

〈原著〉

生体パラメーターを指標とした食品と医薬品との相互作用評価

神内 伸也 (かみうち しんや) 深谷 睦 (ふかや むつみ)

日比野 康英 (ひびの やすひで)*

城西大学大学院 薬学研究科 医療栄養学専攻 生体防御学講座

要旨

【目的】薬物排泄トランスポーターとして薬物相互作用に影響を与える可能性のあるP-糖タンパク質 (P-gp) について、糖尿病態時の腸管における発現変動と薬物輸送能との関連を検討した。

【方法】ストレプトゾトシンを腹腔内投与して1型糖尿病モデルラットを作製した。同時に、飼育終了1週間前からインスリンを皮下投与し血糖の上昇を抑制したラットを作製した。これらラットの酸化ストレス度および抗酸化力を評価した。また、腸管のP-gp発現量を解析するとともに、空腸におけるRhodamine 123の排泄量を測定した。

【結果・考察】糖尿病モデルラットは、正常血糖ラットと比較して酸化ストレス度が上昇し、腸管のP-gp発現が増加するとともに薬物排泄量が増加した。一方、インスリン投与ラットでは、P-gp発現が糖尿病ラットに比べ低下し、正常血糖ラットの薬物排泄量と同程度を示した。これらの結果は、P-gpの発現が酸化ストレス度に依存して変動し、薬物動態に大きく影響を及ぼすと考えられた。

はじめに

食品の分類に新たなカテゴリーを設けてスタートした「機能性表示食品」制度は、消費者の「自主的かつ合理的な商品選択の機会の確保」を促すことをコンセプトとしている。これまで日本国内では、特定保健用食品と栄養機能食品にのみ食品の機能性表示を認め、これら食品の摂取が健康寿命の延伸に貢献するとして一次予防の重要性を後押ししてきた。しかし、実際には機能性が表示できない数多くのいわゆる健康

食品がこれらにも増して流通したことも事実であり、本制度が消費者自らの選択によってセルフメディケーションを加速させる取り組みとなることを期待したい。

ところで、日本では消費者の半数以上が何らかの健康食品・機能性食品を利用しており¹⁾、さらに驚くことに、健康食品が健常者における健康増進や疾病予防といった目的だけでなく、多くの生活習慣病や難治性疾患に対しても利用されている実態がある。つまり、健康食品の利用と標準治療(薬物治療)との併用が実体として存在するこの事実は、医療従事者だけでなく医療機関の受診者や有病者に対して、併用による有効性、安全性、経済性といった面での適正使用に関する情報が提供されなければならないことを意味している。しかし、医薬品と健康食

Evaluation of the interaction of food and drug by biological parameters

Shinya Kamiuchi, Mutsumi Fukaya, Yasuhide Hibino*
城西大学大学院 薬学研究科 医療栄養学専攻 生体防御学講座 (Tel: 049-271-7285 Fax: 049-271-7284
E-mail: seitaib@josai.ac.jp)

品の相互作用による有害事象が懸念される中で、適正使用に関する情報を収集する以前に医薬品と健康食品の相互作用を検討するための適切なガイドラインがこれまでなかった。

2014年7月、厚生労働省医薬品食品局審査管理課から「医薬品開発と適正な情報提供のための薬物相互作用ガイドライン」が発表された²⁾。このガイドラインの目的は、薬物相互作用の発現を予測し、臨床試験の実施の必要性を判断するための非臨床試験、及びヒトにおける薬物相互作用の発現の有無とその程度を確認するための臨床試験について、具体的な方法や判断の基準、並びに試験結果の解釈や情報提供に関する一般的な指針を提示することにある。当該ガイドラインで定義する薬物相互作用とは、薬物の効果・副作用あるいは薬物動態に影響を及ぼす併用薬物間（バイオテクノロジー応用医薬品や生物起源由来医薬品などの生物薬品を含む）及び薬物と飲食物、嗜好品など（例えば、喫煙、飲酒、サプリメント）との間に生じる現象であるとしている。つまり、アンダーライン部分は、このガイドラインが医薬品と健康食品の相互作用を検討するための適切なガイドラインになりうることを示唆している。さらに、このガイドラインの重要な点は、相互作用に関する科学的根拠を薬物代謝酵素などの活性への影響といった作用機序に基づく理論上の議論を通して、医薬品開発過程で得られた被験薬の薬物動態情報及び薬物相互作用試験によって得られる情報が、添付文書やその他の手段を通じて医療現場に提供されることで、医薬品の適正使用に有用な情報になりうる点である。従って、実際の症例報告が医療用医薬品の添付文書に相互作用情報として記載され、患者のみならず医療関係者へ周知徹底されることによって、相互作用に関する適正使用情報が有効に活用されることになる。

薬物代謝酵素シトクロム P450 (CYP) は、代謝過程における薬物相互作用の約 96% に関与していると考えられている³⁾。CYP の活性には遺伝的多型や性別、年齢などの個人差が存在

