

食品が薬の作用に影響を与える機構

一葉の体内動態に及ぼす飲料物（果物ジュース、清涼飲料、嗜好飲料、健康飲料など）の効果一

澤田 康文 (九州大学大学院薬学研究所教授)

目 的

「食べ物と薬の相互作用」は薬の作用に影響する重要な問題であり、医療現場での「医薬品の適正使用」のために必須の情報となっている。薬の体内動態に及ぼす食べ物の効果の機構に関して詳細な解析はあまり行われていない。特に最近、グレープフルーツジュース (GFJ) が高血圧治療薬、抗ヒスタミン剤、免疫抑制剤、睡眠薬などの作用を増強することが報告されており、その機構解析と薬品情報の構築は焦眉の急となっている。これまで、GFJ とこれらの薬物との相互作用の要因は消化管における薬物代謝 (CYP3A4 阻害) が原因であると報告されてきている。一方、CYP3A4 と薬物排出膜輸送機構である P 糖蛋白質 (P-gp) の基質や阻害剤にはかなりの重複が見られる (Wacher, V. J. et al., 1995) ことから、

我々は GFJ と P-gp の相互作用も薬物吸収の増大化に関わっているのではないかと考えた。

GFJ の薬物代謝の原因物質の一つとしてフラボノイド類が考えられている。ケルセチン、ケンフェロールやミリセチン等の食品に含まれるフラボノイド類は、ラットやマウスにおける発ガン性物質誘導型の腫瘍をも阻害する効果を有することが報告されている。一方、これまでに当研究室でも様々なフラボノイド類の P-gp に対する影響を検討している。その結果、配糖体では効果は見られないものの、アグリコンでは濃度依存的にピンクリスチンの排出機能を阻害することが示された。更にケルセチンやケンフェロールなどのフラボノール類では、低濃度領域では排出促進機能も見られるといった二相性の効果が確認された。このような効果は、これまでにケンフェロールの P-gp 機能阻害に働くといった報告 (Sarkar, M.A.,

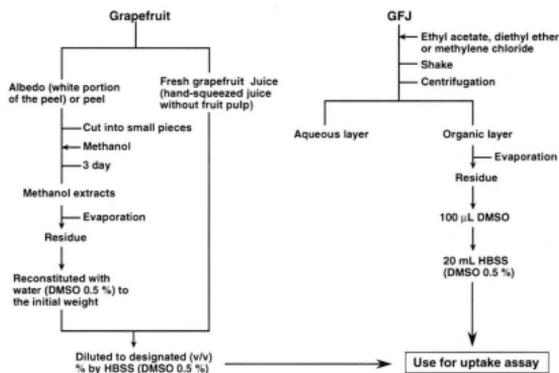


Chart 1. Preparation of grapefruit and GFJ extraction by several organic solutions

1995)やP-gp機能促進に働くといった報告(Phang, J.M. et al., 1993)とも一致するものである。従って、フラボノイド類の排出機能蛋白質への影響は、非常に複雑であるが興味深いものである。この様に、GFJに限らず、多くの食品にはP-gpを含めて薬物との相互作用を引き起こす化合物が含まれていることが考えられるため、詳細に検討する必要があると考えられる。

そこで、GFJに加え、オレンジジュースについても、その効果の要因となる成分の分離を行った。

方 法

Caco-2単層膜(小腸上皮細胞のモデル培養細胞)、反転腸管及び単離刷子縁膜小胞系を用いて、各種薬物の腸管吸収・代謝に及ぼすGFJ成分の効果をスクリーニングする。特に、GFJ成分と薬物の相互作用として着目すべきは、P-gpの機能的阻害による吸収速度の変化と薬物の代謝に関与するP450酵素群への阻害である。この点に焦点を当て、*in vitro*系を用いバイオフラボノイドと薬物の相互作用機序を解析した。P-gpの基質として報告されているピンプラスチンを用いた。

Caco-2細胞系:Caco-2細胞は、ヒト大腸癌由来の培養上皮細胞であり培養すると共に分化し、次第に小腸としての特性を獲得する継代培養細胞であり、一般に消化管上皮細胞モデルとして用いられる実験系である。吸収実験ではトランスウェルあるいはマルチディッシュ上に培養し、これらを用いて経細胞膜輸送あるいは取り込み実験を行う。定量は、主として放射性化合物を輸送実験の基質として用い、放射活性の測定により行った。

反転腸管法:ラットから腸管を取り出し、腸管を反転させ袋状にしたものを用いる。部位差を確認するため、胆管から下部10cmずつ5部位に分けて、それぞれsite1~5として検討した。各反転

腸管袋の内側に薬液を添加し、漏れて薬物の量を経時的に採取する。薬物としては、ローダミン123(Rh123)を用いた。定量は、液体クロマトグラフィーを用いて行った。

代謝実験:ヒト肝ミクロソームあるいはCYP3A4の再構築系を用いてテストステロンの6β水酸化を測定する。吸収実験ではトランスウェルあるいはマルチディッシュ上に培養し、これらを用いて経細胞輸送あるいは取り込み実験を行う。代謝実験においては、薬物の代謝物の定量的及び定性的変化を検討する。定量は、液体クロマトグラフィーを用いて行った。

ジュース成分の分離:ジュースを酢酸エチルにより抽出し、水層を除き有機層を乾固した。残さを精製水で懸濁し、コスモシルカラム(cosmosil 75C18-OPN, Nacalai Tesque, Kyoto, Japan)に付した。溶出にはメタノールを0から100%まで段階的に10%ずつ増加させたものを用い、11のフラクションを得た。得られたフラクションを乾固し、³H]ピンプラスチンのCaco-2細胞での取り込みに及ぼす各フラクションの効果を検討した。効果のあったフラクションを更にシリカゲルカラム(Silica gel 60, Kiesel gel 60, Gel desilica 60, Merck)に付し精製した。溶出には、ヘキサン:アセトン系(5:1, 3:1, 1:1)とクロロホルム:メタノール系(1:1)を用い、各溶媒系で3~4フラクションで合計16のフラクションを得た。これらのフラクションを乾固し、³H]ピンプラスチンのCaco-2細胞の取り込みに及ぼす各フラクションの効果を検討した。各フラクションでの目的成分の確認はTLC(silica gel 60, F254, MERCK)により行い、展開溶媒はヘキサン:アセトン系を用いた。目的成分の構造決定はフラクションをCDCl₃に溶解し、TMSを内部標準とし500MHz H-NMR(UNITY-plus, Varian)により同定した。更に、

GFJ あるいはオレンジジュースの酢酸エチル抽出物における水層部分も $[^3\text{H}]$ ビンブラスチンの Caco-2 細胞への取り込みに及ぼす効果を検討した。

結 果

1. GFJ, オレンジジュース及びベラパミルによるラット反転腸管を用いた Rh123 排出輸送に対する阻害効果

ラット反転腸管を用い、P 糖蛋白質の阻害剤であるベラパミル、GFJ 及びオレンジジュースの酢酸エチル抽出物による Rh123 の排出輸送に対する効果を検討した。Site2~5 において、Rh123 の排出はベラパミルで有意に阻害された (Fig.1A)。また、Site4, 5 において Rh123 の排出は GFJ 酢酸エチル抽出物で有意に阻害された (Fig.1B)。同様な部位において、Rh123 の排出はオレンジジュース酢酸エチル抽出物で有意に阻害された (Fig.1C)。いずれも、その阻害効果は P 糖蛋白質の分布の多い消化管の下部につれて大きくなった。

2. Caco-2 細胞での GFJ による P 糖蛋白質に対する阻害成分の同定

2.1 GFJ の Caco-2 細胞への毒性

LDH の分泌は GFJ 存在下で $2.78 \pm 0.46\%$ 、非存在下で $2.92 \pm 0.76\%$ であった。更に、50%GFJ 存在下、非存在下両場合とも死細胞を示すトリパンブルーの染色率は 5% 以下であり、細胞の生存率に変化は見られなかった。

2.2 Caco-2 細胞での $[^3\text{H}]$ ビンブラスチンの経細胞的な透過に及ぼすシクロスポリン A 及び GFJ の効果

Caco-2 細胞での $[^3\text{H}]$ ビンブラスチンの管腔側膜からバソラテラル側への透過に及ぼす GFJ の効果を検討した (Fig.2)。 $[^3\text{H}]$ ビンブラスチンの透過速度は $0.019 \pm 0.001 \text{ mL/min/mg protein}$ であった。50%GFJ もしくは $20 \mu\text{M}$ シクロスポリン A の存在により透過速度はそれぞれ $0.070 \pm 0.004 \mu\text{L/min/mg protein}$ 、 $0.126 \pm 0.004 \mu\text{L/min/mg protein}$ となり、GFJ 及びシクロスポリン A の存在で有意に増加した。細胞間隙の透過を示す $[^{14}\text{C}]$ マンニトールの透過速度は、コ

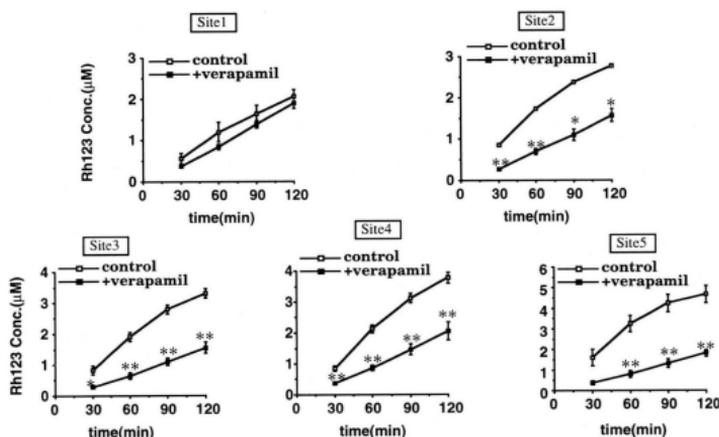


Fig.1A Effect of verapamil (300 μM) on Rh123 (150 μM) efflux in rat intestine everted sac.

