

Analytical Methods

Determination of tolbutamide and 4-hydroxytolbutamide in plasma and urine. The concentrations of tolbutamide and 4-hydroxytolbutamide in plasma and urine were measured by high-performance liquid chromatography (HPLC) method of Csillag et al²³ with minor modification. Briefly, 0.25 mL of 1 N hydrochloride and 3 mL of n-hexane:ethyl ether (7:3, volume/volume [v/v]) were added to the plasma or urine sample (0.25 mL) containing gliclazide (1 µg) as internal standard. After being shaken, the mixture was centrifuged at 3000g for 3 minutes. The organic phase was transferred to the glass tube and evaporated under nitrogen stream of gas at 40°C in water bath. The dry residue was dissolved in 200 µL solvent A (acetonitrile, methanol, and 0.1% acetic acid; 16:4:80 v/v) and used as HPLC sample. The HPLC analysis was constructed with a pump (CCPS, Tosoh Co, Tokyo, Japan), a UV detector (UV8020, Tosoh Co) and injector (AS-8020 Tosoh Co). The analysis was performed on an ODS analytical column (150 × 4.6-mm internal diameter) with a 5-µm particle size (Atlantis dC18, Waters Corp, Milford, Mass). The mobile phase for assay consisted of solvent A and solvent B (acetonitrile and 0.1% acetic acid; 50:50 v/v) at a flow rate of 1 mL/min. The drugs were eluted from 0 to 25 minutes by using solvent A, and then the linear gradient of solvent B from 0% to 100% was applied on the column from 25 to 45 minutes. The HPLC column was maintained at 40°C, and the column eluent was monitored at a wavelength of 235 nm. The limit of detection was 0.1 µg/mL for tolbutamide and 10 ng/mL for 4-hydroxytolbutamide. Interassay coefficients of variation (CV) were less than 14.2% for tolbutamide and 14.2% for 4-hydroxytolbutamide.

Determination of midazolam and 1'-hydroxymidazolam in plasma. The concentrations of midazolam and 1'-hydroxymidazolam in plasma were measured by HPLC as previously described with minor modification.²⁴ Briefly, 1 mL of 1 M sodium phosphate buffer (pH 9) and 3 mL of diethyl ether:methylene chloride (7:3, v/v) were added to the plasma sample (1 mL) containing nitrazepam (1 µg) as internal standard. After being shaken, the mixture was centrifuged at 3000g for 5 minutes. The organic phase was transferred to the glass tube and evaporated under nitrogen stream of gas at 40°C in water bath. The dry residue was dissolved in 200 µL mobile phase and used as HPLC sample. The HPLC analysis was constructed with a pump (CCPS, Tosoh Co), a

UV detector (8020UV, Tosoh Co), and injector (AS-8020 Tosoh Co). The analysis was performed on an ODS analytical column (150 × 4.6-mm internal diameter) with a 5-µm particle size (Atlantis dC18, Waters Corp). The mobile phase for assay consisted of acetonitrile, methanol, 1% sodium acetate, and tetrahydrofuran (14:24:60:2, v/v) at a flow rate of 1 mL/min. The HPLC column was maintained at 40°C, and the column eluent was monitored at a wavelength of 245 nm. The limit of detection was 1 ng/mL for midazolam and 1'-hydroxymidazolam. Interassay CV were less than 20.9% for midazolam and 13.8% for 1'-hydroxymidazolam.

Data Analysis

Pharmacokinetic parameters for tolbutamide, 4-hydroxytolbutamide, midazolam, and 1'-hydroxymidazolam were estimated by noncompartmental analysis from the concentration-time profile in plasma. The elimination half-life ($t_{1/2}$) during the log-linear terminal phase was calculated from the elimination rate constant determined by linear regression analysis, and the area under the concentration-versus-time curve ($AUC_{0-\infty}$) was calculated by trapezoidal rule for the observed values and subsequent extrapolation to infinity. The oral clearance (CL/F) was calculated as $dose/AUC_{0-\infty}$. The maximum plasma concentration (C_{max}) was estimated directly from observed plasma concentration-time data. The metabolic ratio of tolbutamide, defined as the ratio of amount for 4-hydroxytolbutamide to tolbutamide, was estimated in the 24-hour postdose urine collection. To compare the pharmacodynamic effect of tolbutamide before and after the intake of GBE, the area under the concentration-versus-time curve (AUC_{0-2}) for changes of blood glucose levels was calculated by trapezoidal rule from 0 to 120 minutes.

Statistical Analysis

All data are presented as mean ± SD or mean with 95% confidence interval (CI) in the text and tables. In figures, data are presented as mean ± SE. Statistical analysis of all data was performed by paired *t* test. The level of statistical significance was accepted at $P < .05$.

RESULTS

All subjects completed the study. They experienced no adverse events, and the oral administration of a high dose of GBE for 28 days and all blood-drawing

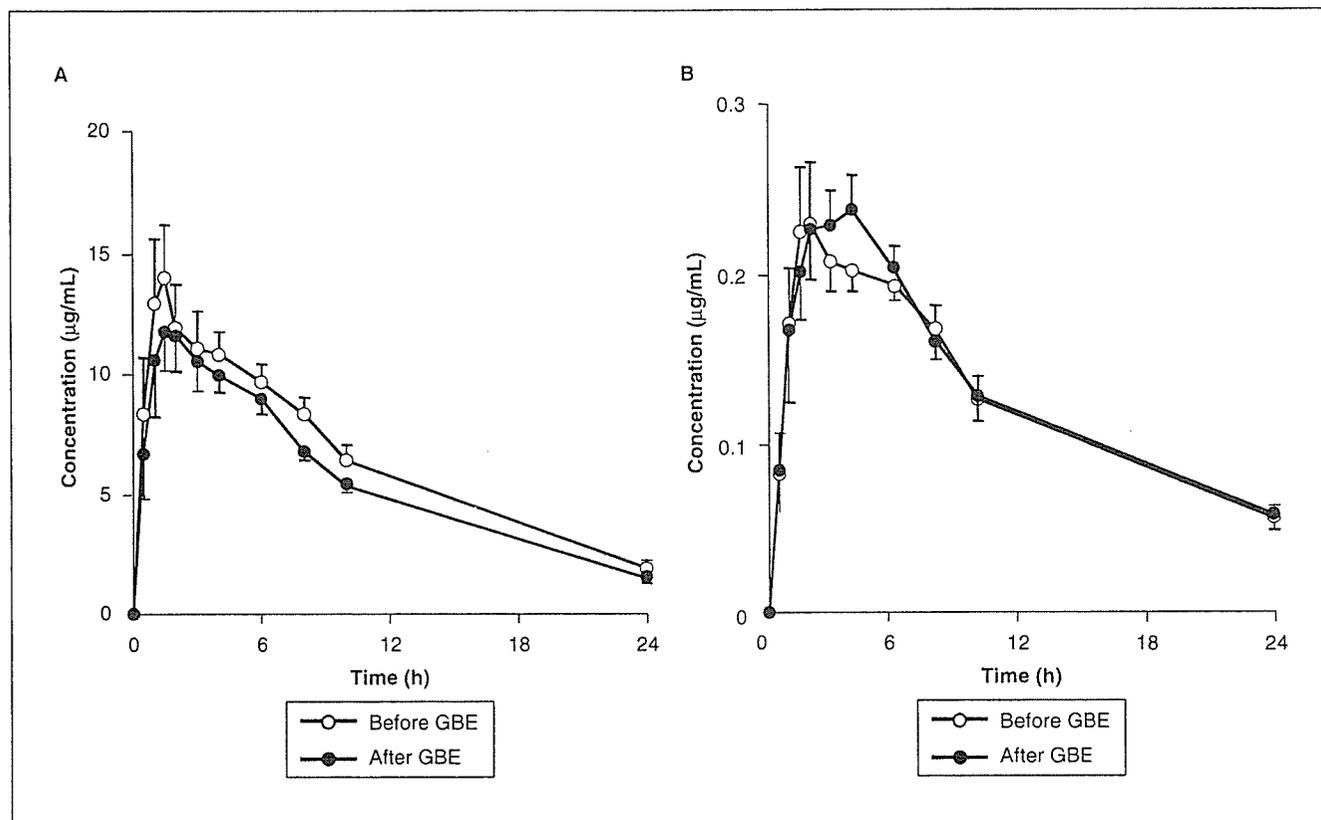


Figure 1. Plasma concentration versus time curves of tolbutamide (A) and 4-hydroxytolbutamide (B) following single oral administration of tolbutamide (125 mg) before and after repeated treatment with Ginkgo biloba extract (360 mg/d) for 28 days in healthy volunteers. Each point represents mean \pm SE of 10 subjects.

procedures were well tolerated. After the completion of the protocol, all subjects had normal follow-up laboratory indices.

Effects of GBE on Pharmacokinetics of Tolbutamide

Figure 1 shows the mean plasma concentration-time profiles of tolbutamide and 4-hydroxytolbutamide in healthy volunteers before and after repeated oral administration of GBE. The plasma concentrations of tolbutamide reached the maximum at 2 hours after oral administration of the drug and then gradually decreased (Figure 1A). Plasma level of 4-hydroxytolbutamide reached the maximum levels at 2 to 4 hours after the administration (Figure 1B). The pharmacokinetic parameters of tolbutamide and 4-hydroxytolbutamide in plasma were calculated from these time-concentration profiles. As shown in Table I, $AUC_{0-\infty}$ of tolbutamide was decreased significantly (16%) by the treatment with GBE. There

were no significant differences in other pharmacokinetic parameters. In C_{max} and $AUC_{0-\infty}$ for 4-hydroxytolbutamide, there were no significant differences before and after oral administration of GBE. The ratio of $AUC_{0-\infty}$ for tolbutamide to 4-hydroxytolbutamide in plasma was significantly (17%) reduced by the treatment with GBE. The metabolic ratio for tolbutamide in urine was not altered by the treatment with GBE.

In the subject with *CYP2C9**1/*3 genotype, $AUC_{0-\infty}$ of tolbutamide was 2-fold higher than that of subjects with *CYP2C9**1/*1, whereas the similar decrease of $AUC_{0-\infty}$ after GBE treatment was obtained among both genotypes of *CYP2C9* (data not shown).

Effects of GBE on Pharmacodynamics of Tolbutamide

To evaluate the influence of repeated oral administration of GBE on pharmacodynamics of tolbutamide, the blood glucose level was measured after oral admini-

Table I Pharmacokinetic Parameters of Tolbutamide and 4-hydroxytolbutamide Following Single Oral Administration of Tolbutamide (125 mg) Before and After Repeated Treatment With GBE (360 mg/d) for 28 Days in Healthy Volunteers

Pharmacokinetic Parameters	Before GBE	After GBE	Mean Difference (95% CI)	P
Tolbutamide				
C_{max} , $\mu\text{g/mL}$	16.3 \pm 4.6	14.0 \pm 4.9	-2.2 (-6.6, 2.9)	.2822
$t_{1/2}$, h	7.70 \pm 2.22	7.10 \pm 1.20	-0.60 (-1.8, 0.64)	.3033
$AUC_{0-\infty}$, h $\cdot\mu\text{g/mL}$	179 \pm 65	150 \pm 35	-29 (-57, 0.2)	.0489
CL/F, mL/h/kg	11.1 \pm 2.9	12.5 \pm 1.8	1.4 (-0.28, 3.0)	.0932
4-hydroxytolbutamide				
C_{max} , ng/mL	294 \pm 72	287 \pm 88	-6.5 (-97, 84)	.8747
$AUC_{0-\infty}$, h $\cdot\mu\text{g/mL}$	4.11 \pm 1.04	4.14 \pm 0.85	0.02 (-0.73, 0.77)	.9472
$AUC_{\text{tolbutamide}}/AUC_{\text{4-hydroxytolbutamide}}$	44.7 \pm 11.9	37.2 \pm 9.6	-7.5 (-13.5, -1.5)	.0203
Metabolic ratio	155 \pm 41	177 \pm 32	21.3 (-19.8, 59.4)	.2384

Each value represents mean \pm SD of 10 subjects. GBE, Ginkgo biloba extract; CI, confidence interval; C_{max} , peak plasma concentration; $t_{1/2}$, elimination half-life; $AUC_{0-\infty}$, area under concentration-versus-time curve, CL/F, oral clearance.

