

<平成19年度>

香辛料食品と医薬品との相互作用に関する基礎研究

伊 東 秀 之

(岡山大学大学院医歯薬学総合研究科准教授)

1. はじめに

近年、身近な飲食物やサプリメントなどを摂取すると、ある医薬品と相互作用を起こし、医薬品の効力を増大する結果、副作用に繋がったり、医薬品の効力が減弱したりすることが問題となっている。食品－医薬品間相互作用には、医薬品の代謝に関与する薬物代謝酵素シトクロム P450 (CYP) の阻害や誘導が原因とされるものが多く、そのため CYP 阻害や誘導を引き起こす成分を含む食品は、特定の医薬品と併用した場合、副作用を誘引する可能性がある。例えば、グレープフルーツ中の Bergamottin や 7'-Dihydroxybergamottin などの成分が、顕著な CYP3A4 阻害作用を示す結果、Ca 拮抗薬の代謝が阻害され、Ca 拮抗薬の血中濃度が上昇するためにその作用を増強することがよく知られている^{1~3)}。このように各種食品成分の薬物代謝酵素に与える影響に関する論文も数多く報告され、データも蓄積されてきており、薬物相互作用の要因として食品成分の薬物代謝酵素に与える影響が大きく取り上げられている。しかし、最近になって薬物代謝酵素以外に薬物トランスポーターもその他の要因として注目されるようになってきている⁴⁾。薬物トランスポーターは消化管、腎、肝臓などの生体膜に存在し、薬物の吸収、代謝、分布、排泄に影響を与える蛋白質である。主に細胞外への薬物排泄に関与する P 糖蛋白質や、細胞内への薬物の取り込みに関与する有機アニオントランスポーティングポリペプチド

などがある。しかし、薬物代謝酵素に比べて、薬物トランスポーターの作用に影響を与える天然物に関する情報は少ないのが現状である。

食品－医薬品間相互作用に影響を与える様々な要因のなかでも、比較的多くのデータが集積されている薬物代謝酵素に与える影響について、身近な食品素材や食品成分の系統的評価に関するデータの提供は十分とは言えない。食品と医薬品との相互作用において、食品については摂取量が多いため果実ジュースなどの飲料をターゲットにした研究が多く、その他の身近な食品、特に香辛料については、薬物代謝酵素に対する影響を系統的に評価した報告は見当たらず、未解明な部分が多い。そこで本研究では食品の中でも我々の食生活に身近な香辛料に注目し、薬物代謝酵素の作用に影響を与える天然物の系統的な評価および薬物代謝酵素阻害活性物質の探索を目的として研究に着手した。

2. 実験方法

2.1 研究試薬

本実験において、Diclofenac sodium, Testosterone, Magnesium Chloride (MgCl₂), Ketoconazole (Wako), Sulfapnenazole (Sigma), Glucose-6-phosphate (G-6-P), β -Nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate reduced (NADP), Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-P DH) (Oriental Yeast), CYP2C9, CYP3A4 (BD Gentest), Tris-HCl buffer

(Nacalai) を試薬として用いた。

2.2 被験香辛料

試験に用いた香辛料は、麻の実、アサフォエティダ、アジOWN、アニス、オールスパイス、オレガノ、香葉、カフィアライムリーフ、カルダモン、カレーリーフ、キャラウェイ、クミン、クローブ、黒胡椒、シナモン、桂皮、ケシの実、ゴマ、コリアンダー、サフラン、山椒、しょうが、白胡椒、スターアニス、セージ、セボリー、セロリシード、ターメリック、タイム、トラゴン、陳皮、ディル、唐辛子、ハバネロ、ナツメグ、にんにく、バジル、パセリ、花椒、バニラビーンズ、パプリカ、ピンクペパー、フェヌグリーク、フェヌグリークリーフ、フェネル、ブラウンカルダモン、ペパーミント、ポピーシード、マジョラム、マスタード、ブラウンマスタード、メース、レモンガラス、ローズマリー、ローレルの計 55 種である。香辛料は粉碎機で粉末されたものを、50% 含水メタノールで抽出を行い、その抽出エキスを試料として用いた。

