

麦門冬湯が代謝酵素チトクローム P450 に及ぼす影響の評価

2016 年度

安原 昌子

麦門冬湯が代謝酵素チトクローム P450 に及ぼす影響の評価

Effect of Bakumondo-to on cytochrome P450 activities
in rat liver microsomes

安原 昌子

Masako Yasuhara

目次

序論	1
本論	
第 I 章 麦門冬湯が肝 CYP 及び xanthine oxidase に及ぼす影響 (<i>in vivo</i>)	
第 1 節 緒言	3
第 2 節 麦門冬湯投与ラットにおける肝 CYP 及び xanthine oxidase 活性の変動 (<i>in vivo</i>)	4
第 3 節 麦門冬湯が肝 CYP 及び xanthine oxidase タンパク質発現量に及ぼす影響 (<i>in vivo</i>)	6
第 4 節 考察および小括	9
第 II 章 薬物代謝酵素活性に及ぼす麦門冬湯の影響 (<i>in vitro</i>)	
第 1 節 緒言	10
第 2 節 薬物代謝酵素活性に及ぼす麦門冬湯の影響 (<i>in vitro</i>)	11
第 3 節 考察および小括	12
第 III 章 臨床における麦門冬湯の使用状況	
第 1 節 緒言	13
第 2 節 麦門冬湯の処方状況と併用薬剤の現状	14
第 3 節 考察および小括	16
結論	17
実験の部	19
試薬	
実験動物	
分析機器	
ラット肝臓試料の調製法 (<i>in vivo</i>)	
CYP 活性の測定法 (<i>in vivo</i>)	
xanthine oxidase 活性の測定法 (<i>in vitro</i>)	
ラット肝臓試料の調製法 (<i>in vitro</i>)	
CYP 活性の測定法 (<i>in vitro</i>)	
CYP イムノブロット解析	
統計的分析	
倫理	

引用文献	23
論文目録	27
謝辞	28

序論

生薬は副作用が軽度であり、多くの優れた効能を示すので¹⁾、世界的に見ても一般的な補助・代替療法として使用されている²⁾。しかし、多種多様な生薬と合成薬物を同時併用した結果、薬物相互作用が発現する可能性が高くなることが示唆されている³⁾。

生薬-合成薬剤間の相互作用に関する報告によると、生薬由来の抗うつ剤であるセント・ジョーンズ・ワート（セイヨウオトギリソウ）は、チトクローム P450（以下、CYP）3A の強力な誘導剤であることが周知されており^{4),5)}、一方、セント・ジョーンズ・ワートに含まれるカテキン誘導体が種々の CYP、xanthine oxidase 及び aldehyde oxidase を阻害する⁶⁾。また、伝統的な漢方薬である小青竜湯に関して、ラットの肝臓 microsomes において、CYP3A 活性を阻害することが明らかとなった⁷⁾。さらに、イチヨウの葉エキスは CYP1A2 の活性を上昇させ、theophylline の代謝に影響を及ぼすという報告もある⁸⁾。これらの研究は、生薬や栄養補助食品が、合成薬剤と同様の有害な副作用の発生並びに合成薬剤との有害な相互作用を発現する可能性があることを裏付けている。

漢方薬は複数の生薬をあらかじめ組み合わせた方剤を指し、東洋医学の傷寒論、金匱要略等の理論に基づき処方されている。日本国内の医療用漢方製剤の年次生産金額は、1994 年の小柴胡湯とインターフェロンの併用禁忌、1996 年の小柴胡湯投与患者の死亡例報告などを機に減少していたが、近年、徐々に増加している⁹⁾。これは、漢方薬の有用性が広く認識されたことに加え、抑肝散のグルタミン酸神経系及びセロトニン神経系への作用^{10)~13)}や葛根湯のサイトカインへの作用¹⁴⁾、六君子湯の食欲増進ホルモン「グレリン」分泌作用^{15),16)}など現代医学の視点からの作用機序の解明が進められていることも要因であると考えられる。

麦門冬湯は、麦門冬、半夏、大棗、甘草及び人参などの生薬から成る伝統的な漢方薬であり、気管支炎や気管支喘息、咳嗽といった慢性の気道疾患の治療に広く用いられている^{17)~20)}。麦門冬湯の 2014 年度の売上金額は、漢方製剤中で大建中湯、補中益気湯、抑肝散、六君子湯、芍薬甘草湯、加味逍遥散に次いで 7 番目に多く²¹⁾、頻用されている品目である。医療用漢方製剤である麦門冬湯エキス顆粒は、9.0g 中に日局バクモンドウ、日局コウベイ、日局ハンゲ、日局タイソウ、日局カンゾウ、日局ニンジン等の 6 種類の混合生薬の乾燥エキス 6.0g を含有し、添加物として日局ステアリン酸マグネシウム、日局乳糖水和物、ショ糖脂肪酸エステルが配合されている²²⁾。麦門冬湯エキス顆粒は、痰の切れにくい咳、気管支炎、気管支喘息に適応があり、薬効薬理試験で、鎮咳作用、去痰作用及び気管支拡張作用が確認されている。また、「咳嗽に関するガイドライン第 2 版」²³⁾において乾性咳嗽の非特異的治療の項に掲載されており、今後処方頻度及び他の薬剤との併用は増加すると考えられる。麦門冬湯の鎮咳効果は、気道炎症時に発現されることが報告されている²⁴⁾。

気道炎症時においては、気道に存在する内因性咳誘発物質のサブスタンス P やニューロキニン A などのタキキニンの分解不活化酵素であるニュートラルエンドペプチターゼの活性が低下するが、麦門冬湯を投与することにより活性が低下しないことから、麦門冬湯とその主要な活性成分であるオフィポゴニンがタキキニンの生成、遊離、分解などの動態に対して競合的に作用し鎮咳作用を発現すると考えられている。さらに、麦門冬湯はシェーグレン症候群の患者に対しても用いられた際、唾液分泌に影響を及ぼしている²⁵⁾。

麦門冬湯の臨床的用途は拡大しつつあり、また、pranlukast や theophylline といった薬剤と併用さ

れることが頻繁にあるため、麦門冬湯と合成薬剤間で相互作用が生じる可能性がある。しかし、麦門冬湯がこれらの薬物代謝酵素活性に与える影響に関する報告はほとんどない。

本研究では、①麦門冬湯がチトクローム P 450 に与える影響について研究した。そして、臨床での処方状況調査として②広島県厚生農業協同組合連合会尾道総合病院（以下、尾道総合病院）での麦門冬湯と他薬剤との併用状況の解析を実施した。

本論

第 I 章 麦門冬湯が肝 CYP 及び xanthine oxidase に及ぼす影響 (*in vivo*)

第1節 緒言

脂溶性薬剤の多くは、生体内で肝の酵素による代謝を受けて不活性化される。中心的な役割を担うのは、肝・小腸粘膜細胞のミクロソームに存在する CYP である。CYP は現在までに約 50 種類の分子種が知られており、実際に薬物代謝に関わっている主な分子種は、CYP 1A2、CYP 2C8、CYP 2C9、CYP 2C19、CYP 2D6、CYP 3A 群である。薬物動態学的相互作用の中で最も頻度が高いのは、代謝過程における相互作用であり、その多くは CYP の阻害もしくは誘導による酵素活性の変動に起因する。