Mean \pm S.E.M (n=5~7) *P<0.05; **P<0.01

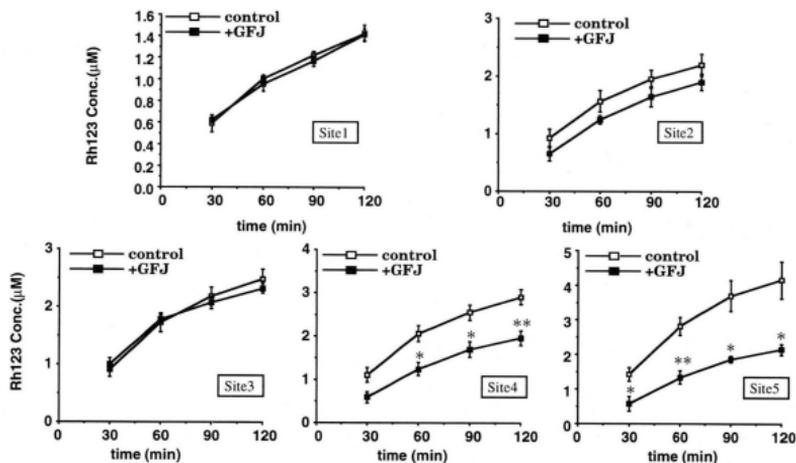


Fig.1B Effect of orange juice (50%) on Rh123 (150 μ M) efflux in rat intestine everted sac.
Mean \pm S.E.M (n=3~5) * P <0.05 ; ** P <0.01

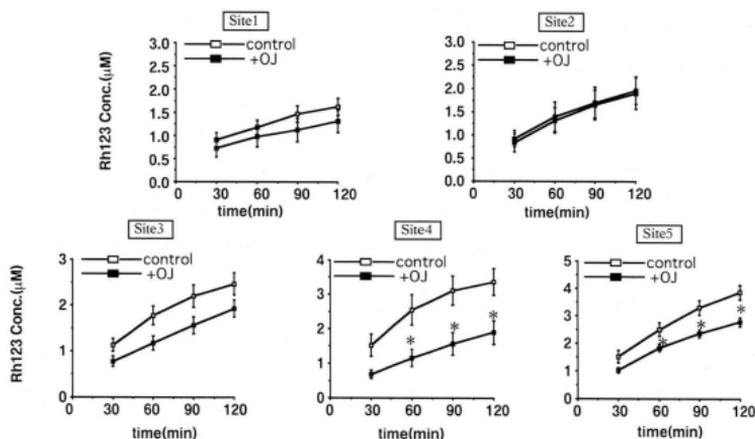


Fig.1C Effect of orange juice (50%) on Rh123 (150 μ M) efflux in rat intestine everted sac.
Mean \pm S.E.M (n=3~5) * P <0.05 ;

ントロールでは $0.035 \pm 0.005 \mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$ proteinであった。GFJ及びシクロスポリンA存在下での $[^1\text{C}]$ マンニトールの透過速度は $0.028 \pm 0.004 \mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$ proteinおよび $0.040 \pm 0.004 \mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$ proteinであり、このことからGFJ

及びシクロスポリンAによる細胞間隙の透過の変化は無視できることが示された。

2.3 Caco-12細胞での $[^3\text{H}]$ ビンブラスチンの取り込みに及ぼすGFJ、グレープフルーツの各部位及びシクロスポリンAの効果

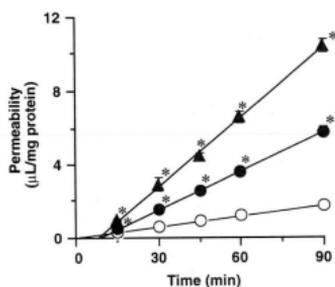


Fig.2 Effect of GFJ or cyclosporin A on the transcellular transport (Apical to basolateral side) of [³H] vinblastine across the Caco-2 monolayer

The transport of [³H] vinblastine (100nM) was measured in the absence (open circle) or presence of 50% GFJ (closed circle) and 20 μM cyclosporin A (closed triangle). Each value represents the mean ± S.E.M. of three experiments. Significant differences from control, *; $P < 0.05$.

[³H] ビンブラスチンの取り込みは濃度依存的に増加し、60分で定常状態に達した。GFJ 存在下で [³H] ビンブラスチンの取り込み平衡値は GFJ の濃度依存的に有意に増加し (Table 1),

Table 1 Effect of original GFJ, different sections of grapefruit or cyclosporin A on the uptake of [³H] vinblastine by Caco-2 monolayer

	Concentration	Cell/medium ratio (% of control)
GFJ	+2.5%	121 ± 2.3
	+5.0%	142 ± 5.3*
	+30%	156 ± 4.3*
	+50%	240 ± 14*
Fresh grapefruit juice (hand-squeezed juice without fruit pulp)	+10%	154 ± 2.4*
	+30%	175 ± 8.3*
	+50%	180 ± 3.1*
The albedo (White portion of the peel)	+10%	195 ± 6.8*
	+20%	278 ± 21*
The peel	+5%	294 ± 8.9*
Cyclosporin A	+20 μM	270 ± 19*

Uptake of [³H] vinblastine (10nM) was measured in the presence or absence of GFJ, different sections of grapefruit or cyclosporin A at 37°C, as described in Materials and Methods. Each value represents the mean ± S.E.M. of three or four experiments. The values were expressed as the percent of each control. The control cell/medium ratio was 33.8 ± 3.0 μL/mg protein. Significant differences from the control, *; $P < 0.05$

このとき [³H] ビンブラスチンの初期取り込みに変化はみられなかった。このことより、GFJ により P-gp での [³H] ビンブラスチンの Caco-2 細胞からの排出が特異的に阻害されていることが示唆された。更に、搾った GFJ, アルベド及び果皮などのグレープフルーツの3つの異なる部分の成分による Caco-2 細胞での [³H] ビンブラスチンの取り込みに対する効果を検討した (Table 1)。グレープフルーツのいずれの部分の存在においても [³H] ビンブラスチンの取り込み平衡値は増加を示した。搾った GFJ とアルベドの濃度に依存して [³H] ビンブラスチンの取り込み平衡値は増加を示し、同濃度の場合を想定しそれぞれの効果を考慮すると、これらの成分の阻害効果は果皮 > アルベド > 搾った GFJ (果肉) の順序であった。P-gp によるエフラックスを検討する上でのコントロールとして、[³H] ビンブラスチンの取り込みは 20 μM シクロスポリン A の存在により有意に増加した。また、ビンブラスチンは CYP3A4 の基質であることから、GFJ 存在、非存在における Caco-2 細胞内での [³H] ビンブラスチンの代謝の有無を検討したところ、GFJ 存在、非存在下60分の取り込み実験後、Caco-2 細胞における [³H] ビンブラスチンの代謝は認められなかった。

2.4 Caco-2 細胞での [³H] ビンブラスチンの経細胞透過と取り込みに及ぼす GFJ の種々有機溶媒抽出物の効果

GFJ の有機溶媒抽出物による [³H] ビンブラスチンの輸送に及ぼす効果を検討した。[³H] ビンブラスチンの管腔側からバソラテラル側への透過速度は $0.019 \pm 0.001 \mu\text{L}/\text{min}/\text{mg protein}$ であり、酢酸エチル、ジエチルエーテル及び塩化メチレンにより GFJ から抽出して得られた抽出物の存在でそれぞれコントロールの348%、281%及び207%に増加した (Table 2)。管腔側膜からの

Table 2 Effect of several organic extracts of GFJ on the transcellular transport and steady state uptake of [³H] vinblastine by Caco-2 cells

	Transcellular Transport Permeability Coefficient ($\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$ protein)	Uptake Cell Medium Ratio ($\mu\text{L}/\text{mg}$ protein)
Control	0.0310 \pm 0.0022 (100)	30.5 \pm 1.3 (100)
+Ethyl acetate extract	0.108 \pm 0.017* (348)	81.6 \pm 3.1* (267)
+Diethylether extract	0.0870 \pm 0.012* (281)	57.6 \pm 1.4* (189)
+Methylene chloride extract	0.0640 \pm 0.0016* (207)	45.8 \pm 2.4* (150)

Transcellular transport from apical to basolateral side and apical uptake of [³H] vinblastine by Caco-2 cells were measured in presence or absence (control) of several organic extracts from GFJ, as described in Materials and Methods. Each value represents the mean \pm S.E.M. of three experiments for the transport studies and four experiments for the uptake studies. The values shown in parentheses represent the percentage compared with each controls compared with each of controls. Significant differences from control,*; $P < 0.05$.