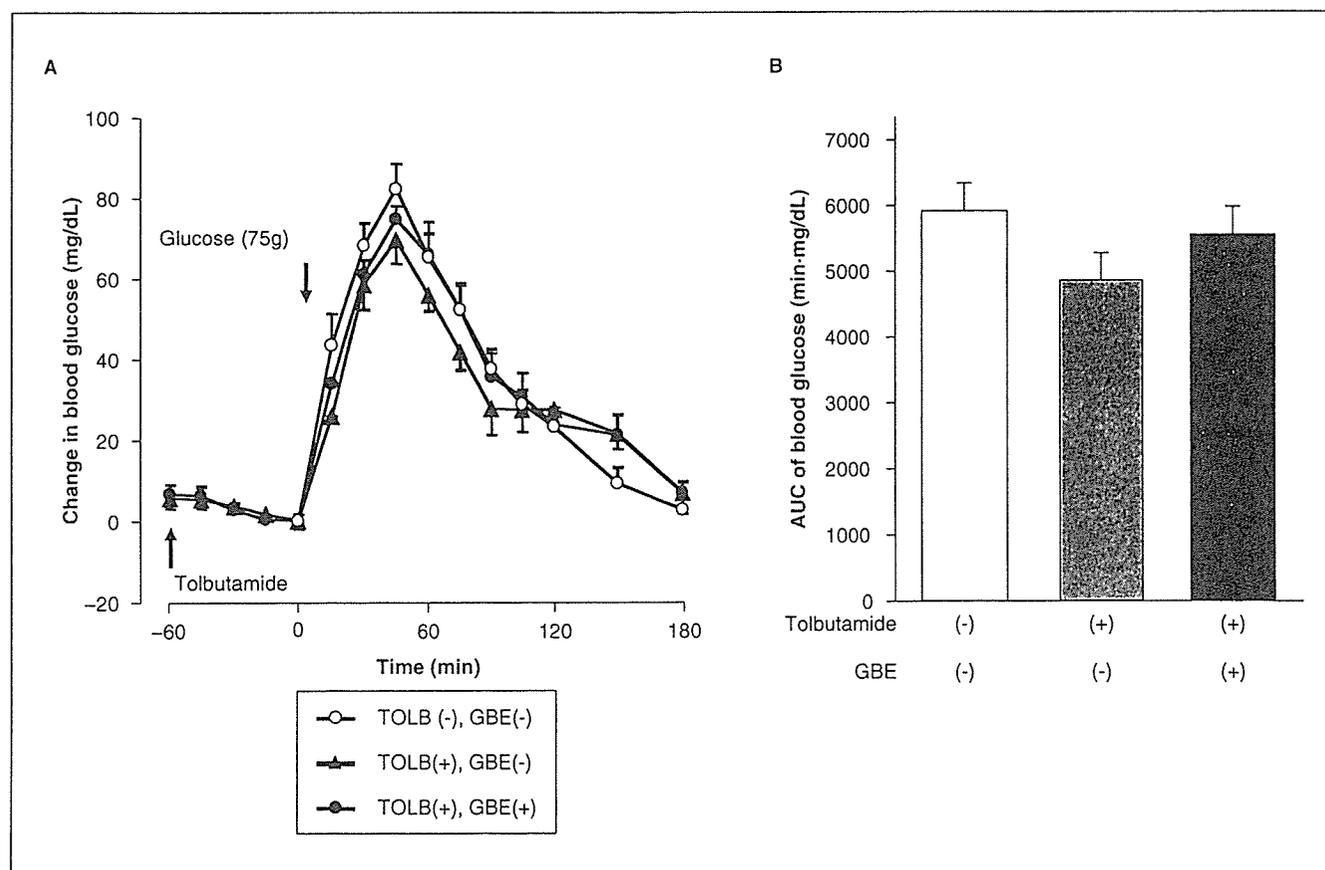


Figure 2. (A) Effects of repeated treatment with Ginkgo biloba extract (GBE) on increases of blood glucose levels after oral intake of a standardized 75-g glucose solution with and without tolbutamide administration in healthy volunteers. Subjects received glucose in pretrial phase, and they received glucose after single oral administration of tolbutamide (125 mg) before and after the treatment with GBE (360 mg/d) for 28 days. (B) Area under concentration-versus-time curve of increase in blood glucose levels in pretrial phase, before and after the treatment with GBE. The AUCs were calculated from the data in Figure 2A. Each column represents mean \pm SE of 10 subjects.

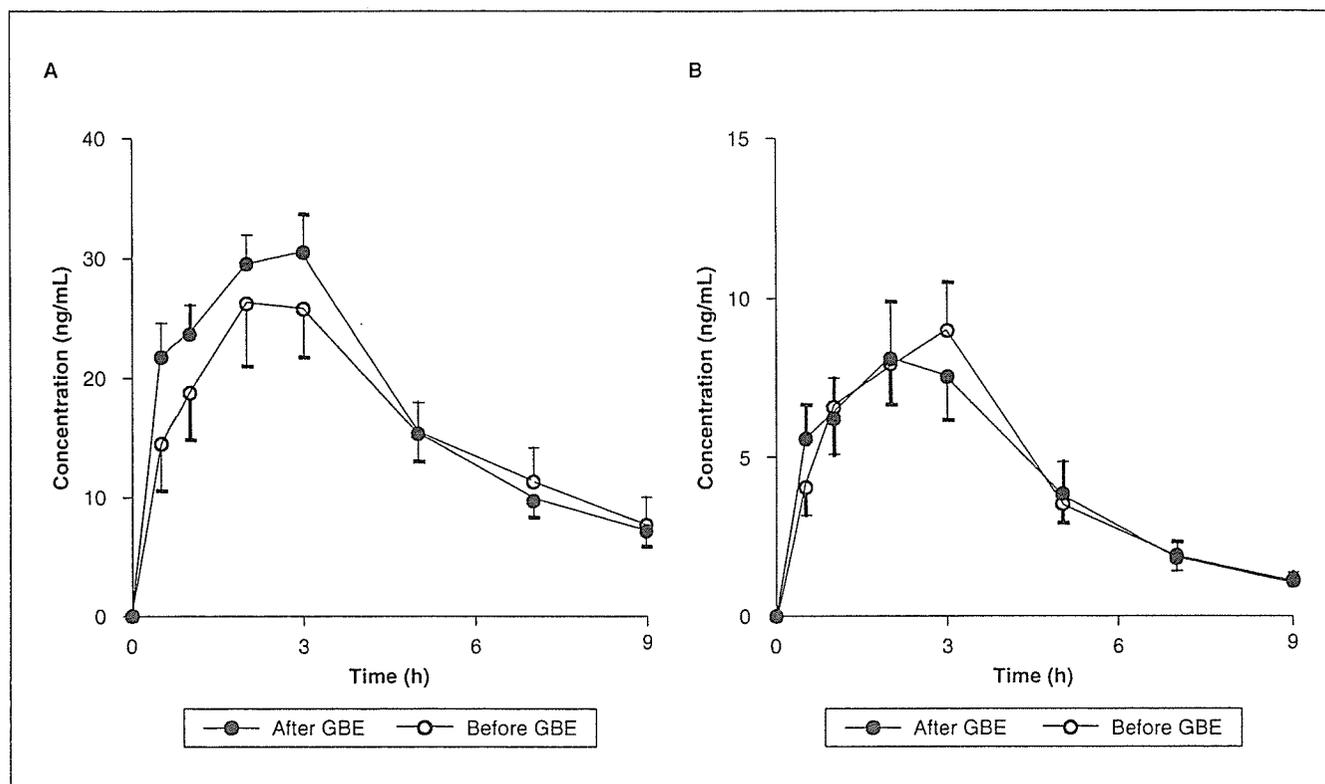


Figure 3. Plasma concentration versus time curves of midazolam (A) and 1'-hydroxymidazolam (B) after single oral administration of midazolam (8 mg) before and after repeated treatment with Ginkgo biloba extract (360 mg/d) for 28 days in healthy volunteers. Each point represents mean \pm SE of 10 subjects.

istration of tolbutamide in healthy volunteers. In each phase of this study, the blood glucose level was increased after the intake of glucose. The glucose level reached the maximal level at 45 minutes after the intake and returned to the basal levels at 180 minutes (Figure 2A). AUC_{0-2} for increase of blood glucose level from 0 to 120 minutes after the intake of glucose was 5870 ± 1260 min·mg/dL, and AUC of blood glucose level was lowered to 4830 ± 1380 min·mg/dL by the tolbutamide administration (Figure 2B). The GBE treatment tended to attenuate the AUC of blood glucose lowering effect of tolbutamide (4830 min·mg/dL vs 5510 min·mg/dL; $P = .1012$; mean difference, 680 min·mg/dL; 95% CI, -160 to 1540), although it was not statistically significant.

Effects of GBE on Pharmacokinetics of Midazolam

Figure 3 shows the time courses for plasma concentrations of midazolam and its metabolite, 1'-hydroxymidazolam after repeated oral administration of GBE in healthy volunteers. The GBE treatment

caused an increase in the plasma concentration of midazolam (Figure 3A) but little change in the 1'-hydroxymidazolam level (Figure 3B). $AUC_{0-\infty}$ was significantly (25%) increased by the GBE treatment and oral clearance was significantly (26%) decreased (Table II). The $t_{1/2}$ and other parameters were not significantly changed by GBE. Furthermore, GBE did not significantly affect C_{max} and $AUC_{0-\infty}$ of 1'-hydroxymidazolam and the $AUC_{0-\infty}$ ratio of midazolam to 1'-hydroxymidazolam (Table II).

DISCUSSION

The present study was undertaken to investigate the effects of oral administration of GBE for 28 days on pharmacokinetics of tolbutamide and midazolam in healthy volunteers. It has been shown that the treatment with GBE significantly decreased both $AUC_{0-\infty}$ of tolbutamide and the ratio of $AUC_{0-\infty}$ of tolbutamide to 4-hydroxytolbutamide. Concomitantly, the GBE treatment tended to reduce the hypoglycemic effect of tolbutamide. In contrast, $AUC_{0-\infty}$

Table II Pharmacokinetic Parameters of Midazolam and 1'-hydroxymidazolam Following Single Oral Administration of Midazolam (8 mg) Before and After Repeated Treatment With GBE (360 mg/d) for 28 Days in Healthy Volunteers

Pharmacokinetic Parameters	Before GBE	After GBE	Mean Difference (95% CI)	P
Midazolam				
C_{max} , ng/mL	28.3 ± 14.1	34.0 ± 9.7	-5.7 (-13.5, 2.03)	.1293
$t_{1/2}$, h	2.87 ± 1.59	3.47 ± 1.53	-0.47 (-1.56, 0.62)	.3540
$AUC_{0-\infty}$, h·ng/mL	167 ± 104	208 ± 101	-36 (-60, -13)	.0062
CL/F, L/h/kg	0.865 ± 0.357	0.639 ± 0.208	0.224 (0.08, 0.37)	.0072
1'-hydroxymidazolam				
C_{max} , ng/mL	9.34 ± 4.41	8.82 ± 5.34	0.52 (-1.32, 2.36)	.5401
$AUC_{0-\infty}$, h·ng/mL	41.6 ± 19.4	43.1 ± 24.5	-1.5 (-8.2, 5.2)	.6255
$AUC_{midazolam}/AUC_{1'-hydroxymidazolam}$	5.02 ± 3.66	5.94 ± 3.67	-0.91 (-2.00, 0.17)	.0885

Each value represents mean ± SD of 10 subjects. GBE, Ginkgo biloba extract; CI, confidence interval; C_{max} , peak plasma concentration; $t_{1/2}$, elimination half-life; $AUC_{0-\infty}$, area under concentration-versus-time curve, CL/F, oral clearance.

of midazolam was significantly increased by the repeated administration of GBE and oral clearance of this drug was decreased.

The ginkgo product chosen for the present study contained the standardized *Ginkgo Biloba* extract, EGb 761, which has been investigated in published clinical trials.^{14,19,25-27} To clarify the effect of GBE on pharmacokinetics and pharmacodynamics of tolbutamide and midazolam, healthy volunteers were treated with GBE at an oral dose of 360 mg/d for 28 days, being a higher dose and longer period than those of GBE previously reported.¹⁷⁻²² All subjects tolerated GBE well during the study.

Tolbutamide is a first-generation oral sulfonylurea hypoglycemic agent that is still used frequently for the treatment of type 2 diabetes mellitus in many countries. It is metabolized to 4-hydroxytolbutamide by CYP2C9 in the liver. This is the rate-limiting step in its metabolism.^{28,29} In this study, $AUC_{0-\infty}$ of tolbutamide after GBE intake was significantly lower than that before GBE intake. In addition, the ratio of $AUC_{0-\infty}$ of tolbutamide to 4-hydroxytolbutamide was significantly reduced by the treatment with GBE. Such change of tolbutamide pharmacokinetics appears to be consistent with our previous animal study that the activity of CYP2C9 (or CYP2C6 in rats), evaluated by (s)-warfarin 7-hydroxylation in young and aged rats was significantly (2.1- and 4.7-fold, respectively) increased by repeated oral administration of GBE for 5 days.³⁰ Thus, there is a possibility that GBE treatment induces CYP2C9 in healthy volunteers as well as in rats, resulting in significant decrease of $AUC_{0-\infty}$ of tolbutamide and its $AUC_{0-\infty}$ ratio to 4-hydroxytolbutamide. In addition, tolbutamide is highly protein bound, and previous interaction stud-

ies have shown that the mechanism by which oral clearance was increased was due to an increase in the percentage unbound.³¹ In this context, additive effects of other factors such as changes in protein binding affecting drug disposition cannot be ruled out.