漢方薬の臨床的用途は拡大しつつあり、その中で麦門冬湯は、pranlukast や montelukast、theophylline といった薬剤と併用されることが頻繁にある。Pranlukast は CYP 3A により代謝される²⁶⁾。Zafirlukast は CYP 2C9 及び CYP 3A4 により代謝され²⁷⁾、montelukast は CYP 2C8 により代謝される²⁸⁾。Theophylline は CYP 1A2 により代謝される²⁹⁾。しかし、麦門冬湯がこれらの酵素活性に与える影響に関する報告はほとんどない。CYP 1A2 の活性に関しては、既にヒトを対象とした研究がされている。麦門冬湯を 7 日間服用した健常者 26 名では、プラセボ投与群と比較して、CYP 2C 活性が低下する傾向にあったという報告がある²⁰⁾。しかし、麦門冬湯が CYP タンパク質発現量に及ぼす影響に関しては不明である。そこで、麦門冬湯が CYP タンパク質発現量に及ぼす影響についても研究を行った。

本章では、麦門冬湯が CYP 1A2、CYP 2C、CYP 3A 及び xanthine oxidase に与える影響について、*in vivo* 実験系として Jcl:Wistar 系雄ラットを用いて薬物代謝酵素活性及びタンパク質発現量の測定を行った。

第2節 麦門冬湯投与ラットにおける肝CYP及びxanthine oxidase活性の変動 (*in vivo*)

CYPは肝臓に多く存在していることから、Jcl:Wistar系雄ラット(6週齢)に麦門冬湯(1g/kg)を1日2回(8時及び18時)、4日間投与した後の肝microsomesおよびcytosol画分を作製した。次に、microsomes画分にはCYP 1A2、CYP 2C、CYP 3A、cytosol画分にはxanthine oxidaseの特異基質を添加し、その代謝産物量を測定した。CYP 1A2活性についてはコントロール群に比べて麦門冬湯投与群が $42.5 \pm 7.8\%$ 減少($p < 0.01$)し、CYP 2C活性についてはコントロール群に比べて麦門冬湯投与群が $158.0 \pm 29.6\%$ 増加($p < 0.05$)した(Fig. 1)。CYP 3A活性については、7-benzyloxyquinoline (7-BQ)代謝活性において $81.5 \pm 7.8\%$ であり、コントロール群との間に有意差は認められなかった。同様に、7-benzyloxy-4-trifluoromethylcoumarin (BFC)においても $132.5 \pm 29.5\%$ であり、コントロール群との間に有意差は認められなかった(Fig. 2)。Xanthine oxidaseにおいては $165.8 \pm 36.6\%$ であり、コントロール群との間に有意差は認められなかった(Fig. 3)。

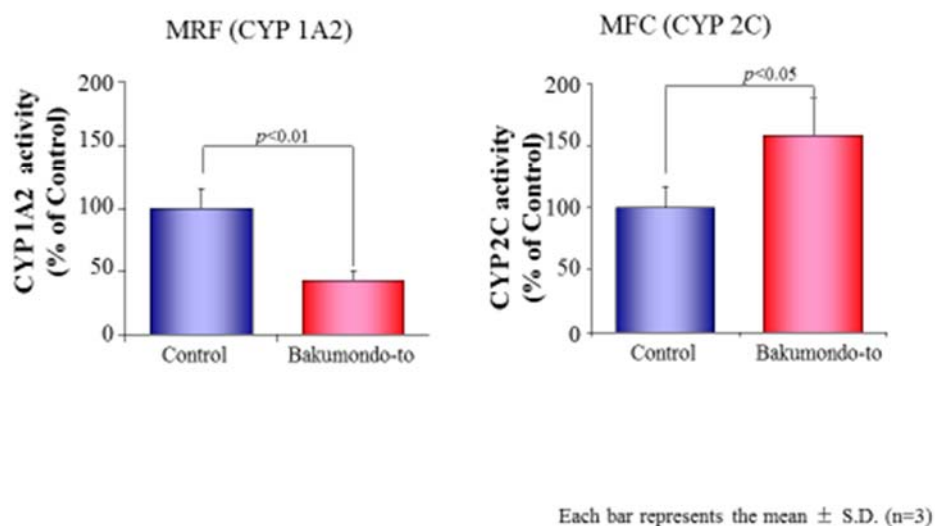


Fig. 1 Changes in hepatic CYP activity in rats treated with Bakumondo-to

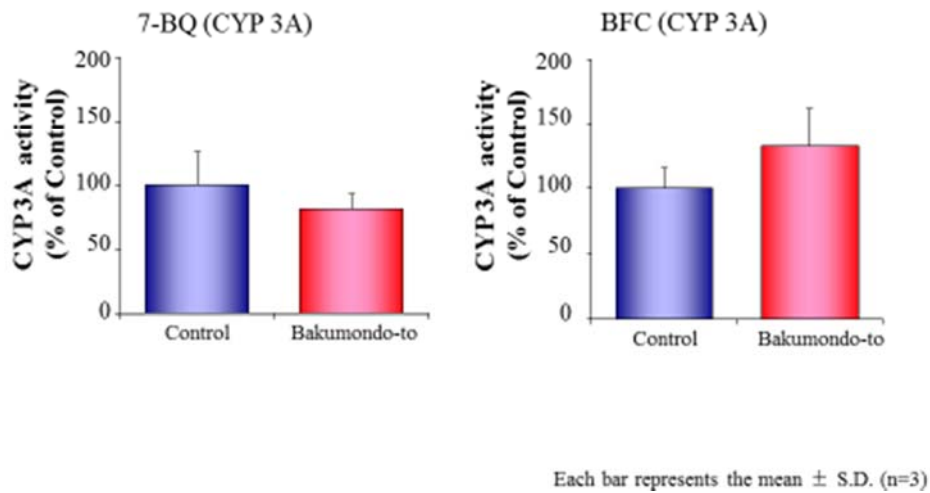


Fig. 2 Changes in hepatic CYP activity in rats treated with Bakumondo-to

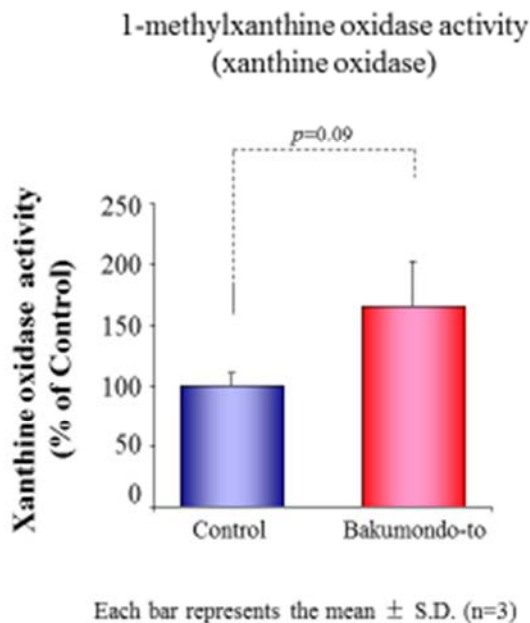


Fig. 3 Influence of Bakumondo-to on Drug Metabolic Enzyme Activity

第3節 麦門冬湯が肝 CYP 及び xanthine oxidase タンパク質発現量に及ぼす影響 (*in vivo*)