し、併用薬との相互作用によりその活性が変動することがある。また、薬物トランスポーターは、主に細胞膜上に発現して細胞外から細胞内への薬物の取込み、もしくは細胞内から細胞外への薬物の排出を司ることで、生体内で体外異物である医薬品の効率よい解毒に薬物代謝酵素と共に寄与しているが、CYP と同様に併用薬との相互作用によりその機能が大きく変動する。そのため、これら分子の挙動は、薬物の体内動態を大きく変化させ、安全で効果的な薬物治療を行うことを難しくしている。従って、CYP 活性や薬物トランスポーターの活性を可能な限り正確に評価することは、最適な薬物治療を行う上で必須である。このため、効率的で網羅的な評価法を確立する研究が続けられており、2014年 Bosilkovska らは、「カクテル試験」を用いて微量の血液から複数の CYP とトランスポーター活性を一度に評価できる試験法を開発し、迅速かつ簡便な相互作用の試験法として応用が期待されている⁴⁾。

上記のように、CYP やトランスポーターの活性には種々の個人差が報告されており、特に、薬物代謝において中心的な役割を担っている肝臓への障害を及ぼす疾患では、薬物の体内動態に大きく影響することが明らかになっている。これまでに、慢性肝炎や肝硬変患者のみならず糖尿病態時の肝臓での顕著な CYP の発現低下が報告されている⁵⁻⁷⁾。一方、薬物トランスポーターの P-糖タンパク質 (P-gp) は、腸管、血液脳関門、腎尿細管など体内の様々な臓器に発現し、生体異物を体外へ排出する役割を担っている。ヒトで *MDR1* 遺伝子にコードされている P-gp は、げっ歯類では *Mdr1a* と *Mdr1b* の 2 種類の遺伝子にコードされている⁸⁻¹⁰⁾。これら遺伝子の発現は、酸化ストレスによって誘導されることが明らかとなっているもの¹¹⁾、病態ごとの発現状態に関する報告はほとんどない。

本論文では、薬物相互作用に大きく影響する腸管粘膜細胞での P-gp の発現状態とその活性を糖尿病態時に把握し、薬物間はもとより食品と薬物との相互作用の評価に資する情報を提供

することを目的とした。

1. 実験材料および方法

1.1. 実験動物

すべての動物実験は、環境省の「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」および「城西大学動物実験規定」に従って行った。Sprague-Dawley 系雄性ラット (4 週齢, 日本エスエルシー (株), 浜松) を温度 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 10\%$ 、照度サイクル 12 時間 (明期 7:00 ~ 19:00) の環境下、固形飼料 (CE-2, 日本クレア (株), 東京) および水を自由摂取させ馴化させた。1 週間の予備飼育後、50 mM クエン酸緩衝液 (pH 4.5) に用時溶解したストレプトゾトシン (STZ, 和光純薬工業 (株), 大阪) を腹腔内投与 (60 mg/kg) し、1 週間後の血糖値が 300 mg/dL 以上を示した個体をさらに 4 週間飼育し、1 型糖尿病モデルラット (STZ) 群として実験に用いた。また、同様にクエン酸緩衝液のみを投与し、同様に飼育したものを正常血糖ラット (Normal) 群とした。加えて、STZ 投与 4 週後、1 週間インスリン (Humulin U-100 HPN, 日本イーライリリー (株), 神戸) 投与 (1 IU at 10:00 and 2 IU at 19:00) したラットを血糖コントロールラット (STZ+Insulin) 群とした。これら各群のラットを、ジエチルエーテル麻酔下で開腹し、腸管を摘出し直ちに生理食塩水で洗浄した。胃幽门部から直腸上部までの長さを測定し、次のように十二指腸、空腸、回腸、結腸の 4 部位に分割した。十二指腸は胃幽门部から 10 cm、空腸は十二指腸下部 10 cm を除いた部分から 10 cm、回腸は盲腸上部 10 cm、結腸は盲腸下部 10 cm とし、これらをサンプルとした。

1.2. 生体内酸化ストレス度および抗酸化力の測定

酸化ストレス度は、d-ROMs (Reactive Oxygen Metabolites) テストキット (Diacron International, Grosseto, Italy) を用いて血中ヒドロペルオキシド濃度を指標として測定した。解剖時直前に尾静脈より得られた血漿 10 μL をキット付属の

酢酸緩衝液に加えて混和し、呈色クロモゲン (*N,N*-ジメチルパラフェニレンジアミン) 20 μL を加え、活性酸素・フリーラジカル解析装置 (F.R.E.E.: Free Radical Elective Evaluator, (株) エムエルエス, 東京) を用いて測定した。抗酸化力評価は、BAP (Biological Anti-oxidant Potential) テストキット (Diacron International, Grosseto, Italy) により、三価鉄イオン試薬と呈色液 50 μL を混和し、血漿を 10 μL 加えて二価鉄に還元される過程を F.R.E.E. により測定した。