There was a tendency of attenuation of hypoglycemic effect of tolbutamide after the long-term treatment with GBE. In this connection, our previous study has clearly shown that continuous oral administration of GBE in rats significantly attenuated the hypoglycemic action of tolbutamide and that the influence of GBE was greater in aged rats than that in young rats.³⁰ These findings, therefore, suggest that coadministration with GBE could be associated with decreased plasma concentration of tolbutamide in patients with diabetes, resulting in a decreased hypoglycemic effect. However, we cannot exclude the possibility that GBE has an independent effect on glycemic control caused by a possible stimulatory effect on pancreatic β -cell function and increased insulin metabolic clearance.^{25,26} Very recently, it has been reported that GBE did not affect the pharmacokinetics and pharmacodynamics of warfarin¹⁷ and flurbiprofen,²² which are also predominantly metabolized by CYP2C9 in healthy subjects. The flurbiprofen study involved acute administration of GBE (3 times of 120 mg), so an inductive effect would not be detected. However, the warfarin study involved 7 days of GBE administration and found absolutely no effect on S-warfarin pharmacokinetics. The effect is also not consistent from pharmacokinetic perspective with the case reports in which bleeding effects were reported.^{32,33} The enhanced anticoagulant effect could be due to other mechanisms such as effects on platelets. Although the reason for the difference from

our data is unclear, it may be, in part, due to the period of treatment and also to the substrate difference between tolbutamide and these drugs.

In contrast to the pharmacokinetics of tolbutamide, the metabolism of midazolam might be inhibited by the repeated treatment with GBE. $AUC_{0-\infty}$ of midazolam was significantly increased and oral clearance was decreased by the treatment with GBE. It is considered that midazolam is predominantly metabolized to 1'-hydroxymidazolam by CYP3A4 and thus this drug is referred to as an in vivo marker of CYP3A4 activity.^{34,35} It is, therefore, considered that oral administration of GBE for 28 days may inhibit CYP3A4, thereby resulting in the increased plasma concentrations of midazolam. Ohnishi et al³⁶ has shown that GBE increased oral bioavailability of diltiazem, a typical substrate for CYP3A, in rats by inhibiting both intestinal and hepatic metabolism via a mechanism-based manner. In spite of the increased $AUC_{0-\infty}$ of midazolam, the $t_{1/2}$ of the drug was little altered by the treatment with GBE in healthy volunteers (Table II). Thus, it is considered that the increase in oral bioavailability of midazolam and/or the inhibition of CYP3A4 activity may be induced by the repeated treatment with GBE. An increase in AUC of midazolam without a change in half-life after the treatment with grapefruit juice has also been reported.³⁷ These results should be due to the inhibition of intestinal metabolism by higher concentration of the interacting substance in the intestine.

Although a significant interaction was observed between midazolam and GBE in this study, ginkgo constituents have been suggested to both inhibit and paradoxically induce CYP3A4, depending on the study design.¹⁹⁻²¹ Our data are agreeable with the preliminary observation by Smith et al²⁰ who showed 53% increase in the mean plasma concentration of nifedipine at the peak time after the administration in healthy volunteers receiving repeated treatment with GBE (120 mg/d) for 18 days, being suggestive of CYP3A4 inhibition. On the other hand, Markowitz et al¹⁹ revealed a tendency toward decrease in AUC of alprazolam after 14 days' administration of GBE (240 mg/d). In contrast to these findings, Gurley et al²¹ showed that repeated treatment with GBE (240 mg/d) for 28 days produced little significant changes in the ratio of serum 1'-hydroxymidazolam/midazolam 1 hour after oral administration of midazolam. However, these authors have determined serum concentrations of midazolam and the metabolite only at one time point. Such distinction in the GBE effect between investigators may result from the study design (dose and treatment period of GBE), probe drugs used to monitor CYP3A4 activity, and/or racial difference.

In conclusion, the present study suggests that the combination of GBE and drugs should be cautious in terms of the potential interactions, especially in elderly patients or patients treated with drugs with relatively narrow therapeutic windows.

The authors thank Mrs Naomi Hashimoto for assistance in conducting the clinical study. The authors also thank Dr Takashi Daimon (University of Shizuoka, Shizuoka, Japan) for his helpful insights of the statistical analysis.

Financial disclosure: None declared.

REFERENCES

1. Dergal JM, Gold JL, Laxer DA, et al. Potential interactions between herbal medicines and conventional drug therapies used by older adults attending a memory clinic. *Drugs Aging*. 2002;19:879-886.
2. Ness J, Johnson D, Nisly N. "Polyherbacy": herbal supplements as a form of polypharmacy in older adults. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2003;58:M478.
3. Kaufman DW, Kelly JP, Rosenberg L, Anderson TE, Mitchell AA. Recent patterns of medication use in the ambulatory adult population of the United States: the Slone survey. *JAMA*. 2002;287:337-344.
4. Klepser TB, Doucette WR, Horton MR, et al. Assessment of patient's perceptions and beliefs regarding herbal therapies. *Pharmacotherapy*. 2000;20:83-87.
5. Brazier NC, Levine MAH. Drug-herb interaction among commonly used conventional medicines: a compendium for health care professionals. *Am J Ther*. 2003;10:163-169.
6. Huang SM, Lesko LJ. Drug-drug, drug-dietary supplement, and drug-citrus fruit and other food interactions: what have we learned? *J Clin Pharmacol*. 2004;44:559-569.
7. Barone GW, Gurley BJ, Ketel BL, Abul-Ezz SR. Herbal dietary supplements: a source for drug interactions in transplant recipients. *Transplantation*. 2001;71:239-241.
8. Hebert MF, Park JM, Chen YL, Akhtar S, Larson AM. Effects of St. John's Wort (*Hypericum perforatum*) on tacrolimus pharmacokinetics in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol*. 2004;44:89-94.
9. Wang Z, Gorski JC, Hamman MA, Huang S, Lesko LJ, Hall SD. The effects of St John's wort (*Hypericum perforatum*) on human cytochrome P450 activity. *Clin Pharmacol Ther*. 2001;70:317-326.
10. Ameer B, Weintraub RA. Drug interactions with grapefruit juice. *Clin Pharmacokinet*. 1997;33:103-121.
11. Soldner A, Christians U, Susanto M, Wachter VJ, Silverman JA, Benet LZ. Grapefruit juice activates P-glycoprotein-mediated drug transport. *Pharm Res*. 1999;16:478-485.
12. Diamond BJ, Shiflett SC, Feiwei N, et al. Ginkgo biloba extract: mechanisms and clinical indications. *Arch Phys Med Rehabil*. 2000;81:668-678.
13. Joshi BS, Kaul PN. Alternative medicine: herbal drugs and their critical appraisal, I. *Progress Drug Res*. 2001;56:1-76.
14. Le Bars PL, Katz MM, Berman N, Iitl TM, Freedman AM, Schatzberg AF. A placebo-controlled, double-blind, randomized trial of an extract of Ginkgo biloba for dementia. North American EGb Study Group. *JAMA*. 1997;278:1327-1332.
15. Zou L, Harkey MR, Henderson GL. Effects of herbal components on cDNA-expressed cytochrome P450 enzyme catalytic activity. *Life Sci*. 2002;71:1579-1589.

16. von Moltke LL, Weemhoff JL, Bedir E, et al. Inhibition of human cytochromes P450 by components of Ginkgo biloba. *J Pharm Pharmacol*. 2004;56:1039-1044.
17. Jiang X, Williams KM, Liauw WS, et al. Effect of ginkgo and ginger on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of warfarin in healthy subjects. *Br J Clin Pharmacol*. 2005;59:425-432.
18. Engelsen J, Nielsen JD, Winther K. Effect of coenzyme Q10 and Ginkgo biloba on warfarin dosage in stable, long-term warfarin treated outpatients. A randomised, double blind, placebo-crossover trial. *Thromb Haemo*. 2002;87:1075-1076.
19. Markowitz JS, Donovan JL, Lindsay DeVane C, Sipkes L, Chavin KD. Multiple-dose administration of Ginkgo biloba did not affect cytochrome P-450 2D6 or 3A4 activity in normal volunteers. *J Clin Psychopharmacol*. 2003;23:576-581.
20. Smith M, Lin MK, Zheng YP. An open trial of nifedipine-herb interactions: nifedipine with St John's wort, ginseng or ginkgo biloba [abstract]. *Clin Pharmacol Ther*. 2001;69:P86.
21. Gurley BJ, Gardner SF, Hubbard MA, et al. Cytochrome P450 phenotypic ratios for predicting herb-drug interactions in humans. *Clin Pharmacol Ther*. 2002;72:276-287.
22. Greenblatt DJ, von Moltke LL, Luo Y, et al. Ginkgo biloba does not alter clearance of flurbiprofen, a cytochrome P450-2C9 substrate. *J Clin Pharmacol*. 2006;46:214-221.
23. Csillag K, Vereczkey L, Gachalyi B. Simple high-performance liquid chromatographic method for the determination of tolbutamide and its metabolites in human plasma and urine using photodiode-array detection. *J Chromatogr*. 1989;490:355-363.
24. Puglisi CV, Pao J, Ferrara FJ, de Silva JA. Determination of midazolam (Versed) and its metabolites in plasma by high-performance liquid chromatography. *J Chromatography A*. 1985;344:199-209.
25. Kudolo GB. The effect of 3-month ingestion of Ginkgo biloba extract on pancreatic beta-cell function in response to glucose loading in normal glucose tolerant individuals. *J Clin Pharmacol*. 2000;40:647-654.
26. Kudolo GB. The effect of 3-month ingestion of Ginkgo biloba extract (EGb 761) on pancreatic beta-cell function in response to glucose loading in individuals with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Pharmacol*. 2001;41:600-611.
27. McKenna DJ, Jones K, Hughes K. Efficacy, safety, and use of ginkgo biloba in clinical and preclinical applications. *Altern Ther Health Med*. 2001;7:70-90.
28. Relling MV, Aoyama T, Gonzalez FJ, Meyer UA. Tolbutamide and mephenytoin hydroxylation by human cytochrome P450s in the CYP2C subfamily. *J Pharm Exp Ther*. 1990;252:442-447.
29. Srivastava PK, Yun CH, Beaune PH, Ged C, Guengerich FP. Separation of human liver microsomal tolbutamide hydroxylase and (S)-mephenytoin 4'-hydroxylase cytochrome P-450 enzymes. *Mol Pharmacol*. 1991;40:69-79.
30. Sugiyama T, Kubota Y, Shinozuka K, Yamada S, Wu J, Umegaki K. Ginkgo biloba extract modifies hypoglycemic action of tolbutamide via hepatic cytochrome P450 mediated mechanism in aged rats. *Life Sci*. 2004;75:1113-1122.
31. Gorski JC, Hall SD, Becker P, Affrime MB, Cutler DL, Haehner-Daniels B. In vivo effects of interleukin-10 on human cytochrome P450 activity. *Clin Pharmacol Ther*. 2000;67:32-43.
32. Rosenblatt M, Mindel J. Spontaneous hyphema associated with ingestion of Ginkgo biloba extract. *N Eng J Med*. 1997;336:1108.
33. Matthews MK. Association of Ginkgo biloba with intracerebral haemorrhage. *Neurology*. 1998;5:1933.
34. Kronbach T, Mathys D, Umeno M, Gonzalez FJ, Meyer UA. Oxidation of midazolam and triazolam by human liver cytochrome P450III A4. *Mol Pharmacol*. 1989;36:89-96.
35. Lee JI, Chaves-Gnecco D, Amico JA, Kroboth PD, Wilson JW, Frye RF. Application of semisimultaneous midazolam administration for hepatic and intestinal cytochrome P450 3A phenotyping. *Clin Pharmacol Ther*. 2002;72:718-728.
36. Ohnishi N, Kusuvara M, Yoshioka M, et al. Studies on interactions between functional foods or dietary supplements and medicines, I: effects of Ginkgo biloba leaf extract on the pharmacokinetics of diltiazem in rats. *Biol Pharm Bull*. 2003;26:1315-1320.
37. Veronese ML, Gillen LP, Burke JP, et al. Exposure-dependent inhibition of intestinal and hepatic CYP3A4 in vivo by grapefruit juice. *J Clin Pharmacol*. 2003;43:831-839.

