及び10.8±0.7mg/mlと顕著に高い値を示した。したがって、ABMエキスが特異的にCYP3A活性を阻害する可能性は低いものと考えられる。一方、プロポリスエキスは、小腸及び肝臓マイクロソームのCYP3A活性を濃度依存的に阻害し、IC₅₀値はそれぞれ0.3±0.02及び1.3±0.1mg/mlであった(Fig. 1)。この結果は、プロポリスエキス中に何らかのCYP3A活性阻害成分が含まれていることを示唆している。プロポリスエキスにはケルセチン等の多くのフラボノイドが含まれており^{21,22}、これらがCYP3A活性の阻害に関与している可能性は考えられるが^{23,24}、その詳細は不明である。今回の実験で得られた小腸と肝臓のマイクロソームに対するIC₅₀値を比較した場合、ABM及びプロポリスエキス両者において小腸の方が低い値を示した。これは、マイクロソームの蛋白質量は両臓器間で統一しているにもかかわらず、小腸マイクロソームのMA生成速度が肝臓の場合と比較して低かったことから、少なくとも一部、マイクロソーム中CYP3A含量の違いに起因するものと推察された。次に、CYP3A活性に対する阻害作用が比較的強くみられたプロポリスエキスについて、その阻害機構を検討した。一般に、CYP活性の低下は、基質-阻害物質間の競合による可逆的阻害、又はヘム鉄への阻害剤の不可逆的結合やメカニズムベースドインヒビションといった不可逆的な酵素修飾

によって起こる。添加物質が不可逆的な酵素失活を起こすと仮定した場合、添加物質とマイクロソームの共存下におけるブレインキューベーションにより阻害が増強される。そこで、NADPH生成系存在下において、肝臓マイクロソームをプロポリスエキスと共にブレインキューベーションした場合としない場合の阻害率を比較した。その結果、プロポリスエキス共存下でブレインキューベーションした場合のMA生成速度は、プロポリスエキス非共存下の場合と同等であった(Fig. 2)。したがって、プロポリスエキスによるCYP3A活性の阻害は、可逆的であると考えられた。

以上の結果より、*in vitro*において、プロポリスエキスはCYP3A活性に対して阻害作用を示すことが明らかとなった。しかしながら、プロポリス等の健康食品は多成分系であり、配糖体等の種々の天然成分を含有しているため、経口投与後阻害物質が吸収されないことや吸収されたとしても速やかに代謝されてしまうことも十分考えられる。そのため、*in vitro*における成績が*in vivo*の結果に反映されるとは限らない。

そこで次に、ラットを用いて、DTZの体内動態に及ぼすABM及びプロポリスエキス同時経口投与の影響について検討した。まず、ヒトにおける1回摂取目安量の1~2倍量に相当する40mg/kgのABMエキス併用は、血漿中DTZ及びMA濃度推移並びにDTZ及びMAのパラメータに影響を及ぼさなかった(Fig. 3及びTable 1)。一方、1回摂取量の約10倍量に相当する200mg/kgのABMエキスを併用したところ、血漿中MA濃度推移に顕著な変化はみられなかったが、投与20分後までの血漿中DTZ濃度は低下傾向を示し、若干の吸収遅延が認められた。さらに、C_{max}値は約40%減少し、また、DTZ及びMAのT_{max}も、有意差は認められなかったものの、それぞれ約64%及び60%の延長傾向を示した。しかしながら、DTZ及びMAのAUC値に有意な変化はみられなかった(Fig. 3及びTable 1)。これらの結果より、*in vitro*の結果と同様に、ABMの同時投与はCYP3A活性を阻害しないこと並びにABMエキス40mg/kg同時投与によりDTZの体内動態は影響を受けないのに対して、200mg/kgの場合DTZの吸収は遅延することが示唆された。江藤及び河野は、イスにおいて、制酸剤又は食餌の同時投与により経口投与後の血中DTZ濃度が低下すること並びにT_{max}が遅延することを報告している²⁵。したがって、ABMエキス併用により観察された吸収遅延の要因として、高用量のABMエキスによる胃内pHの上昇あるいは胃内容物排洩速度の低

