

漢方薬と西洋薬の有機アニオントランスポーターを介する薬物相互作用に関する研究

申請代表者 牧野 利明 名古屋市立大学大学院薬学研究科生薬学分野 准教授
所内共同研究者 手塚 康弘 資源開発部門 化学応用分野 准教授
(現 資源開発部門 天然物化学分野)

【報告セミナー要旨】

【目的】 現代医療の中での漢方薬の利用の拡大に伴い、西洋薬との薬物相互作用に関する医薬品情報が求められている。2007年に報告されたGFJによる有機アニオン輸送ペプチド (OATP) 1A2阻害による fexofenadine の消化管吸収抑制作用は、原因成分がフラボノイド配糖体であり、柑橘系果物を基原とする生薬、陳皮や枳実にも阻害作用を示すのに十分な量が含まれていることが明らかになっている。このことから、漢方薬においてもその機序による薬物相互作用が引き起こされることが懸念される。

これまで演者は、ラットを用いて漢方薬と fexofenadine 間の薬物相互作用の検討を試みたが、ラットではGFJにより fexofenadine の吸収が促進されてしまい、基礎研究成果を臨床へ応用することは困難な結果であった。

そこで本研究では、ヒトの小腸に発現する OATPs のうち、すでに消化管吸収に関する薬物相互作用を起こすことが知られている OATP1A2 と OATP2B1 をとりあげ、ヒト由来細胞を用いた強制発現細胞を用いた実験系により生薬・漢方薬の OATPs に対する阻害力価を測定し、臨床へ応用するための基礎的なデータを集めることを目的としている。

【方法】 市販のヒト小腸 cDNA ライブラリーから、OATP1A2 と OATP2B1 遺伝子をクローニングし、pCI-neo ベクターに組み込んだ。ヒト腎臓由来 HEK293 細胞へそれら遺伝子をリポフェクション法により導入し、OATP1A2 または OATP2B1 を一過性に発現させた。コントロールとして、空ベクターを導入した mock 細胞を利用した。OATP1A2 および OATP2B1 の基質として fexofenadine, atorvastatin, [³H]estrone sulphate を選択し、各種漢方薬を含む培地とともに細胞を 10 分間処理し、細胞内に取りこまれた薬物量を LC/MS/MS または放射活性により測定した。

【結果】 Fexofenadine の OATP1A2 を介する細胞内への輸送は、500 µg/mL の小青竜湯および小柴胡湯で有意に阻害された。一方、atorvastatin の細胞内への輸送は、mock 細胞、OATP2B1 導入細胞ともに、500 µg/mL の防風通聖散により促進する傾向が見られた。そこで、OATP2B1 導入細胞では estrone sulphate を基質として使用したところ、500 µg/mL の防風通聖散、釣藤散、大柴胡湯により、OATP2B1 を介する estrone sulphate の輸送はほぼ完全に阻害された。

【考察】 今回の 500 µg/ml という濃度は、計算上ではヒトの消化管内で十分に起こりうる濃度であるが、培養細胞実験としてはかなり高い濃度であり、今後、低濃度時の阻害力価が求められる。また、今回選んだ漢方薬には陳皮や枳実を含まないことから、漢方薬に配合される生薬にはフラボノイド配糖体以外にも OATP 阻害作用をもつ化合物が含まれている可能性が示唆された。

■背景・目的

現代医療の中での漢方薬の利用の拡大に伴い、西洋薬と併用される機会が増えてきており、西洋薬との薬物相互作用に関する医薬品情報が求められている。医薬品と薬物相互作用を引き起こす代表的な天然由来素材であるグレープフルーツジュースは、含有成分のフラノクマリン類が消化管上皮細胞におけるシトクロムP450 (CYP) 3A4やP糖タンパク質 (MDR1) を阻害することでその基質となる多くの薬物の血中濃度を高めることが知られている。しかし、漢方薬の場合は臨床使用量ではCYP3A4を阻害するだけのフラノクマリン類を含んでおらず、現代医療の場において漢方薬と西洋薬との間では、それらを介する薬物相互作用は起こらないものと推定される。

