【原 著】

食一薬間相互作用：薬物代謝酵素 (CYP2C9) 活性に対するエゾウコギの影響（第2報）

Food and Drug Interactions: Effect of *Acanthopanax senticosus* Harms on CYP2C9 Activity (Part 2)

高橋恒久^{1,2}, 佐藤隆司^{1,*}, 渡辺一弘¹
Tsunehisa TAKAHASHI^{1,2}, Takashi SATOH^{1,*}, Kazuhiro WATANABE¹

¹ 北海道薬科大学薬学部

² 株式会社アミノアップ化学

【要 旨】

機能性食品素材として利用されるエゾウコギ *Acanthopanax senticosus* Harms の乾燥エキス (ASE) の CYP2C9 に及ぼす影響について検討した。ヒト小腸および肝ミクロソームを用いた実験より、ジクロフェナク 4'-水酸化活性は ASE の添加により用量依存的に有意に低下し、その阻害形式は非競合的であった。また、ラットに 50~400 mg/kg の ASE を経口投与したときの肝ジクロフェナク 4'-水酸化活性に及ぼす影響を検討したところ、活性値は用量依存的に低下し、200 mg/kg 以上で有意となった。その後、同活性は投与後 8 時間でほぼ投与前のレベルにまで回復した。さらに、CYP2C9 の基質であるトルブタミドをラットに経口投与し、トルブタミドの血中濃度に及ぼす ASE の影響を検討した。単独投与群に比べ、ASE 400 mg/kg の併用群では投与 0-6 時間のトルブタミドの AUC が約 165% 上昇した。

以上より、ASE あるいは代謝物を含む ASE に由来する成分が消化管から吸収され、小腸の CYP2C9 を阻害すると共に、肝へ移行して肝 CYP2C9 活性をも阻害していることが示唆された。

【キーワード】

エゾウコギ, CYP2C9, 食一薬間相互作用, 薬物動態

はじめに

近年、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、サプリメントやいわゆる「健康食品」が利用される機会が増えている。過去には、セントジョーンズワート含有食品の摂取により血液凝固剤であるワルファリンの効果が減弱した例¹⁾や、イチョウ葉含有製品により抗てんかん薬であるバルプロ酸ナトリウムの血中濃度が低下し死亡に至った例²⁾が報告されている。サプリメントを含むこれら「健康食品」を適正かつ安全に使用するためには、食一薬間相互作用のエビデンスの蓄積が急がれる。

エゾウコギ (*Acanthopanax senticosus* Harms) は、中国、ロシアあるいは北海道東部に自生するウコギ科の落葉低木で、中国においては刺五加と呼ばれ約二千年前から滋養強壮薬として利用されてきた。本邦においても抗ストレス作用³⁾、抗疲労作用⁴⁾あるいは免疫賦活作用^{5,6)}等を目的に、健康食品あるいは一般用医薬品の機能性素材として広く用いられている。

我々は先に、エゾウコギが小腸および肝の CYP3A4 活性を阻害し、CYP3A4 の基質薬物であるニフェジピンの体内動態に影響を及ぼす可能性があることを報告した⁷⁾。CYP3A4 はヒト肝ミクロソーム中の CYP 分子種のうち約 30% を占め、数多くの薬物代謝に関与している。

CYP3A4 に次いで、CYP2C サブファミリーはヒト肝ミクロソーム中における構成割合が多く、臨床的に重要な

受理日：2013 年 10 月 24 日

* 〒047-0264 北海道小樽市桂岡町 7 番 1 号 Tel & Fax: 0134-62-1822 E-mail: tsatoh@hokuyakudai.ac.jp