[³H] ビンブラスチンの取り込み平衡値は、酢酸エチル、ジエチルエーテル及び塩化メチレンによる抽出物の存在でそれぞれコントロールの267%, 189%及び150%に増加した (Table 2)。経細胞輸送及び取り込み平衡値の両実験において、これら抽出物の阻害効果の強度は酢酸エチル抽出物>ジエチルエーテル抽出物>塩化メチレン抽出物の順であった。一方、塩化メチレン抽出の水層では [³H] ビンブラスチンの取り込み量はコントロールの133%に増加したが、他の2種の有機溶媒抽出の水層では取り込み量に効果を示さなかった。

3. P-gp 阻害活性を有する GFJ 成分の同定

3.1 Caco-2 細胞での [³H] ビンブラスチンの取り込み平衡値とヒト CYP3A4 再構築系によるテストステロン 6 β 水酸化に及ぼす GFJ 酢酸エチル抽出物の効果

まず、GFJ 酢酸エチル抽出物をコスモシルカムに付し、0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100%メタノールでの溶出し分離を行った。これら GFJ メタノール溶出分画による Caco-2 細胞での [³H] ビンブラスチンの取り込み平衡値に及ぼす阻害効果を Fig.3 A に示した。メタノール60%溶出分画存在下、 [³H] ビンブラスチンの取り込み平衡値は最も増加し、この分画中に Caco-2 細胞の P-gp を介する排出機能を阻害す

る成分の存在が示唆された。一方、テストステロンの 6 β 水酸化活性における最も高い阻害効果は、メタノール70-80%溶出分画において観察された (Fig.3B)。この結果から、P-gp によるエフラックスと CYP3A4 による代謝に対して最も強力な阻害物質は異なっていると考えられる。

次に、この60%メタノール溶出分画をシリカゲルカラムクロマトグラフィーを用いアセトン：ヘキサンの (5:1), (3:1), (1:1) 及びクロロホルム-メタノール (1:1) 溶液で溶出し、更なる成分の分離精製を行った。これらの分画を用い Caco-2 細胞での [³H] ビンブラスチンの取り込み平衡値に対する効果を検討したところ、Fig.3C に示すようにヘキサン：アセトン (3:1) 混液で溶出した3,4番目の分画において、 [³H] ビンブラスチンの取り込み平衡値の顕著な増加が確認された。また、この分画には CYP3A4 による代謝阻害効果を有するものも含まれていることが示された (Fig.3D)。このフラクションにおいて、 [³H] ビンブラスチンの細胞内取り込みの増加活性と対応する成分を TLC により確認しながら単一成分になるまで精製し、強い P-gp 機能の阻害効果をもつ目的成分を得た。

3.2 精製化合物の H-NMR 解析

前項に述べた方法に従って精製した化合物の H-NMR 解析を行い、以下に示すスペクトルを

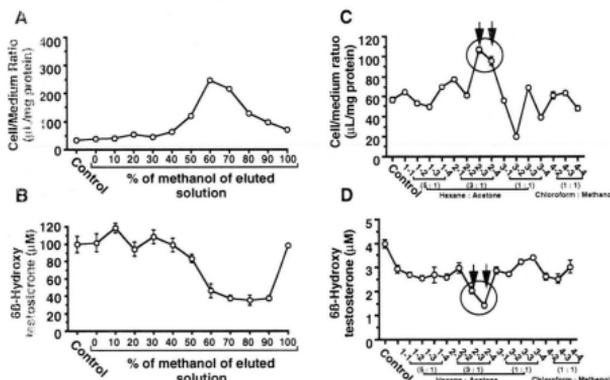


Fig.3 Effect of cosmol column separated fraction of the ethyl acetate extract of GFJ on the steady-state uptake of 10nM [³H] vinblastine by Caco-2 cells for 60min (A) and activity of testosterone 6β-hydroxylation by human CYP3A4 (B) and effect of silica-gel column separated fraction of the 60% methanol eluted fraction of GFJ extract on the steady-state uptake of 10nM [³H] vinblastine by Caco-2 cells for 60min min (C) and activity of testosterone 6β-hydroxylation by human CYP3A4 (D).

The ethyl acetate extract of GFJ was fractionated by cosmol column chromatography eluted with 0,10,20,30,40,50,60,70,80,90 and 100% methanol solution. The 60% methanol eluted fraction of GFJ ethyl acetate extracts by cosmol column were fractionated by silica-gel column chromatography with hexane-acetone (5 : 1, 3 : 1 and 1 : 1) and Chloroform-methanol (1 : 1) mixed solution. The uptake of 10 nM [³H] vinblastine by Caco-2 cells for 60 min and the activity of testosterone 6β-hydroxylation by human CYP3A4 were performed as described in Materials and Methods. Each data represent the mean ± S.E. for three or four experiments.

得た。δ8.13 (1H, *d*, *J*=9.6), 7.58 (1H, *d*, *J*=2.3), 7.14 (1H, *s*), 6.93 (1H, *d*, *J*=1.4), 6.25 (1H, *d*, *J*=9.8), 5.58 (1H, *t*, *J*=6.9), 4.93 (2H, *d*, *J*=6.9), 3.29 (1H, *d*, *J*=9.2), 2.34 (4H, *brm*), 1.69 (3H, *s*), 1.42 (2H, *brm*), 1.17 (6H, *d*, *J*=18.1)。このスペクトルの解析結果から、本成分は 5 [(6,7-Dihydroxy-6-keto-2-octenyl)oxy] psoralen (DHBG) であることが明らかとなった (Fig.4)。

3.3 LLC-PK1 細胞及び LLC-GA5-COL300 細胞での [³H] ビンブラスチンの取り込みに及ぼす GFJ 酢酸エチル抽出物, DHBG 及びシクロスポリン A の効果

LLC-PK1 細胞及びヒト *MDR1* cDNA をトランスフェクトした LLC-GA5-COL300 細胞での [³H] ビンブラスチンの取り込みに対する GFJ 酢酸エチル抽出物と DHBG の効果を検討した (Fig.5A)。LLC-GA5-COL300 細胞では LLC-

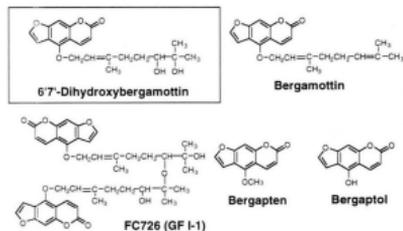


Fig.4 Chemical structures of 6',7-dihydroxybergamottin, bergamottin, FC726, bergapten and bergaptol

PK1 細胞に比べて [³H] ビンブラスチンの取り込み量は減少し (342.322 μL/mg protein vs 34.776 μL/mg protein), 10 μM シクロスポリンの存在下 (370.12±19.20%) と同様に50%GFJ 酢酸エチル抽出物存在により [³H] ビンブラスチンの取り込みはコントロールと比較し191.66±16.97%に大きく増加した (Fig.5B)。また, 20 μM DHBG の存在によっても, 10 μM シクロ

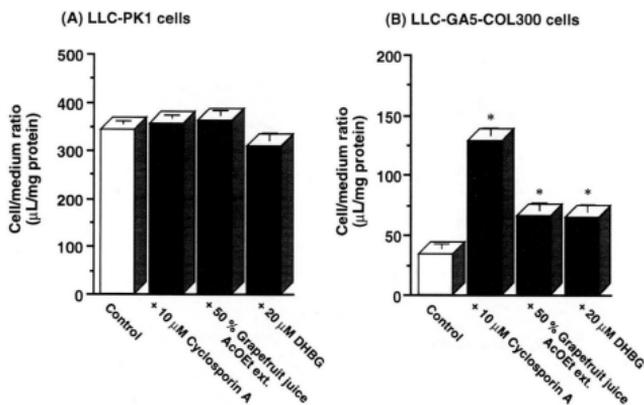


Fig.5 Effect of 50% ethyl acetate extract of GFJ, cyclosporin A and 6', 7'-dihydroxybergamottin on the uptake of [3 H] vinblastine by LLC-PK1 cells (A) and LLC-GA5-COL300 cells (B).

The both cells were incubated in the presence or absence of ethyl acetate extract of GFJ, 10 μM cyclosporin A and 20 μM 6', 7'-dihydroxybergamottin. Incubation time was 60 min and the concentration of [3 H] vinblastine was 10 nM. Significant differences from control were determined by using Student's *t*-test (*; $P < 0.05$). Each data represent the mean \pm S.E. for three or four experiments.

