

## 果物ジュースによるヒトおよびラット CYP3A 活性の阻害効果

上井 幸司, 山田 梨沙, 丘 龍祥, 仲川 義人, 竹下 光弘\*

### Inhibitory effects of various fruit juices on human and rat CYP3A activity

Koji UWAI, Risa YAMADA, Ryusho OKA, Yoshito NAKAGAWA, and Mitsuhiro TAKESHITA\*

(Received November 21, 2006)

There have been very limited reports on the effects of fresh fruit juices on human and rat CYP3A activity. Therefore, the inhibitory effects of readily available fresh fruit juices on midazolam 1'-hydroxylase activity, a marker of CYP3A, were evaluated in pooled human and rat liver microsomes. The fruit investigated in this study were peach, grapefruit, grape, lemon, and pineapple for human and rat CYP3A activity. Grapefruit was used for as positive control. The inhibition depended on the amount of a fruit juice added to the incubation mixture. The inhibitory potential on human CYP3A was in the order: pineapple > lemon > grapefruit > grape > peach, and on rat CYP3A was in the order: lemon > pineapple > grapefruit > grape > peach. Those results suggest that, like grapefruit juice, commercial fruit such as pineapple, and lemon also have the potential to inhibit CYP3A-catalyzed midazolam 1'-hydroxylation. On the other hand, peach juice does not show any effect on CYP3A-catalyzed midazolam 1'-hydroxylation.

**Key words** — cytochrome P450, fresh fruit juice, CYP3A inhibition

チトクローム P450 (CYP) は、肝臓における薬物代謝を担う代表的な酵素である。CYP ファミリーのなかでも、CYP3A は最も重要な酵素であり、CYP が関与する代謝の大部分を担っているため<sup>1)</sup>、多くの薬物の投与量や薬理学的効果、持続時間は、人体での CYP3A の活性に依存しているということが出来る。

ところで、我々が日常摂取する食品中の成分が、生体内での CYP を誘導あるいは阻害することにより、投与された医薬品の血中濃度が上昇あるいは減少し、医薬品の作用に影響を与える場合がある。例えば、グレープフルーツ<sup>2)</sup>、シトラスフルーツ<sup>3)</sup>、スターフルーツ<sup>4)</sup>、ザクロ<sup>5)</sup>、イチゴ<sup>6)</sup>などの果物や、市販の果物ジュース<sup>7)</sup>、茶飲料<sup>8)</sup>等は、食品—医薬品相互作用を引き起こすことが知られている。その中でも、グレープフルーツジュースの飲用は、併用するカルシウムチャネル拮抗薬<sup>2, 9)</sup>やシクロスポリン<sup>10)</sup>、ミダゾラム<sup>11)</sup>、HIV プロテアーゼ阻害

剤<sup>12)</sup>、HMG-CoA 還元酵素阻害剤<sup>13, 14)</sup>等の医薬品の血漿中濃度を増加させることが報告されており、コップ1杯のグレープフルーツジュースが経口でのバイオアベイラビリティを増加させ、薬物治療の効果または副作用を増強する可能性がある。

また、グレープフルーツジュースに含まれる成分が小腸の CYP3A サブファミリーによる医薬品の代謝を強く阻害することが報告されている<sup>2)</sup>。これに対して、CYP3A の基質であるフェロジピンの代謝はオレンジジュース飲用によって影響を受けないことから、オレンジジュースは CYP3A の触媒活性を阻害しないことが報告されている<sup>15)</sup>。このように、果物に含まれる成分はそれぞれ異なるため、果物の CYP3A 阻害効果はその種類によって異なると考えられる<sup>4, 16)</sup>。

このような背景から、医薬品同士の相互作用ばかりでなく、食品が医薬品と相互作用する可能性は十分にあると考えられる。また、近年、国民の

ライフスタイルが健康を指向したものとなりつつあり, それに伴い身近な食品や, 健康食品がTV番組や雑誌を中心としたマスメディアによって取り上げられる機会が増加し, ブームとなっている。しかしながら, 「健康によい」とされる食品は, その正の効果ばかりが注目されてはいるものの, それらの不適切な摂取により, 医薬品の体内動態を変化させ, 身体に重大な影響を及ぼすものもあるということは, 一般的にはあまり知られていない。このように, 新しい食品や, これまで大量には摂取されることの無かった食品の摂取により, それらの未知なる生体に対する効果が表面化してくるリスクは大きくなる危険性がある。

