

はじめに

人參養栄湯(NYT)は病後の体力低下、疲労倦怠、食欲不振、ねあせ、手足の冷え、貧血に対して処方されている。近年の臨床研究では、フレイル患者の食欲不振および握力低下の改善や抗がん剤処方患者の疲労改善、術後の全身状態改善が認められている¹⁻⁵⁾。このように病気の治療や老化に伴う様々な症状に対する有効性から、NYTは西洋薬など他の治療薬と併用して処方される場合が多い。しかし、本剤を含め漢方薬の薬物相互作用に関する情報は乏しく、併用時の安全性および有効性に関わる情報が必要とされる。

薬物相互作用の中でも、薬物動態学的メカニズムによる有害事象や薬効低下は特に予測が困難である。経口投与された薬剤はおもに消化管で吸収され、肝臓に運ばれ初回通過効果を受けたのち全身循環系に入る。この過程では種々のトランスポーターや代謝酵素が複雑に関与し薬剤のクリアランスに影響を与える。特に薬物相互作用において最も重要と考えられている酵素の一つがシトクロムP450(CYP)である。CYPは薬物代謝反応の約80%に関与しているとされ、中でもCYP3Aは臨床で使用されている医薬品代謝の約50%以上に関与している⁶⁾。そこでわれわれはin vitroおよびin vivoにてCYP3Aに対する人參養栄湯の影響を検討した。NYTを構成する単味生薬に関する先行研究では、in vitroでは五味子、桂皮、甘草および茯苓はCYP3A4阻害作用、五味子(Gomisin A)および甘草(glycyrrhetic acid, glycyrrhizic acid)はCYP3A4誘導作用を持つことが報告されている⁷⁻¹⁰⁾。しかしながら、漢方薬は生体内で種々の代謝物へ変換されることを考慮すると、in vitro試験のみでは生体内の薬物動態を模倣できないと考え、in vivo試験としてNYTをマウスに経口投与し肝臓CYP3Aを介した薬物相互作用の検討を実施した。ヒト肝ミクロソームを用いたin vitro阻害試験の結果、NYTは濃度依存的にCYP3A可逆的阻害作用を示したが、陽性対照のグレープフルーツジュース(GFJ)と比較して弱いことが示唆された(約10.0倍量のNYT摂取でGFJと同等の阻害作用)。さらに、ヒト凍結肝細胞を用いたin vitro誘導試験の結果、CYP3A4遺伝子発現量はNYT添加によって増加したことから、CYP3A4誘導作用があると考えられた。ただし、陽性対照rifampicinに対する遺伝子発現率は7.72%(NYT添加濃度0.1 mg/mL)と低く、既知の

CYP3A4誘導薬と比較した場合の誘導作用は弱いと考えられた。in vivo試験の結果、既知のCYP3A4阻害薬であるketoconazoleを投与したマウスではCYP3Aの基質として代謝を受ける血中triazolam(TRZ)濃度の顕著な増加がみられた。一方、NYTを経口投与したマウスでは単回および15日間反復投与のいずれにおいても無処理マウスに対して有意な血中TRZ濃度の変化は認められなかった(図1)。これより、NYTは細胞レベルでヒト肝臓CYP3Aに対する阻害および誘導の双方向の作用を有するが、マウス生体レベルでは肝臓CYP3Aを介した薬物代謝に影響を与えないことが明らかとなった。NYTがin vivoで様々な代謝産物に変換されることを考慮し、これは種差だけではなくin vivoとin vitroの違いに関連するものと考えられた¹¹⁾。