1.3. Total RNA の調製および Real Time RT-PCR

ラット腸管各部位からスライドグラスを用いて粘膜層を採取し、RNeasy Plus Micro Kit (Qiagen, Valencia, CA) により Total RNA を調製した。cDNA への逆転写反応は、Prime Script RT reagent Kit (タカラバイオ (株), 大津) を用いた。500 ng の Total RNA を鋳型として、Random 6mers、Oligo dT Primer、RT Enzyme、dNTP mixture 存在下、 37°C で 15 分間、 85°C で 5 秒間反応させ cDNA を合成した。mRNA 発現量の定量には、SYBR premix Ex Taq (タカラバイオ (株)) を用いた。10 ng の cDNA サンプルにプライマー (それぞれ 0.2 μM) および Real Time PCR 反応液 (SYBR premix Ex Taq) を加えて、iCycler thermal cycler (Bio-Rad, Hercules, USA) により Real Time PCR を行った。反応は、 95°C 、10 秒の後、 95°C で 5 秒、 60°C で 30 秒、 72°C で 15 秒を 50 サイクル行い、蛍光量の増加を経時的に検出した。また、同様の条件下で β -actin を内部標準として用いた。Catalase、SOD、Glutathione peroxidase (GPx) 遺伝子の発現解析に用いたプライマーの塩基配列を表 1 に示した。

1.4. 腸管粘膜からの細胞抽出液の調製

刷子縁膜ベシクルの調製は、Boyer らの方法¹²⁾ に準じて行った。腸管各部位からスライドグラスを用いて粘膜を採取し、5 mL の冷 50 mM マンニトール、プロテアーゼ阻害剤ミッ

表1 プライマー配列

Gene	Sence primer	Antisence primer
<i>Catalase</i>	TCTGGACCAGTACAACCTCCCAGAAG	GGAGACTCCATCCAGCGATGA
<i>SOD</i>	AATGTGTCCATTGAAGATCGTGTGA	GCTTCCAGCATTTCAGTCTTTGTA
<i>GPx</i>	CCGGGACTACACCGAAATGAA	CACCGGGTTCGGACATACTTG
<i>β-actin</i>	TGACAGGATGCAGAAGGAGA	TAGAGCCACCAATCCACACA

All sequences are shown in 5' to 3' direction.

クス {1%, v/v; 和光純薬工業 (株)} を含む 2mM HEPES-KOH 緩衝液 (pH7.1) で懸濁した後、ポリトロンホモジナイザーを用いて 30 秒間氷中でホモジナイズした。このホモジネートを 2,500×g、4℃、15 分間遠心し、得られた上清を 20,500×g、4℃、20 分間遠心して沈殿を得た。沈殿に 4mL の MgCl₂ 含有再懸濁緩衝液 {300mM マンニトール, 20mM HEPES (pH7.1), 0.1mM MgSO₄·7H₂O, 10mM MgCl₂, プロテアーゼ阻害剤ミックス (1%, v/v)} を加え、ホモジナイザーにて懸濁した。氷中で 20 分静置後、3,000×g、4℃、10 分間遠心し、得られた上清をさらに 27,000×g、4℃、30 分間遠心した。得られた沈殿を刷子縁膜ベシクルとした。この刷子縁膜ベシクルを再度 20 μL の MgCl₂ 含有再懸濁緩衝液で懸濁し、使用するまで -80℃ で保存した。

1.5. 電気泳動とウエスタンブロット

腸管粘膜タンパク質 (50 μg) を用いて、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動を行った。泳動後、常法に従ってタンパク質を転写した PVDF 膜を 5% スキムミルクで約 1 時間処理し、一次抗体として抗 MDR 抗体 (1:100; H-241, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)、抗 β-actin 抗体 (1:5000; AC74, Sigma, St. Louis, MO) を、室温で 1 時間反応させた。二次抗体として抗 HRP conjugated donkey anti-rabbit IgG 抗体 (1:2000; NA934V, GE Healthcare, Buckinghamshire, England) あるいは抗 HRP conjugated donkey anti-mouse IgG 抗体 (1:2000; NA931V, GE

Healthcare) を 1 時間作用させた。その後、ECL Plus ウエスタンブロット検出システム (GE Healthcare) を用いて解析した。また、バンドの強度は Image Gauge (Fuji film, 東京) を使用し定量化した。

1.6. 腸管反転法

腸管反転法に用いる空腸は、胃幽門部の 15cm 下部から 10cm を使用した。腸管採取後、直ちに 95% O₂/5% CO₂ ガスで飽和した生理食塩水中でガラス棒を用いて腸管を反転し、約 10cm の絹製縫合糸 (4-0: (株) 夏目製作所, 東京) を用いて一方の先端を結紮し、95% O₂/5% CO₂ ガスで飽和した Krebs-Henseleit 重炭酸緩衝液 {119mM NaCl, 2.5mM CaCl₂, 1.2mM KH₂PO₄, 4.7mM KCl, 1.2mM MgSO₄, 25mM NaHCO₃ (pH7.4)} で調製した 150 μM Rhodamine 123 (和光純薬工業 (株)) 0.8mL を腸管サック内に投与した。もう一方の先端を結紮した後、10mL の Krebs-Henseleit 重炭酸緩衝液 (37℃) 中で保温し、15 分毎に外液 200 μL を 120 分まで採取した。採取した外液は、マイクロプレートリーダー (Wallac 1420, Perkin-Elmer, Waltham, MA) を用いて励起波長 485nm、測定波長 535nm で測定した¹³⁾。