2.3 CYP2C9 および CYP3A4 阻害活性測定法

DMSO に溶解させた各サンプル 10 μ L (10 mg/mL; 終濃度: 100 μ g/mL) となるように S1 試液 (250 μ L), S2 試液 (50 μ L), S3 試液 (10 μ L) および S4 試液 (670 μ L) を加えよく混ぜた後、5 分間 37°C でプレインキュベートした。ボルテックスで攪拌した酵素 (CYP2C9 or CYP3A4) を 10 μ L 加え、よく混ぜた後 37°C でインキュベートし、1 時間後に氷中で S5 試液 (200 μ L) を加え反応停止し、分析まで - 20°C で保存した。コントロールではサンプルの代わりに DMSO (10 μ L) を加えた。HPLC 分析により代謝物 (4'-Hydroxydiclofenac or 6 β -Hydroxytestosterone) のピーク面積を算出し、阻害率 (%) = $[1 - (\text{代謝物面積 sample} / \text{代謝物面積 control})] \times 100$ を用いて阻害率を求めた。

それぞれの実験は n = 2 で行った。

反応溶液

- S1 試液: 20 μ M Diclofenac (CYP2C9) or 100 μ M Testosterone (CYP3A4) in 0.1 M Tris-HCl buffer pH 7.6
- S2 試液: 20 mg/mL G-6-P, 20 mg/mL NADP, 13.3 mg/mL $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ in H_2O
- S3 試液: 40 U/mL G-6-P DH in 5 mM sodium citrate
- S4 試液: 0.1 M Tris-HCl buffer pH 7.6
- S5 試液: Acetonitrile/Acetic acid (94:6)

DMSO で 3 種類の濃度に希釈した各サンプルについて上記と同様の操作を行い、コントロールにおける代謝物の面積の面積を 100% とし、各濃度のサンプルについて代謝物面積の % of control を求めた。50% of control となる点を挟む 2 点で直線を引き、50% of control と交わる時の濃度を IC₅₀ 値とした。

2.4 HPLC 分析

CYP2C9 阻害活性スクリーニングにおける逆相系 HPLC 分析は次の条件で行い、各保持時間は 4'-Hydroxydiclofenac (7.5 min), Diclofenac (11.6 min) であった。

column: YMC-Pack ODS A-302 (4.6 mm i.d. $\times$ 150 mm) (YMC CO., Ltd); pump: HITACHI L-2130; detector: HITACHI L-7455; detection: 280 nm; temperature: 40°C; flow rate: 1.0 mL/min; mobile phase: (A) $\text{H}_2\text{O} : \text{CH}_3\text{CN} : \text{HCOOH}$ (69:30:1), (B) MeOH; gradient mode: 0-20 min: 30-100% B (linear)

CYP3A4 阻害活性スクリーニングの逆相系 HPLC 分析は次の条件で行い、各保持時間は 6 β -Hydroxytestosterone (5.4 min), Testosterone (16.2 min) であった。

column: YMC-Pack ODS A-302 (4.6 mm i.d. $\times$ 150 mm) (YMC CO., Ltd); pump: HITACHI L-2130; detector: HITACHI L-7455; detection: 248 nm; temperature: 40°C; flow rate: 1.0 mL/min; mobile phase: (A) H₂O:CH₃CN:HCOOH (65:30:5), (B) H₂O:CH₃CN (20:80); gradient mode: 0-5 min:0% B 5-20 min:0-50% B (linear)

3. 結果と考察

香辛料の粉末化したものを 50% 含水メタノールで抽出を行い、そのエキスについて、CYP2C9 および CYP3A4 活性の阻害活性評価を行った。

コントロール基質として Diclofenac を用いて CYP2C9 発現系ミクロゾームと作用させると、基質の 4' 位に水酸基が導入されるが、そこに CYP2C9 阻害物質が存在すると 4' 位の水酸化反応が阻害される。その反応を応用して、被験物質を作用させた時の Diclofenac の 4' 水酸化の抑制率を、Diclofenac の 4' 水酸化体の HPLC 分析により算出し、被験物質の CYP2C9 阻害活性の指標とした。CYP3A4 阻害活性についても同様のアッセイ方法により評価を行った。即ちコントロール基質に Testosterone を用いて、CYP2C9 と同様に HPLC 法により香辛料エキスによる阻害を評価した。