従って, 薬物代謝と食品との相互作用について検討することは医薬品の効果的かつ適切な投与という観点から極めて重要であるが, CYP3A活性に対する果物の効果についての体系的な報告はこれまでほとんど無い。そこで, 本研究では, CYP3Aの一般的なプローブであるミダゾラム<sup>17)</sup>の, 1'-水酸化を指標として, ヒトまたはラット肝ミクロソームによるCYP3A活性に対する様々な市販の果物による阻害について検討した。

## 実験の部

本研究は, 東北薬科大学薬学部・大学院薬学研究科倫理委員会によって承認の得られたプロトコールに従い実施された。

### 試薬

1'-ヒドロキシミダゾラムおよびミダゾラムは, 和光純薬工業(大阪, 日本)のものを使用した。プールドヒト肝ミクロソームは, BD Gentest(Woburn, MA)から購入した。その他全ての試薬と溶媒は, 市販特級品を購入し, 使用した。

### 使用動物

実験には, 体重160-180gのWistar系雄性ラット(日本SLC, 浜松)を用い, 実験に供するまで固形飼料(日本クレア, CE-2)および水道水を自由に摂取させ, 室温 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ , 湿度 $55 \pm 5\%$ , 明暗サイクル12時間の一定環境下で飼育した。

### 酵素源の調製

ラットを頸部切開により瀉血し, 直ちに肝臓を摘出し, 氷冷下生理食塩水溶液(0.9% NaCl)で血液成分を除去した。その湿重量を測定した後, 細断し氷冷した10 mM K,Na-リン酸緩衝液(PBS, pH 7.4)を肝湿重量の4倍量加え, ホモジナイズした。この肝ホモジネート液を,  $9,000 \times \text{g}$ , 20分間冷却遠心後, 上清(S-9)画分を $105,000 \times \text{g}$ , 1時間冷却遠心し, 上清(サイトソル)画分と, 沈殿(ミクロソーム)画分を得た。

### 使用フルーツとジュースの準備

実験に使用したフルーツは, 市販されているものを購入した。

レモン(*Citrus limon*), グレープフルーツ(*Citrus paradisi*), ブドウ(*Vitis spp*), パイナップル(フィリピン産*Ananas comosus*), モモ(山梨県産*Prunus persica*)。

それぞれの果実部分のみをミキサーにかけ, ガーゼなどによりろ過したものを100%ジュースとした。

また, ジュース1 mLを凍結乾燥し, これに含まれる成分量を測定した。

### 酵素反応

反応溶液は, プールドヒトあるいはラット肝ミクロソーム(0.2 mg protein/ml), NADPH生成系(NADP 0.5 mM,  $\text{MgCl}_2$  5 mM, G-6-P 5 mM, EDTA 50 mM, G-6-P-D 1.0 unit/mL)存在下, 調製した100%フルーツジュースを最終濃度0(0  $\mu\text{l}$ ), 0.25(1.25  $\mu\text{l}$ ), 0.5(2.5  $\mu\text{l}$ ), 1(5  $\mu\text{l}$ ), 2(10  $\mu\text{l}$ ), 3(15  $\mu\text{l}$ )となるように加え, PBSにより全量を450  $\mu\text{l}$ となるように調製した。37 $^\circ\text{C}$ , 5分間プレインキュベーション後, ミダゾラムのPBS溶液(10 mM, 50  $\mu\text{l}$ )を添加し37 $^\circ\text{C}$ , 10分間恒温振とうした。反応溶液に内標準物質(ベンゾフェノン 819 ng/ml)の酢酸エチル溶液500  $\mu\text{l}$ を加え攪拌後, 遠心分離( $6,750 \times \text{g}$ , 5分)し, 有機相を減圧下溶媒留去した。残渣をメタノール50  $\mu\text{l}$ に溶解し, そのうち10  $\mu\text{l}$ をHPLCに導入した。ミダゾラム1'-水酸化における果物の阻害効果は, 生成物の濃度を内標準法により定量し, 果物のジュースを加えなかったコントロールの活性と残存活性

