P-糖タンパク基質のラット消化管吸収に対する 黒酢(国内産玄米酢)の影響

岩尾一生^{1,2}, 木村なつほ¹, 小田雅子¹, 小林道也¹, 齊藤浩司^{*1}

北海道医療大学薬学部薬剤学講座¹, 北海道医療大学病院薬剤部²

Effect of Kurosu(Japanese Unpolished Rice Vinegar) on Absorption of P-glycoprotein Substrates in Rat Small Intestine

Kazunari Iwao^{1,2}, Natsuho Kimura¹, Masako Oda¹,
Michiya Kobayashi¹ and Hiroshi Saitoh^{*1}

Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Health Sciences University of Hokkaido¹,
Department of Pharmacy, Health Sciences University of Hokkaido Hospital²

[Received October 26, 2010]
[Accepted February 22, 2011]

The objective of this study was to assess possible interaction between kurosu (japanese unpolished rice vinegar) and P-glycoprotein (P-gp), using rhodamine 123 (Rho-123) and glibenclamide (GB) as known P-gp substrates. The absorption of the drugs was investigated using an in situ loop technique. Three 10-cm loops were created in the rat small intestine - in the duodenal, jejunal, and ileal regions. Then, a test solution was introduced into each loop and its disappearance rate after 30 min was determined.

In the presence of kurosu, Rho-123 absorption markedly increased in the 3 regions. Although the lipophilicity of GB was greater than that of tolbutamide (TB), GB absorption was much less than that of TB in the 3 regions, which implied that an efflux transporter restricted GB absorption. However, typical P-gp inhibitors such as verapamil and cyclosporin A slightly increased GB absorption. Also, the enhancing effect of kurosu on GB absorption was limited.

The present results suggest that some components of kurosu are capable of strongly interfering with P-gp function in the intestine and increasing the absorption of P-gp substrates. Our data also imply that an efflux transporter other than P-gp is involved in the low absorption of GB.

Key words — kurosu, P-glycoprotein, rhodamine 123, glibenclamide, intestinal absorption, drug interaction

緒 言

現在, さまざまな健康食品が普及し, 患者が自己判断で処方薬とともにそれらを服用する例が増加している。健康食品の中には, 薬物の体内動態に影響を及ぼすものが多数存在する¹⁾が, セント・ジョーンズ・ワート等の一部の健康食品を除いて, その相互作用の機序については未解明の部分が多い。医薬品と健康食品との相互作用は, 長期にわたり複数の治療薬を服用し続ける慢性疾患患者において特に留意すべきである。例えば糖尿病患者においては生涯に渡り厳密な血糖値のコントロールが必要であり, 健康食品の摂取による直接的な, あるいは糖尿病治療薬との相互作用などに基づく間接的な血糖値へ

の影響は, 症状の増悪を招く危険性を孕んでいる。

われわれはこれまで, 北海道医療大学病院の外来糖尿病患者における治療薬の処方状況ならびに健康食品の使用実態を調査し, グリベンクラミド(GB)等のスルホニル尿素系薬剤(SU剤)を処方される患者が多いこと, また黒酢(国内産玄米酢)などの健康食品を使用する患者が比較的多いことを報告した^{2,3)}。一方, 年齢が高くて罹病期間が長いほど, また糖尿病コントロールが悪い患者ほど黒酢等の健康食品を利用する頻度が高いことも報告されている⁴⁾。したがって, 患者の中にはGBと黒酢を併用する例のあることも予測される。しかしながら, 黒酢がイトラコナゾールの吸収を増大させるという報告⁵⁾があるものの, 黒酢の薬物相互作用についてはこれまでほとんど検証されていない。

* 北海道石狩郡当別町金沢1757

最近の研究で、GBの消化管吸収には有機アニオン輸送ポリペプチド(OATP)や、分泌トランスポーターであるP-糖タンパク(P-gp)が関与することが報告されている^{6,7)}。そこで本研究では、P-gp基質の消化管吸収に対する黒酢の影響を明らかにするために、代表的基質であるローダミン123(Rho-123)とGBの消化管吸収に対する黒酢の影響について、ラット小腸*in situ*ループ法により検討を加えた。

方 法

1. 薬物および試薬

Rho-123はAcros Organics(Morris Plains)から購入した。GB、トルブタミド(TB)、ベラパミル塩酸塩(VER)ならびにシクロスポリンA(CsA)は、和光純薬工業株式会社から購入した。黒酢は、市販の純玄米黒酢(オリヒコ(株))を用いた。その他の試薬はすべて市販の特級規格またはそれに準ずる規格を用いた。