前節では、Jcl:Wistar 系雄ラットにおける肝 CYP 活性の変動を観察し、麦門冬湯を投与することにより、CYP 1A2 活性は減少、CYP 2C 活性は増加することを観察した。しかし、麦門冬湯がタンパク質発現量に及ぼす影響に関しては不明確である。そこで、麦門冬湯が CYP タンパク質発現量に及ぼす影響についても検討を行った。Fig. 4, 5 の図において、上側にはイムノブロット解析で得られたバンドを示しており、下側にはバンドの濃さを数値化したものをグラフとして示している。CYP 1A2 タンパク質の発現量には有意な変化が認められないのに対して、麦門冬湯投与群の CYP 2C タンパク質発現量は、コントロール群と比較して $288.9 \pm 105.2\%$ に増加 ($p < 0.01$) した (Fig. 4)。一方、CYP 3A および xanthine oxidase においてはタンパク質の発現量には有意な変化が認められなかった (Fig. 5)。

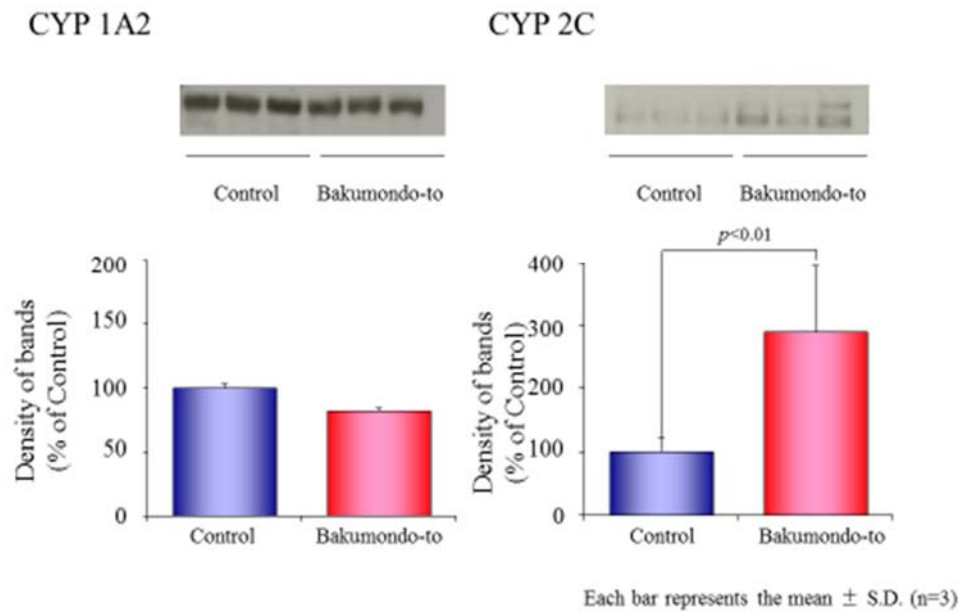


Fig. 4 Influence of Bakumondoto on protein expression (*in vivo*)

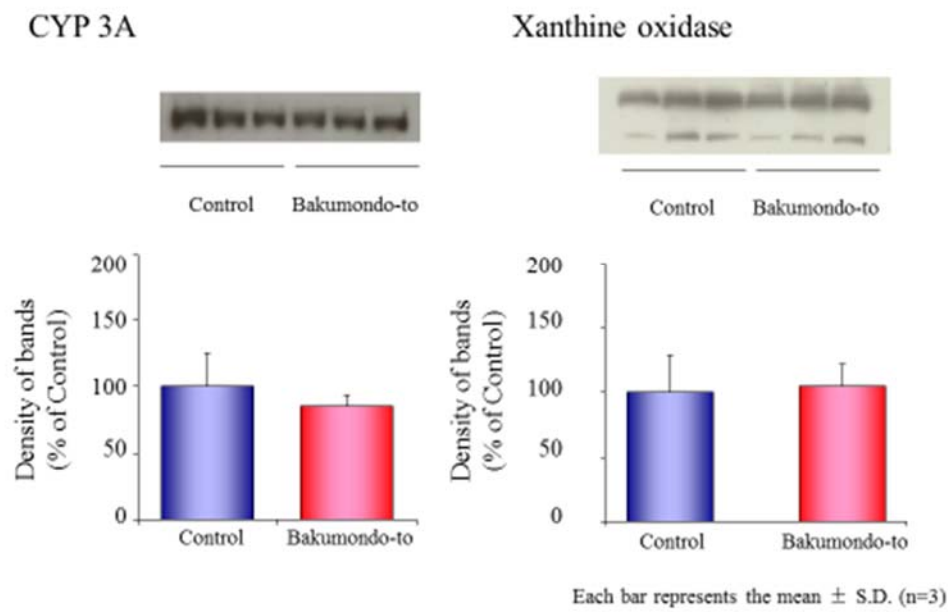


Fig. 5 Influence of Bakumondoto on protein expression (*in vivo*)

第4節 考察および小括

漢方薬による薬物治療は優れた効能、軽度な副作用により今後さらに拡大すると考えられるが、合成薬剤との併用については情報が少ない。合成薬剤については代謝経路及び代謝酵素などの情報が多々あり、注意すべき併用薬が挙げられている例があるが、漢方薬に関しては代謝酵素についての情報もほとんどない。従って、漢方薬による代謝酵素活性の変動を検討することは重要である。

本検討にて、麦門冬湯はラット肝 microsomes 画分において、CYP 1A2 活性の阻害が認められたが、タンパク質発現量には影響を及ぼさなかった。一方、CYP 2C 活性及びタンパク質発現量の上昇を伴う活性が認められた。CYP 3A に代謝される医薬品は多いことから、2種類の基質を用いて、その活性を検討した。その結果、CYP 3A タンパク質発現量および活性には影響を及ぼさなかった。また、cytosol 画分において、xanthine oxidase タンパク質発現量および活性に影響を及ぼさなかった。これらのことから CYP1A2 により代謝される薬剤と麦門冬湯を併用することにより、併用薬剤の血中濃度が上がる可能性があり、併用には注意を要すると考えられる。CYP 1A2 で代謝を受ける主な薬剤については、theophylline、R-warfarin、tizanidine、ramelteon などがあり、特に TDM を必要とする theophylline、用量調節が必要な R-warfarin との相互作用の可能性は臨床で重要なことであると考えられる。また、CYP 2C により代謝される医薬品と麦門冬湯を併用投与することにより、CYP 2C の誘導による代謝が亢進された薬剤の血中濃度が下がる可能性があり、併用には注意を要すると考えられる。CYP 2C で代謝を受ける主な薬剤には S-warfarin、tolbutamide、glimepiride、NSAIDs、benzbromarone、seratrovast、AT₁拮抗薬などがあり、このうちトロンボキサン A₂受容体拮抗薬である seratrovast については麦門冬湯と併用する可能性が高いと考えられるので、注意が必要である。

麦門冬湯は、

- CYP 1A2 活性を阻害したが、タンパク質発現量には影響を及ぼさなかった。
- CYP 2C タンパク質発現量の上昇を伴う活性の増加を示した。
- CYP 3A タンパク質発現量および活性に影響を及ぼさなかった。
- Xanthine oxidase タンパク質発現量および活性に影響を及ぼさなかった。
- CYP 1A2 および CYP 2C により代謝される医薬品と麦門冬湯を併用投与することにより薬物相互作用が生じる可能性があるため、注意が必要である

第Ⅱ章 薬物代謝酵素活性自体に及ぼす麦門冬湯の影響 (*in vitro*)

第1節 緒言

CYP1A2 は、肝臓に発現し、肝臓の総 CYP 含量の約 13%を占めている。CYP1A2 は、phenacetin や theophylline、caffeine などの薬物代謝に加え、がん原性芳香族アミンや加熱分解物などの代謝活性化にも関与している³⁰⁾。CYP 2C サブファミリーには、CYP 2C9 と CYP 2C19 がある。CYP 2C9 は、phenytoin や tolbutamide、diclofenac sodium などの薬物の代謝に関与する。CYP2C19 は、diazepam や omeprazole などの薬物の代謝に関与する。