との百分率により表した。全ての実験は四重サンプルにより行われ、その平均値を解析に使用した。

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による分析<sup>18)</sup> ミダゾラムの代謝物である1'-ヒドロキシミダゾラムのHPLCによる分析において、ポンプはWaters 510 HPLC Pump (Waters, Milford MA, USA) を用い、検出器としてWaters Lambda-May Model 481 (Waters) を接続した。カラムはC18 5- $\mu$ m analytical column (Mightysil, 150  $\times$  4.6 mm i.d.; Kanto Chemicals, Tokyo, Japan) を使用し、移動相として24% メタノール/33% アセトニトリル/43% 10 mM K-リン酸緩衝液 (pH 7.4) を流速1.0 ml/min. で通導し、検出波長220 nmにて測定を行った。クロマトグラム上のピークは、データ解析処理装置 (Chromatocorder 21, SIC, Tokyo, Japan) により得られた面積より算出し、定量した。なお、内標準物質として、ベンゾフェノン (保持時間: 10.78 min) を用いた。また、1'-ヒドロキシミダゾラムおよびミダゾラムの保持時間は以下ようになった。1'-ヒドロキシミダゾラム: 5.69 min; ミダゾラム: 8.69 min.

#### データ解析

GraphPad Prism (San Diego, CA, USA) を用いて非線形回帰のシグモイド関数により濃度-反応曲線を作成し、これよりIC<sub>50</sub>値を決定した。

## 結 果

通常、我々は果物を食用に不適な皮などを削除してそのまま食するか、またはジュースとして飲用するが、本研究では*in vitro*での実験であることを考慮し、新鮮な果物をジュースとしたうえで試料として用いた。また、我々が果物を食する、あるいはジュースを飲用する場合は、そのものの個数あるいは量を飲食した量とするが、果物に含まれる成分について天然物化学的に注目する場合は単位量あたりの成分量を考慮することも必要となる。そこで、果物ジュース1 mlを凍結乾燥し、これに含まれる成分量を測定した (Table 1)。

この結果から、果物ジュースの単位体積あたり

Table 1. Contents of the fruits juice

fruit	Contents (mg/ml 100%fresh juice)
peach	131.93
grapefruit	65.29
grape	209.67
lemon	86.78
pineapple	156.87

の成分量は、最も多いブドウで209.7 mg/ml、最も少ないグレープフルーツで65.3 mg/mlであり、果物によっては3倍以上もの含有成分濃度の差があることが明らかとなった。

続いて、ヒトおよびラットCYP3Aによるミダゾラムの1'-水酸化活性に対する市販の果物ジュースの影響を評価した。果物ジュースのヒトCYP3A阻害活性をfig.1に、ラットCYP3A阻害活性をfig.2に示した。

果物のジュースの添加はマイクロソームによるCYP3A活性を阻害した。とりわけ、レモン、パイナップルジュースは1%の濃度で、ヒトおよびラットのCYP3A活性を85%以上阻害した。また、グレープフルーツ、ブドウジュースは、濃度依存的に代謝を阻害する傾向があるのに対し、モモジュースはほとんど阻害活性を示さなかった。ヒトCYP3Aのミダゾラム1'-水酸化活性の阻害作用は、ジュース濃度2%でパイナップル $\approx$ レモン $>$ ブドウ $\approx$ グレープフルーツ $>$ モモのような順で阻害活性は増強された。これに対して、それぞれの果物のジュースに含まれる成分量を基準として阻害活性を比較した場合、ジュース成分2 mg/mlの濃度でパイナップル $\approx$ レモン $>$ グレープフルーツ $>$ ブドウ $>$ モモのような順であった。ラットCYP3Aのミダゾラム1'-水酸化活性の阻害作用は、ジュース濃度2%でパイナップル $\approx$ レモン $>$ グレープフルーツ $>$ ブドウ $>$ モモのような順であった。これに対して、それぞれの果物のジュースに含まれる成分量を基準として阻害活性を比較した場合、ジュース成分2 mg/mlの濃度でレモン $>$ パイナップル $>$ グレープフルーツ $>$ モモ $>$ ブドウのような順であった。