2. 試験液の調製

薬物溶液の調製には、6 mM D-グルコースを含むタイロード液(137 mM NaCl, 3 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 12 mM NaHCO₃, 0.4 mM NaH₂PO₄)を使用した。GBおよびTBは水に難溶であることから、あらかじめエタノールに溶解させて原液を調製し、これを溶解補助剤としてβ-シクロデキストリンを添加したタイロード液で使用濃度まで希釈し実験に供した。β-シクロデキストリンの濃度は、医薬品の吸収実験に影響を与えないことが確認されている1%とした⁸⁾。黒酢は原液をタイロード液にて2倍または10倍に希釈して実験に供した。使用した黒酢はpH約3.0と酸性を呈し、また緩衝作用が強いためにタイロード液を用いて通常の吸収実験条件であるpH6~7.4に調整するには相当量の希釈が必要だったことから、黒酢共存下での吸収実験はpHを3.5に調整して行った。

3. *in situ* ループ法による吸収実験

実験計画は北海道医療大学動物実験センター管理運営委員会によって審査・承認され、動物実験は北海道医療大学動物実験指針に従って行った。*in situ*ループ法による吸収実験は、LevineとPelikan⁹⁾およびSaitohら¹⁰⁾の方法に準拠して行った。まず体重240~480 gのWistar系雄性ラット((株)ホクドー)を15~18時間絶食した後、エーテルとペントバルビタールナトリウム(40 mg/kg、腹腔内投与)で麻酔し、十二指腸部、空腸部、回腸部にループを作成した。すなわち、胃幽門部2 cm下から約10 cmの部分に十二指腸ループ、その下に約10 cmの間隔をおき、そこから下方へ約10 cmの部分に空腸ループ、また回盲部の約5 cm上から上方へ約10 cmの部分に回腸ループとした。各ループ内を生理食塩液で洗浄しながら内容

物を除去した後、ループの両端を結紮しシリンジで試験液1 mLを注入して直ちに腸管を腹腔内に戻した。なお、腸管内への胆汁の流入を避けるために胆管をあらかじめ結紮した。また全身麻酔による体温低下を防ぐために、吸収実験中はランプを用いてラットを保温した。試験液投与30分後に各ループを速やかに小腸より単離し、生理食塩液中でループ表面の血液を除去した後、ループ内液をメスフラスコ中に回収した。さらにタイロード液でループ内を洗浄しながら全量を10 mLにした。

また、ループ粘膜への薬物蓄積量を算出するために、粘膜部分をスライドガラスで擦過した後タイロード液(pH7.4)を加えて氷冷下ホモジナイズし、全量を10 mLとした。得られたループ内液および粘膜ホモジネート各200 μLにメタノール200 μLを加え、氷冷下にて10分放置後、遠心分離(5,350 × g, 5℃, 10分)した。得られた上清中の薬物濃度をHPLCにて測定した。なお、採取した試料は定量時まで-30℃にて凍結保存した。

4. 分配係数の測定

あらかじめオクタノールを飽和させたタイロード液(pH3.5, 6.0または7.4)を用いて薬物溶液(50 μM)を調製し、共栓試験管に3 mLずつ分注した。これにタイロード液を飽和させたオクタノールを3 mLずつ添加し、室温にて1時間振とうした。振とう終了後、直ちに遠心分離(1,150 × g, 5℃, 10分)し、オクタノール層を吸引除去した後、タイロード液中の残存薬物濃度をHPLCにて測定した。初期濃度をA、振とう後のタイロード液中濃度をA'とし、次式よりlog分配係数(log P)を算出した。

$$\log P = \log(A - A')/A'$$

5. HPLC分析

HPLCは、SPD-10A VP UV/VIS detector((株)島津製作所)を備えたLC-10AT VP((株)島津製作所)を使用した。カラムはCosmosil 5C₁₈-AR(5 μm, 4.6 × 150 mm, ナカライテスク(株))を用いた。移動相として、Rho-123の定量には0.05 M KH₂PO₄ : CH₃CN = 6 : 4を、GBの定量には0.05 M KH₂PO₄ : CH₃CN = 1 : 1を、TBの定量には0.05 M KH₂PO₄ : CH₃CN = 7 : 6をそれぞれ用いた。流速はRho-123で0.6 mL/min、GBで1.0 mL/min、TBで0.7 mL/minとした。カラム温度は50℃とし、Rho-123は500 nm、GBは230 nm、TBは226 nmでそれぞれ検出した。

6. 統計処理

結果はすべて平均値 ± 標準誤差(mean ± S.E.)で示した。二群間の有意差検定はStudent's *t*-testにより行った。また、多群間検定は一元配置分散分析(One-factor ANOVA)により行い、有意差が認められた場合に多重比較検定(データ数が等しい場合: Tukey-Kramer test, データ数が異なる場合: Scheffe's F test)を行った。*p* < 0.05を

Fig. 1. Effect of Kurosu on the Disappearance of Rhodamine 123(100 μ M) from Rat Intestinal Loops
Medium pH was set at 3.5. Each column represents the mean with S.E. of 3 experiments.
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, significantly different from rhodamine 123 alone or rhodamine 123 with kurosu(1/10).