1.7. 統計処理

データは、全て平均値 ± 標準偏差として表示した。群間の統計学的有意差は、一元配置分散分析 (ANOVA) 後、Tukey's もしくは Dunn's 多重比較検定により検定した。

2. 結果

2.1. 生体パラメーター

STZ 群および STZ+Insulin 群の体重、血糖値および腸管長を測定した (表 2)。STZ 群では、Normal 群と比較して有意な体重減少および血糖値の上昇が認められた。STZ+Insulin 群では、Normal 群と比べ体重は減少したが、血糖値は STZ 群と比べ有意に低下し、Normal 群とほぼ同程度の値を示した。また、腸管長は STZ 群では Normal 群と比較して有意に伸長していた。これに対し、STZ+Insulin 群では STZ 群よりも有意に短縮しており、Normal 群と差は認められなかった。

2.2. 生体内酸化ストレス度および抗酸化力

血糖値の上昇は体内酸化ストレス度を上昇させることから、尾静脈血を用いて d-ROMs テストキットにより測定した (表 3)。酸化ストレス度は、Normal 群と比較して STZ 群で約 2 倍に上昇した。一方、STZ+Insulin 群では STZ 群の約 60% にまで低下し、ほぼ Normal 群と同程度であった。体内の抗酸化力は、STZ 群では

Normal 群と比較して有意に低下した。これに対して、STZ+Insulin 群では STZ 群と比べ有意に上昇した。

2.3. 腸管各部位の抗酸化酵素遺伝子の発現

ラット腸管の抗酸化酵素 Catalase、SOD、GPx の mRNA 発現を Real Time RT-PCR により検討した (図 1)。Catalase mRNA の発現量は、Normal 群と比較して STZ 群の十二指腸、空腸で有意に増加していたが、STZ+Insulin 群で低下傾向を示した。SOD では、十二指腸において Normal 群と比較して STZ 群で約 2.5 倍有意に増加したが、STZ+Insulin 群では低下した。しかし、GPx の mRNA 発現量には、3 群間に差は認められなかった。

2.4. 腸管各部位の P-gp 発現

ラット腸管に発現する P-gp をウエスタンブロットにより解析した (図 2)。STZ 群の十二指腸、空腸、回腸では、Normal 群と比較して P-gp の発現量が約 2 倍有意に増加した。一方、STZ+Insulin 群では、Normal 群とほぼ同程度

表2 STZ 誘発糖尿病ラットの体重・血糖値および腸管長

Group	Body weight (g)	Blood glucose (mg/dL)	Intestine length (cm)
Normal	414 ± 26	162 ± 24	117 ± 10
STZ	298 ± 33 ^a	446 ± 33 ^a	131 ± 13 ^a
STZ + Insulin	287 ± 36 ^a	121 ± 22 ^b	118 ± 10 ^c

Data represent mean ± S.D., (n = 5-6). ^a p < 0.01 compared with Normal. ^b p < 0.01 compared with STZ. ^c p < 0.05 compared with STZ.

表3 ラット体内の酸化ストレス度および抗酸化力

Group	d-ROMs (U.CARR)	BAP (mmol/L)
Normal	131 ± 7	1875 ± 156
STZ	253 ± 33 ^a	1476 ± 67 ^a
STZ + Insulin	156 ± 25 ^b	1966 ± 462 ^b

Data represent mean ± S.D., (n = 5-8). ^a p < 0.01 compared with Normal. ^b p < 0.01 compared with STZ. 1 U.CARR = 0.08 mg H₂O₂/100 mL.

まで発現量が低下した。

2.5. 腸管反転法による Rhodamine 123 排泄

腸管の P-gp 発現変化に伴う薬物の排泄機能を評価するために、P-gp の基質である Rhodamine 123 を用いて空腸での漿膜側から粘膜側への排泄量を、腸管反転法を用いて検討した (図 3)。STZ 群の Rhodamine 123 排泄は、Normal 群と比較して増加する傾向が認められ、特に 60 分、90 分において有意な差を示した。一方、STZ+

Insulin 群では Normal 群とほぼ同様に推移し、STZ 群と比較して有意に排泄量が減少した。

3. 考察

糖尿病の発症とその悪化には、酸化ストレスが密接に関与すると考えられており、糖尿病態に起因する酸化ストレスが、腸管、腎臓や血管内皮細胞などに障害を与え合併症を引き起こすことが明らかとなっている¹⁴⁾。また、酸化ストレスの上昇は、様々な酵素や受容体などの機能