また、各フルーツジュースによるヒトおよびラッ

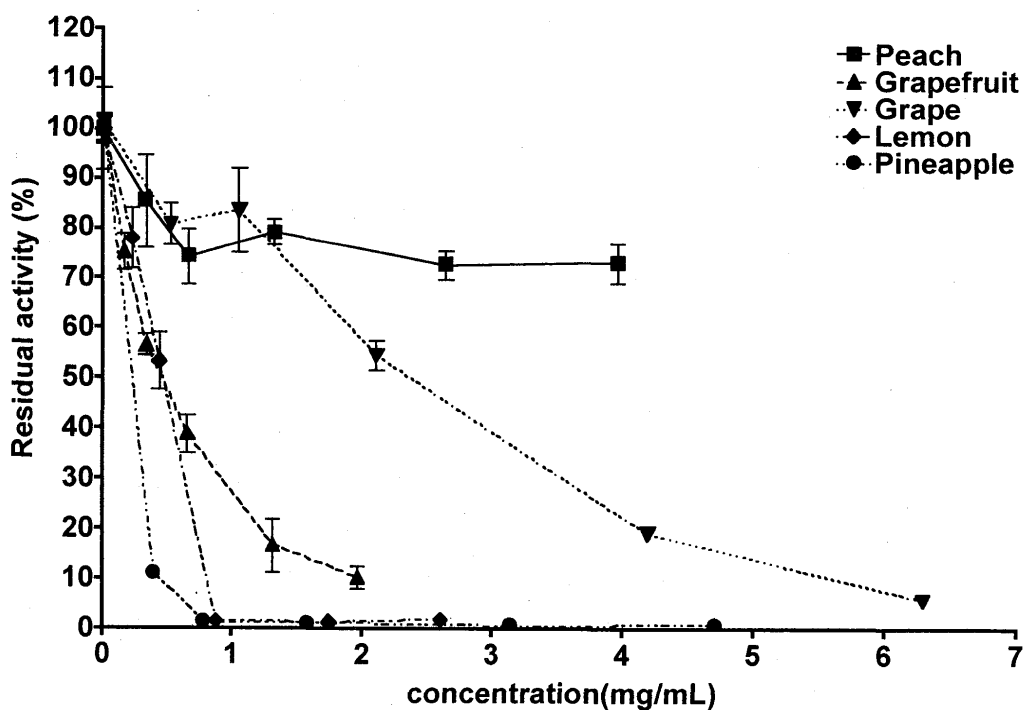
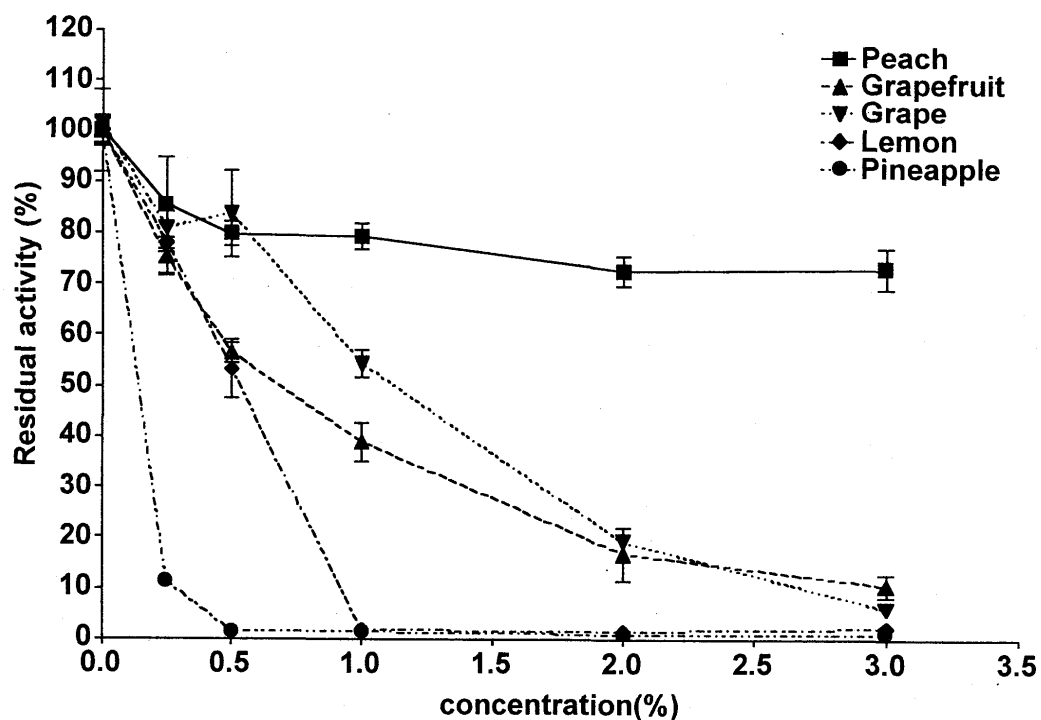