Fig. 2. Disappearance of Glibenclamide and Tolbutamide from Rat Intestinal Loops
Initial drug concentration was 50 μ M. Medium pH was set at 6.5. Each column represents the mean with S.E. of 4 experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, significantly different from tolbutamide.

Table 1. Log Partition Coefficients of Glibenclamide and Tolbutamide between n-Octanol and Tyrode's Solution

	pK_a	log P		
		pH 3.5	pH 6.5	pH 7.4
Glibenclamide	6.8	1.21 ± 0.02	1.19 ± 0.02	1.12 ± 0.01
Tolbutamide	5.43	n.d.	0.04 ± 0.01	-0.37 ± 0.00

The pH of Tyrode's solution was 6.5.
Each value represents the mean $\pm$ S.E. of 3 experiments. n.d., not determined.

もって有意差ありとした。

結 果

1. Rho-123の吸収に対する黒酢の影響

2倍希釈の黒酢共存下で、代表的P-gp基質であるRho-123のラット小腸ループからの消失率は十二指腸部、空腸部、回腸部でそれぞれ約50%、58%、50%であり、単独投与時に比べ各部位で有意に増大した(Fig. 1)。一方、10倍希釈の黒酢共存下ではRho-123の消失率はそれぞれ約25%、34%、47%となり、回腸部で有意な増大がみられた。

2. グリベンクラミドおよびトルブタミドの吸収挙動

GBがP-gpの基質になることは報告されている⁷⁾ものの、その吸収特性についてはほとんど報告されていない。そこで、GBの吸収に対する黒酢の影響を検討するのに先だって、同じSU剤であるTBとGBのラット小腸ループからの吸収性を比較した(Fig. 2)。この吸収実験は

pH 6.5の条件下で行ったが、TBの消失率は十二指腸部で約86%、空腸部で約98%、回腸部で約79%であり、小腸各部位でその吸収性はかなり良好であった。これに対し、GBの消失率は十二指腸部で約56%、空腸部で約46%、回腸部で約16%であり、各部位でGBの吸収性はTBに比べ低い値を示した。その傾向は特に回腸部において顕著であった。

pH 3.5、6.5および7.4におけるGBおよびTBのlog Pはいずれも1以上であった(Table 1)。一方、TBのlog PはpH 6.5ではほぼ0であり、pH 7.4では負の値を示した。pH 3.5ではオクタノール層へのTBの分配が極めて大きく、log P値は算出できなかった(Table 1)。これらの結果から、pH 6.5においてGBはTBよりも脂溶性が高いにもかかわらず、TBよりも吸収されにくいことが明らかになった。

投与30分後におけるTBの粘膜蓄積率は小腸各部位において4%以下であったのに対し、GBでは十二指腸部で約12%、空腸部で約17%、回腸部で約8%の蓄積がみられ、TBに比べ消失率は有意に低かったにもかかわらず

ず、粘膜蓄積は各部位でTBよりも有意に大きい結果となった。

脂溶性が高いにもかかわらず吸収性が低いというGBの吸収特性がP-gpによって引き起こされているか否かを確認するために、P-gpの代表的阻害剤であるVERとCsAを共存させ、GBの吸収に対する影響について検討した。その結果、VERおよびCsA共存下でGBの消失に一部有意な増加が認められた(Fig. 3)。

Fig. 3. Effect of Verapamil and Cyclosporin A on the Disappearance of Glibenclamide from Rat Intestinal Loops. Initial concentration of glibenclamide was 50 μ M. The concentration of verapamil and cyclosporin A was 250 μ M and 20 μ M, respectively. Medium pH was set at 6.5. Each column represents the mean with S.E. of 4 experiments. * p <0.05, significantly different from glibenclamide alone.

Fig. 4. Effect of Kurosu on the Disappearance of Glibenclamide(50 μ M) from Rat Intestinal Loops. Medium pH was set at 3.5. Each column represents the mean with S.E. of 3-4 experiments.