薬物の肝臓における代謝への寄与が大きい。このうち CYP2C9 は約 3 分の 1 を占め⁸⁾、肝臓のみならず小腸においても発現していることが知られており、様々な薬物の代謝に関与している。CYP2C9 の基質には、抗てんかん薬のフェニトインや抗凝固薬のワルファリンがあるが、これらの薬物は治療域が狭く、CYP2C9 活性に影響を及ぼす成分を含有する「健康食品」との併用により、薬物のバイオアベイラビリティに影響を及ぼし、常用量であっても薬効の減弱や増減、さらには毒性の発現等が懸念される^{9,10)}。仮にエゾウコギが CYP3A4 と同様に CYP2C9 を阻害する場合、薬-食相互作用の発現が懸念されるが、エゾウコギが CYP2C9 活性に与える影響を検討した報告は少ない。

そこで我々は、ヒト小腸及び肝ミクロソームを用い、CYP2C9 活性に対するエゾウコギの影響について種々検討を行った。

材料・方法

1. 試薬

ジクロフェナクナトリウム、トルブタミド¹¹⁾は Sigma (St. Louis, MO, U.S.A.) より購入したものを用いた。4'-ヒドロキシジクロフェナク、ヒト小腸ミクロソーム (pooled) (HIM) およびヒト肝ミクロソーム (pooled) (HLM) は、日本ベクトン・ディッキンソン (東京) より購入したものを用いた。 β -nicotineamide-adenine dinucleotide phosphate sodium salt (β -NADP⁺)、D-glucose-6-phosphate sodium salt (G-6-P) および glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PDH) は、オリエンタル酵母 (東京) より購入したものを用いた。その他の試薬は全て市販特級品を用いた。

2. ASE の調製

エゾウコギの乾燥エキス (ASE) は既報に基づいて調製した⁷⁾。

3. 実験動物

Wistar/ST 系雄性ラット (8~10 週齢) は日本エスエルシー (静岡) より購入した。飼育および実験は、北海道薬科大学実験動物センター運営委員会の承認を受け、北海道薬科大学動物実験指針および環境省告示第 88 号「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」に基づき実施した。ラットは、室温 23±1℃、湿度 55±5%、照明 06:00~18:00 の条件のもと個々のケージで飼育し、飼料 (MF, オリエンタル酵母, 東京) および水は自由に摂取させた。

4. ラット肝ミクロソームの調製

約 16 時間絶食させたラットに、精製水に溶解した ASE を 50, 100, 200 および 400 mg/kg となるように経口投与し、一定時間経過後に Saito らの方法¹²⁾を若干改変してラット肝ミクロソーム (RLM) を調製した。エーテル麻酔下で開腹し、頸部動脈を切断、瀉血した後に腹部下大動脈より氷冷リン酸緩衝生理食塩水で肝臓を灌流した。次いで肝臓を摘出し、細切して 100 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) を加え、15 w/v% ホモジネートを調製した。このホモジネートを遠心分離 (9,000×g, 20 min, 4℃) し、さらにその上清を再度遠心分離 (9,000×g, 20 min, 4℃) した。得られた上清を遠心分離 (105,000×g, 60 min, 4℃) した後、得られた沈殿物に 100 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) を加えてホモジナイズし、ミクロソーム画分とした。なお、肝臓摘出後の操作は全て 0~4℃ で行い、ミクロソーム画分は -80℃ で保存した。ミクロソーム画分のタンパク質定量は、ウシ血清アルブミンを標準タンパク質として Bradford の染色法¹³⁾にて Bio-Rad Protein Assay (Hercules, CA, U.S.A.) を用いて行った。

5. ジクロフェナク 4'-水酸化活性の測定

CYP2C9 活性の測定は、ジクロフェナク 4'-水酸化反応を指標に、Obach の方法¹⁴⁾を若干改変して行った。すなわち、NADPH 生成系 (5 mM β -NADP⁺, 0.5 mM G-6-P, 1 unit/mL G-6-PDH および 5 mM MgCl₂) を含む 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) に HIM, HLM (0.1 mg prot./mL) および ASE (0.1~1.0 mg/mL) を加え、37℃ で 5 分間プレインキュベートした。その後、40% メタノールに溶解したジクロフェナク (0~50 μ M) を加え、37℃ で 30 分間インキュベートし、反応は等量の氷冷メタノールを加えることにより停止させた。

