

氏 名 (本籍) 福 田 勝 行

学 位 の 種 類 博 士 (薬 学)

学 位 記 番 号 薬 第 4 5 1 号

学位授与年月日 平 成 13 年 11 月 21 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 2 項該当

学位論文題目 グレープフルーツジュース中の新規 CYP3A4 活性
阻害成分に関する研究

論文審査委員 (主 査)
教授 山 添 康 教授 後 藤 順 一

教授 大 島 吉 輝

論文内容要旨

グレープフルーツジュースによる薬物相互作用の研究は、主にジヒドロピリジン型カルシウム拮抗薬を中心として展開し、Bailey らによる最初の報告以降、20種以上の临床上重要な薬物との間で相互作用が確認されている。この相互作用が注目された理由としては、コップ1杯の果汁が明瞭な薬効変化を誘発することやグレープフルーツジュースに選択的で同じ柑橘類のオレンジジュースでは起こらないことなどが挙げられる。グレープフルーツジュースでの服用により血漿中の薬物濃度が上昇する主な薬物は、上記のカルシウム拮抗薬のほか、シクロスポリン（免疫抑制薬）、ミダゾラム（催眠薬）、テルフェナジン（抗ヒスタミン薬）、ロバスタチン（HMG-CoA 阻害薬）、エチニルエストラジオール（抗エストロゲン薬）、カルバマゼピン（抗てんかん薬）およびサキナビル（抗 HIV ウィルス薬）など多岐にわたっている。これらの薬物は構造上類似しないが、共通する薬物動態学的性質として、①脂溶性が高く消化管からの吸収率が高い、②酸化的に代謝され、尿中にはほとんどが代謝物として排泄される、③経口投与時の AUC が動脈内投与時の AUC に比べ 25% 以下、④チトクローム P450 分子種のうち、CYP3A4 で主に代謝されることなどが挙げられる。これらの特徴から、グレープフルーツジュースは初回通過時の代謝を阻害することにより薬物の AUC を増加すると考えられるようになった。原因物質は、CYP3A4 の活性を *in vitro* で阻害することが知られていたフラボノイドのナリンギンであると当初から考えられていた。しかしながら、本成分は *in vivo* で上記ジヒドロピリジン型カルシウム拮抗薬の体内動態にほとんど影響せず、この結果本相互作用の原因は他の成分に求められることになった。そこで本研究では、ナリンギン以外の CYP3A4 活性を阻害する成分の探索を目的とし、研究に着手した。まず、グレープフルーツジュースの酢酸エチル抽出物を試料とし、CYP3A4 活性測定系に及ぼす影響を試験した、ジュース抽出物の添加により CYP3A4 活性は濃度依存的に阻害され、本試料中に何らかの阻害成分が存在することが明らかとなった。次に、抽出物による阻害が従来から本相互作用の原因物質と考えられていたナリンギンで解釈できるかを試験するため、ナリンギンの合成標品を用いて CYP3A4 活性の阻害試験を行った。コントロールの活性を 50% 阻害するナリンギン濃度 (IC₅₀) は 100 μ M 以上となり、先の抽出物添加時の試験からジュース中のナリンギン濃度（文献値：約 800 mg/L）用いて算出した IC₅₀ 値 (68.9 μ M) より 14 倍以上も高くなったことから、抽出物で認められた阻害はナリンギン以外の成分に起因することが明らかとなった。ナリンギンは消化管で腸内細菌により糖鎖がはずれ、アグリコンであるナリンゲニンに変換することが知られている。本試験系において検討したナリンゲニンの IC₅₀ は約 50 μ M となり、抽出物中のナリンギンがすべてナリンゲニンに変換していたと仮定すると、抽出物による阻害はナリンゲニンで解釈可能となる。しかしながら、抽出物の HPLC 分析ではナリンゲニンを検出することができず、ナリンゲニンによっても抽出物による阻害を説明することはできなかった。同様の検討を以下に示す 3 成分、すなわちグレープフルーツに特有の苦味成分でトリテルペノイドのリモニン、オオバクノン、およびフレーバー成分であるセスキテルペノイドのノトカトンについても試験し、原因物質としての可能性を定量的に評価した。いずれの成分も CYP3A4 の活性を阻害したが、その効果は弱く、抽出物で認められた阻害効果を説明するには至らなかった。これ