前章にて麦門冬湯による CYP 1A2 活性の阻害が認められ、CYP 1A2 で代謝される薬物を併用することで併用薬剤の血中濃度が上昇する可能性が示された。一方、CYP 2C 活性の誘導が認められ、CYP 2C で代謝される薬物を併用すると併用薬剤の血中濃度が低下する可能性が示された。これら CYP 阻害あるいは誘導に起因する相互作用の可能性を検討することは临床上重要である。

しかし、前章の実験では、タンパク質変動を含めた活性変化を観察し、CYP 1A2 活性の阻害がタンパク質発現量の低下によるものではないことを確認したことにとどまった。そこで、麦門冬湯が酵素活性自体に直接影響を及ぼしている可能性を考え、麦門冬湯が酵素活性に及ぼす影響を検討する目的で無処置のラット肝 microsomes にメタノールで抽出した麦門冬湯エキスを添加し、前章の実験で活性変動の認められた CYP 1A2 及び CYP 2C 活性を測定した。

第2節 薬物代謝酵素活性に及ぼす麦門冬湯の影響 (*in vitro*)

CYP 1A2 活性および CYP 2C 活性についてメタノール抽出した麦門冬湯エキスを肝 microsomes に添加し活性を測定した結果を Fig. 6 に示した。麦門冬湯添加により、CYP 1A2 活性は有意な低下が認められ、一方、CYP 2C 活性に関しては有意な上昇が認められた。

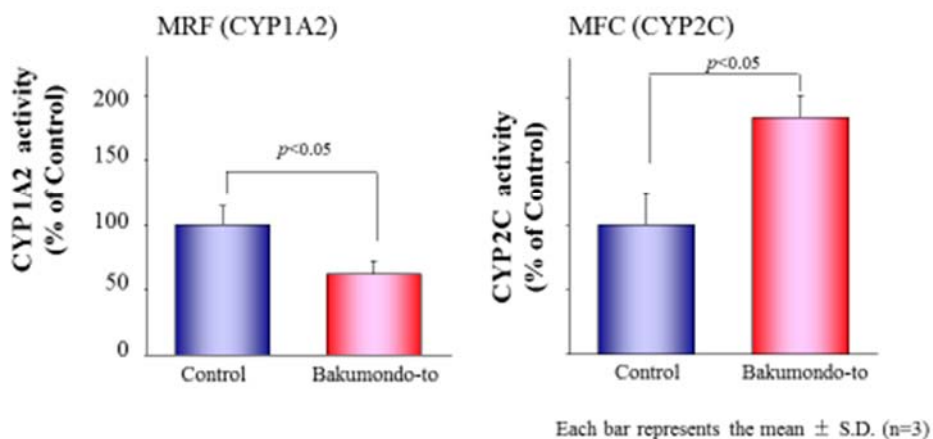


Fig. 6 Influence of Bakumondonto on Drug Metabolic Enzyme Activity (*in vitro*)

第3節 考察および小括

薬動態学的相互作用の中で最も発現頻度が高いのは、代謝の過程における相互作用であり、その多くは肝薬物代謝酵素 CYP の酵素活性の変化に起因する。前節の結果では、メタノール抽出した麦門冬湯エキスを直接添加したことで、CYP 1A2 は有意な活性低下が認められ、CYP 2C に関しては有意な活性上昇が認められた。この要因については不明であるが、麦門冬湯には cAMP を活性化し、肺サーファクタントの分泌を促進することが報告されているため、CYP 2C においても cAMP の活性化により CYP2C 活性が変化した可能性も考えられる³¹⁾。この点に関しては今後、より詳細に検討を行う必要がある。これらのことより、麦門冬湯は直接 CYP に作用し、活性の変化を引き起こしたと考えられる。また、麦門冬湯の構成成分の一つである人参の抽出液は CYP 1A2 の活性を阻害するという報告もあり³⁴⁾、阻害に関与する成分及びその機序は未だ明らかとなっておらず、今後解明していく必要がある。

麦門冬湯は

- CYP 1A2 活性の阻害を観察した。
- CYP 2C 活性の上昇を認めた。
- CYP 1A2 において、麦門冬湯に含有される成分が酵素を直接的に阻害している可能性が示唆された。
- CYP 2C において、麦門冬湯に含有される成分が酵素タンパク質に直接的に作用し活性を上昇させている可能性が示唆された。

第Ⅲ章 臨床における麦門冬湯の使用状況

第1節 緒言

薬物代謝に関与する主要な CYP 分子種は、主として CYP 1A2、CYP 2C9、CYP 2C19、CYP 2D6 および CYP 3A 群の 5 分子種といわれている³²⁾。第 I 章、第 II 章で行った研究の結果、麦門冬湯は CYP 1A2 活性を阻害することが認められ、一方、CYP 2C 活性を上昇させることが認められた。併用により CYP 1A2 活性が阻害された際には、CYP 1A2 基質薬物の代謝が低下し副作用が発現する可能性がある。緊張緩和薬 tizanidine の CYP 1A2 による代謝が選択的セロトニン再取り込み阻害薬 (SSRI) で阻害され³³⁾、心拍数や体温、血圧の低下などが起こることが認められ併用禁忌となった例がある。近年上市された薬物では、不眠症に用いるメラトニン受容体作動薬 ramelteon が CYP 1A2 の基質薬物であり³⁴⁾、fluvoxamine との併用は禁忌、quinolone 系抗菌薬との併用は注意である。セロトニン・ノルアドレナリン再取り込み阻害薬 (SNRI) の duloxetine は CYP 2D6 でも代謝されるが、おそらく CYP 1A2 の寄与のほうが大きく、fluvoxamine との併用は注意ではあるものの血中濃度 - 時間曲線下面積 (AUC) は 5.6 倍、半減期は 3 倍にも延長するとの報告がある³⁵⁾。CYP 2C9 を強く誘導する薬物としては、bosentan が知られており³⁶⁾、併用により warfarin、simvastatin などの血中濃度を低下させるため、併用注意となっている。このように CYP 1A2 および CYP 2C の基質薬物は多数存在し、代謝活性の変動を検討することは临床上重要である。

麦門冬湯の臨床での使用状況は、今後さらに拡大することが予想され、前章での研究結果を鑑みると、CYP 1A2 および CYP 2C において代謝される薬剤との併用について調査する必要があると考えられる。臨床での処方状況を調査検討することを目的とし、尾道総合病院での症例の検討を行った。

第2節 麦門冬湯の処方状況と併用薬剤の現状

2015年4月1日～2016年3月31日までの1年間の麦門冬湯の処方状況を Table 1 に示している。麦門冬湯処方患者数は54人であった。54人のうち、男性が14人、女性が40人であった。年齢は 52 ± 5 (5-83) 才、処方日数は 54 ± 9 (3-350) 日分であった。54人のうち単剤処方の患者は19人、他剤併用処方の患者は35人であった。併用薬剤は、去痰剤、 β_2 刺激貼付薬など鎮咳に関する薬剤が多く処方されていたが、患者の持つ基礎疾患治療薬に麦門冬湯を併用する処方もあった。