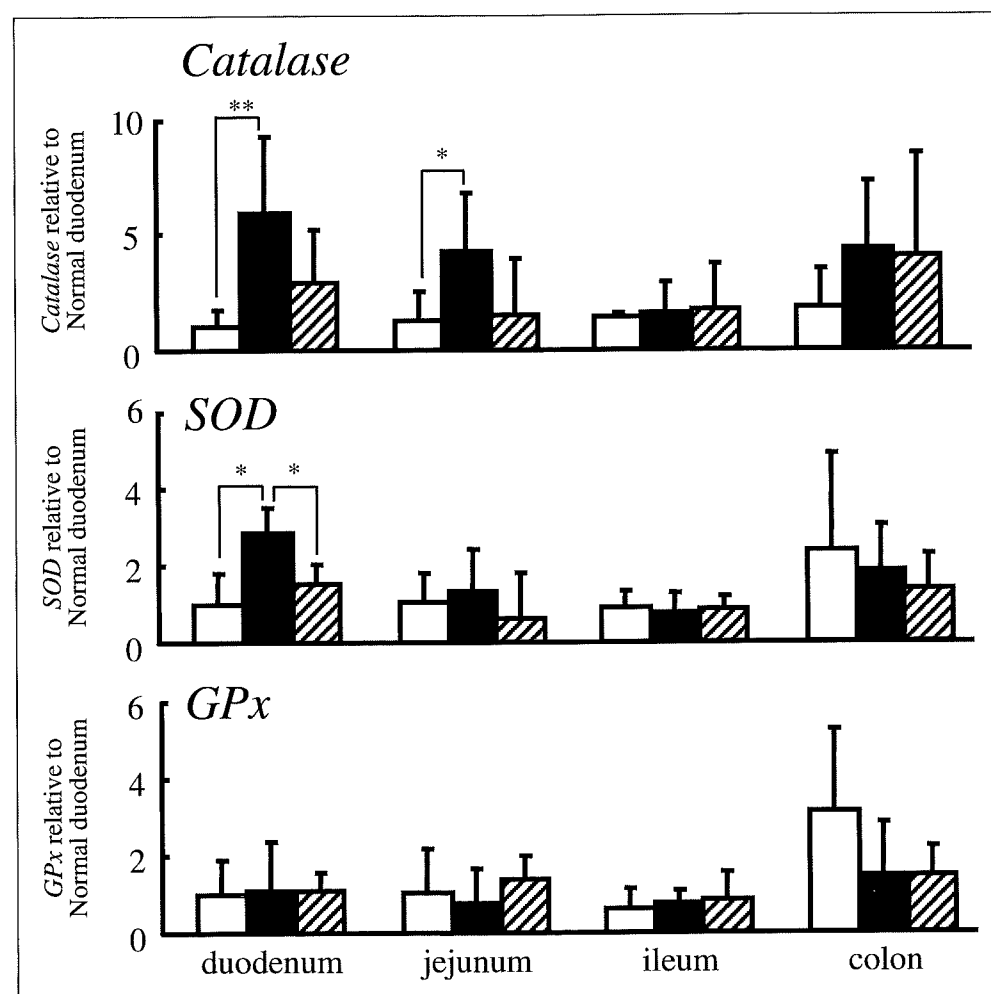


図1 ラット腸管の抗酸化酵素遺伝子の発現解析
十二指腸 (duodenum)、空腸 (jejunum)、回腸 (ileum)、結腸 (colon) における Catalase、SOD、GPx の mRNA の発現量を Real Time RT-PCR により解析した。Normal 群 (□)、STZ 群 (■)、STZ+Insulin 群 (▨) (n=3-6, 各値は平均値 ± 標準偏差 (SD), * p <0.05, ** p <0.01 を示す。)

性タンパク質の発現に影響を与え、中でも P-gp の発現誘導の一因となっていることが報告されている¹¹⁾。

本研究では、STZ 誘発 1 型糖尿病モデルラットを用いて、腸管各部位の P-gp 発現とその機能を正常ラットと比較検討した。糖尿病態時は、腸管長の伸長、粘膜絨毛の伸長、胚細胞の増殖など消化管の形態学的な変化が生じるとの報告がある¹⁵⁻¹⁸⁾。本研究においても、STZ 群において腸管長の伸長が認められたものの、1 週間インスリンを投与した STZ+Insulin 群では、血糖値の改善に伴って腸管長は Normal 群と同程度にまで改善されることが明らかになった (表 2)。

続いて、各ラットの酸化ストレス度および抗

酸化力を比較・検討した (表 3)。これまでに、STZ 誘発糖尿病ラットでは腎臓、腸管の酸化ストレスの上昇が報告されており¹⁸⁻¹⁹⁾、本研究においても STZ 群の酸化ストレス度の上昇が認められた。これに対して、抗酸化力は Normal 群に比べて有意に低下していた。一方、血糖管理を施した STZ+Insulin 群では、酸化ストレス度および抗酸化力は STZ 群に比べ有意に改善され、Normal 群とほぼ同程度であった。

生体は、生成した酸化ストレスを消去する多くの防御機構を有しており、Catalase、SOD、GPx などの抗酸化酵素もその一翼を担っている。そこで、腸管での酸化ストレス状態と体内ストレス度との相関について検討するために、