トルブタミドおよびミダゾラムの体内動態に対するイチョウ葉エキスの影響

李 暁東^{*1} 内田信也^{*1} 山田 浩^{*2} 渡邊裕司^{*1}
大橋京一^{*1} 隠岐知美^{*3} 大森由貴^{*3} 丸山修治^{*3}
梅垣敬三^{*4} 山田静雄^{*3} 木村良平^{*3}

【目的】近年健康食品が一般市場で容易に手に入る時代となり、その安全性、特に医薬品を併用した場合の相互作用が看過できない問題となっている。医薬品との相互作用を引き起こす健康食品には、人における主要な薬物代謝酵素であるチトクローム P450 (CYP) に影響を与え作用するものがあり、西洋オトギリ草は CYP3A4 を誘導することが知られている。イチョウ葉エキス (*Ginkgo biloba extract*, GBE) は記憶や注意・集中などの認知機能の改善を目的として、わが国では栄養補助食品として市販されている。既に我々は GBE を投与したラット肝臓において CYP が誘導されることを報告した。本研究では GBE がヒトの CYP に及ぼす影響を明らかにする目的で、健康人に GBE を連日投与し CYP2C9 の基質であるトルブタミドおよび CYP3A4 の基質であるミダゾラムの体内動態について検討した。

【方法】健康男性 10 名より文書同意を取得した。対象患者の年齢は 24.9±2.6 (平均値±SD)、体重は 68.6±7.1 であり、すべて非喫煙者であった。試験前日 22:00 より絶食とし、翌日 10:00 にグルコース(75g)を経口投与後 180 分まで経時的に血液中グルコース濃度を測定した。14 日後、同様に前夜より絶食下で、9:00 にトルブタミド(125 mg)を経口投与した。さらに 10:00 にミダゾラム(8 mg)およびグルコース(75g)を経口投与し、投与後 24 時間まで経時的に血漿中薬物濃度と血液中グルコース濃度を測定した。また 24 時間の蓄尿を行い、尿中薬物量を測定した。翌日より GBE (360 mg/日)を分 3 食後に投与し、GBE 投与 28 日後に同様にトルブタミド、ミダゾラムおよびグルコースを投与し血中濃度を測定した。なお血漿と尿中のトルブタミドおよびミダゾラム濃度は HPLC 法により、血液中グルコース濃度は自己血糖測定器 (フリースタイルキッセイ) により測定した。

【結果】GBE 投与後において投与前に比べ、血漿中トルブタミド濃度は減少する傾向を示した (Fig. 1A)。GBE 投与後のトルブタミドの AUC は投与前に比べ 16%有意に減少した。他の薬物動態学的パラメータには有意な差異は認められなかった (Table 1)。また 4-OH トルブタミドのパラメータにおいては有意な変化を認めなかった。GBE 投与後における血漿中のトルブタミドと代謝物の AUC 比は投与

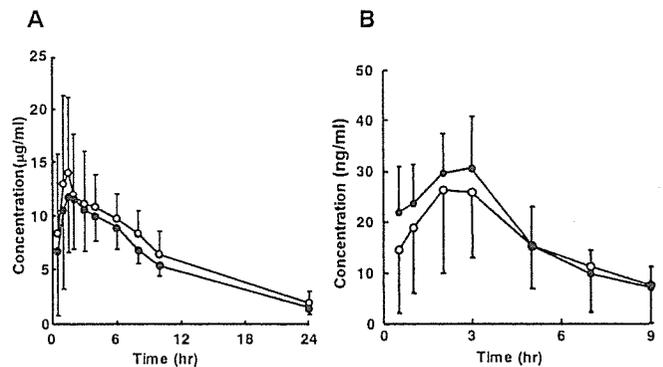


Fig. 1 イチョウ葉エキス投与前 (○) および 28 日間投与後 (●) におけるトルブタミド (A) およびミダゾラム (B) の血漿中濃度推移。データは Mean ±SD。

Table 1 イチョウ葉エキス投与前と 28 日間投与後におけるトルブタミドおよびミダゾラムの薬物動態学的パラメータ

Pharmacokinetic parameter	GBE 投与前	GBE 投与後
Tolbutamide		
AUC _{0-∞} (hr · mg/ml)	179 ± 65	150 ± 35*
CL _{tot} /F (ml/hr/kg)	11.1 ± 2.9	12.5 ± 1.8
MRT (hr)	11.2 ± 2.9	10.5 ± 1.9
Vd _{ss} /F (ml/kg)	120 ± 25	130 ± 28
Midazolam		
AUC _{0-∞} (hr · mg/ml)	167 ± 104	208 ± 101**
CL _{tot} /F (ml/hr/kg)	0.865 ± 0.357	0.639 ± 0.208**
MRT (hr)	5.33 ± 2.61	5.63 ± 1.69
Vd _{ss} /F (ml/kg)	4.34 ± 2.19	3.35 ± 0.70

Mean ± SD (n=10), *GBE 投与前との有意差、*P<0.05, **P<0.01
AUC_{0-∞}: area under concentration-time curve, CL_{tot}: total clearance, F: bioavailability, MRT: mean residence time, Vd_{ss}: volume of distribution at steady-state

前に比べ 17%有意に低値を示した。一方、尿中トルブタミドと代謝物の比には有意な差異は認められなかった。75g グルコース経口投与後の血液中グルコース濃度の 120 分までのトルブタミド投与前後の AUC 低下率は、GBE 投与前 (18%低下) と比較し投与後 (6%低下) で減少した。

GBE 投与後において投与前に比べ、血漿中ミダゾラム濃度は増加し (Fig. 1)、その AUC は投与前に比べ 25%有意に増加した。また経口クリアランスは 26%有意に減少した (Table 1)。

【考察】GBE (360 mg) の 28 日間投与後において CYP2C9 の基質であるトルブタミドの血漿中濃度が減少したことから、GBE 投与により CYP2C9 が誘導されることが示唆された。さらに 75g グルコース経口投与後におけるトルブタミドの血液中グルコース濃度上昇抑制作用が GBE 投与により減弱する傾向が認められた。一方 CYP3A4 の基質であるミダゾラムの血漿中濃度は GBE の 28 日間投与により著明に上昇した。本研究の結果、CYP2C9 および 3A4 の基質薬物投与中の患者における GBE の使用は、注意を要すると考えられる。

^{*1} 浜松医科大学医学部臨床薬理学

〒431-8192 浜松市半田山 1-20-1

^{*2} 浜松医科大学医学部附属病院治験管理センター

^{*3} 静岡県立大学薬学部薬剤学・COE21

^{*4} 国立健康栄養研究所食品表示分析・規格研究部

ラットの排尿機能及び下部尿路受容体に対する ノコギリヤシ果実抽出液の薬理作用

静岡県立大学・薬学部・薬剤学教室・COE Program in the 21st Century¹

国立健康・栄養研究所², 大鵬薬品工業(株)ヘルスケア研究所³

鈴木真由美¹ 隠岐 知美¹ 丸山 修治¹
高木由希子¹ 梅垣 敬三² 西岡 安彦³
安田 昭男³ 山田 静雄¹

Pharmacological effects of Saw Palmetto Extract
on urodynamic functions and autonomic receptors in lower urinary tract of rats

Mayumi Suzuki¹, Tomomi Oki¹, Shuji Maruyama¹,
Yukiko Takagi¹, Keizo Umegaki², Yasuhiko Nishioka³,
Akio Yasuda³ and Shizuo Yamada¹

Department of Biopharmacy, School of Pharmaceutical Sciences & COE Program in the 21st Century,
University of Shizuoka¹, National Institute of Health and Nutrition²
and OTC Product R and D Development, Taiho Pharmaceutical Co., Ltd.³

Abstracts

Saw Palmetto Extract (SPE) is approved as a medicine for benign prostatic hyperplasia (BPH) in some European countries, and is also available as a healthy food product in Japan. Numerous mechanisms of SPE have been proposed, including 5 α -reductase inhibition, and antiandrogenic, antiproliferative, antiinflammatory and antiedema effects. However, none of these mechanisms for SPE has ever convincingly been shown to be therapeutically relevant *in vivo*. α -Adrenoceptor antagonists and muscarinic cholinceptor antagonists are commonly used in the treatment of lower urinary tract symptoms in patients with BPH and overactive bladder. Because SPE contains many constituents, it may improve voiding symptoms due to significant antagonism of α -adrenoceptors and muscarinic cholinceptors in the lower urinary tract. The present study was undertaken to clarify pharmacological effects of SPE on urodynamic functions and autonomic receptors in the lower urinary tract.

The intraduodenal administration of SPE in anesthetized rat cystometry significantly reversed the shortened micturition interval as well as the decreased micturition volume and bladder capacity induced by the intravesical injection of 0.1% acetic acid in a dose-dependent manner, and such effect of SPE was dose-dependently observed at relatively lower doses (12 and 20 mg/kg). The improvement of urodynamic parameters was also observed by repeated oral administration of SPE in SHR/NDmc-cp(cp/cp) rats. SPE (10-1000 μ g/mL) inhibited specific binding of [³H]prazosin, [³H]NMS and (+)-[³H]PN 200-110 in the rat prostate and bladder in non-competitive manner. The binding activity of SPE based on IC₅₀ values of SPE was 2-4 times greater for muscarinic cholinceptors and 1,4-dihydropyridine (DHP) calcium channel antagonist receptors than for α -adrenoceptors. Repeated oral administration of SPE (0.6, 6, 60 mg/kg) in rats exerted significant alteration of Bmax values for prostatic [³H]prazosin binding and also for bladder [³H]NMS binding, suggesting significant autonomic receptor binding activities of SPE in the lower urinary tracts under *in vivo* condition. Furthermore, the SPE administration tended to alleviate the increased density of prostatic α -adrenoceptor binding sites (Bmax) evoked by repeated injection of testosterone in rats.

These data suggest that SPE significantly alleviates lower urinary tract symptoms in patients with BPH or overactive bladder by acting on autonomic receptors in the prostate and bladder.

Key words: Saw Palmetto Extract (SPE), urodynamic parameters, prostatic α -adrenoceptors, bladder muscarinic

要旨：ノコギリヤシ果実抽出液 (Saw palmetto extract: SPE) の排尿機能及び下部尿路受容体に対する作用を調べた。酢酸誘発頻尿ラットシストメトリーにおいて SPE は十二指腸内投与により、排尿間隔、一回排尿量及び膀胱容量を有意に増加させ、最大膀胱収縮圧を低下した。この排尿パラメータに対する SPE の薬理作用は病態動物の SHR/NDmc-cp (cp/cp) ラットに SPE を反復経口投与することによっても認められた。SPE は前立腺 [^3H]prazosin, 膀胱 [^3H]NMS 及び膀胱 (+)-[^3H]PN 200-110 の特異的結合を濃度依存的に抑制し、この SPE の受容体結合活性は α_1 受容体よりムスカリン性受容体及び 1,4-DHP 系 Ca 拮抗薬受容体に対し 2 - 4 倍高いこと並びに各受容体に対し非競合的結合様式を示すことが明らかになった。SPE は *in vivo* においても下部尿路の α_1 及びムスカリン性受容体に結合活性を示すことが示唆された。SPE の反復投与はテストステロン誘発肥大前立腺において認めた α_1 受容体数の増加に対し抑制傾向を示した。以上の結果から、SPE は臨床用量において下部尿路受容体への直接作用による前立腺肥大の機能的閉塞の解除や過活動膀胱の抑制などの薬理作用を示すことが示唆された。

キーワード：ノコギリヤシ果実抽出液 (SPE), 排尿パラメータ, 前立腺 α_1 受容体, 膀胱ムスカリン性受容体

緒 言

前立腺肥大症 (BPH) は、前立腺組織の肥大による機械的閉塞や、前立腺平滑筋の α_1 受容体緊張亢進による機能的閉塞により排尿困難や残尿などが認められる疾患であり、その有病率は高く、加齢とともに増加する。BPH は組織学的に60歳の男性では50%以上に、85歳までに約90%に認められ、その1/4に臨床症状が出現する¹⁾。本邦においても、厚生省統計資料によれば、全診療科における BPH の受療患者数は、1990年に25.6万人、98年には60.1万人と報告されており²⁾、高齢化、生活様式の欧米化及び治療薬の開発等による患者啓発の影響と思われる患者数の増加が認められる。

BPH の薬物治療には、一般的に α_1 遮断薬や抗アンドロゲン薬が使用されている³⁾ が、BPH を含めた排尿障害に対して、患者は自己判断で治療手段を選択することも多い。ヤシ科シュロ属のノコギリヤシ果実抽出液 (Saw palmetto extract: SPE)^{3,4)} は、ヨーロッパでは BPH に対する治療薬として用いられ、また本邦でも健康食品として注目されている。SPE の薬理作用としては、5 α -reductase 阻害作用⁵⁾、アンドロゲン受容体遮断作用⁶⁾、抗炎症作用⁸⁾、細胞増殖抑制作用⁹⁾、 α_1 受容体遮断作用¹⁰⁾ が *in vitro* 実験において報告されている。また臨床的に、SPE (320mg/day, Permixon[®]) の6ヶ月の投与により、BPH やそれに伴う頻尿に有効であるとの報告がある¹¹⁾。しかし、SPE の *in vivo* における排尿機能に対する作用や、BPH 及び過活動膀胱などの薬物治療において標的部位となる下部尿路 α_1 受容体及びムスカリン性受容体に対する作用については、殆んど明らかにされていない。本研究では、下部尿路に対する SPE の薬理作用を明らかにする目的で、シストメトリー法を用いた排尿機能に対する作用及び下部尿路受容体に対する作用を検討した。

