【短 報】

Coix-seed Reactive Derivatives (CRD) の薬物代謝酵素
CYP3A4, CYP2D6, CYP2C9 に与える影響Effects of Coix-seed Reactive Derivatives (CRD) on Cytochrome
P450 Isoforms CYP3A4, CYP2D6, CYP2C9 In Vitro鈴木信孝^{1,*}, 許 鳳浩¹, 上馬場和夫², 太田富久³
Nobutaka SUZUKI^{1,*}, Hoko KYO¹, Kazuo UEBABA², Tomihisa OHTA³¹ 金沢大学大学院医薬保健学総合研究科 臨床研究開発補完代替医療学講座² 帝京平成大学³ 金沢大学学際科学実験センター

【要 旨】

Coix-seed Reactive Derivatives (CRD) と薬物との相互作用の有無を検討するために、薬物代謝酵素チトクローム P450 に対する CRD の阻害活性を In vitro で測定した。CRD は、製造ロットが異なるものを2種類測定した (CRD 1, CRD 2)。測定には CYP スクリーニング・キットとルミノイメーリアナライザーを用いた。CRD 1 と CRD 2 の CYP3A4 に対する IC₅₀ はそれぞれ >500 µg/ml, 490 µg/ml, CYP2D6 の IC₅₀ は >500 µg/ml, >500 µg/ml, CYP2C9 の IC₅₀ は >500 µg/ml, 339 µg/ml であった。以上の結果より、CRD は CYP3A4, CYP2D6, CYP2C9 に対し阻害作用をほとんど有していないと考えられた。今後はさらに In vivo での阻害活性の有無を検討したい。

【キーワード】

ハトムギ, ハトムギ反応生成物, CYP3A4, CYP2D6, CYP2C9

はじめに

最近、健康食品やサプリメント使用が増大するのにとともに、食品と医薬品との相互作用を懸念する声が大きくなってきている。しかしながら、メディカルハーブを含めいわゆる健康食品と医薬品との相互作用に関しては、医薬品同士の相互作用に比べ科

学的な検証データが少ないのが現状である。健康食品やサプリメントの適正かつ安全な使用を推進するためにも、これらの相互作用のエビデンスの構築が急務となっている。一方、我々はハトムギの外殻、薄皮、渋皮の食効に着目し、Coix Reactive Derivatives (CRD) を研究開発し、CRD が有する様々な生物作用について研究しているが、今回、薬物代謝酵素チトクローム P450, なかでも薬物代謝における重要度の高い CYP3A4, CYP2D6, CYP2C9 に与える CRD の影響について検討したので報告する。

材料・方法

測定検体としてハトムギ全粒熟水抽出エキス CRD (Coix-seed Reactive Derivatives) (株式会社 ALT 製) の異なる製造ロット CRD 1, CRD 2 の2種類を用いた。ネガティブコントロールの食品としては我々が研究室で標準的に使用しているアガリクス菌糸体と緑茶を用いた。

また、市販のグレープフルーツジュースの中で最も CYP 阻害活性が強いものを1つ選択し、濃度 1/4 に希釈したものをコントロール検体として用いた。ポジティブコントロールとしては、CYP3A4 測定の際は katoconazol [Sigma-Aldrich (K1003)] を、CYP2D6 には quinidine [Sigma-Aldrich (Q3625)] を、CYP2C9 には miconazol [Sigma-Aldrich (M3512)] を用いた。測定は3種類の測定キット、① Vivid CYP3A4 Green Screening Kit (インビトロジェン製)、② Vivid CYP2D6 Blue Screening Kit (インビトロジェン製) および ③ Vivid CYP2C9 Green Screening Kit (インビトロジェン製) を用いた。測定は、サンプルの

Table 1. CRD の CYP3A4 阻害率と IC₅₀

濃度	グレープフルーツ ジュース	濃度	ketoconazole	濃度	CRD 1	CRD 2	コントロール キノコ菌糸体	コントロール 緑茶
1/4	100.0%	1 µg/ml	85.7%	500 µg/ml	30.4%	50.8%	59.3%	50.4%
		0.1 µg/ml	28.9%	100 µg/ml	5.0%	19.8%	7.6%	13.4%
		0.01 µg/ml	3.2%	20 µg/ml	-14.1%	4.7%	0.0%	5.0%
		0.001 µg/ml	-1.7%	4 µg/ml	-10.2%	14.4%	-5.6%	11.7%
		IC ₅₀	0.4 µg/ml	IC ₅₀	>500 µg/ml	490 µg/ml	428 µg/ml	496 µg/ml