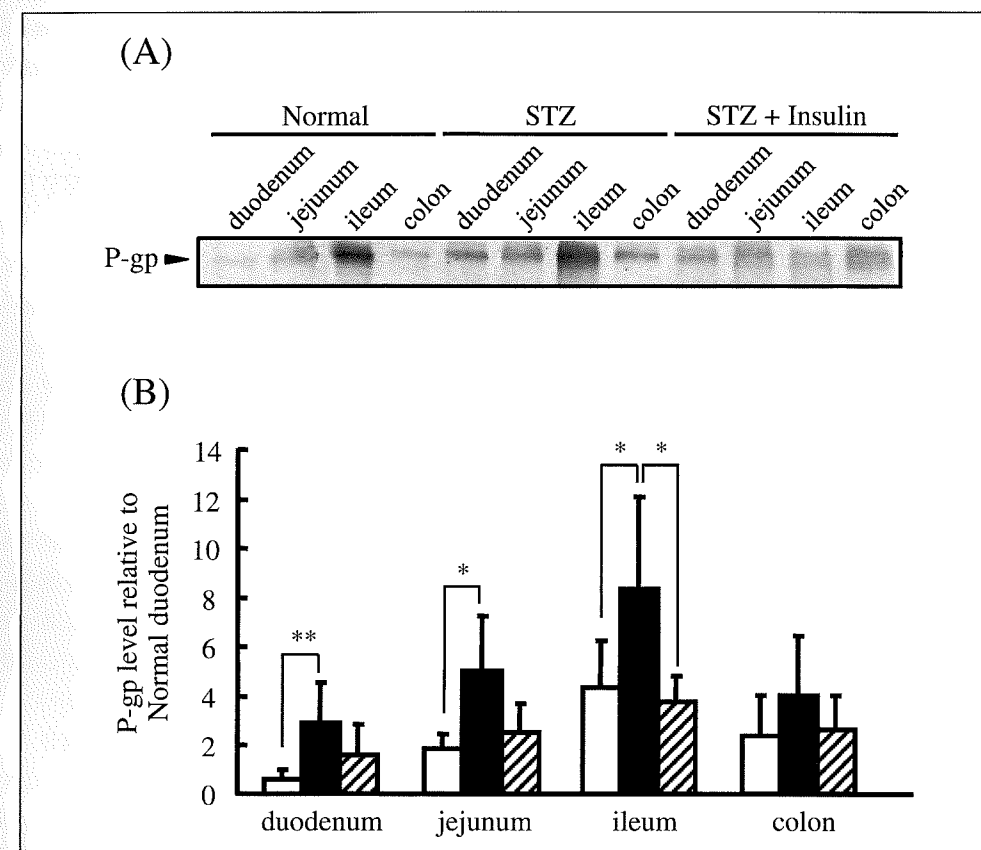


図2 P-gp の発現解析
(A) 十二指腸 (duodenum)、空腸 (jejunum)、回腸 (ileum)、結腸 (colon) における P-gp の発現量をウエスタンブロットにより解析した。(B) Normal 群 (□)、STZ 群 (■)、STZ+Insulin 群 (▨) (n=3, 各値は平均値 ± 標準偏差 (SD), * p <0.05, ** p <0.01 を示す。)

腸管各部位での抗酸化酵素の mRNA の発現量を測定した (図 1)。STZ 群の十二指腸では、Catalase と SOD の発現量が増加していることが明らかとなった。また、STZ 群の空腸において Catalase の発現量が Normal 群に比べて有意に増加していた。これに対して、STZ+Insulin 群では、十二指腸において SOD の発現が有意に低下した。

STZ 誘発性糖尿病モデルラットでは、スーパーオキシドアニオンラジカルによる酸化ストレスの上昇と、それに伴う SOD 発現の上昇が明らかとなっている¹⁰⁾。本実験においても、STZ 群では酸化ストレス度が上昇し、十二指腸の SOD に加えて Catalase 遺伝子の発現が増加していた。これに対して、STZ+Insulin 群では、これらの値がすべて低下していた。すなわち、インスリンによる血糖管理は、体内酸化ストレス度を顕著に軽減させ、腸管において抗酸化酵

素の発現を低下させるものと考えられる。

P-gp は、腸管、血液脳関門、腎尿細管など体内の様々な臓器に発現する薬物排泄トランスポーターとして、生体異物を体外へ排出する役割を担っている。ヒトでは単一の *MDR1* 遺伝子にコードされているが、げっ歯類では *Mdr1a* と *Mdr1b* の 2 種類の遺伝子にコードされている⁸⁻¹⁰⁾。さらに、両遺伝子の発現は酸化ストレスによって誘導されることが明らかとなっている¹¹⁾。本研究では、ラット腸管各部位の P-gp 量を比較した (図 2)。P-gp は、特に空腸と回腸において Normal 群と比べて STZ 群で増加した。また、STZ+Insulin 群では STZ 群と比べて回腸において有意に低下していた。すなわち、P-gp の発現は STZ 群では空腸および回腸において増加し、インスリンによる血糖値の低下に伴って減少した。以上の結果は、高血糖状態の STZ ラットへのインスリン投与は、血糖値の低