方 法

I. 供試化合物および試薬

[7-Methoxy- ^3H]prazosin ([^3H]prazosin, 2.979TBq/mmol), [N-methyl- ^3H]scopolamine methyl

chloride ([^3H]NMS, 2.997TBq/mmol), (+)-[5-methyl- ^3H]PN 200-110 ((+)-[^3H]PN 200-110, 3.180TBq/mmol) 及び α, β -methylene ATP [2,8- ^3H]tetrasodium salt ([^3H] $\alpha\beta$ -MeATP, 580.9GBq/mmol) は PerkinElmer Life Sciences (Boston, MA) 社より購入した。ノコギリヤシ果実抽出液 (SPE, SABALSELECT[™]) は Indena[®] (Italy) 社より供与された。SPE は0.5%メチルセルロース液に懸濁して用いた。その他の試薬は全て市販の特級規規格品を使用した。なお、SPE は、超臨界抽出法により抽出された油状物質で、含有成分を表1に示した¹²⁾。

II. 実験動物

実験動物として、シストメトリー実験には8 - 9週齢 (体重: 250-350g) の SD 系雄性ラット、SPE2 週間反復投与実験には7週齢 (体重: 250-310g) の SHR/NDmc-cp (cp/cp) 雄性ラット、SPE4 週間反復投与実験には8 - 11週齢 (体重: 250-430g) の SD 系雄性ラット、テストステロン投与実験では56週齢 (体重: 550-800g) の SD 系雄性ラット (日本エスエルシー株) を使用し、ラット用固形飼料 (MF, オリエンタル酵母工業株製) 並びに飲料水を自由に与えて、室温24 ± 2°Cで飼育した。

III. シストメトリーによる膀胱内圧及び尿道排出液量の測定

ウレタン (1.1g/kg, 皮下投与: s.c.) 麻酔下、ラットを仰臥位に固定し腹部正中線に沿って切開後、静脈留置針 (ベニユーラ) を胃より挿入し胃幽門部を縫合糸で縛り固定した (SPE 十二指腸内投与用カテーテル)。次に、下腹部を切開して膀胱を露出させ、膀胱頂部に小切開を加え、膀胱内にポリエチレンチューブ (PE50: 日本ベクトンディッキンソン株) を挿入した。切開部を結紮し、膀胱内に挿入したチューブの他端を圧トランスデューサー (ディスポーザブル血圧モニタリング用ライフキット DX-360: 日本光電株) に接続した。

ラットをポールマンケージ (アクリル製特注品: 山下技研株) に伏臥位に固定した。生理食塩水あるいは0.1%酢酸溶液を満たした専用注射筒 (テルモシリンジ 30mL) を

持続注入器（テルフュージョンシリンジポンプ STC-521：テルモ(株)）に装着した。37℃に設定した保温装置（BLOODWATER TM-90：東レ・メディカル(株)）を介して、膀胱内に生理食塩水あるいは0.1%酢酸溶液を4.0mL/hrで持続注入しながら、圧力アンプ（日本電気三栄製）により膀胱内圧を連続的に測定し、MacLab/8sシステム（データ記録、専用ソフト PowerLab/MacLab Chart v3.6s (ADInstrument Pty Ltd.)) でシストメトログラムを記録した。また、排尿量はデジタル天秤（HF-200, エー・アンド・デイ(株)）に100mmシャーレを設置し、尿道口から排出される液を累積的に採取し、その重量変化を MacLab/8s システムで記録した。膀胱内圧曲線と排尿量変化から、以下のパラメータ：排尿間隔 (min), 一回排尿量 (mL), 膀胱容量 (注入速度×排尿間隔, mL), 静止時膀胱圧 (mmHg), 排尿閾値圧 (mmHg), 最大膀胱収縮圧 (mmHg) を算出した。安定した排尿パターンが得られた後、SPE 投与前後の排尿パラメータを比較した。

IV. 無麻酔下での排尿回数及び排尿量の測定

SHR/NDmc-cp (cp/cp) ラットを代謝ケージ (NALGENE) に入れ、SPE (6mg/kg) を2週間反復経口投与した。そして、SPE 投与前日から反復投与期間中、夜18時から翌朝6時までの夜間12時間における SHR/NDmc-cp (cp/cp) ラットの排尿量を累積的に記録した。排尿量は、流動パラフィンを入れた尿量測定用容器をデジタル天秤 (HF-200, エー・アンド・デイ(株)) の上に設置し、尿を累積的に採取してその重量変化を MacLab/8S システム（データ記録、専用解析ソフト PowerLab/MacLab Chart v3.6s (ADInstruments Pty Ltd.)) で記録した。測定データから排尿間隔 (min), 排尿回数 (回/夜間12時間), 一回排尿量 (mL), 全排尿量 (mL) を求めた。

V. 受容体結合実験における SPE の投与

SPE の反復投与実験では、正常ラットの場合、control 群 (0.5%メチルセルロース経口投与：p.o.), SPE (0.6, 6, 60mg/kg/day, p.o.) 投与群に分け、4週間経口投与した。またテストステロン誘発前立腺肥大モデルラットの場合、sham 群 (ヒマシ油, s.c. と0.5%メチルセルロース, p.o.), control 群 (テストステロン, 3mg/kg/day, s.c. と0.5%メチルセルロース, p.o.), SPE 投与群 (テストステロン, 3mg/kg, s.c. と SPE の6ないし60mg/kg/day, p.o.) に分け、4週間反復経口投与した。

VI. 受容体標品の調製法

ラットをエーテル麻酔下で開腹し、腹部下行大動脈よりヘパリン処理した注射筒で採血し、屠殺した。ただちに生理食塩水で灌流し、膀胱、前立腺、顎下腺及び脾臓を摘出

した。

α 受容体測定では、前立腺（腹葉部）及び脾臓に30倍量の 50mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) を加え、ポリトロンホモジナイザーでホモジナイズし、冷却下 40,000xg で20分間遠心分離した。沈渣を Tris-HCl buffer で懸濁し、同様の条件にて再度遠心分離後、沈渣を Tris-HCl buffer に懸濁して受容体標品 (3.3-6.7%) とした。

ムスカリン性受容体測定では、膀胱および顎下腺に19倍量の 30mM Na⁺/HEPES buffer (pH 7.5) を加え、ポリトロンホモジナイザーでホモジナイズし、冷却下 40,000xg で20分間遠心分離した。沈渣を Na⁺/HEPES buffer で懸濁して受容体標品 (3.3%) とした。

1,4-Dihydropyridine (DHP) 系 Ca 拮抗薬受容体測定では、膀胱に19倍量の 50mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) を加え、ポリトロンホモジナイザーでホモジナイズ後、冷却下 40,000xg で15分間遠心分離した。沈渣を19倍量の Tris-HCl buffer で懸濁し同様の条件にて再度遠心分離した。沈渣を Tris-HCl buffer で再懸濁して受容体標品 (5%) とした。

P2X 受容体測定では、膀胱に10倍量の 50mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) を加え、ポリトロンホモジナイザーでホモジナイズ後、冷却下 2,000xg で10分間遠心分離し上清を分取した。沈渣を10倍量の Tris-HCl buffer で再度懸濁し同様の条件にて遠心分離後上清を分取した。2回分の上清を合わせ、37℃で20分間インキュベーション後、冷却下 48,000xg で20分間遠心分離し、沈渣を Tris-HCl buffer で懸濁して受容体標品 (5%) とした。

VII. ラジオレセプターアッセイ

α , ムスカリン性, 1,4-DHP 系 Ca 拮抗薬及び P2X の各受容体の測定では、標識リガンドとして、それぞれ [³H] prazosin¹³⁾, [³H]NMS¹⁴⁾, (+)-[³H]PN 200-110¹⁵⁾ 及び [³H] $\alpha\beta$ -MeATP¹⁶⁾ を用いるラジオレセプターアッセイ法に従った。即ち、各臓器の受容体標品を、[³H] prazosin 結合実験では 50mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) 中で [³H] prazosin (0.03-0.05nM) と25℃, 30分間, [³H]NMS 結合実験では 30mM Na⁺/HEPES buffer (pH 7.5) 中で [³H] NMS (0.06-1.0nM) と25℃, 60分間, (+)-[³H]PN 200-110 結合実験では 50mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) 中で (+)-[³H]PN 200-110 (0.025-0.5nM) と25℃, 60分間, [³H] $\alpha\beta$ -MeATP 結合実験では 50mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) 中で [³H] $\alpha\beta$ -MeATP (5nM) と4℃, 60分間インキュベーション後、Receptor Binding Assay 用 Cell Harvester (米国 Brandel 社製) を用いて反応液をガラス繊維濾紙 (Whatman GF/B) 上に急速吸引濾過した。直ちに濾紙を 50mM Na/K phosphate buffer 3mL で3回洗浄した。この濾紙をバイアル瓶に取りトルエンシンチレーター (2,5-diphenyloxazole: 5g, 1,4-Bis-(5-phenyl-2-oxazol) benzene: 0.1g, Triton X-100: 333mL, toluene: 666mL) を加えて、室

温中に6時間以上放置後、その放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。この場合、displacerとして、10 μ M phentolamine ($[^3\text{H}]$ prazosin), 1 μ M atropine ($[^3\text{H}]$ NMS), 1 μ M nifedipine ((+)- $[^3\text{H}]$ PN 200-110), 3 μ M $\alpha\beta$ -MeATP ($[^3\text{H}]$ $\alpha\beta$ -MeATP) を用い、displacerの非存在下及び存在下で得られた放射活性をそれぞれ全結合と非特異的結合とし、両者の差を受容体への特異的結合と定義した。測定はすべて duplicate で行った。なお、(+)- $[^3\text{H}]$ PN 200-110 を用いた実験は遮光(ナトリウムランプ)下で行った。

VIII. 受容体結合パラメータの算出

各標識リガンドを用いて得られた結合実験の結果の解析は、Bennett ら¹⁷⁾ および Yamada ら¹⁸⁾ の方法に従って行った。各標識リガンドの最大結合部位数 (Bmax), 解離定数 (Kd) は各標識リガンドの種々の濃度における特異的結合を測定し、その Scatchard 解析 ((1)式) により算出した。

Scatchard equation :

$$[\text{RL}]_e/[\text{L}]_T = -1/\text{Kd} \cdot [\text{RL}]_e + [\text{R}]_T/\text{Kd} \quad (1)$$

$[\text{RL}]_e$: 平衡状態における標識リガンドと受容体との複合体の濃度 (fmol/mg protein)

$[\text{L}]_T$: 遊離状態の標識リガンドの濃度 (pM)

Kd: 見かけの解離定数 (pM)

$[\text{R}]_T$ (Bmax): 最大結合部位数 (fmol/mg protein)

この等式において $[\text{RL}]_e/[\text{L}]_T$ を Y 軸に、 $[\text{RL}]_e$ を X 軸にそれぞれプロットすることによって得られる回帰直線の傾斜が $-1/\text{Kd}$, X 軸切片が Bmax に相当する。

タンパク量は Lowry ら¹⁹⁾ の方法に従い、牛血清アルブミンを標準物質として測定した。

IX. *In vitro* 抑制効力の測定

上述と同様に調製した前立腺、脾臓、膀胱および顎下腺を用いて、10-1000 μ g/mL の SPE 存在下で、前立腺および脾臓への $[^3\text{H}]$ prazosin (0.5nM), 膀胱および顎下腺への $[^3\text{H}]$ NMS (0.5nM), 膀胱への (+)- $[^3\text{H}]$ PN 200-110 (2nM) 及び $[^3\text{H}]$ $\alpha\beta$ -MeATP (5nM) の特異的結合を測定し、log probit analysis に従って各標識リガンドの結合を50%抑制する SPE 濃度、即ち IC₅₀ 値を求めた。なお、SPE は、0.5%メチルセルロース溶液に懸濁後、各標識リガンドの buffer で希釈して用いた。

X. 統計処理

実験値は平均値 \pm 標準誤差 (mean \pm S.E.) で表示した。有意差検定は、Dunnett's test を用いて行い、危険率5%未満を有意差ありと判定した。

I. SPE の排尿機能に対する作用

生理食塩水注入ラットのシストメトリーにおいて、SPE (6mg/kg) を十二指腸内投与したところ、排尿間隔、一回排尿量、膀胱容量、静止時膀胱圧、排尿閾値圧及び最大膀胱収縮圧は投与前後で有意な差がなかった。次に、SPE (60mg/kg) 投与により、排尿間隔、一回排尿量及び膀胱容量はいずれも約40%有意に増加、最大膀胱収縮圧は有意に(約10%)低下した(図1B, 表2)。