Table 2. CRD の CYP2D6 阻害率と IC₅₀

濃度	グレープフルーツ ジュース	濃度	quinidine	濃度	CRD 1	CRD 2	コントロール キノコ菌糸体	コントロール 緑茶
1/4	100.0%	1 µg/ml	93.8%	500 µg/ml	11.2%	12.6%	5.8%	29.2%
		0.1 µg/ml	88.9%	100 µg/ml	14.4%	-0.5%	-18.5%	20.7%
		0.01 µg/ml	72.5%	20 µg/ml	20.4%	-11.0%	-5.4%	13.3%
		0.001 µg/ml	29.8%	4 µg/ml	17.0%	-15.2%	-1.3%	22.5%
		IC ₅₀	0.01 µg/ml	IC ₅₀	>500 µg/ml	>500 µg/ml	>500 µg/ml	>500 µg/ml

Table 3. CRD の CYP2C9 阻害率と IC₅₀

濃度	グレープフルーツ ジュース	濃度	miconazole	濃度	CRD 1	CRD 2	コントロール キノコ菌糸体	コントロール 緑茶
1/4	100.0%	1 µg/ml	96.3%	500 µg/ml	36.0%	66.7%	47.0%	35.5%
		0.1 µg/ml	43.9%	100 µg/ml	7.0%	26.6%	-2.5%	2.9%
		0.01 µg/ml	28.3%	20 µg/ml	1.7%	14.9%	-14.0%	-20.5%
		0.001 µg/ml	13.5%	4 µg/ml	-1.4%	13.8%	-19.9%	-20.2%
		IC ₅₀	0.2 µg/ml	IC ₅₀	>500 µg/ml	339 µg/ml	>500 µg/ml	>500 µg/ml

希釈系列に基質および CYP450 を加え、反応を開始させ、30 分後にルミノイメージアナライザー LAS-3000 (富士フィルム) を用いて、基質の反応産物の産出量を測定した。次いで、サンプルを添加していないウェルにおける基質の反応産物の産生量を 100 % とした反応の阻害率を下記の式で算出した。

$$\text{阻害率 (\%)} = \{(\text{ODc-ODcb}) - (\text{ODs-ODsb})\} / (\text{ODc-ODcb}) \times 100$$

OD:optimal density, c:control, s:sample, b:blank

上記の式で求めた阻害率から 50 % 阻害率 IC₅₀ を算出した。なお、阻害率がマイナスになった場合は、阻害はないものとみなして阻害率 0 % とした。

結 果

CYP3A4 の阻害については、Table 1 に、CYP2D6 の阻害については Table 2 に、CYP2C9 の阻害については Table 3 に示した。CRD 1 と CRD 2 の CYP3A4 に対する IC₅₀ はそれぞれ >500 µg/ml, 490 µg/ml, CYP2D6 の IC₅₀ は >500 µg/ml, >500 µg/ml, CYP2C9 の IC₅₀ は >500 µg/ml, 339 µg/ml であった。CRD 1, CRD 2 は CYP3A4, CYP2D6 に対し阻害作用を有していなかった。また、CRD 1 は CYP2C9 に対し阻害作用を有していなかったが、CRD 2 の CYP2C9 に対する IC₅₀ は 339 µg/ml とごくわずかな阻害作用を有していた。

考 察

薬物代謝酵素であるチトクローム P450 (cytochrome P450: CYP) には多くの種類があり、亜型により代謝を受ける薬物が異なることが知られているが、亜型の一つである CYP3A4 を介する薬物代謝がもっとも多くを占めており、重要視されている¹⁾。また、代謝に関与する主要なヒト P450 分子種の割合を 94 の医薬品について調査した結果では、35 の医薬品が CYP3A であり (37.2 %), 31 が CYP2D6 (33.0 %), 10 が CYP2C9 (10.6 %) および CYP2C19 (10.6 %), 4 が CYP1A2 (4.3 %), その他が 4 (4.3 %) であり、CYP3A, CYP2D6 と CYP2C9 だけで約 8 割以上を占めている²⁾。そこで、今回 CYP3A4, CYP2D6, CYP2C9 に的を絞って検討したが、CRD 1 と CRD 2 はともに CYP3A4, CYP2D6 に対し阻害作用を有していなかった。また、CRD 1 は CYP2C9 に対する IC₅₀ が >500 µg/ml であったのに対し、CRD 2 の IC₅₀ は 339 µg/ml とごくわずかに阻害作用を有していた理由は測定誤差、もしくはロット間のばらつきが考慮されるため、今後別のロットで CYP2C9 に対する阻害作用を再検討していくつもりである。

ハトムギの薬物代謝酵素に与える影響に関する報告は少なく、我々の調べた限り 2 件の In vivo での報告がみられた。Yao らはハトムギ糠のエタノール抽出物を 5 % もしくは 10 % 含む餌をラットに 4 週間摂取させ、肝と肺のミクロゾーム分画中の各 CYP 活性をイムノブロット法で測定した。その結果、肝臓では CYP1A1, 1A2, 2C6, 2C11, 2D1, 2E1, 3A1,