4'-ヒドロキシジクロフェナクの定量は、Zhou らの方法¹⁵⁾を若干改変して行った。装置は、ポンプ (L-2130 形; Hitachi, 東京)、UV 検出器 (L-2400 形; Hitachi, 東京)、逆相カラム (Inertsil ODS-2; 5 μ m, 250×4.6-mm i.d.; GL Sciences, 東京) を装備した HPLC システムを用いた。移動相は、0.5%ギ酸/アセトニトリル (55:45, v/v) を用い、流速は 1.0 mL/min、カラム温度 40℃、測定波長 272 nm で行った。

6. トルブタミドの血漿中濃度の測定

約 16 時間絶食させたラットに、トルブタミド (10 mg/kg) および ASE (400 mg/kg) を同時に経口投与し、投与から 6 時間までの一定時間ごとに頸静脈より経時的に採血した。

血漿中トルブタミドの定量は、Nagata らの方法¹⁶⁾を若

干改変して行った。血漿分画後、得られた血漿サンプルに等量のアセトニトリルを加え、攪拌後遠心分離 (16,000×g, 10 min, 4°C) し、上清 10 µL について上記 HPLC システムを用いて血漿中トルブタミド濃度を測定した。移動相は 0.1% リン酸緩衝液 (pH 7.4) / アセトニトリル (20:80, v/v) を用い、流速は 1.0 mL/min, カラム温度 40°C, 測定波長 230 nm で行った。

7. 統計解析

統計解析には IBM SPSS Statistics (Version 20.0, IBM/SPSS, Chicago, IL, U.S.A.) を用いた。独立した 2 群間の差の検定は、*F* 検定で分散検定後、等分散の場合は Student の *t* 検定を、一方、不等分散の場合は Welch の *t* 検定を行った。独立した 3 群間以上の母平均の差の検定は、Bartlett 検定で分散検定後、等分散の場合は一元配置分析を行い、有意差が認められた場合で群間の例数が等しい場合は Dunnett の多重比較検定を、一方、例数が異なる場合は Scheffe の多重比較検定を行った。また、Bartlett 検定後、不等分散の場合は Kruskal-Wallis 検定を行い、有意差が認められた場合 Scheffe の多重比較検定を行った。なお、いずれの場合も有意水準は $p < 0.05$ とした。

結 果

1. HIM および HLM におけるジクロフェナク 4'-水酸化活性に対する ASE の影響

HIM および HLM の CYP2C9 活性に対する ASE の影響について検討した (Fig. 1)。CYP2C9 活性は基質プローブとして推奨されるジクロフェナクの 4'-水酸化活性を指標とし、ジクロフェナクは 50 µM, ASE の添加濃度は 0.1~1.0 mg/mL に設定した。HIM におけるジクロフェナク 4'-水酸化活性は、ASE 0.5 mg/mL 以上の添加により有意に低下し、1.0 mg/mL で 70% 以上の阻害が認められた。

また、HLM におけるジクロフェナク 4'-水酸化活性は、タンパク質量当たり HIM のおよそ 7 倍の活性値を示した。HLM の CYP2C9 活性は、ASE 0.3 mg/mL 以上の添加で有意かつ用量依存的に低下し、1.0 mg/mL で 65% 以上の阻害が認められた (Fig. 1)。

2. 速度論的解析

ASE による CYP2C9 活性の阻害が認められたため、次に CYP2C9 活性に及ぼす ASE 添加の影響について、速度論的解析を行った。ASE の添加濃度は、HIM および HLM 検討の結果から、両酵素源で 50% 阻害濃度付近の 0.3 および 0.5 mg/mL とした (Fig. 1)。ジクロフェナク 0~50 µM の時の結果を Fig. 2(A) に示した。CYP2C9 によるジクロ

Fig. 1 Effects of ASE addition on diclofenac 4'-hydroxylase activity in HIM and HLM.