ところで、2007年にグレープフルーツジュースが有機アニオン輸送ペプチド (OATP) 1A2を阻害することでそれを介して消化管から吸収されるフェキソフェナジンの血中濃度を低下させるという薬物相互作用が報告された。その原因成分はフラボノイド配糖体であるナリンギンとされ、その50%阻害濃度 (IC₅₀) は3.6 μMであった (Bailey D.G., et al., Clin Pharmacol Ther, 81, 495–502, 2007)。この濃度は、陳皮や枳実などの柑橘系果物を基原とする生薬でも十分に含まれている濃度であったことから、申請代表者はラットを用いてそれらとフェキソフェナジン間の薬物相互作用について検討し、ヒト1回常用量に相当する枳実エキスとフェキソフェナジンとの併用により、フェキソフェナジンの消化管吸収が有意に抑制されたことを報告した (2009年和漢医薬学会大会にて発表)。しかし、ラットではグレープフルーツジュースがフェキソフェナジンの吸収を抑制しないどころかむしろ促進するなど、ラットにおけるOATPsの分子種や活性がヒトとは大いに異なり、臨床へ応用するためには困難な結果であった。

そこで本研究では、ヒトの小腸に発現するOATPsのうち、すでに消化管吸収に関する薬物相互作用を起こすことが知られているOATP1A2とOATP2B1をとりあげ、ヒト由来細胞を用いた強制発現細胞を用いた実験系により生薬・漢方薬のOATPsに対する阻害力価を測定し、臨床へ応用するための基礎的なデータを集めることを目的とした。

■方法

OATP1A2とOATP2B1をコードするopen reading frameを、ヒト小腸cDNAライブラリー (タカラバイオ, 大津) からDDBJ/EBI/GenBank DNA databases番号, BC042452およびBC041095に基づいたプライマーを用いたPCR法により増幅させ、pCI-neo発現ベクター (Promega, Madison, WI, USA) にサブクローニングした。

ヒト腎臓由来HEK293細胞 (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) は、10%ウシ胎児血清 (FBS, Thermo Scientific, Waltham, MA), penicillin-streptomycin mixed solution (ナカライテスク, 京都) を含むDulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM, ナカライテスク) を用いて培養した。20 μg/mlのpoly-L-lysine (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) でコーティングした24 wellプレート (日本ジェネティクス, 東京) に、HEK293細胞を 1.5×10^5 cells/wellとなるように播種し、24時間、培養した。そこへ、OATP1A2またはOATP2B1を含むpCI-neoベクターをHilly Max試薬 (同仁化学, 熊本) を用いたりポフェクション法により導入し、OATP1A2またはOATP2B1を一過性に発現させた。コントロールとして、空ベクターを導入したmock細胞を利用した。細胞を48時間培養後、OATP1A2およびOATP2B1の基質であるfexofenadine (LKT Laboratories, St. Paul, MN, USA), atorvastatin (LKT Laboratories), または [³H]estrone sulphate (Waltham,