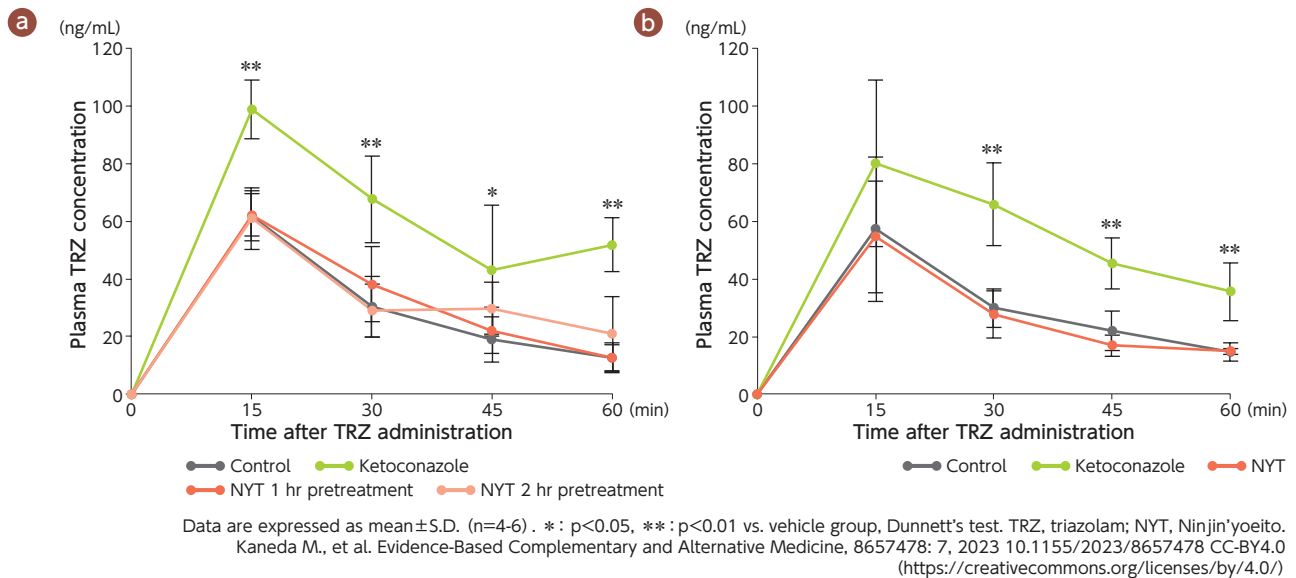
本検討では、CYP3Aに対する人參養栄湯投与の影響についてさらに評価を行うため、マウスの肝臓組織を用いて人參養栄湯によるCYP3Aタンパク発現への影響の有無を確認したため報告する。

試験方法

5週齢のddY雄性マウスを日本SLCより購入し、1週間予備飼育後に本試験に使用した。動物は温度 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 10\%$ 、8:00点灯、20:00消灯の12時間毎サイクルで飼育した。実験期間中動物は自由に摂水、摂餌させた。人參養栄湯エキス(Lot. 18011216)はクラシエ製薬(株)にて製造した。コントロール群には蒸留水を、NYT群にはNYT 1700 mg/kg/dayを15日間経口投与し、最終投与の24時間後に剖検を行い、臓器を凍結保存した。

剪刀を用いて凍結肝臓組織を細断したのち、RIPA buffer(富士フィルム和光、182-02451、1%Protease inhibitor、1%Phosphatase inhibitor、1mM EDTA添加)を加え、ハンディマイクロホモジナイザーを用いて氷上にて破碎を行った。Tissue Lyser LT(QIAGEN)を用いてさらに粉碎し、遠心分離後回収した上清をタンパク抽出液として 95°C で5分間加熱した。4~20%ポリアクリルアミドゲルmini-PROTEAN™ TGXTMを用いてタンパク濃度10 ngのライセートを泳動した。PVDFメンブレン(ポアサイズ $0.45 \mu\text{m}$)に転写終了後、0.1% tween 20含有TBS溶液(TBST)で洗浄した。5% BSA in TBSTで室温1hrのブロッキングを行ったのち、再びTBSTで洗浄し、 4°C で

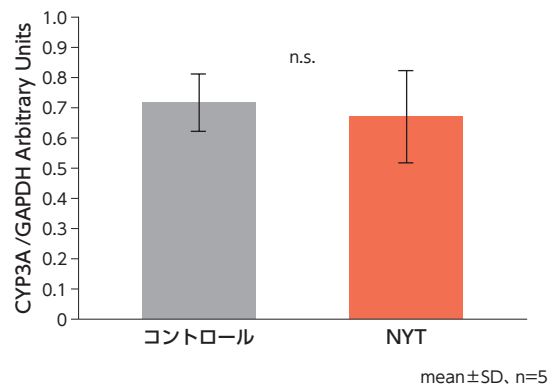
図1 TRZの血漿濃度プロファイルに対するNYTの単回投与 a、15日間反復投与 b の影響