HIM (●) and HLM (○) (0.1 mg prot./mL) were incubated with diclofenac (50 µM) in the presence of ASE (0.1~1.0 mg/mL) for 30 min at 37°C. Each value represents the mean ± S.D. of three experiments. Significantly different from control, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

フェナク 4'-水酸化活性は、ASE の添加により有意に低下した。この時の Lineweaver-Burk プロットを Fig. 2(B) に示した。Michaelis-Menten の式に従い、 V_{max} 値および K_m 値を算出したところ、ASE の添加により V_{max} 値は有意に低下したが、 K_m 値に有意な変化は認められなかった (Table 1)。

3. 肝 CYP2C9 活性に及ぼす ASE 経口投与の影響

In vitro において、HIM および HLM における ASE のジクロフェナク 4'-水酸化活性の阻害が明らかとなったことから、次に *ex vivo* におけるジクロフェナク 4'-水酸化活性に及ぼす ASE の影響についてラットを用いて検討した。ラットに ASE を 50, 100, 200 および 400 mg/kg とするように経口投与し、投与 8 時間後までの RLM におけるジクロフェナク (50 µM) の 4'-水酸化活性を経時的に測定し、投与前の活性と比較した。結果を Fig. 3 に示す。ASE 添加時の活性値は投与前と比較して投与 30 分後から用量依存的に低下する傾向を示し、ASE 200 mg/kg 以上投与群において、投与後 1 時間で最も低値を示し、かつ有意であった。投与 2 時間以降から活性値は徐々に回復し、投与後 8 時間でほぼ投与前のレベルまで回復した。

4. トルブタミドの血中濃度に及ぼす ASE 経口投与の影響

次に、CYP2C9 の典型的な基質であるトルブタミド (10 mg/kg) をラットに経口投与した時の、トルブタミド

Fig. 2 Michaelis-Menten plot (A) and Lineweaver-Burk plot (B) of diclofenac 4'-hydroxylase activity in HLM.

HLM were incubated with diclofenac (0~50 μM) 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. of three experiments. Significantly different from control, ** $p < 0.01$.

Fig. 3 Time courses of diclofenac 4'-hydroxylase activity in RLM after ASE oral administration.

After ASE oral administration, RLM were incubated with diclofenac (50 μM) for 30 min at 37°C. $\circ$, 50 mg/kg ASE; $\blacklozenge$, 100 mg/kg; $\blacktriangle$, 200 mg/kg; $\bullet$, 400 mg/kg. Each value represents the mean $\pm$ S.D. of six to seven rats. Significantly different from control (0 hr), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Table 1 Kinetic parameters of diclofenac 4'-hydroxylase in HLM

Parameter	Control	ASE (mg/mL)	
		0.3	0.5
$V_{\max}$ (nmol/mg prot./min)	2.02 $\pm$ 0.05	1.19 $\pm$ 0.03**	1.13 $\pm$ 0.10**
K_m (μM)	23.9 $\pm$ 1.25	24.3 $\pm$ 1.78	24.8 $\pm$ 3.35

Each value represents the mean $\pm$ S.D. of three experiments. Significantly different from control, ** $p < 0.01$.

の血中濃度－時間曲線下面積 (AUC) に与える ASE (400 mg/kg) の影響を検討した (Fig. 4). トルブタミド単独の場合、投与 10 分後に最も高い血中濃度 76.70 $\pm$ 4.82 $\mu\text{g/mL}$ に達し、以後時間と共に減少した. 0-6 時間の AUC

は 495.37 $\pm$ 57.82 $\mu\text{g/mL}\cdot\text{hr}$ であった (Table 2). これに対し、ASE を同時投与した時の最も高い血中濃度は投与 1 時間後に遅延し、62.24 $\pm$ 6.24 $\mu\text{g/mL}$ であった. また、AUC は 816.03 $\pm$ 106.85 $\mu\text{g/mL}\cdot\text{hr}$ で、トルブタミド単独より有意に上昇した.