Fig.1 Dose-dependent curves in the inhibition of CYP3A activity of human liver microsomes by various fruit juices. a) Correlation of concentration of the fruit juice with residual activity b) Correlation of concentration of contents of the fruit juice with residual activity. Values are presented as mean  $\pm$  SEM of quadruplicate assays.

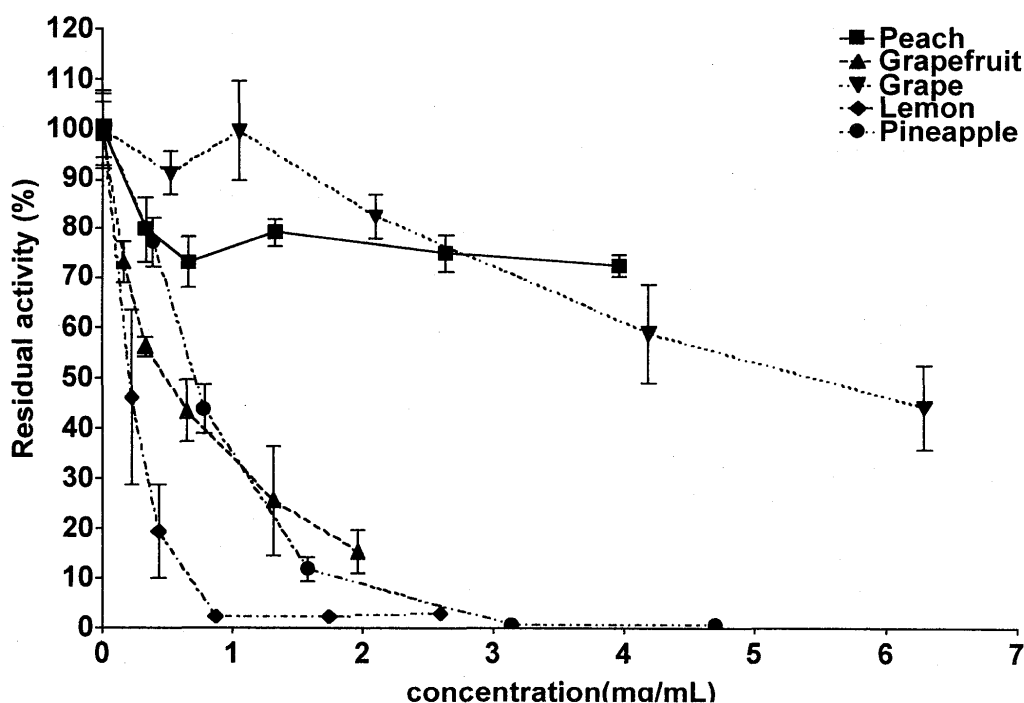
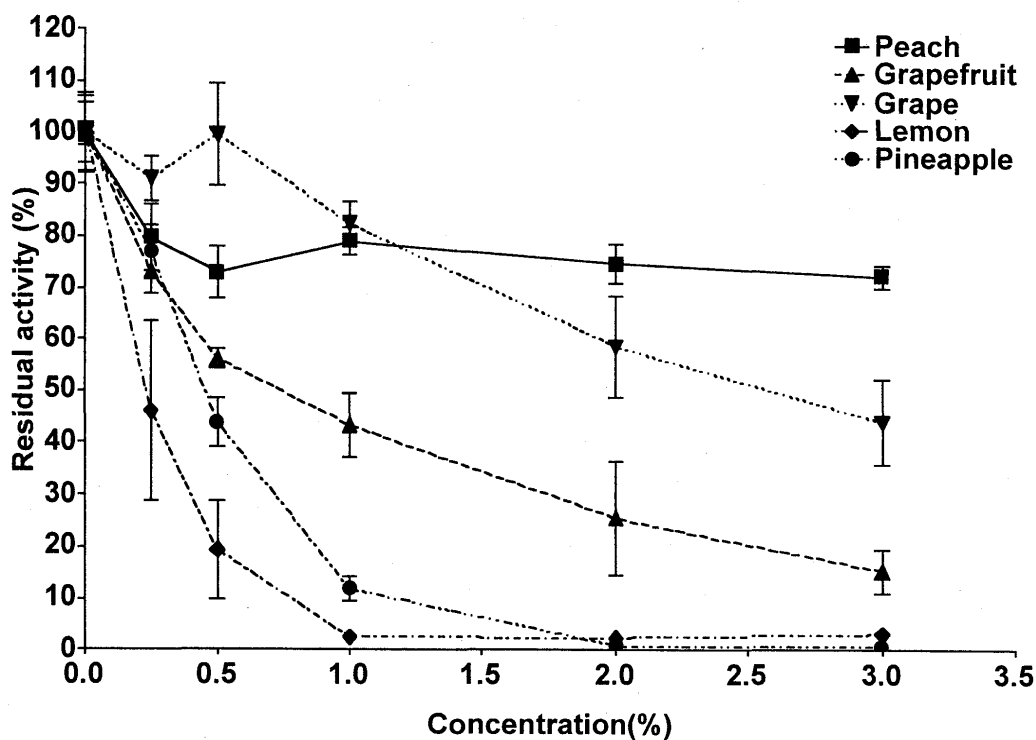


Fig.2 Dose-dependent curves in the inhibition of CYP3A activity of rat liver microsome by various fruit juices. a) Correlation of concentration of the fruit juice with residual activity b) Correlation of concentration of contents of the fruit juice with residual activity. Values are presented as mean  $\pm$  SEM of quadruplicate assays.