3. グリベンクラミドの吸収に対する黒酢の影響

2倍希釈の黒酢を共存させた場合、十二指腸部、空腸部、回腸部におけるGBの消失率はそれぞれ約54%、62%、34%であり、一方、10倍希釈の黒酢共存下での消失率はそれぞれ約66%、55%、20%であった(Fig. 4)。いずれの場合にも有意差は認められなかったものの、小腸各部位におけるGBの消失は黒酢共存下で増大する傾向を示した。

なお、黒酢共存下での吸収実験はpH3.5で行ったが、この条件下におけるGBの消失率は小腸各部位においてpH6.5の場合とほぼ同程度であった。このことから、pH3.5の条件下で粘膜障害等により小腸透過性が変化する可能性は低いと考えられた。

考 察

今回、ラット小腸*in situ*ループ法での検討により、P-gp基質モデルとして汎用されるRho-123の吸収が黒酢共存下で増大するという知見が得られた(Fig. 1)。これまでも種々の食品成分がP-gpと相互作用を示すことが報告されてきた^{11, 12)}が、今回の結果は本研究に用いた黒酢中にP-gpを強く阻害する成分が含まれる可能性を示唆した。黒酢には、原産地の異なるものあるいは製法が異なるもの等、さまざまな製品が市販され、それにより含有成分が異なることも予想される。したがって、本研究で得られた黒酢とP-gpとの相互作用をさらに検証するために、今後複数の黒酢製品を用いて、この結果の再現性を確認する必要がある。

また、黒酢にはクエン酸等、種々の有機酸が含まれるが、これら有機酸の中には小腸上皮細胞間隙を修飾して薬物の透過を促進する作用を示すものがある¹³⁾。したがって、黒酢中の有機酸によってRho-123の吸収が促進された可能性も残されており、今後分泌トランスポーターの基質とならない薬物を用いて黒酢の影響を検討する必要があると判断される。

GBはP-gpの基質となることが報告されている⁷⁾が、臨床ではP-gp誘導剤であるリファンピシンやP-gp阻害剤であるベラパミル、クラリスロマイシンの併用によってGBの血中濃度が減少する、あるいは増加するという知見¹⁴⁻¹⁶⁾や、GBを服用中のII型糖尿病患者がクラリスロマイシンを併用したところ重篤な低血糖症状に陥った事例¹⁷⁾が報告されており、これらはいずれもP-gpを介する薬物相互作用とみなされている。しかしながら今回の検討では、小腸ループ内にVERやCsAを共存させても、各部位におけるGBの消失率の増大は一部に有意差はみられたもののそれほど顕著ではなく(Fig. 3)、P-gpの強い関与を示唆する結果は得られなかった。これを反映して、Rho-123の吸収を大きく増大させた黒酢の効果も限定的であった(Fig. 4)。Gedeonら¹⁸⁾はGBの胎盤透過制御に乳がん耐性タンパク(BCRP)や多剤耐性関連タンパ

ク(MRP)が関与していると報告している。BCRPやMRPは小腸粘膜にも発現していることから、ラット小腸でみられたGBの低吸収性にはP-gp以外の分泌トランスポーターが密接に関与している可能性も考えられる。GBの低吸収性に関わる要因については、今後さらに詳細に検討を進める必要がある。

今回の検討では、脂溶性がそれ程高くないにもかかわらずTBがラット小腸各部位において良好に吸収されることが示された(Fig. 2)。TBの消化管吸収については、これまでNishimuraら¹⁹⁾が、Caco-2細胞を用いた検討においてTBの吸収方向の透過にトランスポーターが介在することを報告している。したがって今回の知見は、ラット小腸においてTBがこうしたトランスポーターを介して良好に吸収された可能性を反映するものと考えられた。

結論として、黒酢の含有成分の中に小腸P-gpを阻害するものが存在することが示唆された。したがって、P-gpの基質となる医薬品では黒酢との併用により吸収が増大し、治療効果が影響を受ける可能性がある。小腸のシトクロムP450(CYP)3A4への影響も含め、黒酢と薬物との相互作用についてさらなる検討が必要と考えられる。