考 察

近年、食－薬相互作用に起因した CYP3A サブファミリー活性の阻害が多く報告されている¹⁴⁾. 先に我々も、エゾウコギが小腸および肝 CYP3A4 活性を阻害することを報告した⁷⁾. 一方、CYP2C サブファミリーはヒト肝ミクロソーム中の CYP 分子種において CYP3A4 に次い

Fig. 4 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 (●) or without (○) ASE oral administration (400 mg/kg). Each value represents the mean±S.D. of four to five rats. Significantly different from the group without ASE oral administration, * $p<0.05$.

Table 2 Pharmacokinetic parameters of tolbutamide after oral administration of ASE

Parameter	ASE (mg/mL)	
	0	400
Cmax (μg/mL)	76.70±4.82	62.24±6.24*
AUC (μg/mL·hr)	495.37±57.82	816.03±106.85*

Each value represents the mean±S.D. of four to five rats. Significantly different from the group without ASE oral administration, * $p<0.05$.

で含量が多く、中でも CYP2C は構成割合が最も多く、様々な薬物の代謝に関与するが、相互作用についての報告は少ない。CYP2C9 の基質薬物には治療濃度域が狭く、厳密な血中濃度管理を必要とするものが少なくない。本研究の目的は、エゾウコギが小腸 CYP2C9 ならびに肝 CYP2C9 に及ぼす影響を明らかにすることにある。

ジクロフェナク 4'-水酸化活性は、HIM においても弱いながらも認められた。一方、HLM はタンパク質量当たり HIM の約 7 倍の酵素活性を示した。ASE の添加により、ヒト小腸および肝のいずれの酵素活性も用量依存的に低下した (Fig. 1)。また、速度論的解析の結果、Km 値は一定で Vmax 値のみ低下したことから、その阻害形式は非競合型であることが示唆された (Fig. 2(B), Table 1)。Henderson ら¹⁷⁾ はエゾウコギの特有成分である eleutheroside B および eleutheroside E のリコンビナント 2C9 活性に対する影響を検討し、両成分は阻害作用を示さなかったと報告している。今回我々が明らかとした ASE のジクロフェナク 4'-水酸化活性の阻害作用は、未知成分を含む単一若しくは複数のエキスを含有成分の関与に

よるものと推察された。

次に、CYP2C9 に対する ASE の影響を明確にするため、ラットを用いて *ex vivo* の実験を行った。ASE をラットに経口投与したときの、肝ジクロフェナク 4'-水酸化活性は、投与後 30 分から用量依存的に低下し、投与後 1 時間で最低値を呈し、その後 4 時間で投与前のレベルにまで回復した (Fig. 3)。これは、代謝物を含む ASE 由来成分が小腸微絨毛刷子縁膜を通過し、消化管から吸収され、肝へ移行し、肝 CYP2C9 活性を阻害していることを示唆している。Sun ら¹⁸⁾ はエゾウコギをラットに経口投与したところ、血中に eleutheroside B, E を含むエゾウコギ由来の 11 成分及びその代謝物 8 種を検出したと報告している。一方、Henderson らによれば、eleutheroside B, E は CYP2C9 の阻害作用を有していないことから、本研究において認められたジクロフェナク 4'-水酸化活性阻害は、Sun らによって検出された eleutheroside B, E 以外の成分による可能性が考えられる。今回用いた ASE はこれら成分が含まれる他に、chlorogenic acid やエゾウコギとの特有成分とされる eleutheroside B₁, isofraxidin の含有も確認している⁷⁾。また、ASE 中に含有する配糖体等の構成成分の一部は、胃や小腸の消化管で加水分解を受け、アグリコン等の代謝物となり CYP2C9 活性の阻害に関与している可能性もある。