Table 1 Prescription status of Bakumondo-to in Onomichi General Hospital

Department	Sex	Age	Prescription days	Concomitant drug
Emergency outpatient	Female	29	3	loxoprofen, tranexamic acid, rebamipico
Emergency outpatient	Female	66	5	tipepidine hibenzate
Emergency outpatient	Female	64	5	L-carbocisteine
Emergency outpatient	Female	27	5	azithromycin hydrate, L-carbocisteine, codeine phosphate hydrate, tipepidine hibenzate
Emergency outpatient	Male	66	5	none
Emergency outpatient	Male	70	5	none
Emergency outpatient	Female	60	5	none
Emergency outpatient	Female	23	5	tranexamic acid, acetaminophen, tipepidine hibenzate
Emergency outpatient	Female	39	6	ambroxol hydrochloride, montelukast sodium, pranlukast hydrate, codeine phosphate hydrate
Emergency outpatient	Female	75	7	laninamivir octanoate hydrate, acetaminophen, cefdinir
Emergency outpatient	Male	23	7	tranexamic acid, acetaminophen
Emergency outpatient	Male	28	10	tipepidine hibenzate, L-carbocisteine
Emergency outpatient	Female	50	10	L-carbocisteine
Emergency outpatient	Female	69	14	ambroxol hydrochloride, montelukast sodium, bepotastine besilate
Emergency outpatient	Female	28	14	L-carbocisteine
Emergency outpatient	Male	25	14	none
Emergency outpatient	Female	24	14	none
Emergency outpatient	Male	40	14	none
Emergency outpatient	Female	63	25	tranexamic acid
Respiratory medicine department	Male	75	7	none
Respiratory medicine department	Female	67	8	ambroxol hydrochloride, montelukast sodium
Respiratory medicine department	Female	61	14	levocetirizine hydrochloride, L-carbocisteine, codeine phosphate hydrate
Respiratory medicine department	Female	26	14	none
Respiratory medicine department	Female	58	14	none
Respiratory medicine department	Male	67	14	none
Respiratory medicine department	Female	66	16	L-carbocisteine
Respiratory medicine department	Female	76	19	none
Respiratory medicine department	Female	38	21	codeine phosphate hydrate
Respiratory medicine department	Male	41	35	hochuekki-to
Respiratory medicine department	Female	70	35	pregabalin, esomeprazole magnesium hydrate, duloxetine hydrochloride, celecoxib, sennoside A•B calcium
Respiratory medicine department	Female	69	42	sitagliptin phosphate hydrate, ambroxol hydrochloride
Respiratory medicine department	Female	72	350	benidipine hydrochloride, clarithromycin, sodium ferrous Citrate, rosuvastatin calcium, warfarin, esomeprazole magnesium hydrate, pregabalin, sulbactam sodium• ampicillin sodium, loxoprofen, telmisartan
Gastroenterology department	Female	83	7	L-carbocisteine, tulobuterol tape
Gastroenterology department	Female	80	7	rebamipide, sennoside A•B calcium, brotizolam, alendronate sodium hydrate, loxoprofen, eldecalcitol, prednisolone, levothyroxine sodium hydrate, pravastatin sodium, esomeprazole magnesium hydrate
Gastroenterology department	Female	72	14	famotidine, ursodeoxycholic acid, pravastatin, olopatadine hydrochloride
Gastroenterology department	Female	51	28	none
Gastroenterology department	Female	41	28	loxoprofen, rebamipide
Gastroenterology department	Female	50	30	none
Obstetric and gynecology	Female	33	7	none
Obstetric and gynecology	Female	25	7	tulobuterol tape
Obstetric and gynecology	Female	34	7	tulobuterol tape
Obstetric and gynecology	Female	32	7	tulobuterol tape
Obstetric and gynecology	Female	35	14	L-carbocisteine
Obstetric and gynecology	Female	29	14	none
Otolaryngology	Male	76	14	none
Otolaryngology	female	62	21	none
Otolaryngology	Male	61	28	L-carbocisteine
Otolaryngology	Male	77	101	none
Surgery	Male	80	16	ursodeoxycholic acid
Surgery	Male	80	21	L-carbocisteine, tipepidine hibenzate
Pediatrics department	Female	5	7	none
Orthopedics	Female	29	74	codeine phosphate, azithromycin hydrate
Radiology department	Female	65	7	anastrozole
Department of anesthesiology	Female	53	7	amlodipine besilate, rebamipide, lubiprostone, loxoprofen, triazolam

第3節 考察および小括

尾道総合病院では2015年4月～2016年3月までの期間で麦門冬湯の投与例が54例あった。54例中35例が併用処方、投与日数は3日から350日以上、継続例まで幅があり、併用される頻度も多く、また、長期に亘って使用される漢方薬剤であるということが示されている。他剤併用の患者の中には糖尿病、高血圧、喘息、シェーグレン症候群、悪性腫瘍などの治療中であり、CYPで代謝される薬剤が併用されている例が認められた。併用薬では ambroxol hydrichloride、

L-carbocisteine、tipepidine hibenzate など咳症状を緩和する薬剤が多く用いられていたが、一方で、warfarin、duloxetine など服用中の患者に処方される例も認められた。尾道総合病院では麦門冬湯との重篤な相互作用についての報告例はなかったが、中程度あるいは軽度なものについては不明である。CYP 1A2 で主に代謝される薬物は theophylline、warfarin、pirfenidone、imipramine hydrochloride、clomipramine hydrochloride、duloxetine など多数あり、麦門冬湯の投与日数は長期に及ぶことも考えられ、特に TDM を必要とする theophylline、用量調節が必要な warfarin との相互作用の可能性は臨床において重要であると考えられる。

今回の調査で、CYP 1A2 で代謝される薬剤では R-warfarin、duloxetine、CYP 2C9 で代謝される薬剤では S-warfarin、celecoxib に麦門冬湯が併用されていたことが確認された。併用に関する副作用は不明であるが、麦門冬湯は CYP 1A2 活性を阻害、CYP 2C 活性を増加させるので、今後、相互作用の可能性のある薬剤を回避する必要があると考えられる。

結論

麦門冬湯は生薬であり、慢性気道疾患に対して投与される。セント・ジョーンズ・ワートに含まれるカテキン類など、生薬中の成分は酵素活性を阻害するが、麦門冬湯に関しては、CYP 活性に影響を及ぼすのか否か不明確であった。この研究の目的は、麦門冬湯が CYP 活性及び CYP タンパク質発現量に影響を及ぼすのか否かを評価することにあった。

CYP 3A はヒトの肝臓における主要代謝酵素の一つである。CYP 3A は midazolam や felodipine、lovastatin、triazolam といった様々な薬剤を代謝する。そのため、麦門冬湯が CYP 3A 活性に及ぼす影響を評価したが、本研究において、ラット肝臓 microsomes を用いた麦門冬湯の CYP3A 活性への影響は認められなかった。従って臨床において、麦門冬湯と CYP 3A で代謝される薬物との相互作用が生じる可能性は少ないと考えられる。

CYP 1A2 は theophylline や tizanidine、caffeine の代謝酵素である。気道炎症や慢性気管支炎の治療の際、麦門冬湯と theophylline が併用される場合もある。また、ヒトにおいて、麦門冬湯の 7 日間投与により CYP 1A2 活性が阻害傾向を示した報告もある²⁰⁾。本研究では、麦門冬湯投与後に CYP 1A2 の有意な抑制が認められたが、タンパク質発現量に関しては control 群と比較して有意な変化は認められなかった。しかし、メタノール抽出した麦門冬湯エキスを直接添加したことで、CYP 1A2 は有意な活性低下が認められた。これらのことから、麦門冬湯による CYP 1A2 の活性阻害は、タンパク質発現量とは無関係に生じていることを示唆している。前述の CYP 1A2 活性阻害に関する研究報告を考慮すると、麦門冬湯は併用薬剤の CYP 1A2 への親和性を変化させる可能性がある。また、麦門冬湯の構成成分の一つである人参の抽出液は CYP 1A2 の活性を阻害するという報告があるが³⁷⁾、阻害に関与する成分及びその機序は未だ明らかとなっておらず、今後解明していく必要がある。