次に、0.1%酢酸溶液をラット膀胱内に注入することにより、排尿間隔 (8.64 \pm 0.73min \rightarrow 6.22 \pm 0.57min), 一回排尿量 (0.60 \pm 0.05mL \rightarrow 0.42 \pm 0.04mL) 及び膀胱容量 (0.57 \pm 0.05mL \rightarrow 0.42 \pm 0.04mL) は正常ラットの場合に比べ有意に (P<0.05) 減少した。この頻尿モデルラットのシストメトリーにおいて、SPE (12mg/kg) を投与したところ、排尿間隔、一回排尿量及び膀胱容量はいずれも約15%有意に増加、最大膀胱収縮圧は有意に(12%)低下した。また、SPE (20mg/kg) 投与により、排尿間隔、一回排尿量及び膀胱容量は有意に(それぞれ48, 65, 48%)増加、静止時膀胱圧は有意に(5%)低下した(図1C, 表2)。排尿間隔、一回排尿量及び膀胱容量において、SPEの投与量依存性が認められた。なお、0.5%メチルセルロースの十二指腸内投与においては、投与前後で排尿パラメータの有意な変化は認められなかった(図1A)。

次に、SHR/NDmc-cp (cp/cp) ラットの無麻酔下での夜間(12時間)排尿パラメータに対する SPE の反復投与の影響を検討した。SHR/NDmc-cp (cp/cp) ラットに SPE (6mg/kg) を14日間反復経口投与することにより、排尿間隔は SPE 投与前に比べて投与後一時的に有意に減少した後、投与4から8日後にかけて継続的に増加した(図2A)。それに伴い排尿回数は、SPE 投与前に比べ投与後一時的に増加した後、継続的に減少した(図2C)。一方、両パラメータは、SPE 投与9-14日後では投与前

表1 Saw Palmetto Extract (SPE) の組成

Fatty acids	Content (%)	Fatty alcohols and sterols	Content (%)
Total fatty acids	93.5	Fatty alcohols	0.20
Saturated	59.8	Hexacosanol	0.017
Caproic acid	1.5	Octacosanol	0.146
Caprylic acid	2.3	Tetracosanol	0.004
Capric acid	2.5	Triacontanol	0.033
Lauric acid	30.2		
Myristic acid	12.0	Sterols	0.32
Palmitic acid	9.5	Campesterol	0.07
Stearic acid	1.8	Stigmasterol	0.03
Unsaturated	33.7	β -Sitosterol	0.22
Oleic acid	28.5		
Linoleic acid	4.6		
Linolenic acid	0.6		

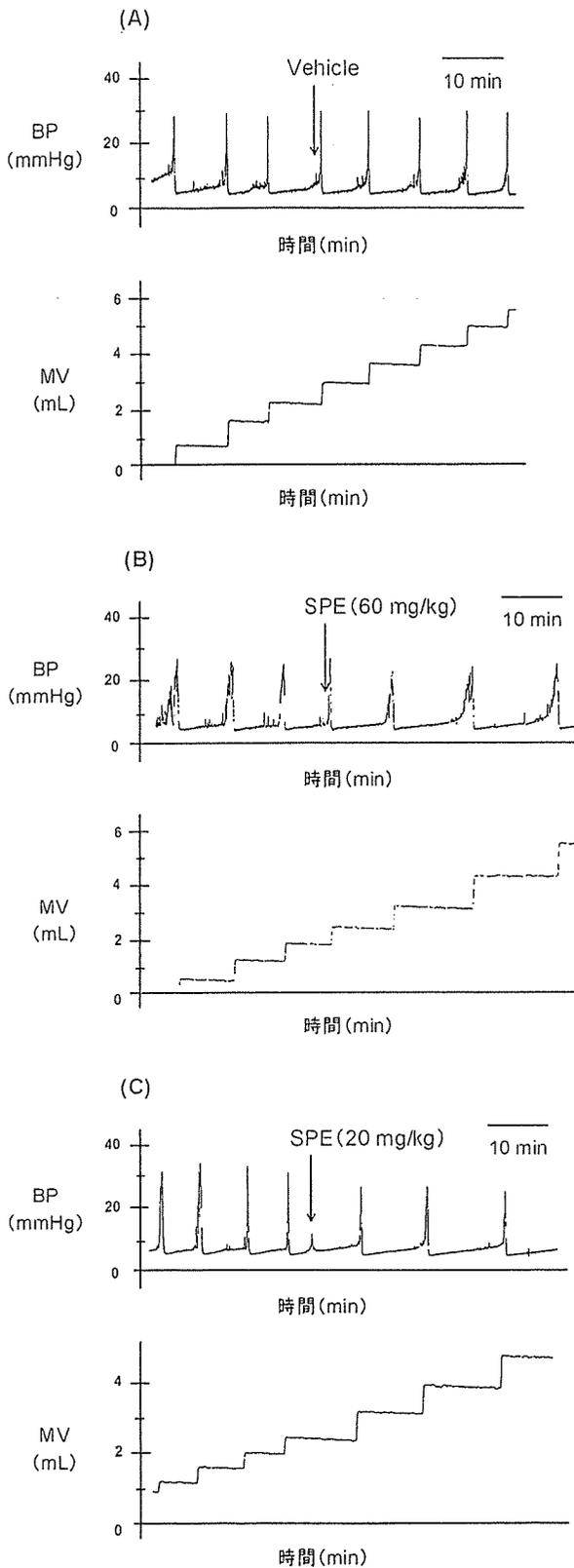


図1 麻酔下ラット (A, B: 生理食塩水注入ラット, C: 0.1% 酢酸溶液注入ラット) シストメトリーにおける SPE 投与時のシストメトログラム (A), (B) 及び (C) は, それぞれ0.5%メチルセルロース, SPE 60mg/kg, SPE 20mg/kg の十二指腸内投与の影響. BP: Bladder pressure (膀胱内圧), MV: Micturition volume (排尿量).

と差がなかった. 一回排尿量は, SPE 投与期間中増加する傾向 (図 2 B), また, 全排尿量は 9 - 14 日後において有意な増加が認められた (図 2 D). 次に, 高用量 (60mg/kg) の SPE を 14 日間反復経口投与することにより, 排尿間隔は SPE 投与前に比べ投与 1 - 5 日後で一時的に減少し, 投与 8 - 11 日後で有意に減少した (図 2 A). それに伴い排尿回数は, 投与前に比べ投与後で一時的に増加し, 投与 8 - 14 日後では有意な増加が認められた (図 2 C). 特に, 投与 10, 13 日後の排尿回数は, 6mg/kg の場合と比べ有意に増加した. 一回排尿量は, SPE 投与期間中増加傾向にあり, 投与 11, 13 日後においては 6mg/kg の場合と比べ有意に増加した (図 2 B). また, 全排尿量においても SPE 投与開始後から増加傾向にあり, 投与 2 - 5, 12 日後においては 6mg/kg の場合と比べ有意な増加が認められた (図 2 D). SPE の反復投与により, 水分摂取量は投与前と比べほとんど変化が認められなかった.

II. *In vitro* における SPE の各種受容体に対する作用

SPE は 10 - 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度において, ラット前立腺及び脾臓への [^3H]prazosin 特異的結合を濃度依存的に抑制し, IC_{50} 値はそれぞれ 169 ± 24 , $188 \pm 47 \mu\text{g}/\text{mL}$ であった (図 3 A). 同様にラット膀胱及び顎下腺への [^3H]NMS 特異的結合を濃度依存的に抑制し, IC_{50} 値はそれぞれ 40.4 ± 4.1 , $52.3 \pm 4.4 \mu\text{g}/\text{mL}$ であった (図 3 B). さらに, SPE (30 - 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) はラット膀胱への (+)-[^3H]PN 200-110 特異的結合を濃度依存的に抑制した (IC_{50} 値は $97.3 \pm 17.1 \mu\text{g}/\text{mL}$) (図 3 C). 一方, SPE はラット膀胱への [^3H] αB -MeATP 特異的結合には殆ど影響を与えなかった (図 3 D).

SPE (150 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 存在下の Scatchard 解析により, ラット前立腺及び脾臓の [^3H]prazosin 特異的結合の B_{max} 値は対照値に比べ有意に (55, 45%) 減少した (表 3). また, 前立腺の K_d 値の有意な減少も認められた. SPE (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) の存在下において, 膀胱及び顎下腺の [^3H]NMS 特異的結合の B_{max} 値は対照値に比べ有意に (55, 30%) 減少した. また, SPE (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) の存在下において, 膀胱の (+)-[^3H]PN 200-110 特異的結合の B_{max} 値は対照値に比べ有意に (67%) 減少した.

III. ラットの各臓器受容体に対する SPE 反復経口投与の影響

ラットに SPE (0.6, 6, 60mg/kg) を 4 週間反復経口投与することにより, [^3H]prazosin 結合の K_d 値は対照値と差がなかったが, B_{max} 値は前立腺において SPE の 6, 60mg/kg 投与によりそれぞれ 24, 37%, 脾臓においては 60mg/kg 投与で 26% 有意に増加した (表 4). [^3H]NMS 結合の K_d 値は, 顎下腺において 0.6mg/kg 投与で対照値と比べ有意な増加が認められた. また, [^3H]NMS 結合の B_{max} 値は, 膀胱において 0.6-60mg/kg 投与により 32-

表2 麻酔下ラットシストメトリーにおける SPE (6-60mg/kg) 投与前後の排尿パラメータ

Doses of SPE (mg/kg)	Micturition interval (min)		Mean micturition volume (mL)		Bladder capacity (mL)	
	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post
<i>Saline infused anesthetized rats</i>						
6	9.93 ± 1.07	9.07 ± 1.09	0.69 ± 0.07	0.66 ± 0.09	0.65 ± 0.06	0.60 ± 0.07
60	7.71 ± 0.90	10.8 ± 1.77 (140%)*	0.54 ± 0.06	0.77 ± 0.13 (143%)*	0.51 ± 0.06	0.72 ± 0.12 (141%)*
<i>0.1% acetic acid infused anesthetized rats</i>						
12	6.44 ± 1.10	7.41 ± 1.25 (115%)*	0.44 ± 0.08	0.51 ± 0.08 (116%)*	0.43 ± 0.07	0.49 ± 0.08 (114%)*
20	5.99 ± 0.47	8.85 ± 1.07 (148%)*	0.40 ± 0.04	0.66 ± 0.08 (165%)*	0.40 ± 0.03	0.59 ± 0.07 (148%)*

Doses of SPE (mg/kg)	Baseline pressure (mmHg)		Threshold pressure (mmHg)		Maximum micturition pressure (mmHg)	
	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post
<i>Saline infused anesthetized rats</i>						
6	3.35 ± 0.19	3.20 ± 0.22	5.02 ± 0.13	4.78 ± 0.13	26.1 ± 2.2	23.9 ± 2.0
60	3.17 ± 0.10	2.93 ± 0.21	4.74 ± 0.16	4.81 ± 0.15	28.3 ± 0.8	26.0 ± 0.7 (91.9%)*
<i>0.1% acetic acid infused anesthetized rats</i>						
12	3.99 ± 0.26	3.69 ± 0.23	5.05 ± 0.31	5.13 ± 0.27	29.3 ± 1.7	25.7 ± 2.0 (87.7%)**
20	3.54 ± 0.16	3.37 ± 0.11 (95.2%)*	4.44 ± 0.19	4.62 ± 0.25	25.6 ± 1.4	23.0 ± 0.5

Mean ± S.E., n=5 (6, 12, 20mg/kg), n=7 (60mg/kg), The values in parentheses represent the percentages when compared with the values (Pre) before SPE administration.

Asterisks show a significant difference from the pre-treatment values using Student's paired t-test, *P<0.05, **P<0.01.