引用文献

- 1) R.T. Harris, G.R. Jang, S. Tsunoda, Dietary effects on drug metabolism and transport, *Clin. Pharmacokinet.*, **42**, 1071-1088(2003).
- 2) 岩尾一生, 小林道也, 及川孝司, 中駄優作, 藤崎博子, 室谷光治, 伊藤昭英, 辻昌宏, 井出肇, 遠藤泰, 関川彬, 齊藤浩司, 糖尿病外来患者における健康食品の使用実態調査(第1報) -健康食品に対する患者意識と利用状況-, 医療薬学, **34**, 112-117(2008).
- 3) 岩尾一生, 小林道也, 及川孝司, 中駄優作, 藤崎博子, 室谷光治, 伊藤昭英, 辻昌宏, 井出肇, 遠藤泰, 関川彬, 齊藤浩司, 糖尿病外来患者における健康食品の使用実態調査(第2報) -糖尿病用薬と健康食品との関係-, 医療薬学, **34**, 118-123(2008).
- 4) 黄恵彬, 木村博典, 宮下賜一郎, 堀江一郎, 長良子, 亀田智子, 糖尿病患者における民間療法の実態調査, 国立病院機構長崎医療センター医学雑誌, **10**, 19-24(2007).
- 5) 小熊毅, 田端宏道, 相原顕作, 松本正孝, 鍵岡均, 長野正信, 福井基成, イトラコナゾールカプセルの吸収における黒酢の効果についての検討, 感染症学雑誌, **83**, 369-374(2009).
- 6) H. Satoh, F. Yamashita, M. Tsujimoto, H. Murakami, N. Koyabu, H. Ohtani, Y. Sawada, Citrus juices inhibit the function of human organic anion-transporting polypeptide OATP-B, *Drug Metab. Dispos.*, **33**, 518-523(2005).
- 7) P.E. Golstein, A. Boom, J. van Geffel, P. Jacobs, B. Masereel, R. Beauwens, P-glycoprotein inhibition by glibenclamide and related compounds, *Pflügers Arch.*, **437**, 652-660(1999).
- 8) M. Oda, H. Saitoh, M. Kobayashi, B.J. Aungst, β -Cyclodextrin as a suitable solubilizing agent for in situ absorption study of poorly water-soluble drugs, *Int. J. Pharm.*, **280**, 95-102(2004).
- 9) R.R. Levin, E.W. Pelikan, The influence of experimental procedures and dose on the intestinal absorption of anionium compound, benzomethamine, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **131**, 319-327(1961).
- 10) H. Saitoh, M. Hatakeyama, O. Eguchi, M. Oda, M. Takada, Involvement of intestinal P-glycoprotein in the restricted absorption of methylprednisolone from rat small intestine, *J. Pharm. Sci.*, **87**, 73-75(1998).
- 11) W.V. de Castro, S. Mertens-Talcott, H. Derendorf, V. Butteeweck, Grapefruit juice-drug interactions: Grapefruit juice and its components inhibit P-glycoprotein(ABCB1) mediated transport of talinolol in Caco-2 cells, *J. Pharm. Sci.*, **96**, 2808-2817(2007).
- 12) H.H. Yoo, M. Lee, H.J. Chung, S.K. Lee, D.H. Kim, Effects of diosmin, a flavonoid glycoside in citrus fruits, on P-glycoprotein-mediated drug efflux in human intestinal Caco-2 cells, *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 7620-7625(2007).
- 13) M. Hayashi, M. Tomita, Physiological mechanism for enhancement of paracellular drug transport, *J. Controlled Rel.*, **62**, 141-148(1999).
- 14) M. Niemi, J.T. Backman, M. Neuvonnen, P.J. Neuvonnen, K.T. Kivistö, Effects of rifampin on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of glyburide and glipizide, *Clin. Pharmacol. Ther.*, **69**, 400-406(2001).
- 15) C.G. Semple, C. Omile, K.D. Buchanan, G.H. Beastall, K.R. Paterson, Effect of oral verapamil on glibenclamide stimulated insulin secretion, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **22**, 187-190(1986).
- 16) J.J. Lilja, M. Niemi, H. Fredrikson, P.J. Neuvonen, Effects of clarithromycin and grapefruit juice on the pharmacokinetics of glibenclamide, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **63**, 732-740(2007).
- 17) R. Bussing, A. Gende, Severe hypoglycemia from clarithromycin-sulfonylurea drug interaction, *Diabetes Care*, **25**, 1659-1661(2002).
- 18) C. Gedeon, J. Behravan, G. Koren, M. Piquette-Miller, Transport of glyburide by placental ABC transporters: Implications in fetal drug exposure, *Placenta*, **27**, 1096-1102(2006).
- 19) N. Nishimura, K. Naora, T. Uemura, H. Hirano, K. Iwamoto, Transepithelial permeation of tolbutamide across the human intestinal cell line, Caco-2, *Drug Metab. Pharmacokin.*, **19**, 48-54(2004).