MA, USA) と各種漢方薬エキスを含むHank'sバランス緩衝液 (HBSS) を添加して10分間処理し、氷冷リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で細胞表面を洗浄後、50%エタノールで細胞内容物を抽出し、細胞内に取りこまれた薬物量をLC/MS/MSまたは放射活性により測定した。また、細胞残留物は0.2M NaOHで溶解し、HClで中和後、BCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) でタンパク質量を測定した。細胞内への取り込み量は、以下の条件のLC/MS/MSまたは放射活性で定量した薬物量を、細胞のタンパク質量で補正した値により求めた。LC/MS/MSの条件は、以下の通りである：システム, Quattro Premier XE (Waters, Milford, MS, USA)；カラム, Inertsil ODS-3, 2.1 x 100 mm, 3 μm (GLサイエンス, 東京)；移動層, 0.5% 酢酸 (A)：0.5% 酢酸入りアセトニトリル (B), 50% B → 95% B (0 → 4 min, フェキソフェナジン), 40% B → 96% B → 96% B (0 → 2.5 → 4 min, アトロバスタチン), 0.2 ml/min；検出, ESI(+)モード, フェキソフェナジン $[M+H]^+$ 502.3 → 171.0 (2.9分), アトロバスタチン $[M+H]^+$ 559.4 → 250.11 (3.7分), フェキソフェナジンに対する内部標準としてジフェンヒドラミン ($[M+H]^+$ 255.9 → 166.8, 2.8分) を, アトロバスタチンに対する内部標準としてプラバスタチン ($[M+H]^+$ 447.4 → 327.3, 2.8分) を使用し, それぞれ2 - 500 nMの濃度範囲で良好な直線の検量線を得た ($r^2 > 0.98$)。

漢方薬の調製に使用した生薬は、大見生薬 (名古屋) から購入した。小青竜湯 (麻黄3g・桂皮3g・芍薬3g・甘草3g・半夏6g・乾姜3g・細辛3g・五味子3g), 小柴胡湯 (柴胡7g・黄芩3g・芍薬3g・半夏5g・甘草2g・大棗3g・枳実2g・生姜1g・大黄1g), 大柴胡湯 (柴胡6g・黄芩3g・人参3g・半夏4g・甘草2g・大棗3g・生姜1g), 補中益気湯 (人参4g・白朮4g・茯苓1g・甘草1.5g・大棗2g・黄耆4g・陳皮2g・柴胡2g・当帰3g・生姜0.5g・升麻1g), 麦門冬湯 (麦門冬10g・人参2g・粳米5g・甘草2g・大棗3g・半夏5g), 釣藤散 (石膏3g・釣藤鈎3g・菊花3g・陳皮3g・麦門冬3g・防風3g・甘草1g・人参3g・半夏3g・茯苓3g・生姜1g) 防風通聖散 (麻黄1.2g・石膏2g・甘草2g・生姜0.3g・当帰1.2g・芍薬1.2g・川芎1.2g・大黄1.5g・芒硝0.7g・白朮2g・連翹1.2g・桔梗2g・薄荷1.2g・黄芩2g・荆芥1.2g・防風1.2g・滑石3g・山梔子1.2g) をそれぞれ調剤し, 600 mlの水で60分間煎じることにより得た湯液を凍結乾燥し, 乾燥エキスを得た。

統計処理は、一元配置分散分析 (ANOVA) とDunnettの多重比較検定を使用し, 危険率p値が5%未満の時に統計学的に有意とした。

■結果・考察

はじめにヒト小腸cDNAライブラリーからクローニングしたOATP1A2, 2B1の機能の確認を行った。OATP1A2の基質として、実際の臨床試験においてグレープフルーツジュースにより吸収の阻害が確認されているフェキソフェナジンを, OATP2B1の基質として脂質異常症用薬であるアトロバスタチンを使用した。HEK293細胞への遺伝子導入の方法, 薬物の濃度, 取り込み時間などの条件を検討した結果, フェキソフェナジンでは25 μM, アトロバスタチンでは5 μMの濃度で10分間細胞を処理することにより, 空ベクターを導入したmock細胞に対して, OATP1A2導入細胞で有意なフェキソフェナジンの輸送と, OATP2B1導入細胞でのアトロバスタチンの有意な輸送が確認できた (図1)。