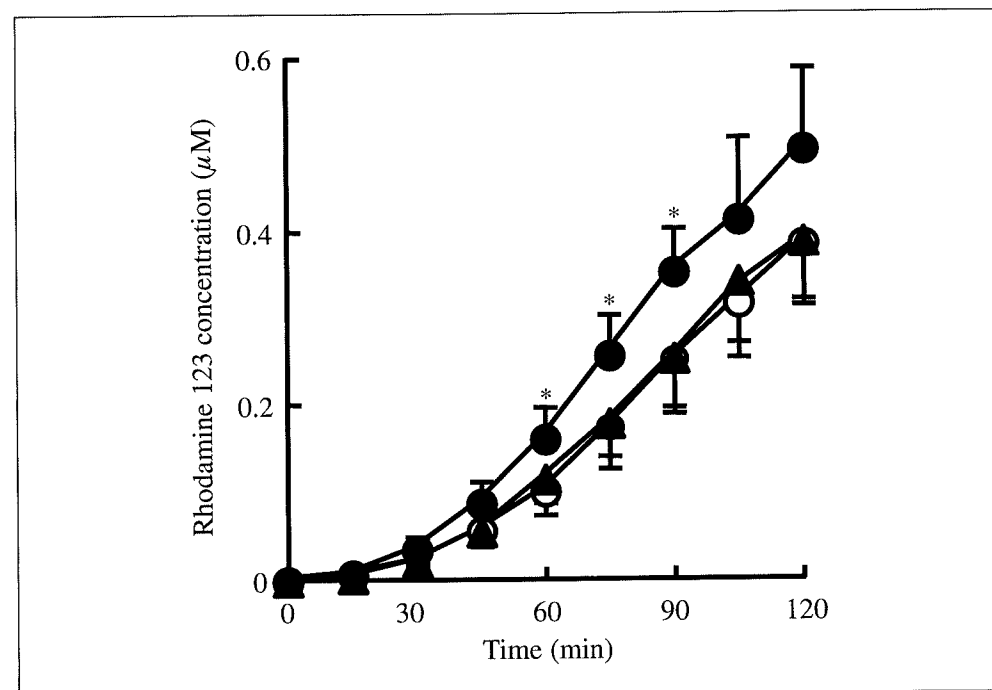


図 3 空腸での Rhodamine 123 排泄量

空腸において漿膜側から粘膜側への Rhodamine 123 の排泄量を腸管反転法により経時的に測定した。Normal 群 (○)、STZ 群 (●)、STZ + Insulin 群 (▲) (n=3-6, 各値は平均値 ± 標準偏差 (SD), * $p < 0.05$ を示す)。

下に伴う体内酸化ストレス度および抗酸化力を改善させ、腸管の P-gp 発現を抑制することを示唆している。

腸管の P-gp は、粘膜絨毛の先端に発現し、腸管間腔内において生体異物を体外へと排泄するバリアーとして働く²⁰⁾。また、P-gp は異物の細胞内への侵入を阻害するだけでなく、細胞内に取り込まれた生体異物に対して、腸管間腔側へと排泄する。腸管反転法は、腸管のみを使用するため、肝代謝、腎排泄、血流速度などの影響を受けることなく薬物の腸管粘膜の移行を解析することが可能であり、この際 Rhodamine 123 が P-gp の基質として広く用いられる。本研究では、STZ 群において P-gp の発現量が有意に増加している空腸を用いて透過実験を行ったところ、Normal 群に比べて STZ 群で Rhodamine 123 の粘膜側への排泄量が増加したのに対して、STZ+Insulin 群では STZ 群よりも排泄量は低下した。この結果は、P-gp の発現量と Rhodamine 123 の排泄活性が正に相関することを示している (図 3)。

以上、1 型糖尿病モデルの STZ ラットでは、薬物の腸管吸収が正常ラットとは異なり、薬物の排泄が著しく亢進することが明らかになった。従って、このような状況下で P-gp の基質となりうる薬剤が経口投与された場合、その効果が著しく低下する可能性がある。逆に言えば、血糖管理が施された状況ではこのような弊害は回避されると予想され、臨床的に糖尿病態時の血糖管理が徹底された状況下では、薬物治療が良い成績を示す事実を物語っている。このことから、仮に P-gp の発現上昇が、血糖値の上昇に伴って生じる体内の酸化ストレス上昇と連動しているとするならば、血糖管理とは別に酸化ストレスを軽減できる抗酸化食品の摂取が薬物治療の成績を向上させるものと考えられる。食品に含まれる機能性成分と薬物との直接的な相互作用ではなく、病態毎に変動の可能性があり薬物動態に影響を与えるパラメーターを食品などの摂取により制御できれば、間接的に薬物の効果に影響を与える相互作用事象と考えることが

できる。

Bosilkovska らによる「カクテル試験」法は、低侵襲で網羅的な CYP と P-gp 活性を評価する系としてその応用が期待されている。その一方で、安全性が担保された食品中の機能性関与成分によって CYP や P-gp の発現が制御できれば、微量な血液で薬物代謝酵素活性等を測定しながら、これらの活性に応じて適切な薬物投与設計を構築することが可能となる。今後のテーラーメイド医療に機能性食品が活用されていくことを期待したい。