CYP 2C はヒト肝臓 microsomes 中の CYP の内、約 25%を占め³⁸⁾、zafirlukast や montelukast、omeprazole 及び phenytoin の代謝に関して、重要な役割を果たしている^{27),39)}。Zafirlukast や montelukast といったロイコトリエン受容体拮抗薬は、喘息やアレルギー性鼻炎の治療に用いられるが、その際、症例によっては麦門冬湯が併用される場合がある。今回、麦門冬湯が CYP 2C に影響を及ぼすのか否かも評価した。その結果、麦門冬湯投与群では control 群と比較して、酵素活性が 158%増加、タンパク質発現量 (CYP 2C バンドより解析) が 288.9%増加したことが認められた。この結果から、CYP 2C 活性の上昇はタンパク質発現量に依存すると考えられる。麦門冬湯を用いたわずか 4 日間の投与で CYP 2C の誘導が引き起こされたため、臨床において、より長期に渡って麦門冬湯を投与する場合、CYP 2C で代謝される薬物の併用を回避するように警戒すべきであると考えられる。

前述の結果により、麦門冬湯と他薬剤との併用状況を検討するため、2015 年 4 月～2016 年 3 月までの期間で麦門冬湯の臨床での投与例を調査した。麦門冬湯は単剤、短期間での処方例がある反面、他薬剤と併用される機会も多く、また、長期に亘って使用される薬剤であるということが調査の結果明らかとなった。他剤併用の患者の中には基礎疾患治療中であり、CYP で代謝される薬剤が投与されている例があった。このような患者では CYP 1A2 で代謝される R-warfarin、duloxetine hydrochloride、CYP 2C9 で代謝される S-warfarin、celecoxib の併用が確認された。併用に

関する副作用は不明であった。麦門冬湯は CYP 1A2 活性を低下させ、CYP 2C 活性を増加させるため、今後、相互作用の可能性のある薬剤の併用を回避する必要もあるのではないかと考える。

特に、CYP 2C の酵素活性の増加にはタンパク質発現の誘導に加え、麦門冬湯自体による作用が関与している可能性が示唆された。今後、誘導機序についても詳細に検討する必要がある。

実験の部

1. 試薬

医療用麦門冬湯抽出エキス顆粒は、ツムラ株式会社より購入し、使用した。

CYP1A2、CYP2C 及び CYP3A の特異基質として、以下を BD Gentest より購入し、使用した。

7-methoxyresorufin (以下、MRF)

7-methoxy-4-(trifluoromethyl)coumarin (以下、MFC)

7-benzoyloxyquinoline (以下、7-BQ)

7-benzyloxy-4-trifluoromethylcoumarin (以下、BFC)

10-20% ポリアクリルアミドゲルは、ATTO 株式会社より購入し、使用した。

Chemi-Lumi One L は、ナカライテスク株式会社より購入し、使用した。

その他一般試薬は特級レベルを使用した。

2. 実験動物

Jcl:Wistar 系雄ラット (6 週齢) は、日本クレア株式会社より購入し、使用した。

3. 分析機器

吸光度計

Spectrofluorophotometer RF-5300 PC (島津製作所)を用いた。

電気泳動・ウエスタンブロッティングには以下の機器を使用した。

電気泳動槽 AE-6530(アトー社)

電気泳動電源 powerpac basic (バイオ・ラッド社)

ブロッティング装置 criterion blotter (バイオ・ラッド社)

ブロッティング電源 crosspower 150 (アトー社) を用いた。

4. ラット肝臓試料の調製法 (*in vivo*)

Microsomes 画分の調製法

麦門冬湯投与群として Jcl:Wistar 系雄ラットに麦門冬湯エキス顆粒 (1g/kg) を 1 日 2 回 (8 時及び 18 時) 4 日間投与した。また、control 群として蒸留水を 1 日 2 回 (8 時及び 18 時) 4 日間投与した。両群のラットより肝臓を摘出後、4 倍量の 1.15% KCl を加えてホモジナイズした。ホモジナイズ後 9,000 g で 20 分間遠心分離し、更にその上清を 10,500 g で 60 分間遠心分離したものを microsomes 画分とした。肝 microsomes はカリウムリン酸緩衝液中に懸濁させた。タンパク質濃度は Lowry 法によって測定した。標準タンパク質としてウシ血清アルブミンを用いた。

Cytosol 画分の調製法

ラットより肝臓を摘出後、冷 1.15%KCl で灌流し、4 倍量の冷 1.15%KCl (肝 1g あたり 4mL) を加え、テフロンホモジナイザーを用いてホモジナイズした。その後、9,000g で 20 分間遠心分離し、その上清をさらに 105,000g で 60 分間遠心して得られた上清を cytosol 画分とした。

5. CYP 活性の測定法 (*in vivo*)

CYP 活性は、以前の手法を改変した測定方法を用いて測定した。

・ CYP 1A2 活性

CYP 1A2 活性は、基質として MRF を用いて分析した。石英セル中に、肝 microsomes (最終濃度: 0.5 mg/mL) 50 μ L、5 mM NADPH 100 μ L、0.1 M リン酸緩衝液 1840 μ L 及び 1 mM MR 10 μ L を加えて混合後、37 °C で 3 分間インキュベートした。蛍光を実時間で測定し、MR の O-脱メチル化率を測定した (励起波長: 530 nm, 蛍光波長: 585 nm)。

・ CYP 2C 活性

CYP 2C 活性は、基質として MFC を用いて分析した。石英セル中に、肝 microsomes (最終濃度: 0.5 mg/mL) 50 μ L、5 mM NADPH 100 μ L、0.1 M リン酸緩衝液 1840 μ L 及び 1 mM MFC 10 μ L を加えて混合後、37 °C で 15 分間インキュベートした。蛍光性の生成物を測定し、MFC の O-脱メチル化率を測定した (励起波長: 410 nm, 蛍光波長: 510 nm)。

・ CYP 3A 活性

CYP 3A 活性は、基質として 7-BQ を用いて分析した。石英セル中に、肝 microsomes (最終濃度: 0.5 mg/mL) 50 μ L、5 mM NADPH 100 μ L、0.1 M リン酸緩衝液 1840 μ L 及び 1 mM 7-BQ 10 μ L を加えて混合後、37 °C で 10 分間インキュベートした。蛍光を実時間で測定し、7-hydroxyquinoline の形成率を測定した (励起波長: 410 nm, 蛍光波長: 538 nm)。同様に、基質として BFC を用いて分析も行った。石英セル中に、肝 microsomes (最終濃度: 0.5 mg/mL) 50 μ L、5 mM NADPH 100 μ L、0.1 M リン酸緩衝液 1840 μ L 及び 1 mM BFC 10 μ L を加えて混合後、37 °C で 10 分間インキュベートした。蛍光を実時間で測定し、7-hydroxy-4-(trifluoromethyl)coumarin の形成率を測定した (励起波長: 410 nm, 蛍光波長: 510 nm)。