香辛料エキス 55 種について、いずれも 100 μ g/mL の濃度で、CYP2C9 および CYP3A4 の阻害活性を評価した結果を図 1 にまとめた。ほと

んどの香辛料エキスは 50% 以上の阻害活性は示さなかったが、黒胡椒、シナモン、桂皮、山椒、しょうが、白胡椒、セージ、ナツメグ、花椒およびメースの 10 種の香辛料エキスは、100 μ g/mL の濃度で CYP2C9 および CYP3A4 のいずれに対しても 100% 近い阻害率を示した。なかでも黒胡椒、シナモン、桂皮および白胡椒については、CYP2C9 および CYP3A4 のいずれに対しても 100% を超える顕著な阻害活性を示し、山椒、しょうが、セージ、ナツメグおよび花椒については、CYP3A4 よりも CYP2C9 に対してより強い阻害活性を示す傾向があった。また、100 μ g/mL の濃度における阻害活性は、然程強くないが、アジヨワン、アニス、カレーリーフ、タラゴン、ディール、ハバネロおよびペパーミントは、それぞれ CYP2C9 に対して阻害活性は弱い、CYP3A4 に対しては 50% を超える阻害活性を示し、CYP3A4 に対して特異的に阻害活性を示す傾向が認められた。

次に、100 μ g/mL において顕著な阻害活性を示した香辛料エキス 11 種について、IC₅₀ 値を算出し、それらの阻害活性の比較を行った (表 1)。CYP2C9 に対しては、白胡椒、メースおよびナツメグが、それぞれ 3.2, 1.1 および 2.6 μ g/mL の顕著な阻害活性を示した。一方、CYP3A4 に対しては、黒胡椒、白胡椒、しょうが、ナツメグおよびメースが、それぞれ 4.1, 1.0, 5.1, 4.2 および 3.9 μ g/mL の強い阻害活性を示した。また、顕著な活性を示した白胡椒、ナツメグおよびメースは CYP2C9 および CYP3A4 のいずれに対しても同程度の強い阻害活性を示し、各酵素に対する特異性は認められなかったのに対し、黒胡椒は CYP2C9 よりも CYP3A4 をより強く阻害し、特異的な阻害作用が認められた。しかし、セージおよび花椒においては、CYP 阻害活性は顕著ではないが、CYP3A4 よりも CYP2C9 をより強く阻