ポリンの存在下と同様に [3 H] ビンブラスチンの取り込みはコントロールと比較し187.68 \pm 16.05%に有意に増加した。

3.4 DHBG とフラノクマリン類によるヒト肝ミクロソームでのテストステロン 6 β 水酸化及び Caco-2 細胞での [3 H] ビンブラスチンの取り込み平衡値に対する効果

Fig.6A に示すように、DHBG の濃度依存的に [3 H] ビンブラスチンの取り込み平衡値は増加し、一方テストステロン 6 β 水酸化には減少がみられた。代謝阻害に関する DHBG の 50% 阻害濃度 (IC₅₀) 値は約 0.45 μM であった。10 μM DHBG 存在下では [3 H] ビンブラスチンの取り込み量はコントロールと比較し 357 \pm 9.44% に増加し、同濃度で CYP3A4 の代謝は DHBG 非存在下の場合から 90 \pm 1.85% 減少した。

DHBG 同様 GFJ 中の CYP3A4 代謝阻害物質として報告されているベルガモチン (BG) についても (Kan, H. et al., 1998), ヒト肝ミクロソームでのテストステロン 6 β 水酸化及び Caco-2 細

胞での [3 H] ビンブラスチンの取り込み平衡値に対する効果を検討した。Fig.6B に示すように [3 H] ビンブラスチンの取り込み量は 10 μM BG によって有意に 138 \pm 3.33% に上昇し、6 β ヒドロキシテストステロン生成は 66.8 \pm 1.01% 減少した。GFJ 中には他にも多数のクマリン類およびフラノクマリン (プロソレン) 類の存在が知られていることから (Tatum, J.H. and Berry, R.E., 1979), 今回我々は GFJ に含まれるフラノクマリンである FC726 (Fig.6C), ベルガブテン (Fig.6D) 及びベルガブトール (Fig.6E) の P-gp による排出輸送と CYP3A4 による代謝に及ぼす効果について検討を行った。これらの構造を Fig.3 に示す。FC726, ベルガブテン及びベルガブトールはいずれも、濃度依存的に [3 H] ビンブラスチンの取り込み平衡値の増加を示し、中でも FC726 が最も顕著な増加を示した。一方、代謝阻害については、FC726, ベルガブテン及びベルガブトールによる CYP3A4 阻害の IC₅₀ 値はそれぞれ 0.075 μM, 1 μM 及び >20 μM であった

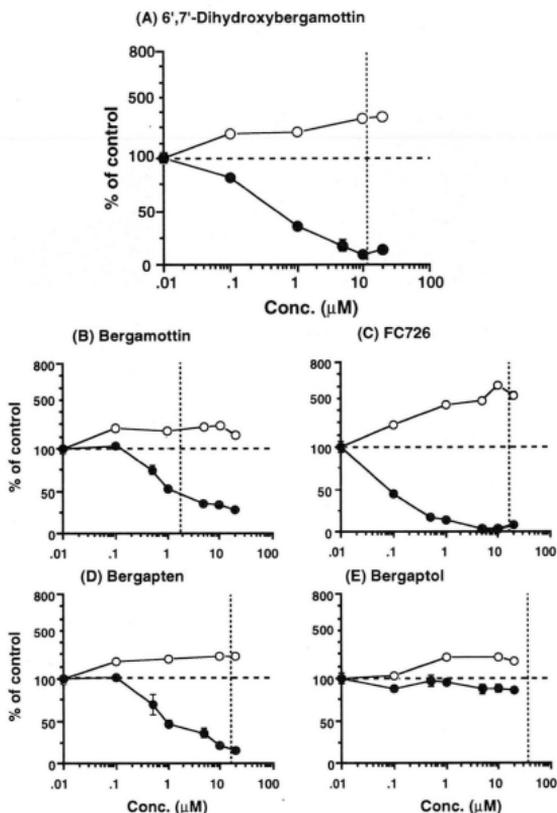


Fig.6 Inhibitory effect of 6', 7'-dihydroxybergamottin (A), FC726 (B), bergamottin (C), bergapten (D) and bergaptol (E) on the steady-state uptake of 10 nM [^3H] vinblastine by Caco-2 cells for 60min (○) and the activity of testosterone 6 β -hydroxylation by human microsomal P4503A4 (●).

A vertical dotted line expresses IC50 value for CYP3A4 inhibitory effect of each furanocoumarin. Each data represent the mean \pm S.E. for four experiments.

(Table 3).

4. Caco-2 細胞でのオレンジジュースによる P 糖蛋白質に対する阻害成分の同定オレンジジュースの Caco-2 細胞への毒性
50%オレンジジュース存在下, 非存在下両場合とも死細胞を示すトリパンブルーの染色率は5%以下であり, LDH の分泌についても GFJ 存在下, 非存在下で 有意な変化は見られなかった。従っ

て, 細胞の生存率に変化は見られなかった。

Caco-2 細胞による [^3H] ビンブラスチンの取り込みに及ぼすオレンジジュース及びジュース成分の有機溶媒抽出物の効果

Caco-2 細胞での [^3H] ビンブラスチンの取り込みは時間依存的に増加し, 60分までに定常状態に達した (Fig.7A)。この60分の [^3H] ビンブラスチン取り込み平衡値に対するオレンジジュース

Table 3 Concentration of furanocoumarins in grapefruit juice and IC₅₀ values of CYP3A4 for furanocoumarins

Furanocoumarins	Concentration (μM)	IC ₅₀ value (μM)
6'7'-Dihydroxybergamottin	12.75	0.45
Bergamottin	1.98	1.0
Bergapten	14.85	1.0
Bergaptol	39.57*	>20
FC726	15.50*	0.075

6'7'-Dihydroxybergamottin, bergamottin and bergapten was quantitated as described in Material and Methods.*; Concentration of bergaptol and FC726 was determined by Bayer Yakuhiinn

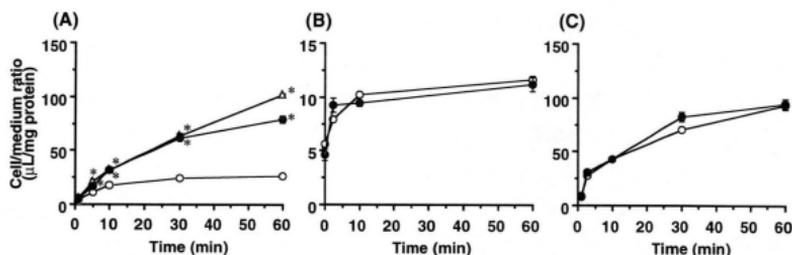


Fig.7 Effect of 50% ethylacetate extract of orange juice and cyclosporin A on the uptake of [³H] vinblastine (A), [³H] 3-O-methylglucose (B) and [¹⁴C] phenylalanine (C) by Caco-2 cells.

The [³H] vinblastine uptake experiments were performed in the absence (open circle) or presence of ethyl acetate extract of orange juice diluted to be equivalent to 50% of the original orange juice strength (closed circle) or 10 μM cyclosporin A (open triangle). The concentrations of [³H] vinblastine, [³H] 3-O-methylglucose and [¹⁴C] phenylalanine were 10nM, and 500nM, respectively. Significant differences from the control were identified by using Student's *t*-test (*; $P < 0.05$). Each value represents the mean \pm S.E. for three or four experiments.

の効果を検討した。Table 4 に示すように、50% オレンジジュース存在下では、[³H] ビンブラスチンの取り込み平衡値はコントロールと比較して $178 \pm 5.5\%$ と有意に増加した。このことから、オレンジジュース中に Caco-2 細胞での [³H] ビンブラスチンの取り込み平衡値を増加させる成分が存在することが考えられた。そこで次に、オレンジジュースを酢酸エチル、ジエチルエーテル、塩化メチレンの3種の有機溶媒で抽出し、抽出成分を用い同様の検討を行った。[³H] ビンブラスチンの取り込み平衡値は、コントロールと比較し、50%ジュースに相当する酢酸エチル、ジエチルエーテル、塩化メチレン抽出物の存在でそれぞれ 238 ± 2.8 , 203 ± 14 , $198 \pm 4.5\%$ といずれも有意な増加を示した。特に、酢酸エチルによる抽出物による効果は、その中で最も高かった。

また、オレンジジュース酢酸エチル抽出の水層

Table 4 Effect of orange juice and its three extracts on the uptake of [³H] vinblastine by Caco-2 cells.

	Cell/medium ratio (% of control)
Control	100 ± 4.3
+50% Orange juice	$178 \pm 5.5^*$
+50% Ethyl acetate extract	$238 \pm 2.8^*$
+50% Diethylether extract	$203 \pm 14^*$
+50% Methylene chloride extract	$198 \pm 4.5^*$

Uptake experiments of 10 nM [³H] vinblastine by Caco-2 cells were performed in absence or presence of orange juice Each data represent the mean \pm S.E. of four experiments.