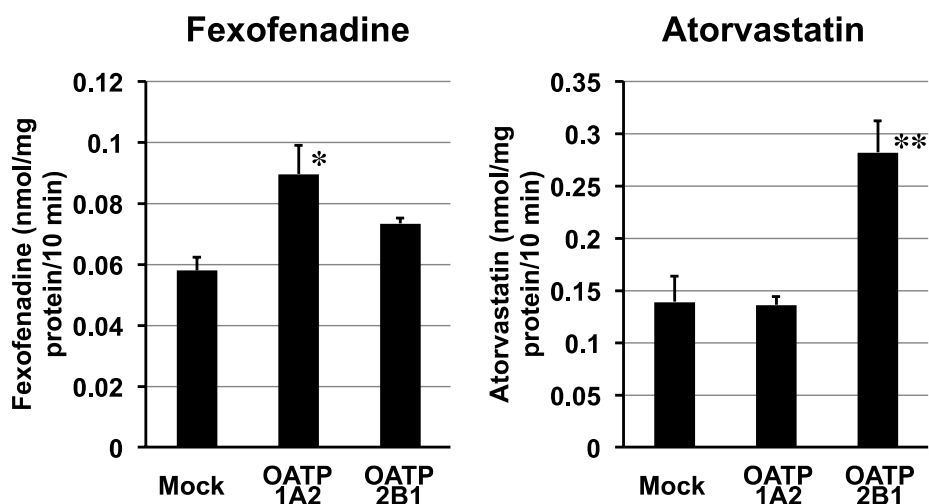


図1 OATP1A2 および 2B1 を導入した HEK293 細胞に対するフェキソフェナジンとアトロバスタチンの輸送

フェキソフェナジンは 25 μ M、アトロバスタチンは 5 μ M の濃度で、細胞に対して 10 分間作用させた。データは平均値 \pm 標準誤差 ($n=3$) で示した。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs mock group by Dunnet's multiple t test.

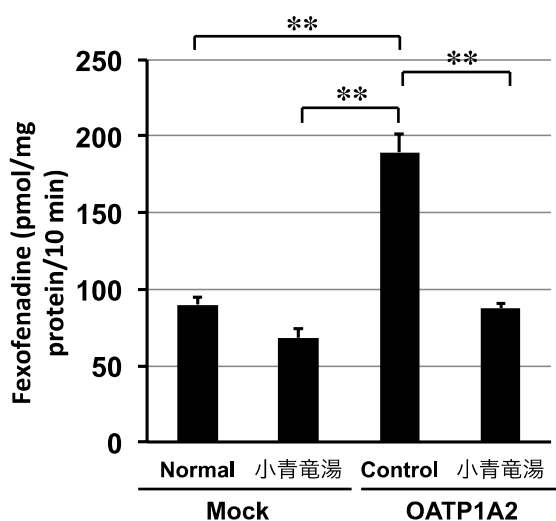


図2 OATP1A2 を介するフェキソフェナジン輸送に対する小青竜湯の作用

フェキソフェナジンは 25 μ M の濃度で、小青竜湯エキスは 500 μ g/ml の濃度で細胞に対して 10 分間作用させた。データは平均値 \pm 標準誤差 ($n=3$) で示した。** $P < 0.01$ vs mock group by Dunnet's multiple t test.

次に、OATP1A2を介するフェキソフェナジンの輸送に対する漢方薬の作用について検討した。フェキソフェナジンは抗アレルギー薬であり、花粉症によく使用されるため、併用される機会の多い漢方薬として小青竜湯を選択した。小青竜湯エキスは、OATP1A2を介するフェキソフェナジンの輸送を、500 μ g/mlの濃度ではほぼ完全に阻害してした(図2)。小青竜湯には、既知のOATP1A2阻害活性を持つフラボノイド配糖体を多く含んでいる陳皮や枳実などなどの生薬を含まないため、小青竜湯にはOATP1A2阻害作用をもつ未知の化合物を含有する生薬が配合されていることが予想された。小青竜