ト肝ミクロソームのCYP3A阻害活性を, フルーツジュースの濃度と代謝物量の比の相関から, 50%阻害率 $IC_{50}$ として算出した (Table 2).

この結果から, ヒトCYP3Aの活性では, パイナップルジュースによる阻害が最も強く, それに対してラットのCYP3A活性では, レモンジュースによる阻害が最も強い阻害活性を示した. また, モモジュースは, ヒトおよびラット肝ミクロソームのCYP3A活性を一定以上阻害しないことが示唆された.

## 考 察

食品と医薬品との相互作用が起きる可能性は常にあり, それによって医薬品の動態が変化した場合, 特に重要である. 1990年代初頭に, グレープフルーツジュースとフェロジピンあるいはニフェジピンとの同時投与によりこれらの医薬品の経口バイオアベイラビリティが大幅に増加するということが報告された<sup>15,19)</sup>. この現象は, 更なる研究により, 現在ではグレープフルーツジュースに含まれるフラノクマリンが, ヒトのCYP3Aの阻害物質であることが知られている<sup>16,20)</sup>. また, 最近の研究では, ザクロの成分がヒトCYP3Aによるカルバマゼピンの代謝を阻害し, ザクロジュースも

またラットのカルバマゼピンの薬物動態を変化させることが明らかとなっているが<sup>5)</sup>, これまでのところ, ヒトCYP3A活性に対する果物の影響についての報告は十分為されているとは言い難い. そこで, 本研究では, 医薬品—食品相互作用における臨床的意義を評価するための手段として, ヒトまたはラット肝ミクロソームによるCYP3A活性に対する様々な市販の果物による阻害について検討した.