一晚の一次抗体(Anti-Cytochrome P450 3A4/CYP3A4 antibody; abcam ab3572)処理を行った。一晚反応後、TBSTで洗浄し、室温で1hrの二次抗体(HRP-Goat Anti-Rabbit IgG (H+L); invitrogen 656120)処理を行った。TBSTで洗浄したのちECL Prime (GE Healthcare, RPN2232)を用い、Amersham Imager 680(富士フィルム)にてCYP3Aタンパク質を検出し定量した。CYP3Aタンパク質発現量はGAPDHによって補正した。

なお、値はMean±SDで示した。有意差検定はStudent's T-testを用いて行い、危険率が5%未満(p<0.05)の場合を有意差ありと判断した。

図2 CYP3Aタンパク発現量 (GAPDH補正值)



の結果も同様に、NYTの反復投与はマウス肝臓におけるCYP3Aタンパク質発現に変化を及ぼさず、in vivoにおいてNYTはCYP3Aを誘導しないことが示唆された。ただし、本研究結果はマウスの肝臓を用いたものでありヒトの体内動態を正確に反映するわけではなく、臨床試験の結果を確実に予測するには限界がある。NYTを含む漢方薬を安全かつ有効に使用するために、今後NYTの薬物動態学的エビデンスに関して、さらなる検討を行う必要がある。

試験結果

ウエスタンブロットの結果、肝臓CYP3Aタンパク質発現量に群間差はみられなかった(図2)。

考察とまとめ

以前の報告¹¹⁾から、NYTの単回/反復投与はマウス肝臓を介した薬物代謝に影響しないことが示唆された。本検討

【参考文献】

- 1) N. Sakisaka, K. Mitani, S. Sempuku et al.: A clinical study of ninjin'yoeito with regard to frailty, *Front Nutr* 5: 73, 2018
- 2) K. Hirai, A. Tanaka, T. Homma et al.: Improvement in frailty in a patient with severe chronic obstructive pulmonary disease after ninjin'yoeito therapy: a case report. *Front Nutr*, 5, 71, 2018
- 3) Y. Motoo, S. Cameron.: Kampo medicines for supportive care of patients with cancer: A brief review, *Integr Med Res*, 11 (2): 100839, 2022
- 4) H. Yoshikawa, T. Ikeuchi, Y. Kai.: Clinical Efficacy of Ninjin'Yoei-To for Recovery of Reduced Physical Strength of the Patients after Prostate Hypertrophy Operation. *Kampo Medicine* 49: 617-622, 1999
- 5) S. Suzuki, F. Aihara, M. Shibahara et al.: Safety and effectiveness of Ninjin'yoeito: a utilization study in elderly patients, *Front Nutr* 6: 14, 2019
- 6) 加藤隆一、鎌滝哲也: 薬物代謝学, 第2版, 東京化学同人: 13-27, 2000
- 7) L. H. Pao, O. Y. Hu, H. Y. Fan, et al.: Herb-drug interaction of 50 Chinese herbal medicines on CYP3A4 activity in vitro and in vivo. *Am J Chin Med* 40: 57-73, 2012
- 8) H. Iwata, Y. Tezuka, T. Usia et al.: Inhibition of human liver microsomal CYP3A4 and CYP2D6 by extracts from 78 herbal medicines. *J Trad Med* 21: 42-50, 2004
- 9) J.-J. Wu, G.-B. Ge, Y.-Q. He et al.: Gomisins A is a novel isoform-specific probe for the selective sensing of human cytochrome P450 3A4 in liver microsomes and living cells. *AAPS J* 18: 134-145, 2016
- 10) H. Chen, X. Zhang, Y. Feng et al.: Bioactive components of *Glycyrrhiza uralensis* mediate drug functions and properties through regulation of CYP450 enzymes. *Mol Med Rep* 10: 1355-1362, 2014
- 11) M. Kaneda, M. Oyama, T. Yoshimi et al.: Effects of Ninjin'yoeito on Human CYP3A and Mouse CYP3A Activity, *Evid Based Complement Alternat Med* 2: 8657478, 2023