Significant differences from control.*; $P < 0.05$

に分離される成分について、Caco-2細胞でのビンブラスチンの取り込みに及ぼす効果を検討したところ、50%水層抽出物の存在では、コントロールに対して $100 \pm 4.33\%$ となり変化は見られなかった。従って、オレンジジュース中で [³H] ビンブラスチンの取り込み平衡値を増加させる成分は酢酸エチルでの抽出によりほぼ完全に有機層に抽出されたことが確認された。

4.4 オレンジジュースの酢酸エチル抽出物せよる Caco-2 細胞での [14 C] フェニルアラニン, [3 H] 3-O-メチルグルコース及び [3 H] ビンブラスチンの取り込みに及ぼす効果

[14 C] フェニルアラニン, [3 H] 3-O-メチルグルコース及び [3 H] ビンブラスチンの取り込みに及ぼすオレンジジュースの酢酸エチル抽出物の効果を検討した。 [3 H] 3-O-メチルグルコース, [14 C] フェニルアラニンの取り込みにおいて、オレンジジュース 酢酸エチル抽出物はコントロールと比較して有意な変化を示さなかった (Figs.7B, C)。一方, Fig.7A に示すように、Caco-2 細胞での [3 H] ビンブラスチンの取り込みは平衡値で、P-gp の特異的阻害剤である 20 mM シクロスポリン A と同様に、オレンジジュースの酢酸エチル抽出物で有意に増加した。一方、その [3 H] ビンブラスチンの取り込み初速度はオレンジジュースの酢酸エチル抽出物及びシクロスポリン A により影響されなかった。このことより、オレンジジュース酢酸エチル抽出物の効果は P-gp に対して特異的な [3 H] ビンブラスチンの排出機構の阻害であると考えられた。

4.5 Caco-2 細胞での [3 H] ビンブラスチンの取り込み平衡値とヒト CYP3A4 再構築系によるテストステロン 6 β 水酸化に及ぼすオレンジジュース酢酸エチル抽出物の効果

オレンジジュース中で P-gp 阻害効果を示す成分について詳細に検討するために、オレンジジュースの酢酸エチル抽出物をコスモシルカラムに付し、0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100% メタノールでの溶出し分離を行った。これら オレンジジュースのメタノール溶出分画による Caco-2 細胞での [3 H] ビンブラスチンの取り込み平衡値に及ぼす阻害効果を Fig.8A に示した。メタノール 60, 70, 80% 溶出分画存在下, [3 H] ビンブラスチンの取り込み平衡値に増加がみられ、中でもメタノール 70% 溶出分画において最も顕著な効果がみられた。よって、この分画中に Caco-2 細胞の P-gp の排出機能を阻害する成分の存在していることが示唆された。一方、テストステロンの 6 β 水酸化活性に対しては、これらメタノール溶出フラクションは全く効果を示さなかった (Fig. 8A) に示した。メタノール 60, 70, 80% 溶出分画存在下, [3 H] ビンブラスチンの取り込み平衡

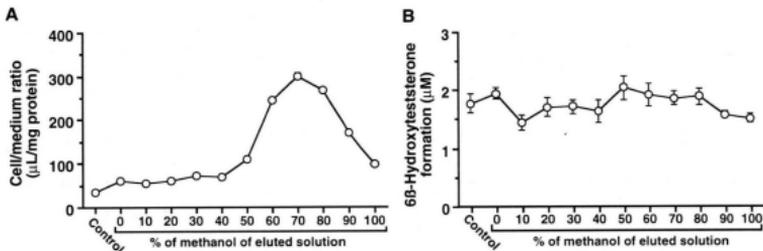


Fig.8 Effect of Cosmosil column-separated fractions of the ethyl acetate extract of GFJ on the steady-state uptake of 10nM [3 H] vinblastin by Caco-2 cells for 60min (A) and on the activity of testosterone 6 β -hydroxylation by human CYP 3A4 (B).

The ethyl acetate extract of GFJ was fractionated by Cosmosil column chromatography eluted with 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 and 100% methanol. The uptake of 10nM [3 H] vinblastine by Caco-2 cells for 60min and the activity of testosterone 6 β -hydroxylation by recombinant human CYP3A4 were assayed as described in Materials and Methods. Control value of 6 β -hydroxytestosterone formation was 2.89 μ M. Each value represent the mean \pm S.E. for three or four experiments.

値に増加がみられ、中でもメタノール70%溶出分画において最も顕著な効果がみられた。よって、この分画中に Caco-2 細胞の P-gp の排出機能を阻害する成分の存在していることが示唆された。一方、テストステロンの 6β 水酸化活性に対しては、これらメタノール溶出フラクションは全く効果を示さなかった (Fig.8B)。この結果から、オレンジジュース中には、代謝には影響を及ぼさず排出機構を特異的に阻害する成分が含まれることが示唆された。

4.6 メタノール溶出分画の精製分離及びそれら分画による Caco-2 細胞での $[^3\text{H}]$ ビンブラスチンの取り込み平衡値に及ぼす効果

次に、最大の $[^3\text{H}]$ ビンブラスチンの取り込み増加効果を示したメタノール70%溶出分画をシリカゲルカラムを用いアセトン：ヘキサンの

(5 : 1), (3 : 1), (1 : 1) 及びクロロホルム-メタノール (1 : 1) 溶液で溶出し、成分の分離精製を行った。これらの分画を用い Caco-2 細胞での $[^3\text{H}]$ ビンブラスチンの取り込み平衡値に対する効果を検討したところ、Fig.9 に示すようにヘキサンの混合液で溶出した4番目の溶出分画によって、 $[^3\text{H}]$ ビンブラスチンの取り込み平衡値が最も高くなった。従って、この溶出分画において、 $[^3\text{H}]$ ビンブラスチンの細胞内取り込みの増加活性と対応する成分をさらにカラムで分離精製し TLC により確認しながら最終的に2種の化合物を得た。

4.7 精製化合物の H-NMR 解析

カラムクロマトグラフィーにより得られた2種の化合物の $^1\text{H-NMR}$ 解析を行い、過去の報告と一致したことから、化合物1は3,3',4',5,6,7,8-hexamethoxyflavone (HMF)、化合物2

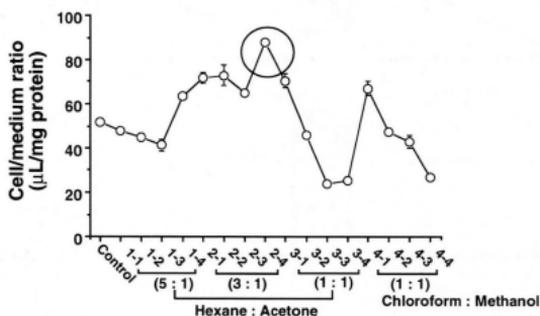


Fig.9 Effect of silica-gel column-separated fractions of the 70% methanol Cosmosil eluate on the steady-state uptake of 10nM $[^3\text{H}]$ vinblastine by Caco-2 cells for 60 min.

The 70% methanol eluate was fractionated by silica-gel column chromatography with hexane-acetone (5 : 1, 3 : 1, and 1 : 1) and chloroform-methanol (1 : 1) mixed solution. The uptake of 10 nM $[^3\text{H}]$ vinblastine by Caco-2 cells for 60 min and the activity of testosterone 6β -hydroxylation by recombinant human CYP3A4 were assayed as described in Materials and Methods. Control value of 6β -hydroxytestosterone formation was $2.89\mu\text{M}$. Each value represent the mean \pm S.E. for three or four experiments.

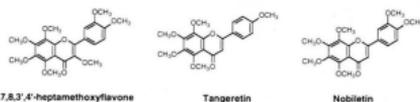


Fig.10 Chemical structures of 3, 4, 5, 6, 7, 8, 3', 4'-heptamethoxyflavone (HMF), tangeretin and nobilletin.