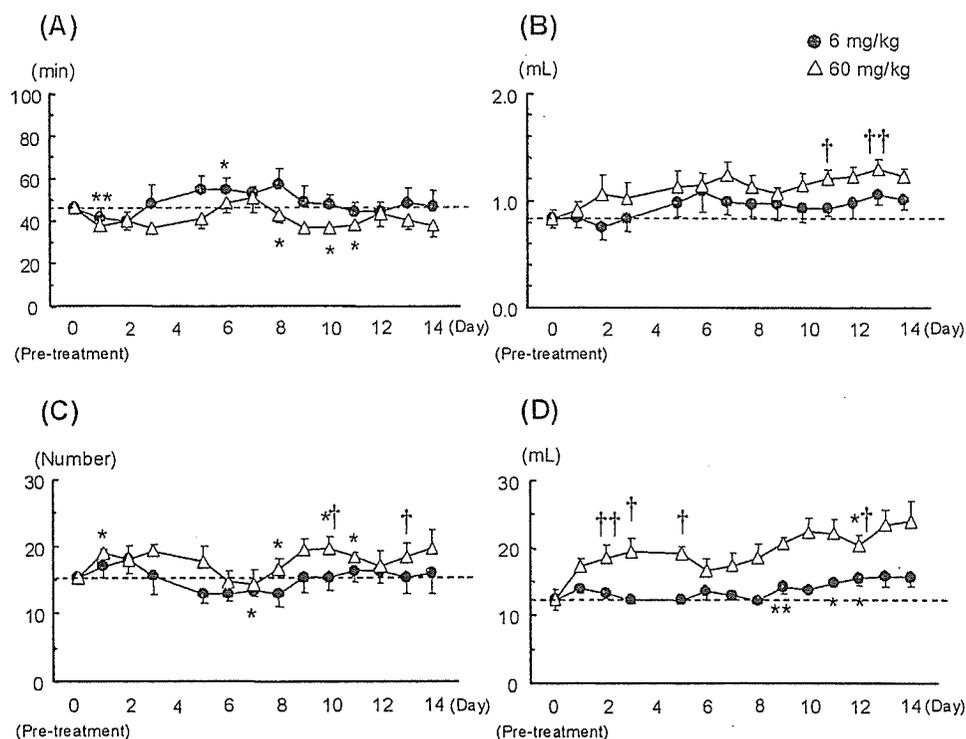


図2 SHR/NDmc-cp (cp/cp) ラットの排尿パラメータに対する SPE (6, 60mg/kg) 反復投与の影響

(A) 排尿間隔, (B) 一回排尿量, (C) 排尿回数/夜間12時間, (D) 全排尿量

Mean ± S.E., n=3. Asterisks show significant difference from pre-treatment values (0 day) using Student's paired t-test, *P<0.05, **P<0.01. Symbols show significant difference from each value at the dose of 6 mg/kg using Student's paired t-test, †P<0.05, ††P<0.01.

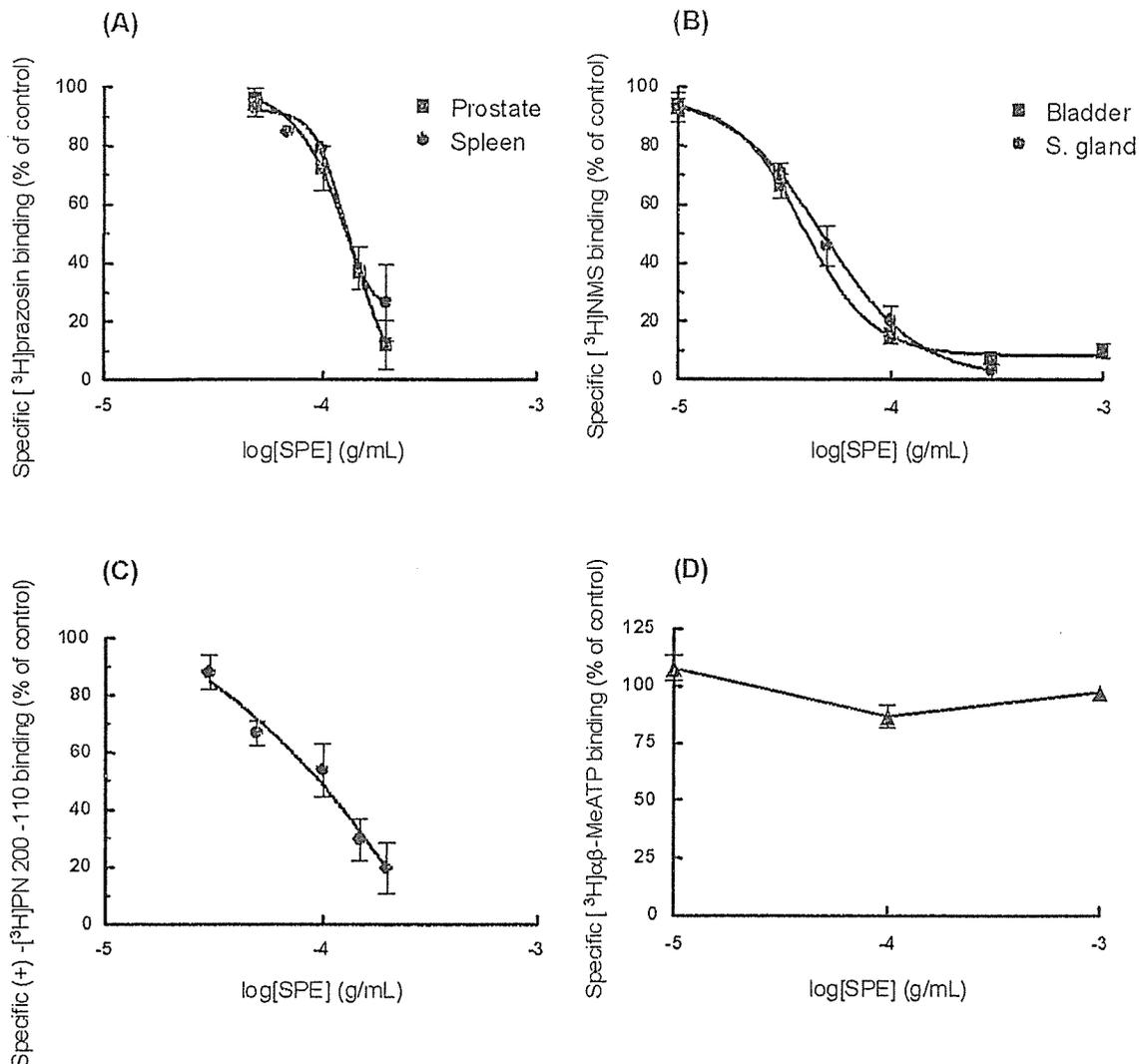


図3 (A) ラット前立腺及び脾臓における $[^3\text{H}]$ prazosin 特異的結合に対する SPE の抑制作用 (n=5-8)
 (B) ラット膀胱及び顎下腺における $[^3\text{H}]$ NMS 特異的結合に対する SPE の抑制作用 (n=8-9)
 (C) ラット膀胱における (+)- $[^3\text{H}]$ PN 200-110 特異的結合に対する SPE の抑制作用 (n=5)
 (D) ラット膀胱における $[^3\text{H}]\alpha\beta\text{-MeATP}$ 特異的結合に対する SPE の抑制作用 (n=2) (Mean \pm S.E.)

表3 $[^3\text{H}]$ Prazosin, $[^3\text{H}]$ NMS 及び (+)- $[^3\text{H}]$ PN 200-110 の特異的結合パラメータに対する SPE の *in vitro* での影響

	Kd (pM)	Bmax (fmol/mg protein)	Kd (pM)	Bmax (fmol/mg protein)
$[^3\text{H}]$ Prazosin				
	Prostate		Spleen	
Control	80.2 \pm 9.6	17.6 \pm 1.4	58.4 \pm 3.8	39.5 \pm 1.9
SPE (150 μ g/mL)	51.3 \pm 2.1*	7.86 \pm 0.49 (44.7%)**	82.0 \pm 12.5	21.9 \pm 4.0 (55.4%)*
$[^3\text{H}]$ NMS				
	Bladder		Submaxillary gland	
Control	256 \pm 77	192 \pm 27	101 \pm 9	101 \pm 5
SPE (50 μ g/mL)	190 \pm 14	86.1 \pm 11.7 (44.8%)*	149 \pm 26	70.5 \pm 4.6 (69.8%)*
(+) - $[^3\text{H}]$ PN 200-110				
	Bladder			
Control	200 \pm 17	188 \pm 12		
SPE (100 μ g/mL)	151 \pm 40	62.7 \pm 11.8 (33.4%***)		

Mean \pm S.E., n=3 ($[^3\text{H}]$ prazosin, $[^3\text{H}]$ NMS), n=8 ((+)- $[^3\text{H}]$ PN200-110). The values in parentheses represent the percentages when compared with control values in the presence of vehicle (0.5% methylcellulose).

Asterisks show a significant difference from control values, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

表4 ラット前立腺, 脾臓, 膀胱及び顎下腺における $[^3\text{H}]$ prazosin 並びに $[^3\text{H}]$ NMS 特異的結合パラメータに対する SPE 反復経口投与の影響

	Doses of SPE (mg/kg)	Kd (pM)	Bmax (fmol/mg protein)
$[^3\text{H}]$ Prazosin			
Prostate	Control	49.7 ± 2.4	26.7 ± 0.5
	0.6	43.1 ± 2.0	30.1 ± 1.6
	6	51.9 ± 4.8	33.0 ± 1.3 (124%)**
	60	54.6 ± 2.8	36.5 ± 1.2 (137%***)
Spleen	Control	26.4 ± 2.8	68.3 ± 4.0
	0.6	28.8 ± 2.2	75.1 ± 3.8
	6	27.5 ± 1.5	65.7 ± 5.1
	60	30.1 ± 1.2	86.1 ± 4.3 (126%)*
$[^3\text{H}]$ NMS			
Bladder	Control	157 ± 10	144 ± 12
	0.6	127 ± 13	84.7 ± 8.1 (58.8%***)
	6	135 ± 11	98.2 ± 3.8 (68.2%***)
	60	137 ± 5	97.5 ± 2.7 (67.7%***)
Submaxillary gland	Control	98.4 ± 3.8	145 ± 3
	0.6	112 ± 3*	149 ± 10
	6	101 ± 2	149 ± 8
	60	105 ± 2	119 ± 2 (82.1%)**

Mean ± S.E., n=6-7. The values in parentheses represent the percentages when compared with control values. Asterisks show a significant difference from control values, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

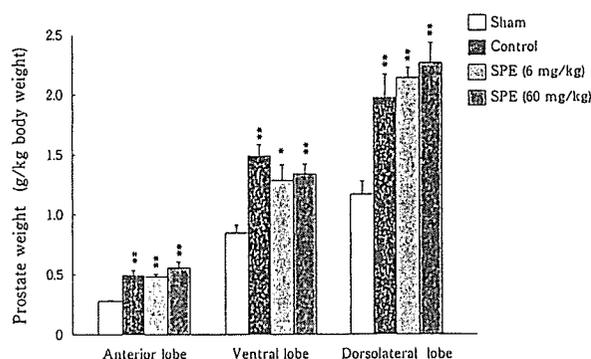


図4 テストステロン処置ラットのの前立腺 (前葉, 腹葉, 背側葉) 重量に対する SPE 反復経口投与の影響
Mean ± S.E., n = 5.
Asterisks show a significant difference from sham values, *P<0.05, **P<0.01.

41%, 顎下腺においては 60mg/kg 投与で18%有意に減少した。

IV. 前立腺肥大モデルラット前立腺の組織重量並びに受容体に対する SPE 反復投与の影響

ラットにテストステロン (3mg/kg) を4週間皮下投与することにより, 前立腺の前葉, 腹葉及び背側葉の重量は, sham 群に比べそれぞれ79, 77, 69%有意に増加した (図4)。また, 6及び60mg/kgのSPEをテストステロンとともに4週間経口投与した場合, 前立腺各部位の重量は, control (テストステロン単独投与) 群の場合と比べ, 腹葉において減少傾向が認められたものの, いずれの部位で

表5 テストステロン処置ラットのの前立腺 $[^3\text{H}]$ prazosin 特異的結合パラメータに対する SPE 反復経口投与の影響

	$[^3\text{H}]$ Prazosin (Prostate)	
	Kd (pM)	Bmax (fmol/mg protein)
Sham	52.6 ± 3.1	14.8 ± 0.7
Control	71.0 ± 11.5	24.0 ± 2.1 (162%)**
SPE (6mg/kg)	58.6 ± 7.9	21.4 ± 2.2 (145%)*
SPE (60mg/kg)	46.7 ± 3.3	20.4 ± 1.2

Mean ± S.E., n=5. The values in parentheses represent the percentages when compared with the sham values. Asterisks show a significant difference from sham values, *P<0.05, **P<0.01.

