

ため、柑橘類摂取に慎重になる人も多い。FCs の含有量は果肉より果皮に多いため、日向夏やキンカン等の果皮も食用となる柑橘類の FCs の影響は購入者の関心があるところである。

現在までに CYP 阻害に関与する BG 及び DHB の含有量について調査を行ったところ、グレープフルーツ、スウィーティー、ブンタンの果肉から BG 及び DHB が検出されたが、本県特産の日向夏、キンカン、へべすからは検出されなかった。本研究では更に人への影響に近い CYP 阻害活性を調べることで、薬物治療中の患者における相互作用の予測及び回避のための知見とする。

【研究計画】

CYP3A4 活性測定キットを用い、収集した柑橘試料の CYP3A4 阻害活性測定を行う。

Promega 製 CYP3A4 活性測定キット (P450-Glo™ CYP3A4 Assay and Screening System) は、CYP3A4 が基質を反応生成物に変換し、その反応生成物が検出試薬により発光する反応を利用している。FCs は CYP3A4 を阻害し反応生成物の産生量を低下させ発光量が低下する。このことを利用し試料抽出物の CYP3A4 阻害活性を測定できる。

本研究では、HPLC 分析における BG 及び DHB の抽出液を CYP3A4 阻害活性測定にも利用可能か検討する。また果皮及び果肉について CYP3A4 阻害活性を測定し、BG 及び DHB 含有量と阻害活性について確認する。

【実施内容・結果】

1. 試料

宮崎県総合農業試験場より譲受したグレープフルーツ類 (マーシュ、ダンカン、スタールビー)、レモン (リスボン、マイヤー、カリステイニ、璃の香)、タンゴール類 (せとか、みはや、津の輝)、ミカン類 (サガマンダリン)、ブラッドオレンジを使用した。果実は旬の時期に収穫したものをを用いた。果実を果皮及び果肉に分け、試料として用いた。

2. 果実中の BG 及び DHB 濃度

果皮については 40℃で 24 時間乾燥させた試料を 200 mg、果肉については細切後、均一化した試料 1 g を秤量し、メタノールを 5 mL 添加して 10 分間超音波抽出を行い、一晚静置した。その後 3,000 rpm で 5 分遠心分離を行い、上清を 0.45 µm のシリンジフィルタでろ過したものを HPLC 試験溶液とした。

HPLC 測定条件

装置 ; 島津製作所 Prominence LC-20D、カラム ; COSMOSIL Packed Column 5C18-MS-II (4.6ID × 250 mm、5 µm)、流速 ; 1.0 mL/min、カラム温度 ; 40℃、移動相 ; A : 水 B : アセトニトリル、グラジエント条件 B% : 10% (0-5 min) - 80% (40-50 min) - 95% (51-60 min) - 90% (73 min) - 10% (75 min)、注入量 ; 5 µL、検出波長 ; 310 nm

HPLC にて BG 及び DHB 濃度を測定した結果、BG 及び DHB はグレープフルーツの果皮及び果肉、レモンの果皮から検出され、それ以外の柑橘類からは検出されなかった。果皮については、グレープフルーツ果皮の DHB 濃度が高く、レモン果皮からは BG のみが検出された。果肉については、グレープフルーツのみ BG 及び DHB が検出され、スタールビー種の濃度が高かった (表)。

表 果皮及び果肉から検出された BG 及び DHB

		濃度 (µg/g)			
		果皮		果肉	
		BG	DHB	BG	DHB
グレープフルーツ	マーシュ	293	1177	8	8
	ダンカン	N. D.	79	6	2
	スタールビー	275	1377	17	19
レモン	リスボン	417	N. D.	N. D.	N. D.
	カリステイニ	319	N. D.	N. D.	N. D.

N. D. : 定量下限値未満 (N. D. < 0.5 µg/g)

3. CYP3A4 阻害活性試験

CYP3A4 活性測定キットを用いて試験を行った。なお、control inhibitor として、20 µM ケトコナゾール、陰性コントロールとして Luciferin-Free-Water を用い、試料の CYP3A4 の阻害率を次式により求めた。

$$\text{CYP3A4 阻害率(\%)} = (1 - \text{試料の発光強度} / \text{陰性コントロールの発光強度}) \times 100$$

まず、HPLC 測定用抽出液で CYP3A4 阻害活性試験が可能かどうかを検討した。HPLC の前処理では BG 及び DHB の抽出にメタノールを使用した。メタノール自体が CYP3A4 活性を阻害するため CYP3A4 阻害活性の測定には適さなかった。そこで、メタノールで抽出した試液からメタノールを除去後、水で希釈して CYP3A4 阻害活性試験を実施した。その結果、果皮の CYP3A4 阻害率は高く、特にグレープフルーツ (マーシュ、スタールビー)、レモン (リスボン、カリステイニ) 及び津の輝 (タンゴール類) で阻害率 90%以上であった (図 2)。一方、果肉の CYP3A4 阻害率は果皮に比べて低かったが、26%から 69%であった。特に、グレープフルーツのスタールビー種において CYP3A4 阻害率が高かった (図 3)。