はタンゲリチンとして同定された (Fig.10)。

4.8 HMF, タンゲリチンによるヒト肝ミクロソーム及びヒト CYP3A4 再構築系でのテストステロン 6 β 水酸化と Caco-2 細胞による [3 H] ビンブラスチンの取り込み平衡値に及ぼす効果

Fig.11 に HMF とタンゲリチンのテストステロン 6 β 水酸化と [3 H] ビンブラスチンの取り込み平衡値に及ぼす効果を示した。HMF, タンゲリチンとも濃度依存的に [3 H] ビンブラスチンの取り込み平衡値を増加し, 50mM 存在下においてはコントロールと比較しそれぞれ578 \pm 15.9%, 906 \pm 23.63%の増加を示した, 効果はタ

ンゲリチンの方が顕著であることが示唆された。また, ヒト肝ミクロソーム及びヒト CYP3A4 発現系を用いた両化合物の CYP3A4 活性に対する効果を検討したが, いずれもほとんど変化を示さなかった。また, HMF, タンゲリチン同様のフラボン骨格を有し, オレンジジュースに含まれるノビレチンについても同様の検討を行った。 [3 H] ビンブラスチンの取り込み平衡値は HMF, タンゲリチンと比較し程度は低いが濃度依存的に増加を示した。一方, ヒト肝ミクロソーム及びヒト CYP3A4 発現系におけるテストステロン 6 β 水酸化に対しては検討した濃度範囲で顕著な CYP3A4 阻害効果は確認されなかった。

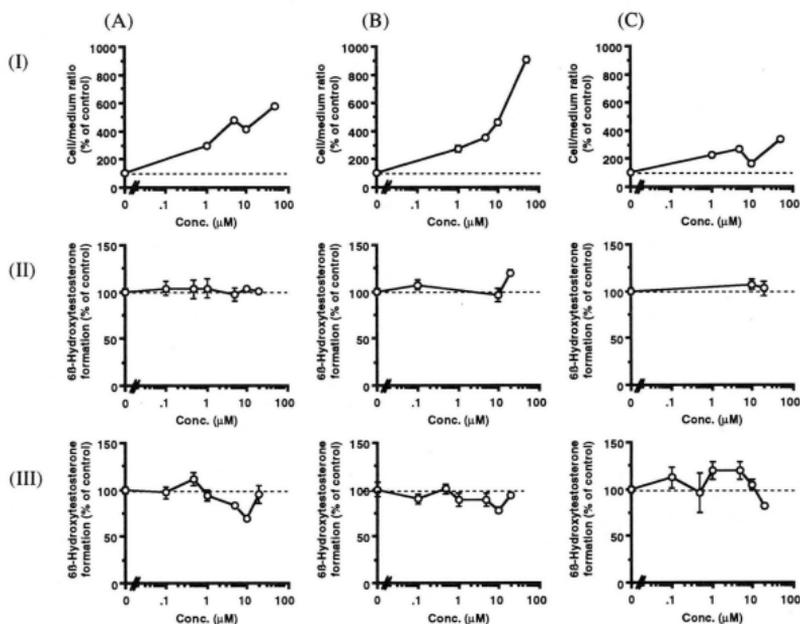


Fig.11 Enhancing effect of HMF (A), tangeretin (B) and nobiletin (C) on the steady-state uptake of 10nM [3 H] vinblastine by Caco-2 cells for 60min (I), and inhibitory effect on the activity of testosterone 6 β -hydroxylation by human liver microsomes (II) and recombinant human CYP3A4 (III).

Vertical dotted lines represent the concentrations of the furanocoumarins in orange juice. Control value of steady-state uptake of [3 H] vinblastine was 11.0 ± 0.224 (μ L/mg protein). Control values of 6 β -hydroxytestosterone formation by human liver microsome and human CYP3A4 were 11.5 ± 0.422 and 2.09 ± 0.0700 μ M, respectively. Each value represents the mean \pm S.E. for four experiments.

4.9 LLC-PK1 及び LLC-GA5-COL300 細胞における $[^3\text{H}]$ ビンブラスチンの取り込み MDR1 の関与について検討を行うために、LLC-PK1 及び LLC-GA5-COL300 細胞を用いて、 $[^3\text{H}]$ ビンブラスチンの取り込み平衡値に対する HMF、タンゲリチン、ノビレチンの効果を検討した。その結果、LLC-GA5-COL300 細胞では、 $[^3\text{H}]$ ビンブラスチンの取り込み平衡値は、 $\text{HMF} > \text{タンゲリチン} > \text{ノビレチン}$ の順で有意に上昇した (Fig.12B)。一方、LLC-PK1 細胞では全く効果が見られなかった (Fig.12A)。従って、これらの成分、特にノビレチンとタンゲリチンがオレンジジュースによる P 糖蛋白質の阻害を起していることが示された。

考 察

GFJ と薬物との相互作用は薬物代謝酵素である CYP3A4 の阻害が原因であることが報告されている。一方、CYP3A4 の基質と P-gp の基質及び阻害剤には、かなりの重複が見られることから、我々はこの相互作用の要為胞は CYP3A4 の発現

量が低くまた P-gp が高発現しているため、CYP3A4 による薬物代謝が低く P-gp による輸送を検討する上で適切な系である。P-gp の代表的な阻害剤であるシクロスポリン A の効果から明らかにように、P-gp による $[^3\text{H}]$ ビンブラスチンの管腔膜側での排出は Caco-2 細胞において容易に検出可能である (Fig.2 及び Table 1)。更に、Caco-2 細胞による $[^3\text{H}]$ ビンブラスチンの代謝はほとんどみられず、それは GFJ の存在下においても同様であった。

GFJ の存在で Caco-2 細胞における $[^3\text{H}]$ ビンブラスチンのアピカル側から側基底膜側への輸送は有意な増加を示したが、 $[^{14}\text{C}]$ マンニトールの輸送には GFJ により有意な変化はみられなかった (Fig.2)。このことから、GFJ は細胞間隙の透過に対してではなく $[^3\text{H}]$ ビンブラスチンの経細胞輸送に影響を与えていると推察された。更に、 $[^3\text{H}]$ ビンブラスチンの取り込み平衡値は GFJ の濃度依存的に増加した (Table 1)。GFJ による Caco-2 細胞の生存率の変化はなかったことから、GFJ の効果は非特異的な効果ではない

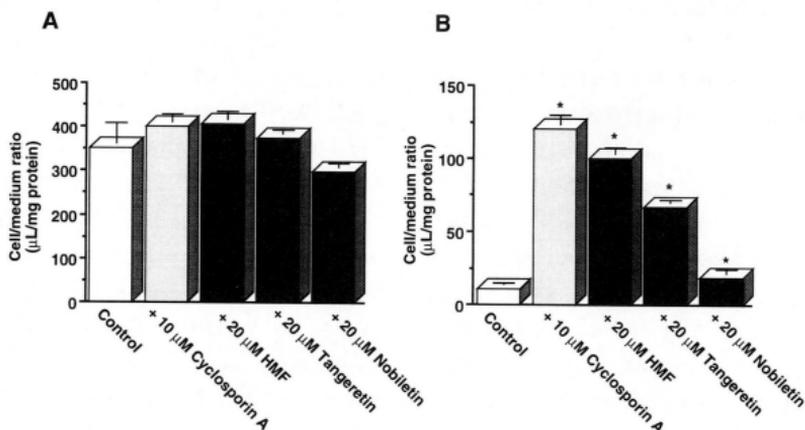


Fig.12 Effect of cyclosporin A, HMF, tangeretin and nobiletin on the steady-state uptake of 20nM $[^3\text{H}]$ vinblastine by LLC-PK1 cells (A) and LLC-GA5-COL300 cells (B) for 60 min. Each value represents the mean \pm S.E. for three or four experiments. Significant differences from the control were identified by using Student's t-test (*; $P < 0.05$).

ことが示された。市販されているジュースには果物組織からの成分も含まれていることから、我々はグレープフルーツをいくつかの部分に分離し、それぞれの $[^3\text{H}]$ ビンブラスチンの輸送に及ぼす効果を検討した。 $[^3\text{H}]$ ビンブラスチンの輸送に及ぼす阻害強度は、果皮>アルベド>果肉から搾ったジュースの順であった (Table 1)。

Fukuda らにより、ブソラレンのゲラニルオキシ誘導体がフラボノイド以上に CYP3A4 に対し強力な阻害効果を示すことが報告された。これらの化合物は酢酸エチルにより抽出されており、これらが P-gp を阻害する可能性は高いと考えられる。これらの化合物の排出阻害効果が GFJ による排出阻害効果と一致するかどうかを確認するために P-gp との効果を示唆する必要性が示唆された。そこでさらに、GFJ 中の P-gp 阻害成分の同定及びその化合物の P-gp 及び CYP3A4 に対する効果について検討を行う必要がある。そこで、GFJ 中の P-gp 機能の阻害活性を持つ化合物を同定することを目的とし、同時に CYP3A4 に対する阻害効果についても検討することにより、P-gp と CYP3A4 機能に対する阻害機構の違いの有無について検討を加えた。

まず、この GFJ 酢酸エチル抽出物に含まれる P-gp 阻害成分の単離精製及び同定を行うこととした。GFJ 酢酸エチル抽出物をメタノール-水系を溶出液としたコスモシルカラムクロマトグラフィーを用いて溶出分画した。Fig.3A に示すようにメタノール60%溶液による溶出分画存在下、 $[^3\text{H}]$ ビンブラスチンの取り込み平衡値が最も高くなった。一方、CYP3A4 による代謝の阻害効果は、メタノール70-80% 溶出分画で顕著だった。続いてこのメタノール60%水溶液による溶出分画をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、ヘキサン-アセトン系及びクロロホルム-メタノール系を溶出液として分離した。ヘキサン：ア