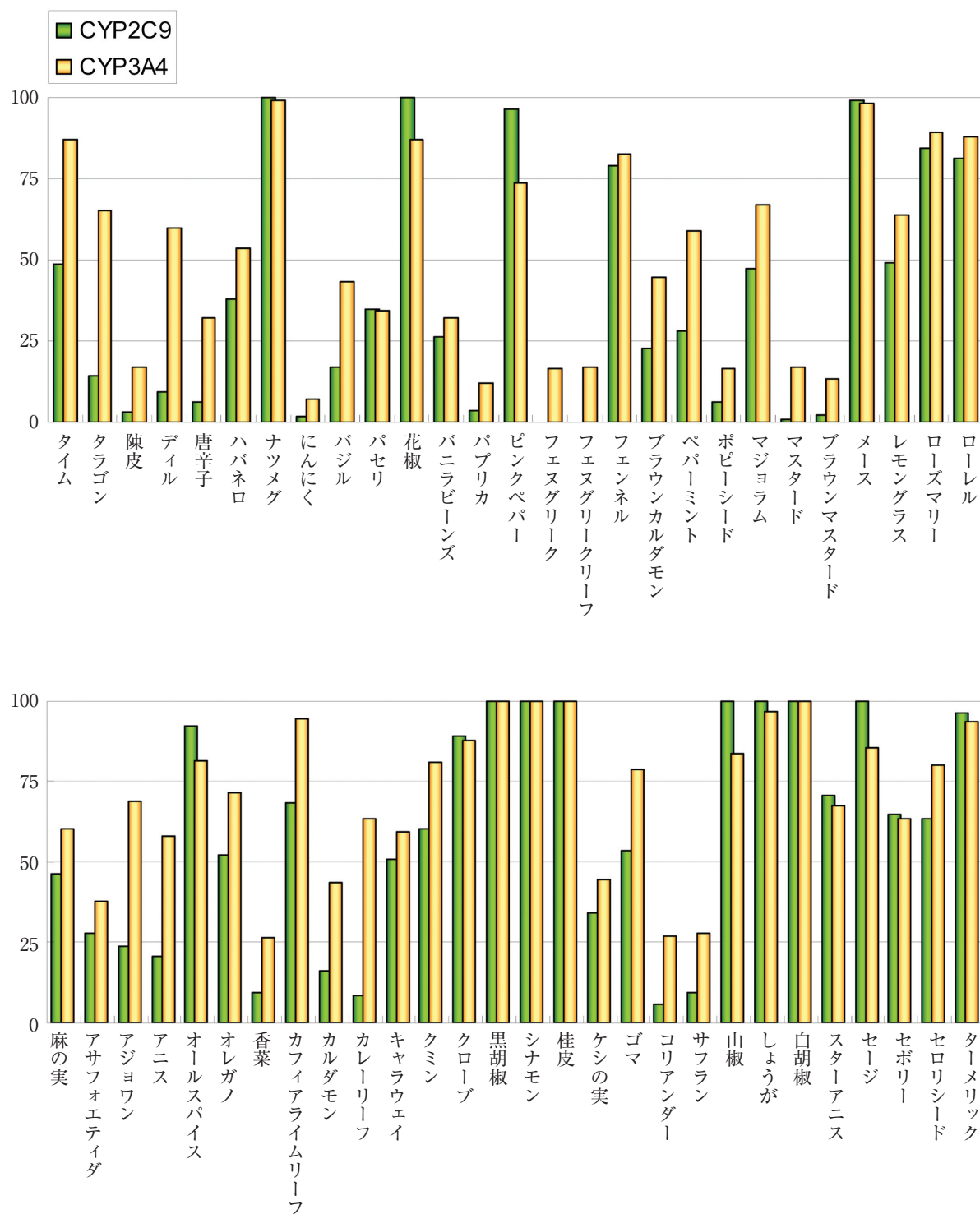


図1 香辛料エキスの薬物代謝酵素 CYP2C9 および CYP3A4 活性阻害率
(各種香辛料エキスの濃度 100 $\mu\text{g/mL}$)

害する傾向が認められた。

本研究の結果、顕著な CYP 阻害活性を示した黒胡椒および白胡椒には、Piperine, Chavicine および Piperlyne などの辛味成分、および (–)- α -Phellandrene, α -, β -Pinene, Linalool などの精

油成分が含まれていることが知られている。胡椒中の Bisalkaloid 類が CYP3A4 に対して顕著な阻害活性を示すことが、*in vitro* 系実験において報告されているが^{5, 6)}, *in vivo* 系実験の報告は見当たらない。また、ナツメグおよびメースについて

表1 顕著なCYP2C9およびCYP3A4活性阻害を示した香辛料エキスの薬物代謝酵素CYP2C9およびCYP3A4活性に対するIC₅₀値

	IC ₅₀ (μg/mL)	
	CYP2C9	CYP3A4
黒胡椒	12.1	4.1
白胡椒	3.2	1.0
シナモン	15.2	30.8
桂皮	12.4	24.0
山椒	36.0	—
しょうが	10.0	5.1
花椒	32	—
セージ	29.0	—
ターメリック	14.8	17.0
ナツメグ	2.6	4.2
メース	1.1	3.9

nt : not tested

は、Geraniol, Camphene などのモノテルペン類や Myristicin などのフェニルプロパノイド系化合物の存在が知られている。しかし、いずれも薬物代謝酵素に与える影響に関する報告は見当たらないが、Myristicin に関しては、それ自身が薬物代謝酵素の働きにより代謝を受けることが報告されているので⁷⁾、逆に Myristicin が薬物代謝酵素に影響を及ぼす可能性も否定できない。山椒、しょうが、セージ、シナモンおよび桂皮に関しては、薬物代謝酵素に与える影響についての報告はない。現在、報告されている成分を含めて、活性を指標にした分離、精製から阻害活性成分の探索を進めており、さらに、今後実験動物を用いた香辛料と医薬品との相互作用の有無について検討を進めて行きたい。

4. おわりに

本研究では、香辛料 55 種について CYP2C9 および CYP3A4 の阻害活性を系統的に評価した。その結果、ほとんどの香辛料は阻害活性を示さなかったが、特に黒胡椒、シナモン、桂皮および白胡椒については CYP2C9 と CYP3A4 の両酵素に対して顕著な阻害活性を示し、また、山椒、しょうが、セージ、ナツメグおよび花椒については、いずれも CYP2C9 に対して阻害活性を示した。