下等が考えられる。そこで、DTZ水溶液 (30mg/5ml) 及びDTZ-ABM混合液のpHを測定したところ、DTZ水溶液のpHが5.49であるのに対して、DTZ-ABM (それぞれ30及び40mg/5ml) 又はDTZ-ABM (30及び200mg/5ml) 混合液のpHはそれぞれ5.83又は5.87であり、ABMの混合によりいずれも有意に上昇した。しかしながら、2種のDTZ-ABM混合液間のpHに有意差が認められなかったこと及び200mg/kg ABMエキスの併用時のみにおいてDTZの動態が変化したことから、ABMエキスによるDTZの吸収遅延はpHの上昇によるものではないと推測された。一方、胃内容排泄速度の低下の可能性については今回検討しておらず、その詳細については不明である。

最後に、プロポリスエキス同時投与の影響について検討した。ヒトにおける1回摂取目安量の約10倍量に相当する20mg/kgのプロポリスエキスの併用は、血漿中DTZ及びMA濃度並びにDTZ及びMAのパラメータに影響しなかった (Fig.4及びTable 2)。ゆえに、*in vitro*の結果と相違し、プロポリスエキスの同時投与はCYP3A活性を阻害しないこと並びにDTZ経口投与後の体内動態に影響しないことが明らかとなった。*in vitro*で認められたCYP3A活性に対するプロポリスエキスの阻害作用が*in vivo*では認められなかった理由としては、前述したように、経口投与されたプロポリスエキス中の阻害成分が消化管から吸収されないこと又は阻害成分が消化液による分解や腸内細菌叢による代謝を受けた結果微量しか吸収されないことなどがあげられる。

5. おわりに

以上、ラットにおいて高用量のABMエキス同時投与によりDTZの消化管吸収が遅延する可能性が示唆されたことから、ラット及びヒト間の種差及びABM摂取量の違いの問題は残るが、ヒトにおいてABMエキスとDTZの同時摂取を控え、少なくとも2~3時間の摂取間隔をあけた方が望ましいものと考えられる。一方、*in vitro*においてプロポリスエキスがラット小腸及び肝ミクロソームのCYP3A活性を阻害したものの、ラットへの高用量プロポリスエキスの同時投与はDTZの体内動態に影響を及ぼさないことが明らかになった。したがって、ヒトにおけるプロポリスエキスとDTZの同時摂取はDTZの体内動態に影響しないものと推察される。