セトン (3:1) 溶液で分画した3, 4番目の分画に最も P-gp 阻害効果の高い成分が含まれると考えられ、同時にこれらの分画には、CYP3A4 の阻害成分も含まれていることが確認された。そこで、単離した化合物を NMR 解析したところ、GFJ 中の P-gp の排出を阻害する成分として 5[(6,7-Dihydroxy-6-keto-2-octenyl)oxy]psoralen つまり 6',7'-Dihydroxybergamottin (DHBG) が同定された。さらに、この効果が P-gp の阻害によるものであることを明らかにするため、MDR1 の発現株を用いて検討を行った。Fig.5A に示すように、LLC-PK1 細胞 (親株) では、シクロスポリンや GFJ 抽出物の効果は、一切見られないのに対し、MDR1 cDNA をトランスフェクトし P-gp を発現させた LLC-GA5-COL300 細胞において GFJ 酢酸エチル抽出物存在によりシクロスポリンと同様に、 $[^3\text{H}]$ ビンブラスチンの取り込み平衡値の有意な増加がみられた (Fig.5B)。従って、GFJ 酢酸エチル抽出物中には、P-gp の阻害物質が含まれていることが示された。しかしながら、LLC-GA5-COL300 細胞における $[^3\text{H}]$ ビンブラスチンの取り込み平衡値は、50% GFJ 酢酸エチル抽出物及び DHBG によってシクロスポリンに比べ約1/3倍の上昇率しか示さなかった (Fig.5B)。

今回我々が同定した DHBG は、既に Edwards らによって、CYP3A4 の阻害剤として同定されており (Edwards, D.J. et al., 1996)、その阻害メカニズムは mechanism based inactivation から生じる消化管 CYP3A4 蛋白質量の減少であり、CYP3A4 に対する DHBG の阻害効果が報告されている (Schmiedlin-ren, P. et al., 1997)。従って、本化合物が薬物代謝と排出輸送の両機能に対し阻害効果を持っていることが示された。これまでに DHBG 以外にも GFJ 中からベルガモチンや GF-I-1 (FC726)、GF-I-4 が DHBG よりも強

力な CYP3A4 代謝阻害成分として同定されている (Fukuda, K. et al., 1997, Kan, H. et al., 1998)。この様に DHBG を含めベルガモチン, FC726, GF-I-4 はクマリン化合物であり自然界に広く分布している (Gray, A.I and Waterman, P.G., 1978) また、これら以外にも多数のクマリン類およびフラノクマリン (ブソラレン) 類が GFJ による P-gp 機能の阻害に寄与している可能性も考えられる。そこで、GFJ 中に含まれるフラノクマリン化合物である FC726, ベルガモチン, ベルガブテン及びベルガブトールによる CYP3A4 による代謝と $[^3\text{H}]$ ビンブラスチン取り込み平衡値に及ぼす効果について検証した (Figs.6B~E)。Caco-2 細胞における $[^3\text{H}]$ ビンブラスチンの取り込み平衡値は FC726 で最も上昇し ($10\ \mu\text{M}$ で 6 倍上昇), ベルガモチン, ベルガブテン及びベルガブトールの排出阻害効果は DHBG とほぼ同じ程度の能力を有している ($10\ \mu\text{M}$ で 3 倍上昇) ことが明らかとなった。今回使ったジュース中のこれらフラノクマリン類の含量を測定した結果, DHBG, ベルガモチン, ベルガブトール, ベルガブテンや FC726 の濃度は 13, 2, 15, 40, $16\ \mu\text{M}$ とベルガモチン以外は比較的高いものであった (Table 3)。もちろん GFJ の種類によって成分の含有量は大きく異なるため、様々な GFJ においてそれぞれの成分の含有量を調べる必要があるが、GFJ の相互作用の要因として、DHBG のみではなく、これらフラノクマリン類が排出阻害と代謝阻害に寄与していると考えられた。さらに、GFJ との相互作用の対象となる薬物の種類によっても両阻害機構の寄与率は変化すると考えられる。

最終フラクションに DHBG と最も効果が高い FC726 の両化合物が存在していたことが TLC で確認された。我々は最終的にこの両化合物のうち発蛍光が強かった DHBG を分取、同定したため

FC726 を取ることができなかったと考えられる。また、酢酸エチル抽出による水層, メタノール 70% などのフラクションにベルガブトール, ベルガブテンなどの他の阻害剤が含まれている可能性があり、それらをとらえることができなかったと考えられる。

特に、興味を引くのはベルガブトールの効果で、 $[^3\text{H}]$ ビンブラスチンの排出阻害効果 ($10\ \mu\text{M}$ で 270% に上昇) を示したが、代謝阻害効果は 0 から $20\ \mu\text{M}$ までの範囲ではみられなかった。すなわち、ベルガブトールは P-gp にのみ特異的阻害効果を示すことが明らかとなった。このようにベルガブトールは P-gp の特異的な阻害物質であり、癌化学療法における耐性克服剤となる可能性があるため、今後ベルガブトールについてこの点に着目し更に検討を行う必要がある。

オレンジジュースは GFJ の CYP3A 代謝実験において、多くの実験者が代謝阻害効果が見られない対照として用いている。我々も、GFJ の輸送阻害実験で対照として用いたところ、オレンジジュースにも GFJ と同程度の $[^3\text{H}]$ ビンブラスチン排出輸送阻害能が見られた。また、GFJ の輸送阻害成分が 3 有機溶媒 (塩化メチレン, ジエチルエーテル, 酢酸エチル) のうち、酢酸エチルによりもっとも抽出されていた。これと同様に、オレンジジュースについてもその輸送阻害成分は酢酸エチルで最も抽出されることが明らかとなった。しかしながら、オレンジジュースには、ジヒドロキシベルガモチンは GFJ ほど含まれておらず (オレンジジュース: $1.11\ \mu\text{M}$, GFJ: $12.75\ \mu\text{M}$), オレンジジュースの輸送阻害の原因物質は、他の化合物であると考えられる。また、コスモシルカラムでのメタノール溶出分画の効果では、GFJ の阻害成分が含まれる分画として 60% メタノール分画での効果が最も高かったことに対し (Ohnishi, A. et al., submitted), 今回オレンジ

ジュースでは、70%メタノール分画に最も高い効果が見られたことから (Fig.8A), オレンジジュースの方がGFJに比べ脂溶性の高い化合物が輸送阻害成分として関与していることが示唆された。そこで、本研究では、この原因物質を特定することを試みた。興味深いことに、オレンジジュースにはCYP3A阻害活性がほとんど見られない (Fig.8B)。オレンジジュースの酢酸エチル抽出物の効果は、 ^3H ビンブラスチンの初期取り込みには影響を及ぼさず、平衡値を有意に上昇させた (Fig.7A)。また、グルコースやアミノ酸 (フェニルアラニン) の輸送には影響を与えなかった (Figs.7B, C)。ビンブラスチンはP-gpの基質であり、Caco-2細胞にはP-gpが過剰発現していることから、このオレンジジュース酢酸エチル抽出物による効果はP-gpによる ^3H ビンブラスチンのエフラックスシステムの阻害によるものと考えられた。MDR発現細胞株 (LLC-PK1及びLLC-GA5-COL150) を用いて、HMF及びタンゲレチン、構造類似体であるノビレチンのP-gp機能に対する効果を検討した結果、確かにこれらの化合物はP-gp機能阻害効果を有していることが明らかとなった (Fig.12)。最近、P-gp以外にもMRP3などの薬剤排出にかかわる排出輸送系の存在が示されている (Kiuchi, Y. et al., 1998)。ビンブラスチンがこの様な輸送系に認識されるか否かはわからないが、今後この様な輸送系についても検討を行っていく必要はあると考えられる。

本研究で見いだされたHMF、タンゲレチン、ノビレチンはCYP3A代謝には一切効果を示さず、P-gpの様な排出機能のみを阻害するような化合物である。これらの化合物は、その低バイオアベイラビリティの原因の一つが消化管におけるP-gpによる排出 (分泌) と考えられる免疫抑制剤 (シクロスポリン、タクロリムス) や HIV プ

ロテアーゼ阻害剤 (サキナビル、リトナビル) などの消化管吸収改善物質として有用であると考えられる。また、CYP3A4は阻害せず、P-gpを特異的に阻害する物質が見いだされたなら、ガン化学療法における多剤耐性克服剤としても有望視されるであろう。

タンゲレチンは、オレンジジュースからNelson (1934) によってタンゲレチン油から結晶化されている。この他、柑橘系のジュースには多くのフラボノイド類が含まれている。フラボノイドには、抗炎症作用、抗アレルギー作用などの薬理作用を有していることが報告されている。また、発ガン抑制作用等を有しているケルセチン等といった化合物も存在する。テトラメトキシフラボン、HMFはSwift (1967) によって、ノビレチンはTseng (1938) によってオレンジ皮油から単離された。これらのメトキシフラボンのジュース中の組成は産地や製法などにより様々であり、柑橘類のジュースには様々な量や種類のメトキシフラボンが含まれる。