参考文献

- 1) 内閣府ホームページ：消費者の「健康食品」の利用に関する実態調査 http://www.cao.go.jp/consumer/iinkaikouhyou/2012/houkoku/201205_report.html
- 2) 厚生労働省ホームページ：医薬品開発と適正な情報提供のための薬物相互作用ガイドライン <http://www.nihs.go.jp/mhlw/>
- 3) Michalets EL : Update : clinically significant cytochrome P-450 drug interactions. *Pharmacotherapy* 1998 ; 18 : 84-112.
- 4) Bosilkovska M, Samer CF, Déglon J, et al.: Geneva cocktail for cytochrome P450 and P-glycoprotein activity assessment using dried blood spots. *Clin Pharmacol Ther* 2014 ; 96 : 349-59.
- 5) Shimojo N: Cytochrome P450 changes in rats with streptozocin-induced diabetes. *Int J Biochem* 1994 ; 26 (10-11) : 1261-1268.
- 6) van Waarde WM, Verkade HJ, Wolters H, et al.: Differential effects of streptozotocin-induced diabetes on expression of hepatic ABC-transporters in rats. *Gastroenterology* 2002 ; 122 (7) : 1842-1852.
- 7) 加藤隆一：臨床薬物動態学改訂第 3 版。東京、南江堂、2003 : 263-306.
- 8) Borst P, Evers R, Koel M, et al.: A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J Natl Cancer Inst* 2000 ; 92 (16) : 1295-1302.
- 9) Gottesman MM, Pastan I: Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu Rev Biochem* 1993 ; 62 : 385-427.

- 10) Schinkel AH, Mayer U, Wagenaar E, et al.: Normal viability and altered pharmacokinetics in mice lacking *mdr1*-type (drug-transporting) P-glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997 ; 94 (8) : 4028-4033.
- 11) Hong H, Lu Y, Ji ZN, et al.: Up-regulation of P-glycoprotein expression by glutathione depletion-induced oxidative stress in rat brain microvessel endothelial cells. *J Neurochem* 2006 ; 98 (5) : 1465-1473.
- 12) Boyer S, Sharp PA, Debnam ES, et al.: Streptozotocin diabetes and the expression of GLUT1 at the brush border and basolateral membranes of intestinal enterocytes. *FEBS Lett* 1996 ; 396 (2-3) : 218-222.
- 13) Veau C, Leroy C, Banide H, et al.: Effect of chronic renal failure on the expression and function of rat intestinal P-glycoprotein in drug excretion. *Nephrol Dial Transplant* 2001 ; 16 (8) : 1607-1614.
- 14) Kobayashi T: Possible involvement of insulin and oxidative stress in vascular dysfunction of diabetic mellitus. *Yakugaku Zasshi* 2008 ; 128 (7) : 1013-1021.
- 15) Adachi T, Mori C, Sakurai K, et al.: Morphological changes and increased sucrase and isomaltase activity in small intestines of insulin-deficient and type 2 diabetic rats. *Endocr J* 2003 ; 50 (3) : 271-279.
- 16) McMinn LH, Hodges GM, Carr KE: Gastrointestinal uptake and translocation of microparticles in the streptozotocin-diabetic rat. *J Anat* 1996 ; 189 (Pt 3) : 553-559.
- 17) Neu J, Reverte CM, Mackey AD, et al.: Changes in intestinal morphology and permeability in the bio-breeding rat before the onset of type 1 diabetes. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2005 ; 40 (5) : 589-595.
- 18) Shirpoor A, Ansari MH, Salami S, et al.: Effect of vitamin E on oxidative stress status in small intestine of diabetic rat. *World J Gastroenterol* 2007 ; 13 (32) : 4340-4344.
- 19) Bhor VM, Raghuram N, Sivakami S: Oxidative damage and altered antioxidant enzyme activities in the small intestine of streptozotocin-induced diabetic rats. *Int J Biochem Cell Biol* 2004 ; 36 (1) : 89-97.
- 20) Zhang Y, Benet LZ: The gut as a barrier to drug absorption: combined role of cytochrome P450 3A and P-glycoprotein. *Clin Pharmacokinet* 2001 ; 40 (3) : 159-168.

ABSTRACT

OBJECTIVE: P-glycoprotein (P-gp), a drug efflux transporter, has a significant effect on drug interactions. We examined the association between its expression and the drug delivery ability of the intestinal tract of diabetes, and intended to provide information that contributes to the evaluation of the interactions.

METHODS: Diabetic rats were administered streptozotocin (STZ) intraperitoneally, and maintained for 5 weeks. In addition, glycemic control rats were administered insulin 1 week before the end of the administration to diabetic rats. Oxidative stresses of rats were evaluated. The P-gp expression level was analyzed in the intestinal tract of these rats. Additionally, the excretion of Rhodamine 123 in the jejunum was measured by the everted sac method.

RESULTS AND DISCUSSION: In the diabetic rats, P-gp expression in the intestinal tract is increased as compared to the control rats, furthermore, drug excretion also increased. On the other hand, in the glycemic control rats, P-gp expression is reduced in comparison with the diabetic rats, and drug excretion showed the same extent as the control rats. These results indicate that the expression variation of a drug excretion transporter by pathology significantly affects drug efficacy.

Keywords : Functional food, drug, interaction, drug-metabolizing enzyme, P-glycoprotein

キーワード : 機能性食品、医薬品、相互作用、薬物代謝酵素、P-糖タンパク質