以上の成績は、今後、ヒトにおいてABM及びプロポ

リスエキスと医薬品の薬物動態学的相互作用を検討する上で、有益な基礎的知見を与えるものと考えられる。

6. 謝辞

ABMエキス及び超臨界抽出プロポリスエキス末を御提供して頂きました協和エンジニアリング株式会社に厚く御礼申し上げます。

引用文献

- 1) 本間真人, 武田光志, 山本由里子, 須賀肇, 脇内学, 佐藤信一, 幸田幸直, 薬学雑誌, **120**, 1435-1440(2000).
- 2) S. C. Piscitelli, A. H. Burstein, D. Chaitt, R. M. Alfaro and J. Falloon, *Lancet*, **355**, 547-548(2000).
- 3) F. Ruschitzka, P. J. Meier, M. Turina, T. F. Luscher and G. Noll, *Lancet*, **355**, 548-549(2000).
- 4) 中根一樹, 松浦夕子, 久保茂, 武田隆久, 伊藤剛, 奥田郁, 矢野裕太郎, 上田祐一, *Biotherapy*, **15**, 503-507(2001).
- 5) ハラタケ科の担子菌類アガリクス茸 (社内研究資料), 協和エンジニアリング株式会社(2001).
- 6) O. K. Mirzoeva and P. C. Calder, *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, **55**, 411-419(1996).
- 7) D. Grunberger, R. Banerjee, K. Eisinger, E. M. Oltz, L. Efros, M. Caldwell, V. Estevez and K. Nakanishi, *Experientia*, **44**, 230-232(1988).
- 8) 佐藤利夫, "よいプロポリスの見分け方・選び方", 現代吉林, 東京, 1999.
- 9) 千葉寛, *ファルマシア*, **31**, 992-996(1995).
- 10) J. H. Lin and A. Y. H. Lu, *Clin. Pharmacokinetics*, **35**, 361-390(1998).
- 11) F. P. Guengerich, *J. Pharmacokinetics Biopharm.*, **24**, 521-533(1996).
- 12) K. E. Thummel and G. R. Wilkinson, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **38**, 389-430(1998).
- 13) M. M. Doherty and W. N. Charman, *Clin. Pharmacokinetics*, **41**, 235-253(2002).
- 14) Q.-Y. Zhang, J. Wikoff, D. Dunbar and L. Kaminsky, *Drug Metab. Dispos.*, **24**, 322-328(1996).
- 15) Q.-y. Zhang, D. Dunbar, A. Ostrowska, S. Zeisloft, J. Yang and L. S. Kaminsky, *Drug Metab. Dispos.*, **27**, 804-809(1999).
- 16) R. S. Obach, Q.-Y. Zhang, D. Dunbar and L. S. Kaminsky, *Drug Metab. Dispos.*, **29**, 347-352(2001).
- 17) P. K. Yeung, S. J. Mosher, M. A. Quilliam and T. J. Montague, *Drug Metab. Dispos.*, **18**, 1055-1059(1990).
- 18) L. Pichard, G. Gille, I. Fabre, I. Dalet-Beluche, C. Bonfils, J.-P. Thenot and P. Maurel, *Drug Metab. Dispos.*, **18**, 711-719(1990).
- 19) D. Sutton, A. M. Butler and L. Nadin and M. Murray, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **282**, 294-300(1997).
- 20) K. Mohri and Y. Uesawa, *Pharm. Res.*, **18**, 1232-1236(2001).
- 21) T. Omura and R. Sato, *J. Biol. Chem.*, **239**, 2370-2378(1964).

- 22) O. H. Lowry, N. J. Rosebrough and A. L. Farr, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951).
- 23) M. Murray and A. M. Butler, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **279**, 1449-1452 (1996).
- 24) N. Ohinisi, M. Kusuhara, M. Yoshioka, K. Kuroda, A. Soga, F. Nishikawa, T. Koishi, M. Nakagawa, S. Hori, T. Matsumoto, M. Yamashita, S. Ohta, K. Takara and T. Yokoyama, *Biol. Pharm. Bull.*, submitted.
- 25) 山岡浩, "マイコンによる薬物体内動態解析法", 南江堂, 東京, 1990.
- 26) 医薬品インタビューフォーム: ヘルベッサール, 田辺製薬(株) (1998).
- 27) A. Miniscalco, J. Lundahl, C. G. Regardh, B. Edgar and U. G. Eriksson, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **261**, 1195-1199 (1992).
- 28) R. S. Obach, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **294**, 88-95 (2000).
- 29) 江藤見, 河野啓一, 薬学雑誌, **103**, 426-433 (1983).

PROFILE

大西 憲明

京都薬科大学薬学部病院薬学教室
助教授
薬学博士

1980年徳島大学薬学部卒業、1982年同大学院薬学研究科修士課程修了、同年神戸大学医学部附属病院薬劑部薬劑師、1993年京都薬科大学講師、1997年同助教授、現在に至る。医療薬学会認定指導薬劑師。

中川 政人

京都薬科大学薬学部病院薬学教室
(現緑紡記念病院薬劑部)
薬学修士

西川 翠

京都薬科大学薬学部病院薬学教室
薬学士

山下 正行

京都薬科大学薬学部機能分子化学教室
助教授
薬学博士

太田 俊作

京都薬科大学薬学部機能分子化学教室
教授
薬学博士

吉岡 睦展

宝塚市立病院薬劑部
主査

黒田 和夫

宝塚市立病院薬劑部
薬劑部長

高良 恒史

京都薬科大学薬学部病院薬学教室
助手
医学博士

横山 照由

京都薬科大学薬学部病院薬学教室
教授
薬学博士