本研究では, モモ, グレープフルーツ, ブドウ, レモン, パイナップルジュースによる, ヒトおよびラット肝ミクロソームのCYP3A活性への阻害の影響を *in vitro* にて検討した. その結果, ヒトおよびラット肝ミクロソームによるCYP3A活性はレモン, パイナップルジュース1%の濃度で85%以上の阻害を受けた. また, ブドウジュースは, 濃度依存的に代謝を阻害した. 従って, フルーツジュースによる代謝の阻害の程度, 機構はそれぞれのフルーツにより異なることが示唆された. また, ヒト, ラットの異なる種間では, ブドウジュースによる阻害活性がラットの場合, ヒトに比べて減弱する傾向にあるものの, その他の果物では同様の傾向が観測された.

このように, 果物のCYP3A阻害効果はその種類によって異なることが示唆されたが, これは果物に含まれる成分の種類やその構成比の相違によるものと考えられる. 例えば, グレープフルーツジュースの場合, ジュースに含まれるフラノクマリン系化合物とその多量体が<sup>16,20)</sup>, また, イチゴのフェノール性化合物配当体<sup>6)</sup>, 日向夏のリモニン<sup>21)</sup>がCYP3A活性を阻害することが知られている. 一方, 本研究で阻害活性が比較的高かったパイナップルは, これまでにその成分としていくつかのフェノール性化合物が<sup>22)</sup>, また, レモンにはリモニン<sup>23)</sup>が含まれていることが報告されていることから, これらの化合物がCYP3A活性を阻害している可能性が推測される. 本研究の結果も, 果物を絞って得られた100%ジュースを一律に希釈したサンプルを用いた場合 (Fig. 1aおよび2a) と, それらに含まれる成分量を考慮した場合 (Fig. 1bおよび2b) の阻害活性を比較した場合その傾向に変化が観察された. 例えば, グレープフ

Table 2. 50% inhibition concentration of fruits juice in CYP3A activity of midazolam 1'-hydroxylation by human and rat liver microsome

Fruit juice	$IC_{50}$ (%) (mg/ml)	
	human	rat
peach	211.7 (2185.0)	209.5 (2147.4)
grapefruit	0.61 (0.40)	0.65 (0.42)
grape	1.39 (13.2)	32.5 (2384.7)
lemon	0.38 (0.33)	0.19 (0.17)
pineapple	0.11 (0.15)	0.37 (0.65)

Values are presented as mean of quadruplicate assays.

ルーツはジュースの体積で見られる結果よりも成分量を考慮したときの方が他の果物ジュースより相対的に阻害強度が強まる傾向がある。このことは、グレープフルーツに含まれる一般的にはフラノクマリンであると言われる阻害成分の阻害活性が他の果物に含まれる活性成分よりも阻害活性が強い、またはその含量比が大きいことを示唆している。一方で、逆の傾向がグレープジュースの場合に見られる。

以上、レモンとパイナップルの大量摂取は、CYP3Aによって代謝される医薬品との相互作用を引き起こす可能性があることが示唆された。しかしながら、*in vitro*でのCYP3Aの阻害結果を直接*in vivo*での医薬品相互作用へと置き換えることはできないため、レモンやパイナップルのような果物とCYP3Aの基質との相互作用を*in vivo*にて検討することにより、果物によるCYP3A活性阻害が臨床的に意味があるかどうかを検討する必要がある。また、レモンやパイナップルのようなこれまでCYP3A阻害活性の報告がない果物の成分を探索し、その作用機作について検討することも、今後の食品—医薬品相互作用の研究に有益な情報を提供することになる可能性がある。