トルブタミドは、主に CYP2C9 によって代謝される経口糖尿病薬である。CYP2C9 阻害剤であるスルファフェナゾールとの併用により、トルブタミドの血清中濃度が上昇し、深刻な低血糖状態を引き起こしたとの報告¹⁹⁾が

ある。もし、ASE が小腸あるいは肝臓に発現する CYP2C9 活性を阻害する場合、同様の症状に至る可能性が考えられる。そこで、ASE がトルブタミドの体内動態に影響を与えるかどうかについて、ラットを用いて検討した。その結果、ASE 400 mg/kg の同時投与で 0–6 時間の AUC が 160% に上昇した (Fig. 4)。先の我々の研究から、ASE は小腸における P 糖タンパク質 (P-gp) 輸送活性を阻害することが明らかとなっていることから²⁰⁾、AUC の上昇は、その結果として AUC の上昇、すなわちトルブタミドのバイオアベイラビリティの増加につながったとも考えられる。しかしながら、Nishimura らは、トルブタミドの Caco-2 細胞における輸送に P-gp は関与していないことを報告している²¹⁾。よって、トルブタミドのバイオアベイラビリティの増加は、ASE の P-gp 輸送活性の阻害によるものではなく、CYP2C9 の阻害によるものであると考えられる。

結 論

以上より、エゾウコギは、先に我々が報告⁷⁾した CYP3A4 活性の阻害に加え、小腸及び肝 CYP2C9 活性を阻害することが明らかとなった。一度に大量のエゾウコギを摂取しないこと、あるいは内服薬を同時に服用せず、少なくとも 4 時間以上間隔を空けるなど適切な摂取を心掛ければ、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。

助成源

なし

参考文献

- Ernst E. Second thoughts about safety of St John's wort. *Lancet* 1999; 354: 2014–2015.
- Kupiec T, Rai V. Fatal seizures due to potential herb-drug interactions with *Ginkgo biloba*. *J Anal Toxicol* 2005; 29: 755–758.
- Fujikawa T, Yamaguchi A, Morita I, et al. Protective effects of *Acanthopanax senticosus* Harms from Hokkaido and its components on gastric ulcer in restrained cold water stressed rats. *Biol Pharm Bull* 1996; 19: 1227–1230.
- Nishibe S, Kinoshita H, Takeda H, et al. Phenolic compounds from stem bark of *Acanthopanax senticosus* and their pharmacological effect in chronic swimming stressed rats. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 1990; 38: 1763–1765.
- Steinmann GG, Esperester A, Joller P. Immunopharmacological in vitro effects of *Eleutherococcus senticosus* extracts. *Arzneimittelforschung* 2001; 51: 76–83.
- Deyama T, Nishibe S, Nakazawa S. Constituents and pharmacological effects of *Eucommia* and Siberian ginseng. *Acta Pharmacol Sin* 2001; 22: 1057–1070.
- 佐藤隆司, 高橋恒久, 渡辺一弘. 食-薬間相互作用: CYP3A4 に対するエゾウコギの影響. *日本未病システム学会雑誌*. 2013; 9: 36–44.
- Miners JO, Birkett DJ. Cytochrome P4502C9: an enzyme of major importance in human drug metabolism. *Br J Clin Pharmacol* 1998; 45: 525–538.
- Gilbar PJ, Brodribb TR. Phenytoin and flurouracil interaction. *Ann Pharmacother* 2001; 35: 1367–1370.
- Suvarna R, Pirmohamed M, Henderson L. Possible interaction between warfarin and cranberry juice. *BMJ* 2003; 327: 1454.
- Bjornsson TD, Callaghan JT, Einolf HJ, et al. The conduct of in vitro and in vivo drug-drug interaction studies: a Pharmaceutical Research and Manufacturers of America (PhRMA) perspective. *Drug Metab Dispos* 2003; 31: 815–832.
- Saito M, Okutomi T, Shimizu M, et al. Activities of rat cytochrome P450 3A and 2C isoforms are increased in vivo by magnesium sulfate as evidenced by enhanced oxidation of bupivacaine and testosterone in liver microsomes. *Drug Metab Pharmacokinet* 2006; 21: 201–207.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248–254.
- Obach RS. Inhibition of human cytochrome P450 enzymes by constituents of St. John's Wort, an herbal preparation used in the treatment of depression. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 294: 88–95.
- Zhou D, Lu Y, Steiner MS, et al. Cytochrome P-450 2C9 sensitizes human prostate tumor cells to cyclophosphamide via a bystander effect. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 2659–2663.
- Nagata M, Hidaka M, Sekiya H, et al. Effects of pomegranate juice on human cytochrome P450 2C9 and tolbutamide pharmacokinetics in rats. *Drug Metab Dispos* 2007; 35: 302–305.
- Henderson GL, Harkey MR, Gershwin ME, et al. Effects of ginseng components on c-DNA-expressed cytochrome P450 enzyme catalytic activity. *Life Sciences* 1999; 65: PL209–PL214.
- Sun H, Lv H, Zhang Y, et al. HPLC method for preliminary analysis of constituents in rat blood after oral administration of the extract of *Acanthopanax senticosus*. *J Sep Sci* 2007; 30: 3120–3126.
- Christensen LK, Hansen JM, Kristensen M. Sulphaphenazole-induced hypoglycaemic attacks in tolbutamide-treated diabetics. *Lancet* 1963; 2: 1298–1301.
- Takahashi T, Kaku T, Sato T, et al. Effects of *Acanthopanax senticosus* HARMS extract on drug transport in human intestinal cell line Caco-2. *J Nat Med* 2010; 64: 55–62.
- Nishimura N, Naora K, Uemura T, et al. Transepithelial permeation of tolbutamide across the human intestinal cell line, Caco-2. *Drug Metab Pharmacokinet* 2004; 19: 48–54.