らのことから、抽出物に含まれるフラボノイドおよびテルペノイド以外の成分が CYP3A4 の阻害に寄与していることが示唆された。グレープフルーツには、フラボノイドをはじめとしてテルペノイド、クマリン類など多種多様の成分が含まれている。したがって、化合物標品を用いて CYP3A4 活性の阻害効果を検討することは非効率的であり、またすべての標品を入手することも容易ではないと考えられた。そこで、逆相 HPLC にて抽出物を分画し、得られた粗精製フラクションについて CYP3A4 の阻害効果を検討することにした。逆相 HPLC の移動相にはメタノールおよび水を採用し、グラジエント溶出を行った。グレープフルーツジュースの酢酸エチル抽出物を注入後、溶出液の分取を 15 分間隔で 90 分まで行い、6 フラクションを得た。試料中の溶媒を留去した後、メタノールに再溶解して CYP3A4 活性の阻害効果を検討した結果、2 つのフラクションにおいて有意な阻害効果が認められ、酢酸エチル抽出物の阻害効果を説明できることが明らかとなった。本 HPLC 条件下において、ナリンギン、ナリンゲニンおよびリモニンの標品が溶出するフラクションには有意な阻害効果が認められず、先の標品で行った結果を支持した。阻害が認められたフラクションをさらに細分画し、阻害試験を行うことにより成分の特定を行った結果、最終的に 4 成分を単離することに成功した。これらの阻害成分の構造については、各種機器分析、すなわち UV スペクトル、LC/MS/MS および $^1\text{H-NMR}$ スペクトルにより解析した。その結果、単離した 4 成分はいずれも 5-ゲラニルオキシソラレン誘導体であり、このうち 2 種は新規化合物であることが判明した。そこで、グレープフルーツ (Grapfruit) 中の CYP3A4 阻害物質 (Inhibitor) にちなみ、各々 GF-I-1 および GF-I-4 と命名した。新規化合物 (GF-I-1 および GF-I-4) の CYP3A4 に対する阻害が特に強かったことから、Dixon plot による解析を行った。阻害定数 (K_i) の比較から、GF-I-1 および GF-I-4 の阻害効果は、CYP3A4 の典型的かつ強力な阻害薬であるケトコナゾールと同等かあるいはそれ以上であることが明らかとなり、阻害反応の様式は競合および非競合的拮抗阻害の混合型であると推察された。薬物によるチトクローム P450 活性の低下は薬物間の競合による阻害 (競合阻害) と不可逆的な酵素修飾による失活 (Mechanism-based Inhibition) によって起こると考えられる。添加物質が反応液中でより活性な反応性代謝物に変換され酵素失活を起こす場合、添加物質と酵素とのプレインキュベーションによって阻害率が増加すると予想される。そこで、GF-I-1 および GF-I-4 を予め NADPH の存在下に 15 分間ヒト肝ミクロソームと反応させ、阻害活性の変化を調べた。GF-I-1 および GF-I-4 の阻害率は、プレインキュベーションによって著しく増加し、同様の結果がジュースの酢酸エチル抽出物においても認められた。したがって、GF-I-1 および GF-I-4 による阻害メカニズムには、競合的阻害だけでなく代謝的活性化による非競合的阻害が一部関与していることが明らかとなった。この結果は、ジュースの影響が飲用後 12 時間以上持続し、また CYP3A4 の mRNA ではなくタンパクのみが減少するという臨床知見を矛盾なく説明する現象として非常に興味深い。以上の結果から、グレープフルーツジュースの酢酸エチル抽出物で認められた CYP3A4 活性の阻害は、今回単離した 4 成分、すなわち GF-I-1, GF-I-2, GF-I-3, および GF-I-4, に起因し、これらが相加的に作用して多数の薬剤との間で薬物動態学的相互作用を引き起こしていると考えられる。

次いで、今回単離した成分の HPLC による定量法を確立し、市販のジュースまたは果実中の局在について考察した。市販のジュースの分析では、ブランド間の濃度差は大きかったが、試験したいずれのジュース