湯 1 回量の煎液の濃度は約 10 mg/ml であり、本実験で採用した 500 μ g/ml という濃度はそれを 20 倍に希釈した濃度である。ヒトが薬物を摂取する時には、消化管内液で 10 倍程度に希釈されるといわれていることから、本実験における濃度は、実際のヒト消化管内でも起こりうる濃度と考えられる。このことから、小青竜湯とフェキソフェナジンは、臨床において OATP1A2 を介する薬物相互作用が起る可能性が示唆された。

同様に、他の漢方処方 OATP1A2 に対する作用について検討した。小柴胡湯、補中益気湯、麦門冬湯各エキスをそれぞれ 500 μ g/ml の濃度で作用させたところ、小柴胡湯で有意な OATP1A2 阻害作用が確認され、補中益気湯、麦門冬湯では有意な抑制は認められなかった (図 3)。一方、OATP1A2 の遺伝子を導入していない mock 細胞において、有意差はないものの、フェキソフェナジンの細胞内への移行を補中益気湯が促進する傾向が見られた。フェキソフェナジンは、細胞の内側から外へと薬物を排出するトランスポーターである P 糖タンパク質の基質でもあることが知られており、そのような排出型のトランスポーターを補中益気湯が阻害する可能性が示唆された。

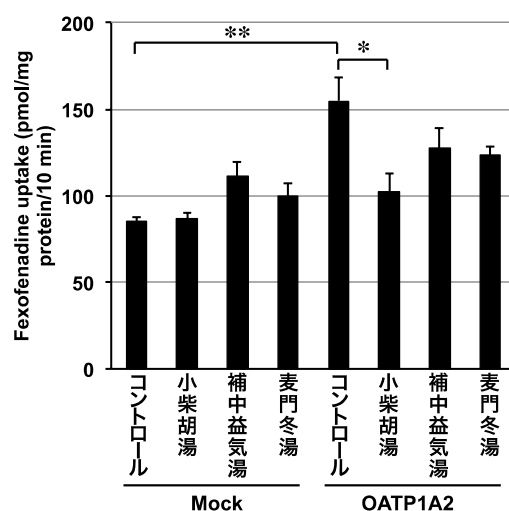


図 3 OATP1A2 を介するフェキソフェナジン輸送に対する漢方薬の作用

フェキソフェナジンは 25 μ M の濃度で、各漢方薬エキスは 500 μ g/ml の濃度で細胞に対して 10 分間作用させた。データは平均値 \pm 標準誤差 ($n=3$) で示した。* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs mock group by Dunnet's multiple t test.

次に、OATP2B1 に対する漢方薬の作用について検討した。OATP2B1 の代表的な基質であるアトロバスタチンやグリベンクラミドは、脂質異常症や糖尿病に使用される薬物であることから、防風通聖散をまずはじめに選択した。防風通聖散エキスを 500 μ g/ml の濃度で作用させたところ、OATP2B1 を導入していない mock 細胞において、防風通聖散エキスはアトロバスタチンの細胞への取り込みを増加させる傾向が認められ、OATP2B1 遺伝子導入細胞においては、防風通聖散エキスは有意にアトロバスタチンの細胞への取り込みを増加させた (図 4)。アトロバスタチンの場合は、フェキソフェナジンよりも排出系トランスポーターの基質として認識されやすく、漢方薬の排出系トランスポーター阻害作用の影響を受けやすい可能性が推測された。以上のことから、OATP1A2 や OATP2B1 を介する西洋薬と漢方薬の薬物相互作用を検討するためには、P 糖タンパク質などの排出型のトランスポーターの基質にならない物質を用いて実験を行うなどの改善が必要であると考えられた。