ABSTRACT

Food and Drug Interactions: Effect of *Acanthopanax senticosus* Harms on CYP2C9 Activity (Part 2)Tsunehisa TAKAHASHI^{1,2}, Takashi SATOH¹, Kazuhiro WATANABE¹¹ Hokkaido Pharmaceutical University School of Pharmacy² Amino Up Chemical Co., Ltd.

Objective: *Acanthopanax senticosus* Harms extract (ASE) is an ingredient of functional foods, such as health supplements, in Japan. We investigated the effects of ASE on CYP2C9 activity.

Methods and Results: CYP2C9-catalyzed diclofenac 4'-hydroxylase activities in human intestinal and liver microsomes (abbreviated as HIM and HLM, respectively) were significantly decreased by the addition of ASE in a concentration-dependent manner. Kinetic studies of diclofenac 4'-hydroxylase in HLM revealed that ASE addition significantly decreased $V_{\max}$ but had no effect on K_m . These results suggest that diclofenac 4'-hydroxylase activity is suppressed by ASE addition in a non-competitive manner. Then, we investigated the time courses of diclofenac 4'-hydroxylase activity in rat liver microsomes after ASE oral administration (50 to 400 mg/kg). Diclofenac 4'-hydroxylase activities were significantly lowered by the administration of 200 and 400 mg/kg ASE at 0.5 to 4 hr compared with control (0 hr). Furthermore, we investigated the effects of ASE oral administration on the pharmacokinetics of tolbutamide (substrate for CYP2C9) in rats. The area under the concentration-time curve of tolbutamide after ASE oral administration (400 mg/kg) was enhanced by approximately 1.6 times compared with that without ASE oral administration.

Conclusion: These findings indicated that ASE inhibits human intestinal and hepatic CYP2C9 activities.

Key words: *Acanthopanax senticosus* Harms, CYP2C9, food and drug interaction, pharmacokinetics