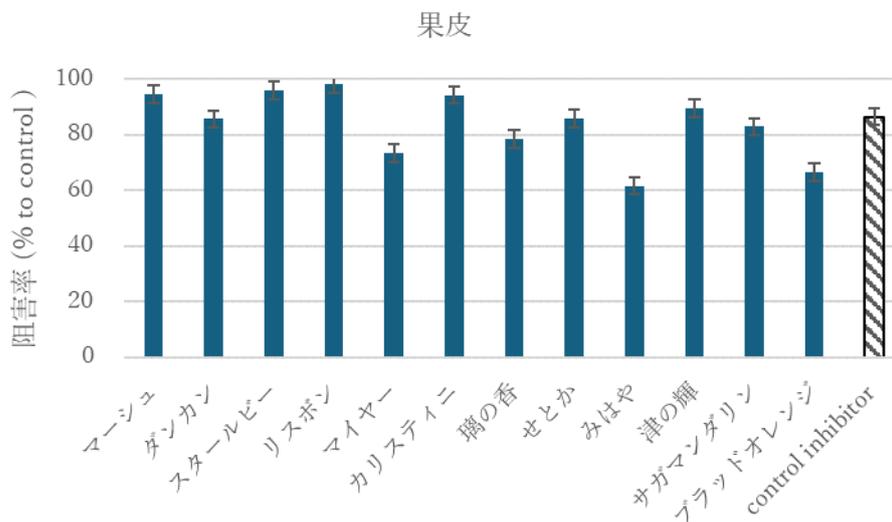


図 2 果皮の CYP3A4 阻害活性試験結果 (n = 3)

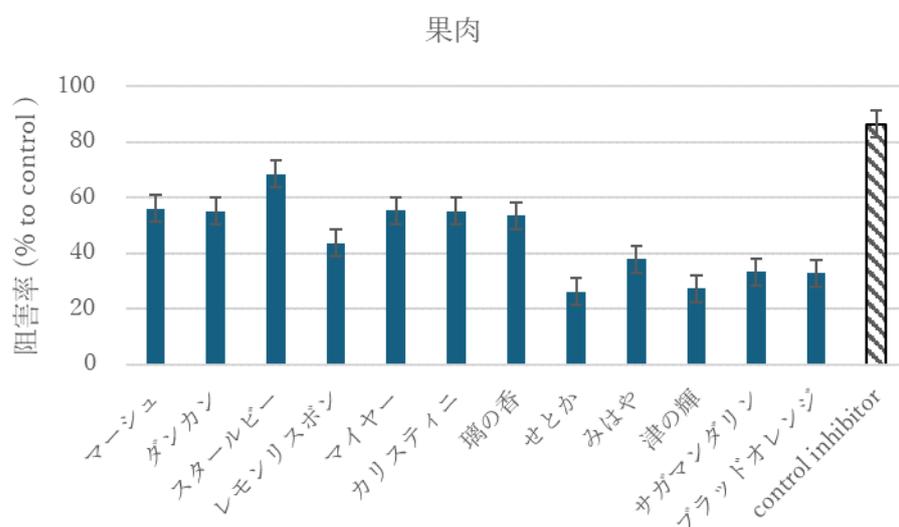


図3 果肉の CYP3A4 阻害活性試験結果 (n = 3)

【考察と今後の課題】

本研究では宮崎県産の柑橘類における BG 及び DHB の含有量を調査し、CYP3A4 阻害活性を調べた結果、BG 及び DHB は果肉に比べて果皮に多く含まれていた。果皮については、グレープフルーツで DHB が、レモンで BG が多かった。果肉については、グレープフルーツのみ BG 及び DHB が検出された。

CYP3A4 阻害活性については、果肉よりも果皮で高かった。果肉の CYP3A4 阻害率は、グレープフルーツのスタールビー種で高かった。これらの結果は、降圧剤などの薬を服用中の人がグレープフルーツを摂取すると薬が効き過ぎてしまうため、一緒に摂取しないということを裏付ける結果であった。また、今回の試験において、グレープフルーツ類、レモン以外の柑橘の BG 及び DHB は定量下限値未満であったが、CYP3A4 阻害活性がみられた。BG 及び DHB 以外の成分による CYP 阻害への影響等が考えられるため、引き続き検討していきたい。

【参考文献】

- 1) Yoshihiro UESAWA, Kiminori MOHRI. The Use of Heat Treatment to Eliminate Drug Interactions Due to Grapefruit Juice. Biol. Pharm. Bull. 29(11) 2274-2278 (2006)
- 2) 石原優, 戸田光, 砂金信義 他. 果実果皮加工食品のフラノクマリン含有量と Cytochrome P450 3A (CYP3A) 阻害活性 : 果皮の加工過程における 6', 7' - dihydroxybergamottin の流出. The Pharmaceutical Society of Japan. 131 679-684 (2011)
- 3) 大西美知代, 望月美菜子, 大倉敏裕 他. 健康食品等の CYP3A4 阻害作用スクリーニン

グ試験について. 平成 22 年度愛媛衛環研年報 13 27-33 (2010)

- 4) Tadashi FUJITA, Atsushi KAWASE, Toshiro NIWA., et al. Comparative Evaluation of 12 Immature Citrus Fruit Extracts for the Inhibition of Cytochrome P450 Isoform Activities. Biol. Pharm. Bull. 31(5) 925-930 (2008)

【経費使途明細】

使 途	金 額
CYP 活性測定キット、ルシフェリン標準品、CYP 阻害薬	188,760 円
ピペット及びチップ	107,965 円
メタノール	3,275 円
通信費	84 円
利息	-4 円
合 計	300,080 円
大同生命厚生事業団助成金	300,000 円