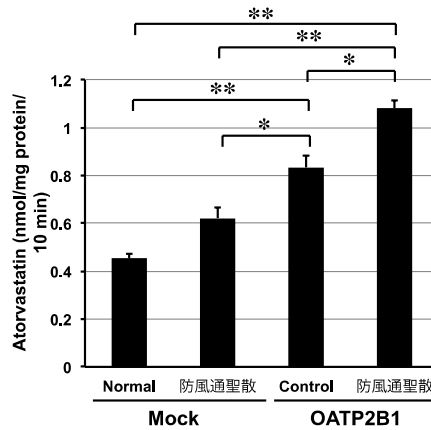


図4 OATP2B1 を介するアトロバスタチン輸送に対する防風通聖散の作用

アトロバスタチンは 5 μ M の濃度で、防風通聖散エキスは 500 μ g/ml の濃度で細胞に対して 10 分間作用させた。データは平均値 \pm 標準誤差 ($n = 3$) で示した。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs mock group by Dunnet's multiple t test。

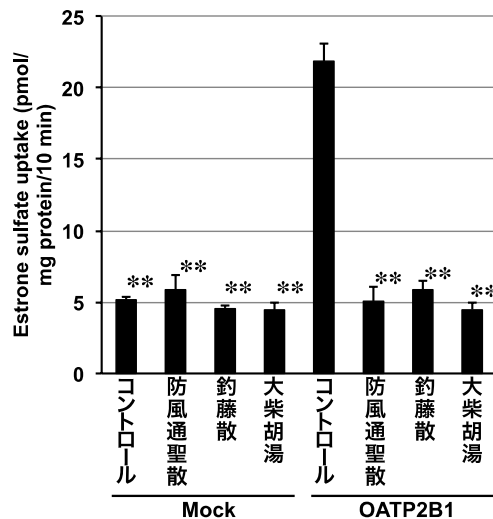


図5 OATP2B1 を介するエストロン硫酸輸送に対する漢方薬の作用

エストロン硫酸は 1 μ M の濃度で、各漢方薬エキスは 500 μ g/ml の濃度で細胞に対して 10 分間作用させた。データは平均値 \pm 標準誤差 ($n = 3$) で示した。** $P < 0.01$ vs mock group by Dunnet's multiple t test。

そこで、OATP2B1を導入した細胞において、有機アニオントランスポーターで輸送される典型的な基質であるエストロン硫酸を用いて、同様の実験を行った。漢方薬として防風通聖散のほか、高血圧に適応をもつ釣藤散と大柴胡湯を選択した。その結果、防風通聖散、釣藤散、大柴胡湯、各エキスとも 500 μ g/ml の濃度で、完全に OATP2B1 の機能を阻害した (図 5)。従って、それらの処方はいは OATP2B1 を介して消化管から吸収される薬物と相互作用を示す可能性が示唆された。

本実験では、消化管上皮細胞を用いること、対象としたトランスポーターは細胞膜上に発現しているものであり消化管内で漢方薬中の成分が直接的に培養細胞に触れることから、和漢薬研究における

「ふりかけ実験」に対する批判には該当しない。今回の500 µg/mlという濃度は、計算上ではヒトの消化管内で十分に起こりうる濃度であるが、培養細胞実験としてはかなり高い濃度である。本研究では濃度依存性についての検討ができていないが、今後、低濃度時の阻害力価を求め、50%阻害濃度などで、臨床において実際に薬物相互作用が報告されているグレープフルーツジュースと比較することなどにより、実際に薬物相互作用を示す可能性について慎重に検討する必要がある。また、今回選んだ漢方薬には陳皮や枳実を含まないことから、漢方薬に配合される生薬にはフラボノイド配糖体以外にもOATP阻害作用をもつ化合物が含まれている可能性が示唆された。

■結論

本研究では、OATP1A2および2B1の機能に対する漢方薬の影響を評価する実験系を確立した。その結果、OATP1A2では小青竜湯、小柴胡湯において、OATP2B1では防風通聖散、釣藤散、大柴胡湯において、500 µg/mlの濃度で有意な阻害作用を認めた。今後、それらのIC₅₀値を求め、グレープフルーツジュースと比較することで、臨床において薬物相互作用が起こりうる可能性を推定していきたい。