3A2が減少し、肺ではCYP1A1が減少した³⁾。

ハトムギには抗癌作用や癌化学予防作用があることはよく知られた事実であるが^{4,5)}、ハトムギの子実のヨクイニン油から製造された中国・ロシアの医薬品 Kanglaite (KLT) は、現在、アメリカで米国食品医薬品局 (FDA) の許可のもとに、非小細胞肺がんの治療薬として、第Ⅱ相試験が実施され⁴⁾、現在、第Ⅲ相試験も計画されている。Du Xらは、Kanglaiteの薬物代謝酵素に与える影響を報告した⁶⁾。Kanglaiteをラットの腹腔内に7日間投与し、その後、5種類の薬剤を含むカクテル溶液を経口投与し、それぞれの薬物の半減期を測定した。薬剤のうちphenacetinはCYP1A2, bupropionはCYP2B6, tolbutamideはCYP2C9, omeprazoleはCYP2C19, midazolamはCYP3A4の指標とした。結果は、Kanglaite投与によりCYP1A2は誘導され、CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4は阻害された⁶⁾。

今回、我々はIn vitroでCRDの薬物代謝酵素に与える検討を行ったが、CYP3A4, CYP2D6, CYP2C9には影響がみられなかった。CRDは子実のみならず、渋皮、薄皮、外殻を酵素処理した熱水抽出物であるので、Kanglaiteのように子実のみのヨクイニン油とは組成が異なる。また、Yaoらの試料はハトムギ糠のエタノール抽出物であり、やはりCRDとはかなり組成が異なると考えられる。これら組成の相違が、CYPに与える影響の差になっているのかもしれない。いずれにしろ、今後CRDのIn vivoにおける薬物代謝酵素への影響を検討したいと考えている。

結 論

薬物代謝酵素チトクロームP450に対するCRDの阻害活性をIn vitroで測定したが、CRDはCYP3A4, CYP2D6, CYP2C9に対し阻害作用をほとんど有していないと考えられた。

助成元

平成20年 農商工等連携事業計画認定 第1期(経済産業省, 中小企業庁)

利益相反

本試験に用いたハトムギ全粒熱水抽出エキスCRDは著者鈴木信孝、太田富久らが設立した大学発ベンチャー企業(株)CRDの研究開発食品である。

謝 辞

(株)バイオセラピー開発研究センター、川島拓也医師、新井隆成医師、徳田春邦、(株)JAアグリひみ、JA氷見市、NPO法人代替医療科学研究センター他、関係各位に感謝します。

参考文献

- 1) F. Peter Guengerich. CYTOCHROME P-450 3A4: Regulation and Role in Drug Metabolism. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 1999; 39: 1-17.
- 2) 千葉寛. ヒト P450 分子種同定: 臨床薬理学及び医薬品開発における意義. 薬物動態. 1995; 10(3): 391-402.
- 3) Yao HT, Lin JH, Chiang MT, et al. Suppressive effect of the ethanolic extract of adlay bran on cytochrome P-450 enzymes in rat liver and lungs. J Agric Food Chem. 2011; 59(8): 4306-4314.
- 4) 鈴木里芳, 徳田春邦, 鈴木信孝ら. ハトムギの抗腫瘍ならびに抗炎症作用に関する検討. 日本補完代替医療学会誌. 2013; 10(2): 75-85.
- 5) 鈴木信孝. ハトムギと健康体質. FOOD STYLE 21. 2014; 18(6): 57-61.
- 6) Du X, Ye H, Zhang C, et al. Effect of kanglaite on rat cytochrome P450. Pharm Biol. 2015; 53(7): 995-1001.

ABSTRACT

Du X, Ye H, Zhang C, et al. Effect of kanglaite on rat cytochrome P450.
Pharm Biol. 2015; 53(7): 995-1001.

Nobutaka SUZUKI¹, Hoko KYO¹, Kazuo UEBABA², Tomihisa OHTA³

¹*Department of Complementary and Alternative Medicine Clinical Research and Development,
Kanazawa University Graduate School of Medical Science*

²*Teikyo Heisei University*

³*Advanced Science Research Center, Kanazawa University*

CRD, a Coix-seed Reactive Derivatives, has a novel mechanism in the treatment of various diseases. In the present study, a fluorometric-based high throughput method using cytochrome P450 (CYP) screening kit was adopted to evaluate in vitro inhibition potential of CRD (CRD 1 and CRD 2) on CYP isoenzymes by calculating remaining enzyme activities and inhibitory potential (IC₅₀ values) using the determined values of fluorescence intensity. IC₅₀ of CRD 1 and CRD 2 were as follows: CYP3A4; >500 µg/ml, 490 µg/ml, CYP2D6; >500 µg/ml, >500 µg/ml, CYP2C9; >500 µg/ml, 339 µg/ml, respectively. The result showed that CRD exhibited little activity in the inhibition of CYP3A4, CYP2D6 and CYP2C9.

Key words: *Coix lacryma-jobi* L. var. *ma-yuen* Stapf, Coix Reactive Derivatives, CYP3A4, CYP2D6, CYP2C9