以上結論として、今回GFJからフラノクマリン類がP-gpに対する阻害剤として機能している可能性が示された。しかしながら、これらは、P-gpのみでなくCYP3A4の阻害効果も有することが明らかとなった。その中で、bergaptolについては、CYP3A4の特異的な阻害剤であることが示唆された。また、オレンジジュースから見いだされたHMF、タンゲレチン、ノビレチンはCYP3A4に対する阻害はほとんどなく、一方、P-gpに対して特異的に阻害することが示唆された。その阻害強度は、タンゲレチン>HMF>ノビレチンの順であった。また、それらのオレンジジュース中の濃度はタンゲレチンが最も高く、オレンジジュースとP-gpの基質との相互作用はタンゲレチンが最も大きく寄与することが示唆された。これら新規P-gp特異的阻害剤は薬物の吸収

改善, ガン化学療法における多剤耐性克服剤としての有用性が示唆され, 今後更なる相互作用に関する臨床試験が必要であると考えられる。

文 献

- 1) Wachter, V.J., Wu, C.-Y., Benet, L.Z., Overlapping substrates and tissue distribution of cytochrome p450 3A and P-glycoprotein: implications for drug delivery and activity in cancer chemotherapy, *Molecular Carcinogenesis*, 13, 129-134 (1995)
- 2) Holtt, V., Kouba, M., Diemel, M., and Vogt, G., Stereoisomers of calcium antagonists which differ markedly in their potencies as calcium blockers are equally effective in modulating drug transport by P-glycoprotein, *Biochem. Pharmacol.*, 43, 2601-2608 (1992)
- 3) Fukuda, K., Ohta, T., Ohshima, Y., Ohashi, N., Yoshikawa, M., Yamazoe, Y., Specific CYP3A4 inhibitors in grapefruit juice: furocumarin dimers as components of drug interaction, *Pharmacogenetics*, 7, 391-396 (1997)
- 4) Takanaga, H., Ohnishi, A., Matsuo, H. and Sawada, Y., Inhibition of vinblastine efflux mediated by P-glycoprotein by grapefruit juice components in Caco-2 cells, *Biol. Pharm. Bull.*, 21, 1062-1066 (1998)
- 5) Edwards, D.J., Bellevue, F.H., Woster, P.M., Identification of 6',6'-dihydroxybergamottin, A cytochrome P450 inhibitor, in grapefruit juice, *Drug Metabolism and Disposition*, 24, 1287-1290, (1996)
- 6) Schmedlin-ren, P., Edwards, D.V., Fitzsimmons, M. E., He K., Lown, K.S., Woster, P.M., Rahman, A., Thummel, K.E., Fisher, J.M., Hollenberg, P.F., Watkins, P.B., Mechanism of enhanced oral availability of CYP3A4 substrates by grapefruit constituents, *Drug Metabolism and Disposition*, 25, 1228-1233 (1997)
- 7) Kan He, Krishna, R.L., Roger, N.H., Micheal, W.S. Thomas, F. Woolf, Paul, F. H., Inactivation of cytochrome P450 3A4 by bergamottin, a component of grapefruit juice, *Chem. Res. Toxicol.*, 11, 252-259 (1998)
- 8) Gray, A. I., Waterman, P.G., Coumarins in the retaceae, *Phytochemistry*, 17, 845-864 (1978)
- 9) Tatum, J.H. and Berry, R.E., Coumarins and psoralens in grapefruit peel oil, *Phytochemistry*, 18, 500-502 (1979)
- 10) Kiuchi, Y., Suzuki, H., Hirohashi, T., Tyson, C. A., Sugiyama, Y., cDNA cloning and inducible expression of human multidrug resistance associated protein 3 (MRP3), *FEBS Letters*, 433, 149-152 (1998)
- 11) Nelson, E. K., The occurrence of a pentamethyl flavonol in tangerine peel, *J. Am. Chem. Soc.*, 56, 1392, (1934)
- 12) Swift, L. J., TLC-spectrophotometric analysis for neutral fraction flavones in orange peel juice, *J. Agric. Food Chem.*, 15, 99 (1967)
- 13) Tseng, K. F., Nobiletin. Part I., an oil extracted by cold methyl alcohol from *Citrus nobilis*, Lour, affords nobiletin, a hexamethoxyflavone containing a veratryl nucleus, *J. Chem. Soc.*, 1003 (1938)

報告文献

- 1) Takanaga, H., Ohnishi, A., Matsuo, H. and Sawada, Y., Inhibition of vinblastine efflux mediated by P-glycoprotein by grapefruit juice components in Caco-2 cells, *Biol. Pharm. Bull.*, 21, 1062-1066 (1998)
- 2) Ohnishi, A., Yamada, S., Takanaga, H., Matsuo, H., Morimoto, S., Shoyama, Y., Sawada, Y., Identification of P-glycoprotein inhibitor of grapefruit juice, submitted.
- 3) Takanaga, H., Ohnishi, A., Murakami, H., Matsuo, H. and Sawada, Y., Pharmacodynamic analysis of felodipine-grapefruit juice interaction based on irreversible enzyme inhibition model, submitted.
- 4) Takanaga, H., Ohnishi, A., Yamada, S., Matsuo, H., Morimoto, S., Shoyama, Y., Sawada, Y., Polymethoxylated flavones in orange juice are inhibitor of P-glycoprotein but not cytochrome P450 3A4, submitted.

Biopharmaceutical analysis of the effect of fruit juice contents on the pharmacokinetics of drugs

Yasufumi Sawada (Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University)

The simultaneous intake of grapefruit juice (GFJ) is known to alter the efficacies and pharmacokinetics of various drugs such as dihydropyridine calcium blockers, cyclosporin A and terfenadine. It has been reported that the mechanism of this interaction is proposed to be a suppression of drug metabolism by cytochrome P450 3A4 (CYP3A4), which is responsible for the metabolism of these drugs. While, the striking overlap of substrates and inhibitors between CYP3A4 and P-glycoprotein (P-gp) was discussed and as a result, the effect of GFJ components on P-gp may thus be a factor to increase the bioavailabilities of drugs. So, we examined the effect of GFJ components on the absorption of drugs from digestive tracts.

We investigated the effect of GFJ and the different sections of grapefruit on the transport of vinblastine, a substrate of P-gp, across Caco-2 cells, a human colonic adenocarcinoma cell line, LLC-PK1 cells, a porcine kidney epithelial cell line, and LLC-GA5-COL300 cells, LLC-PK1 cells transfected with human *MDR1* cDNA. The steady-state uptake of [³H] vinblastine ([³H] VBL) from the apical side of Caco-2 cells was significantly increased in the presence of GFJ in a dose-dependent manner. However, the initial uptake of [³H] VBL was not altered. So, it was suggested that the efflux of [³H] VBL from Caco-2 cells by P-gp might be especially inhibited by GFJ. Moreover, the effect of the three different sections of grapefruit, such as the fresh grapefruit juice, the albedo and the peel, on the uptake of [³H] VBL by Caco-2 cells was examined. The steady-state uptake of [³H] VBL was increased in the presence of all parts of grapefruit. Similarly the effect of organic solvent extracts of GFJ and 6',7'-dihydroxybergamottin (DHBG), we isolated in this study, on the uptake of [³H] VBL by LLC-PK1 cells and LLC-GA5-COL300 cells. The uptake of [³H] VBL by LLC-GA5-COL300 cells was low as compared with LLC-PK1 cells and it was increased in the presence of ethyl acetate extracts or 20 μM DHBG. Then, the effect of DHBG on the 6β-hydroxylation of testosterone and the uptake of [³H] VBL by Caco-2 cells were examined. The uptake of [³H] VBL by Caco-2 cells was increased, while the 6β-hydroxylation of testosterone was decreased in the presence of DHBG. It has already reported that DHBG, we isolated in this study, was an inhibitor of CYP3A4 and the inhibitory effect of DHBG was due to the decrease of the amount of CYP3A4 in the digestive tracts. These results demonstrate that DHBG possess the inhibitory effects between on the drug metabolism and on the active efflux system.

Moreover, we examined the effect of orange juice (OJ) on the function of P-gp and CYP3A4. The initial uptake rate of [^3H] VBL by Caco-2 cells was not inhibited in the presence of ethyl acetate extract of OJ, however significantly increased the steady-state uptake. No significant effect on the cell/medium (C/M) ratio of [^3H] 3-*O*-methylglucose and [^{14}C] phenylalanine was found as compared with control. When the extract was separated on a Cosmosil column, the elute with 70% methanol showed the most potent activity to increase [^3H] VBL uptake. Further separation with hexane-acetone (3 : 1) afforded 3,3',4',5,6,7,8-heptamethoxyflavone (HMF) and 4',5,6,7,8,-pentamethoxyflavone (tangeretin).

HMF and tangeretin were contained in OJ and they increased the steady-state uptake of [^3H] VBL by Caco-2 cells in a concentration-dependent manner. These two methoxyflavones did not inhibit 6 β -hydroxylation of testosterone catalyzed by CYP3A4. While, the ethyl acetate extract of OJ and these methoxyflavones increased steady-state [^3H] VBL uptake by LLC-GA5-COL300 cells, a cell line transfected with human *MDR1* cDNA. We concluded that these methoxyflavones enhanced VBL uptake by specifically inhibiting drug efflux via P-gp. They may have potential as agents for reversing multidrug resistance or for recovering the bioavailability of certain drugs.