6. Xanthine oxidase 活性の測定法 (*in vivo*)

PBS (-)350 μ L に肝 cytosol 100 μ L、1-methinexanthine 1 μ mol (50 μ L) を添加し、10 分間のプレインキュベーション後、10 分間インキュベーションを行った。その後、MeOH 0.5mL と内部標準物質として acetaminophen 50 μ g/50 μ L 添加し、上清中の 1-methyl uric acid を HPLC で測定した。

HPLC 条件

Column : Mightysil RP-18 (150mm×4.6mm、5 μ m)

Detection : 280nm

Flow rate : 0.5mL/min

Mobile phase : 0.5% GH₃COOH : MeOH=92 : 8

Retention time : 1-methyl uric acid 41.0 min

Acetaminophene 18.5 min

7. ラット肝臓試料の調製法 (*in vitro*)

ラットより肝臓を摘出後、4 倍量の 1.15% KCl を加えてホモジナイズした。ホモジナイズ後 9,000 g で 20 分間遠心分離し、更にその上清を 10,500 g で 60 分間遠心分離したものを microsomes 画分とした。肝 microsomes はカリウムリン酸緩衝液中に懸濁させた。タンパク質濃度は Lowry 法によって測定した。標準タンパク質としてウシ血清アルブミンを用いた。

8. CYP 活性の測定法 (*in vitro*)

ツムラ麦門冬湯エキス顆粒 3 g を MeOH 30 mL にて 懸濁後、上清を減圧乾固した。その後、残渣を 10 mL の蒸留水に溶解し検討に用いた。CYP 1A2 活性は MRF、CYP 2C 活性は MFC を基質とし、その代謝物生成量を評価した。

9. CYP イムノブロット解析

肝 microsomes のイムノブロット解析を行い、CYP タンパク質の発現量を測定した。10-20% ポリアクリルアミドゲルを使用し、microsomes (50 μ g) を SDS-PAGE にて分離後、エレクトロブロットにてポリフッ化ビニリデン (PVDF) メンブレンに移行させた。メンブレンは Blocking One にて 30 分間ブロッキング処理した。その後、ウサギ抗ラット CYP 抗体を Signal enhancer HIKARI (ナカライテスク株式会社) にて 2000 倍希釈し、冷所 (4 $^{\circ}$ C) で 12 時間振とう反応させた。その後、メンブレンを洗浄し、Signal enhancer HIKARI (ナカライテスク株式会社) にて 1000 倍希釈した horseradish peroxidase -ヤギ抗ウサギ IgG 抗体と室温で 1 時間振とうを行った。次に、Chemi-Lumi One L (ナカライテスク株式会社) を用いて結合抗体を検出した。続いて、X-ray film に現像を行った。

バンドの濃淡は、X 線フィルムをスキャナー (Canon 5000F) で読み取り、TIFF 形式ファイルに保存後、NIH (National institutes of health) Image ソフトを用いて、バンドの濃淡を数値化した。

10. 統計的分析

F 検定により、統計的有意差を評価した。等分散性である場合スチューデントの t 検定を、不等分散性である場合ウェルチの t 検定を実施した。両側確率 $p < 0.05$ を有意とした。

11. 倫理

本研究は広島国際大学動物実験倫理委員会の承認（AE15-001）を受け、実験した。

本研究は広島県厚生農業組合連合会 尾道総合病院倫理委員会の承認を受け、実施した。

引用文献

- 1) Ishohama Y., Bakumondo-to increases bl-adrenergic receptor mRNA expression in rat alveolar type II cells. **18**, pp. 8-14, 2001.
- 2) Al-Ramahi, R., Jaradat, N., Shalalfeh, R., Nasir, S., Manasra, Y., Shalalfeh, I., Esam, Y., Evaluation of potential drug-herb interactions among a group of Plalestinian patients with chronic diseases. *BMC Complement. Altern. Med*, **15**, 221, 2015.
- 3) Izzo, A.A., Ernst, E., Interactions between herbal medicines and prescribed drugs: a systematic review. *Drugs*, **61**, 2163-2175, 2001.
- 4) Roby, C.A., Anderson, G.D., Kantor, E., Dryer, D.A., Burstein, A.H. St John' s wort: effect on CYP3A4 activity. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **67**, 451-457, 2000.
- 5) Wang, Z., Gorski, J.C., Hamman, M.A., Huang, S.M., Lesko, L.J., Hall, S.D., The effects of St John' s wort (*Hyoericum perforatum*) on human cytochrome P450 activity. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **70**, 317-326, 2001.
- 6) Tayama, Y., Sugihara, K., Sanoh, S., Miyake, K., Morita, S., Kitamura, S., Ohta, S., Effect of tea beverages on aldehyde oxidase activity. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **26** (1), 94-101, 2011.
- 7) Makino, T., Mizuno, F., Mizukami, H., Dose a kampo medicine containing schisandra fruit affect pharmacokinetics of nifedipine like grapefruit juice? *Biol. Pharm. Bull.*, **29** (10), 2065-2069, 2006.
- 8) Tang, J., Sun, J., Zhang, Y., Li, Cui, F., He, Z., Herb-drug interactions: effect of *Ginko biloba* extract on the pharmacokinetics of theophylline in rats. *Food Chem. Toxicol.*, **45** (12), 2441-2445, 2007.
- 9) ツムラグループ コーポレートレポート 2015, 株式会社ツムラ コーポレート・コミュニケーション室環境・社会活動グループ, 37, 2015.
〈<http://www.tsumura.co.jp/corporate/csr/report/ebook/2015/index.html#page=1>〉, 2016. 12. 1.
- 10) Atsushi Takeda, Haruna Tamano, Hiromasa Itoh, Naoto Oku, Attenuation of abnormal glutamate release in zinc deficiency by zinc and Yokukansan, *Neurochemistry International*, **53**, 230-235, 2008.
- 11) Zenji Kawakami, Yasushi Ikarashi, Yoshio Kase, Glycyrrhizin and its metabolite 18β-glycyrrhetic acid in glycyrrhiza, a constituent herb of yokukansan, ameliorate thiamine deficiency-induced dysfunction of

glutamate transport in cultured rat cortical astrocytes, *European Journal of Pharmacology*, **626**, 154-158, 2010.