## REFERENCES

- 1) Guengerich F. P., *J. Pharmacokinet. Biopharm.*, **24**, 521-533 (1996).
- 2) Bailey D. G., Malcom J., Arnold O., Spence J. D., *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **46**, 101-110 (1998).
- 3) Fujita K., Hidaka M., Takamura N., Yamasaki K., Iwakiri T., Okumura M., Kodama H., Yamaguchi M., Ikenoue T., Arimori K., *Biol. Pharm. Bull.*, **26**, 1371-1373 (2003).
- 4) Hidaka M., Fujita K., Ogikubo T., Yamasaki K., Iwakiri T., Okumura M., Kodama H., Arimori K., *Drug. Metab. Dispos.*, **32**, 581-583 (2004).
- 5) Hidaka M., Okumura M., Fujita K., Ogikubo T., Yamazaki K., Iwakiri T., Setoguchi, N. Arimori K., *Drug. Metab. Dispos.*, **33**, 644-648 (2005).
- 6) Tsukamoto S., Tomise K., Aburatani M., Onuki H., Hirorta H., Ishiharajima E., Ohta T., *J. Nat. Prod.*, **67**, 1839-1841 (2004).
- 7) Kim H., Yoon Y.-J., Shon J.-H., Cha I.-J., Shin J.-G., Liu K.-H., *Drug. Metab. Dispos.*, **34**, 521-523 (2006).
- 8) Ogikubo T., Hidaka M., Okumura M., Fujita K.-i., Yamasaki K., Asai M., Iwakiri T., Sasaki H., Kodama H., Arimori K., *Jpn. J. Pharm. Health Care Sci.*, **32**, 392-399 (2006).
- 9) Bailey D. G., Arnold J. M., Munoz C., Spence J. D., *Clin. Pharmacol. Ther.*, **53**, 637-642 (1993).
- 10) Yee G. C., Stanley D. L., Pessa L. J., Dalla Costa T., Beltz S. E., Ruiz J., Lowenthal D. T., *Lancet*, **345**, 955-956 (1995).
- 11) Kupferschmidt H. H., Ha H. R., Ziegler W. H., Meier P. J., Krahenbuhl S., *Clin. Pharmacol. Ther.*, **58**, 20-28 (1995).
- 12) Kupferschmidt H. H., Fattinger K. E., Ha H. R., Follath F., Krahenbuhl S., *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **45**, 355-359 (1998).
- 13) Lilja J. J., Kivisto K. T., Neuvonen P. J., *Clin. Pharmacol. Ther.*, **64**, 488-483 (1998).
- 14) Lilja J. J., Kivisto K. T., Neuvonen P. J., *Clin. Pharmacol. Ther.*, **66**, 118-127 (1999).
- 15) Bailey D. G., Spence J. D., Munoz C., Arnold J. M., *Lancet*, **337**, 268-269 (1991).
- 16) Guo L. Q., Taniguchi M. Xiao Y. Q., Baba K., Ohta T., Yamazoe Y., *Jpn. J. Pharmacol.*, **82**, 122-129 (2000).
- 17) Chung E., Nafziger A. N., Kazierad D. J., Bertino J. S., *Clin. Pharmacol. Ther.*, **79**, 350-361 (2006).
- 18) Emoto C., Yamazaki H., Yamasaki S., Shimada N., Nakajima M., Yokoi T., *Xenobiotica*, **30**, 943-953 (2000).
- 19) Bailey D. G., Spence J. D., Edgar B., Bayliff C. D., Arnold J. M., *Clin. Investig. Med.*, **12**, 357-362 (1989).
- 20) Guo L. Q., Yamazoe Y., *Acta Pharmacol. Sin.*, **25**, 129-136 (2004).
- 21) Hosoi S., Shimizu E., Usami N., Yamamoto I., Arimori K., Okumura M., Hidaka M., Yamada M., Sakushima A., *J. Nat. Med.*, **60**, 240-242 (2006).
- 22) Wen L., Wrolstad R. E., *J. Food Sci.*, **67**, 155-161

(2002).

23) Roy A., Saraf S., *Biol Pharm. Bull.*, **29**, 191-201

(2006).