スにも阻害成分が含まれていた。また、ホワイト種のフルーツから製造されたジュースでは、ルビーレッド種から得られたピンクグレープフルーツジュースより阻害成分の濃度が高かった。グレープフルーツ以外のフレッシュジュースの分析では、レモンジュース中に微量の GF-I-2 および GF-I-4 が検出されたのみで、その他検討したオレンジ、ミカン、リンゴおよびグレープジュースに検出することはできなかった。したがって、今回単離した CYP3A4 活性の阻害成分はグレープフルーツジュースに特有な成分であると考えられた。この結果は、グレープフルーツ以外のジュースでは相互作用が見られないという臨床知見を支持している。果実中の局在に関する検討では、ホワイト種およびビーレッド種のグレープフルーツをそれぞれ果皮、囊、果肉および種子に分け、各部位に阻害成分がどの程度含まれているかを HPLC で検討した。その結果、当該成分の大部分（果実総量の 7-8 割以上に相当）が果肉に含まれることが明らかとなった。また、ホワイト種はルビーレッド種よりも阻害成分を多く含んでおり、市販ジュースでの試験結果を支持した。グレープフルーツジュースは、コップ 1 杯、すなわち約 200 mL でフェロジピンのバイオアベイラビリティを上昇することが報告されている。今回検討した阻害成分の定量結果から、市販のジュースと果肉（ホワイト種）中の含量を比較し、果実の摂食による相互作用の危険性を考察した。すなわち、市販ジュース 200mL 中に含まれる GF-I-1, GF-I-2, および GF-I-4 は、それぞれ 64.3 μ g, 1128.2 μ g および 59.3 μ g と算出され、これは果肉のおよそ 100g に含まれる量に相当する（それぞれ 59.9 μ g, 1141.8 μ g, 48.9 μ g）。一方、グレープフルーツ 1 果実当たりの果肉重量は約 300g であったことから、果肉の約 1/3 を摂食することにより薬物相互作用を惹起する可能性が示唆された。グレープフルーツ果実の摂食による相互作用についてはまだ報告されていないが、服薬時の注意事項として医療機関のみならず、一般にも広く知らしめる必要があると思われる。

以上、本研究ではグレープフルーツジュースの飲用に起因した薬物動態学的相互作用の原因物質について詳細な検討を行った。グレープフルーツ中には CYP3A4 の活性を阻害する少なくとも 4 種の 5-ゲラニルオキシソラレン物質が含まれており、これらが相加的に働いて相互作用を惹起していると結論付けられる。また、ソラレン誘導体はグレープフルーツに限らず、セリ科の植物（セロリ、パセリなど）や生薬（ビャクシ、キョウカツ、ボウフウ、ハマウドなど）およびクワ科の植物（イチジクなど）にも含まれており、今回の検討結果は食物（食品）や生薬を含めた広義の薬物相互作用を考える上で有用な情報を与えるものと期待される。

審査結果の要旨

グレープフルーツジュースによる薬物相互作用の研究は、主にジヒドロピリジン型カルシウム拮抗薬を中心として展開し、Bailey らによる最初の報告以降、20種以上の臨床上重要な薬物との間で相互作用が確認されている。この相互作用が注目された理由としては、コップ1杯の果汁が明瞭な薬効変化を誘発することやグレープフルーツジュースに選択的で同じ柑橘類のオレンジジュースでは起こらないことなどが挙げられる。グレープフルーツジュースでの服用により血漿中の薬物濃度が上昇する主な薬物は、上記のカルシウム拮抗薬のほか、シクロスポリン（免疫抑制剤）など多岐にわたっている。これらの薬物は構造は類似しないが、共通する薬物動態学的性質から、グレープフルーツジュースは初回通過時の代謝を阻害することにより薬物の AUC を増加すると考えられるようになった。そこで、逆相 HPLC にて抽出物を分画し、得られた粗精製フラクションについて CYP3A4 の阻害効果を検討して、インビトロ阻害試験を行うことにより成分の特定を行った結果、最終的に4成分を単離することに成功した。これらの阻害成分の構造については、各種機器分析、すなわち UV スペクトル、LC/MS/MS および $^1\text{H-NMR}$ スペクトルにより解析した。その結果、単離した4成分はいずれも 5-ゲラニルオキシソラレン誘導体であり、このうち2種は新規化合物であることが判明した。そこで、グレープフルーツ (Grapefruit) 中の CYP3A4 阻害物質 (Inhibitor) にちなみ、各々 GF-I-1 および GF-I-4 と命名した。新規化合物 (GF-I-1 および GF-I-4) の CYP3A4 に対する阻害が特に強かったことから、Dixon plot による解析を行った。阻害定数 (K_i) の比較から、GF-I-1 および GF-I-4 の阻害効果は、CYP3A4 の典型的かつ強力な阻害薬であるケトコナゾールと同等かあるいはそれ以上であることが明らかとなり、GF-I-1 および GF-I-4 による阻害メカニズムには、競合的阻害だけでなく代謝的活性化による非競合的阻害が一部関与していることが明らかとなった。次いで、今回単離した成分の HPLC による定量法を確立し、市販のジュースまたは果実中の局在について考察した。グレープフルーツ中には CYP3A4 の活性を阻害する少なくとも4種の 5-ゲラニルオキシソラレン物質が含まれており、これらが相加的に働いて相互作用を惹起していると結論付けられる。

よって、本論文は博士（薬学）の学位論文として合格と認める。