- 12) Nobuaki Egashira, Katsunori Iwasaki, Ayumi Ishibashi, Kazahide Hayakawa, Ryoko Okuno, Moe Abe, Naoki Uchida, Kenichi Mishima, Kotaro Takasaki, Ryoji Nishimura, Ryozo Oishi, Michihiro Fujiwara, Repeated administration of Yokukansan inhibits DOI-induced haed-twitch response end decreases expression of 5-hydroxytryptamine (5-HT)_{2A} receptors in the prefrontal cortex, *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, **32**, 1516-1520, 2008.
- 13) Kiyoshi Terawaki, Yasushi Ikarashi, Kyoji Aekiguchi, Yoichiro Nakai, Yoshio Kase, Partial agonistic effect of yokukansan on human recombinant serotonin 1A receptors expressed in the membrans of Chinese hamster ovary cells, *Journal of Ethnopharmacology*, **127**, 306-312, 2010.
- 14) Masahiko Kurokawa, Masami Imakita, Cristina A. Kumeda, Tomoyo A. Yukawa and Kimiyasu Shiraki, Kakkon-to suppressed interleukin-1 α production responsive to interferon and alleviated influenza infection in mice, *Journal of Traditional Medicines*, **13**, 201-209, 1996.
- 15) Hiroshi Takeda, Chiharu Sadakane, Tomohisa Hattori, Takehiko Katsurada, Tatsuya Ohkawara, Koichi Nagai, and Masahiro Asaka, Rikkunshito, an Herbal Medicine, Suppresses Cisplatin-Induced Anorexia in Rats Via 5-HT₂ Receptor Antagonism, *Gastroenterology*, **134**, 2004-2013, 2008.
- 16) Tetsro Ohno, Mitsuhiro Yanai, Hiroyuki Ando, Yoshitaka Toyomasu, Atsushi Ogawa, Hiroki Morita, Kyoichi Ogata, Eriko Mochiki, Takayuki Asao, Hiroyuki Kuwano, Rikkunshito, a traditional Japanese medicine, Suppresses cisplatin-induced anorexia in humans, *Clinical and Experimental Gastroenterology*, **4**, 291-296, 2011.
- 17) Saika, Y., Clinical usefulness of Bakumondo-to in enalapril-induced dry cough. *Kampo Immuno-allergy*, **6**, 44-49, 1991.
- 18) Sasaki, H., Usefulness of Bakumondo-to in senile chronic respiratory disease patients having difficulty in expectoration: comparison with bromhexine hydrochloride preparations. *Kampo Immuno-allergy*, **7**, 139-145, 1993.
- 19) Irifune, K., Hamada, H., Ito, R., Katayama, H., Watanabe, A., Kato, A., Miyoshi, S., Hamaguchi, N., Toyozawa, R., Hamaguchi, S., Abe, M., Nishimura, K., Higaki, J., Antitussive effect of bakumondo-to a fixed kampo medicine (six herbal components) for treatment of post-infections prolonged cough: controlled clinical pilot study with 19 patients. *Phytomedicine*, **18** (8-9), 630-633, 2011.

- 20) Saruwatari, J., Hisaeda, S., Higa, Y., Tomiyasu, Y., Nakagawa, K., Ishizaki, T., The in-vitro effect of bakumondo-to (TJ-29), a traditional Japanese medicine used for treatment of chronic airway disease, on cytochrome P450 1A2, xanthine oxidase and N-acetyltransferase 2 activity in man. *J.Pharm. Pharmacol*, **56** (9), 1171-1177, 2004.
- 21) ツムラグループ コーポレートレポート 2015, 株式会社ツムラ コーポレート・コミュニケーション室環境・社会活動グループ, 43, 2015.
〈<http://www.tsumura.co.jp/corporate/csr/report/ebook/2015/index.html#page=1>〉, 2016. 12. 1
- 22) ツムラ麦門冬湯エキス顆粒(医療用)添付文書, 株式会社ツムラ, 2007年5月改訂.
- 23) 咳嗽に関するガイドライン第2版, 咳嗽に関するガイドライン作成委員会, メディカルビュー社, 2012.
- 24) 宮田 健, 麦門冬湯の鎮咳機序, *Modern Physician*, **26** (11), 1700-1702, 2006.
- 25) Ohno, S., Suzuki, T., Dohi, Y., The effect of bakumondo-to on salivary secretion in Sjögren syndrome. *Ryumachi*, **30** (1), 10-16, 1990.
- 26) Yoneda, K., Matsumoto, I., Sutoh, F., Higashi, R., Nunoya, K., Nakade, S., Miyata, Y., Ogawa, M., In vitro metabolism and inhibitory effects of pranlukast in human liver microsomes. *Biol. Pharm. Bull.*, **32**, 688-693, 2009.
- 27) Dekhuijzen, P.N., Koopmans, P.P., Pharmacokinetic profile of zafirlukast. *Clin. Pharmacokinet.*, **41** (2), 105-114, 2002.
- 28) Backman, J.T., Filppula, A.M., Niemi, M., Neuvonen, P.J., Role of cytochrome P450 2C8 in drug metabolism and interactions. *Pharmacol. Rev.*, **68** (1), 168-241, 2016.
- 29) Tjia, J.F., Colbert, J., Back, D.J., 1996. Theophylline metabolism in human liver microsomes: inhibition studies. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **276** (3), 912-917, 1996.
- 30) 高橋 芳樹, 鎌滝 哲也, 肝薬物代謝の最近の進歩, 肝臓, 42 巻, 6 号, 288-296, 2001.
- 31) Yoichiro Isohama, Kana Kurata, Hirohumi Kai, Kazuo Takahama and Takeshi Miata, Bakumondo-to (Mai-Men- Dong Tang) increases intracellular cAMP in alveolar type II cells: Bakumondo-to stimulates production and inhibits degradation of cAMP, *Journal of Traditional Medicines*, **18**, 15-19, 2001.

- 32) 千葉 寛, チトクローム P450 を介した薬物相互作用, *ファルマシア*, **31**, 992-996, 1995.
- 33) Marika T. Granfors, MB, Janne T. Backman, MD, Mikko Neuvonen, MSc, Jouni Ahonen, MD, and Pertti J. Neuvonen, MD, Fluvoxamine drastically increases concentrations and effects of tizanidine: A potentially hazardous interaction, *Clin. Pharmacol. Ther.*, **75** (4), 331-341, 2004.
- 34) R.Scott Obach, F. Ryder Tim, Metabolism of ramelteon in human liver microsomes and correlation with the effect of fluvoxamine on ramelteon pharmacokinetics, *Drug metabolism and disposition the biological fate of chemicals*, **38** (8): 1381-1391, 2010.
- 35) Andrew J Bradley and Alan J Lenox-Smith, Does adding noradrenaline reuptake inhibition to selective serotonin reuptake inhibition improve efficacy in patients with depression? A systematic review of meta-analyses and large randomized pragmatic trials, *Journal of Psychopharmacology*, **27** (8), 740-758, 2013.
- 36) Cornelia Weber, PhD, Lunger Banken, PhD, Herbert Birnboeck, PhD, and Rauner Schulz, MD, Effect of the Endothelin-Receptor Antagonist Bosentan on the Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Warfarin, *Clin. Pharmacol.*, **39**, 847-854, 1999.
- 37) Chang, T.K., Chen, J., Benetto, S.A., In vitro effect of standardized ginseng extracts and individual ginsenosides on the catalytic activity of human CYP1A1, CYP1A2, and CYP1B1. *Drug Metab. Dispos.*, **30** (4), 378-384, 2002.
- 38) Imaoka, S., Yamada, T., Hiroi, T., Hayashi, K., Sasaki, T., Yabusaki, Y., Funae, Y., Multiple forms of human P450 expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. Systematic characterization and comparison with those of the rat. *Biochem. Pharmacol.*, **51** (8), 1041-1050, 1996.
- 39) Karonen, T., Neuvonen, P.J., Backman, J.T., CYP2C8 but not CYP3A4 is important in the pharmacokinetics of montelukast. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **73** (2), 257-267, 2012.

論文目録

Yasuhara M., Tayama Y., Kashiwagi T., Sawa A., Kihira K., Miyake K.,
Effect of Bakumondo-to on cytochrome P450 activities in rat liver microsomes.
Journal of King Saud University Science **28**(4), 198-202, 2016.

謝辞

本研究の終了に臨み、広島国際大学大学院薬学研究科 三宅 勝志教授に心から御礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり、直接ご指導並びに御助言を戴きました広島国際大学大学院薬学研究科 佐和 章弘教授、田山 剛崇准教授に深く感謝いたします。

また、本研究の審査をして頂きました広島国際大学大学院薬学研究科 森 信博教授、池田 潔教授に感謝いたします。

最後に、本研究に御協力戴き、博士課程をより充実した時間にして下さった広島国際大学薬学部薬学科医療薬学研究センターの皆様に感謝いたします