また、アジowan, アニス、カレーリーフ、タラゴン、ディール、ハバネロおよびペパーミントは、CYP2C9 に対しては弱い阻害活性を示したが、いずれも CYP3A4 に対しては比較的強い阻害活性を示した。これら阻害活性を示した香辛料は、ある種の医薬品と相互作用を有する可能性があることから、今後さらに活性を指標とした分離、精製を行い、阻害活性成分を特定すると共に、実験動物を用いた *in vivo* 系実験により、薬物代謝酵素阻害による医薬品の血中動態に及ぼす影響などを検討して行く予定である。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、多大な研究助成金を賜りました財団法人浦上食品・食文化振興財団に深謝申し上げます。また香辛料サンプルをご提供いただきましたハウス食品株式会社に感謝申し上げます。

文 献

- 1) Tassaneeyakul W., Guo L. Q., Fukuda K., Ohta T., Yamazoe Y., Inhibition selectivity of grapefruit juice components on human cytochromes P450. *Arch. biochem. Biophys.*, **378** : 356-363 (2000).
- 2) Bailey D. G., Malcolm J., Arnold O., Spence J. D., Grapefruit juice-drug interactions. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **46** : 101-110 (1998).
- 3) Kakar S. M., Paine M. F., Stewart P. W., Watkins P. B., 6', 7' -Dihydroxybergamottin contributes to the grapefruit juice effect. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **75** : 569-579 (2004).
- 4) Westholm D. E., Rumbley J. N., Salo D. R., Rich T. P., Anderson G. W., Organic anion-transporting polypeptides at the blood-brain and blood-cerebrospinal fluid barriers. *Curr. Top. Dev. Biol.*, **80** : 135-170 (2008).
- 5) Usia T., Iwata H., Hiratsuka A., Watabe T., Kadota S., Tezuka Y., CYP3A4 and CYP2D6 inhibitory activities of Indonesian medicinal plants. *Phytomedicine*, **13**, 67-73 (2006).
- 6) Tsukamoto S., Tomise K., Miyakawa K., Cha B-C., Abe

T., Hamada T., Hirota H., Ohta T., CYP3A4 Inhibitory activity of new bisalkaloids, dipiperamides D and E, and cognates from white pepper, *Bioorg. Med. Chem.*, **10**, 2981-2985 (2002).

7) Yun C-H., Lee H.S., Lee H.-Y., Yim S.-K., Kim K.-H., Kim E., Yea S.-S., Guengerich F.P., Roles of human liver cytochrome P450 3A4 and 1A2 enzymes in the oxidation of myristicin, *Toxicol. Lett.*, **137**, 143-150 (2003).

Studies on interaction between spices and medicines

Hideyuki Ito

(Division of Pharmaceutical Sciences, Okayama University Graduate
School of Medicines, Dentistry and Pharmaceutical Sciences)

Interactions between food components and drugs have recently come into focus of interest. The interactions often occur as a result of inhibiting or inducing of the metabolic enzymes, cytochrome P450 (CYP). It is well known that concomitant intake with grapefruit juice increases the concentration of calcium antagonists in human by suppression of CYP3A4 activation. We investigated the inhibitory effects of 55 spices on CYP3A4 or CYP2C9 activities. *In vitro* inhibitory effects on the metabolism mediated by CYP3A4 or CYP2C9 were determined on the basis of the hydroxylation of testosterone or diclofenac as substrates, respectively, by using reversed-phase HPLC analysis. Among tested spice extracts, Black and White peppers, and Cinnamon exhibited potent inhibition on CYP3A4 and CYP2C9 activations. Ginger, Japanese pepper, Common sage and Nutmeg showed moderate inhibitory effects on CYP2C9. Ajowan, Anise, Curry leaf, Tarragon, Dill, Habanero and Peppermint revealed 50% or higher inhibition at 100 $\mu\text{g/mL}$ on CYP3A4, although these spices have almost no effect on CYP2C9. These results suggested that constituents of a part of spices may have the potential to inhibit the metabolism of drugs, so that further study should be investigated to clarify the clinical relevance.