も有意差は認められなかった。

テストステロン (3mg/kg) 皮下投与ラット (control) 前立腺における $[^3\text{H}]$ prazosin 結合の Bmax 値は sham 群に比べ62%有意に増加した (表5)。テストステロンとSPEの両投与群では, $[^3\text{H}]$ prazosin 結合の Bmax 値はSPE 6mg/kg 投与群で sham 群と比べ45%有意に増加し, 60mg/kg 投与群では38%の増加傾向が認められた。 $[^3\text{H}]$ Prazosin の Kd 値はいずれの群においても sham 群と比べ有意な差は認められなかった。

考 察

SPE の排尿パラメータ及び下部尿路受容体に対する作用を検討した。まず, 麻酔した正常ラットのシストメトリ一実験において, SPE は 6mg/kg の十二指腸内投与では排尿パラメータに殆ど影響しなかったが, 60mg/kg にお

いて排尿間隔、一回排尿量及び膀胱容量を有意に増加させ、最大膀胱収縮圧を有意に低下した。また、酢酸の膀胱内注入による頻尿誘発ラットにおいても同様に、SPE は12及び20mg/kgの投与量で、排尿間隔、一回排尿量及び膀胱容量を投与量に依存して有意に増加させ、最大膀胱収縮圧を有意に低下した。これより、SPE は麻酔ラットのシストメトリーにおいて頻尿改善作用を示すことが明らかになった。このSPEの作用は正常ラットに比べ酢酸誘発頻尿ラットにおいて低用量で発現したことから、病態特異的である可能性が示唆された。ところで、SPE は高カリウム、ノルエピネフリン及びアセチルコリンによるラット摘出平滑筋組織の収縮を抑制する^{20,21)}ことから、*in vivo*において膀胱平滑筋の弛緩により頻尿改善作用を示すと考えられた。また、SPEの主な含有成分である遊離脂肪酸は、 K^+ 、 Na^+ 、 Ca^{2+} などのイオンチャネル透過性及び神経伝達などの生理機能に対して影響を及ぼすこと²²⁾並びに酢酸誘発頻尿は膀胱知覚神経の活性化に基づく²³⁾ことから、SPEは下部尿路神経に作用することも推定された。

次に、SHR/NDmc-cp (cp/cp) ラットを用いて夜間排尿に対するSPE反復経口投与の影響を検討した。SHR/NDmc-cp (cp/cp) ラットは、II型糖尿病性腎症モデル動物として開発された自然発症高血圧/NIH肥満形質ラットである。高血圧を示すSHR/NDmc-cp (cp/cp) ラットは、非糖尿病系SHRラットと共通の遺伝的背景を保持している²⁴⁾。SHRにおいては一般的に交感神経機能亢進が高血圧の発症と維持に関与しているが、SHRの膀胱は対照のWistar-Kyotoラット(WKY)に比し過活動となっていることが報告されている^{25,26)}。さらに、Clemowら²⁷⁾は、SHRの膀胱における求心性及び遠心性神経密度がWKYの場合に比し有意な増加(neuronal hypertrophy)を示したことから、これら神経機能の変化による排尿反射の亢進を示唆している。本研究において、SHR/NDmc-cp (cp/cp) ラットにSPE (6mg/kg)を反復投与することにより、排尿間隔の一過性の短縮後における持続的な延長、並びに排尿回数の有意な減少が観察された。これより、麻酔ラットのシストメトリーにおいてSPEの単回投与で観察された頻尿改善作用は反復経口投与によっても発現することが示された。このSPEの作用がSHR/NDmc-cp (cp/cp) ラットへの9日間以上の投与によって消失した理由については明らかでないが、SPEの頻尿改善作用に何らかの耐性が生じたか、あるいは腎機能や電解質バランスなどに対する全身的な薬理作用が発現したことが推察された。SPEが利尿作用を示すという実験薬理学的報告はないが、ヒトにおいて穏やかな利尿効果を示すことが知られている²⁸⁾。実際に、本研究においても60mg/kgのSPEを反復投与することにより、一回排尿量及び全排尿量が有意に増加したことから、SPEによる利尿作用が示唆された。

次に、排尿障害治療薬の作用部位となる下部尿路自律神

経受容体に対する作用を検討したところ、*in vitro* 実験において、SPEは、ラットの前立腺及び脾臓 α_1 受容体への $[^3H]$ prazosin結合、膀胱及び顎下腺ムスカリン性受容体への $[^3H]$ NMS結合、膀胱1,4-DHP系Ca拮抗薬受容体への(+)- $[^3H]$ PN 200-110結合をいずれも濃度依存的に抑制した。SPEが α_1 受容体結合活性を有することは既にGoepelら¹⁰⁾もヒトクローン発現細胞系を用いて認めているが、本研究結果は α_1 受容体サブタイプの分布密度が異なるラット前立腺(α_{1A} 受容体が優位)と脾臓(α_{1B} 受容体が優位)においてSPEの α_1 受容体結合活性を明らかにし、さらに両臓器でのSPEの結合親和性には差異がないことを示した。また、SPEは、ムスカリン性受容体及び1,4-DHP系Ca拮抗薬受容体に結合活性を示し、両受容体結合活性は IC_{50} 値の比較より、 α_1 受容体の場合より2-4倍高いことが示された。このSPEによるムスカリン性受容体と1,4-DHP系Ca拮抗薬受容体の結合活性についてはこれまで報告がなく、本研究で初めて得られた知見である。これらの各受容体に対するSPEの作用はラット平滑筋弛緩作用^{20,21)}及びラット頻尿改善作用(図1,表2)の発現に寄与すると考えられた。今後、受容体への結合活性成分の分離同定は興味深い課題である。

SPEの存在下でのScatchard解析において、SPEは、 $[^3H]$ prazosin、 $[^3H]$ NMS及び(+)- $[^3H]$ PN 200-110結合の K_d 値には前立腺 $[^3H]$ prazosin結合以外は殆んど影響を与えず、 B_{max} 値を有意に減少した。SPEによる $[^3H]$ prazosin結合の B_{max} 値の減少はGoepelら¹⁰⁾によっても認められている。ラジオレセプターアッセイ実験による受容体結合パラメータの変動と薬物の拮抗様式を詳細に検討したYamadaら²⁹⁾の報告から、SPE存在下での各標識リガンドの B_{max} 値の選択的減少即ち、SPEの非競合的な受容体結合の作用機序として受容体結合後の解離が遅いことが示唆された。また、ラットにSPEを反復経口投与することにより、前立腺と脾臓における $[^3H]$ prazosin結合の B_{max} 値の有意な増加並びに膀胱と顎下腺 $[^3H]$ NMS結合の B_{max} 値の有意な減少が認められたことから、SPEは*in vivo*において各臓器の α_1 受容体及びムスカリン性受容体に結合することが示唆された。両受容体数の変動は、前立腺及び膀胱において他の臓器に比べ低用量(0.6, 6mg/kg)で発現したことから、SPEは下部尿路受容体に対し選択性を示すことが考えられた。

ラットにテストステロンを4週間皮下投与することにより、前立腺各部位の重量は1.7-1.8倍に増加した。このテストステロン投与ラット前立腺において、 $[^3H]$ prazosin結合の B_{max} 値が有意に増加したことから、 α_1 受容体数の増加が示された。これは、去勢により減少した前立腺 α_1 受容体がテストステロンの反復投与により対照値に回復すること³⁰⁾やヒト肥大前立腺の α_1 受容体数が増加すること¹³⁾を示した以前の報告と符号する結果である。6ないし60mg/kgのSPEとテストステロンを4週間反復投

与したラット前立腺重量は、テストステロン単独投与ラットの場合と比べ、腹葉部において若干減少傾向を示したものの、いずれの部位でも有意な減少は認められなかった。前立腺肥大に対する SPE の作用については、ラットへの SPE (100, 320mg/kg) 30日間投与によるスルピリド誘発前立腺肥大抑制³¹⁾、SPE (50mg/kg) 60日間投与によるテストステロン誘発前立腺肥大の抑制³²⁾を示した報告がある。本研究ではこれらの結果を確認できなかった理由として、SPE の投与量が低く投与期間が短かったことが考えられる。実際に、抗アンドロゲン剤における前立腺肥大抑制効果発現には2-3ヶ月間の連続投与を要することが知られている³³⁾。しかしながら、Rhodes ら³⁴⁾は、テストステロン誘発ラット前立腺肥大が高用量 (180, 1800mg/day) SPE の反復投与によっても全く影響されないことを示している。本実験で用いた6ないし60mg/kg という SPE の用量は、ヒトでの内服量 (320mg/day) と同等もしくはその約10倍量であったことから、SPE の臨床での薬効発現量に等しいと考えられる。

テストステロンと SPE の両投与ラットの前立腺 α_1 受容体数 ($[^3\text{H}]$ prazosin 結合の Bmax 値) は、SPE 6mg/kg 投与群ではテストステロン無投与群に比べ有意に (42%) 増加したものの、テストステロン単独投与群のそれ (62%) と比べ、増加率の減少が認められた。さらに、テストステロンと高用量 (60mg/kg) SPE 投与群において前立腺 α_1 受容体数の有意な増加が見られなかったことから、SPE の反復投与はテストステロン投与によるラット前立腺 α_1 受容体数の増加を抑制する可能性が示唆された。SPE は、これまでの研究から、5 α -reductase 阻害作用や抗アンドロゲン作用などに基づく前立腺肥大の抑制により、BPH の機械的閉塞を解除し排尿障害を改善することが主たる薬理作用と考えられている^{3,7)}。このような薬理作用に加え、ラット排尿機能及び下部尿路受容体を測定した本研究より、臨床用量の SPE は下部尿路受容体への直接作用による前立腺肥大の機能的閉塞の解除や過活動膀胱の抑制などの新たな薬理作用を有する可能性が提示された。

結 語

SPE は、酢酸誘発頻尿ラットシストメトリーにおいて、排尿間隔、一回排尿量及び膀胱容量の有意な増加並びに最大膀胱収縮圧の有意な低下を示した。同様な薬理作用は、SHR/NDmc-cp (cp/cp) ラットに SPE を反復経口投与することによっても認められた。ラジオレセプターアッセイにより、SPE は前立腺 α_1 受容体及び膀胱のムスカリン性受容体と 1, 4-DHP 系 Ca 拮抗薬受容体に対し結合活性を示すことが明らかになった。また、テストステロン誘発肥大前立腺の α_1 受容体数の増加に対し抑制傾向を示した。以上の結果から、SPE は臨床用量において下部尿路受容体への直接作用による前立腺肥大の機能的閉塞の解除や過

活動膀胱の抑制などの薬理作用を示すことが示唆された。本研究結果は、SPE の下部尿路に対する新たな薬理作用を提示するもので、今後 SPE の排尿障害における臨床作用を考える上で有用な知見になると思われる。

本論文の要旨は第11回日本排尿機能学会にて発表した。

(2005年5月17日受付, 2005年7月10日受理)

文 献

- 1) Berry, S. J., Coffey, D. S., Walsh, P. C. and Ewing, L. L.: The development of human benign prostatic hyperplasia with age. *J. Urol.*, 132: 474-479, 1984
- 2) 大島伸一, 西澤理, 平尾佳彦, 長谷川友紀: 前立腺肥大症診療ガイドライン: 2001
- 3) Gerber, G. S.: Saw palmetto for the treatment of men with lower urinary tract symptoms. *J. Urol.*, 163: 1408-1412, 2000
- 4) Koch, E.: Extracts from fruits of Saw Palmetto (*Sabal serrulata*) and roots of Stinging Nettle (*Urtica dioica*): Viable alternatives in the medical treatment of benign prostatic hyperplasia and associated lower urinary tracts symptoms. *Planta Med.*, 67: 489-500, 2001
- 5) Ernst, E.: The risk-benefit profile of commonly used herbal therapies: Ginkgo, St. John's wort, Ginseng, Echinacea, Saw Palmetto, and Kava. *Ann. Intern. Med.*, 136: 42-53, 2002
- 6) Iehlé, C., Délos, S., Guirou, O., Tate, R., Raynaud, J. P. and Martin, P. M.: Human prostatic steroid 5 α -reductase isoforms - A comparative study of selective inhibitors. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 54: 273-279, 1995
- 7) Sultan, C., Terraza, A., Devillier, C., Carilla, E., Briley, M., Loire, C. and Descomps, B.: Inhibition of androgen metabolism and binding by a liposterolic extract of "*Serenoa repens* B" in human foreskin fibroblast. *J. Steroid Biochem.*, 20: 515-519, 1984
- 8) Breu, W., Hagenlocher, M., Redl, K., Tittel, G., Stadler, F. and Wagner, H.: Anti-inflammatory activity of sable fruit extracts prepared with supercritical carbon dioxide. *In vitro* antagonists of cyclooxygenase and 5-lipoxygenase metabolism. *Arzneimittel-Forschung*, 42: 547-551, 1992
- 9) Paubert-Braquet, M., Cousse, H., Raynaud, J. P., Mencia-Huerta, J. M. and Braquet, P.: Effect of the liposterolic extract of *Serenoa repens* (Permixon) and its major components on basic fibroblast growth factor-induced proliferation of cultures of human prostate biopsies. *Eur. Urol.*, 33: 340-347, 1998
- 10) Goepel, M., Hecker, U., Krege, S., Rübber, H. and Michel, M. C.: Saw palmetto extract potently and noncompetitively inhibit human α -adrenoceptors in vitro. *The Prostate*, 38: 208-215, 1999
- 11) Carraro, J. C., Raynaud, J. P., Koch, G., Chisholm, G. D., Di Silverio, F., Teillac, P., Da Silva, F. C., Cauquil, J., Chopin, D. K., Hamdy, F. C., Hanus, M., Hauri, D., Kalinteris, A., Marenca, J., Perier, A. and Perrin, P.:

- Comparison of phytotherapy (Permixon) with finasteride in the treatment of benign prostate hyperplasia: a randomized international study of 1,098 patients. *The Prostate*, 29: 231-240, 1996
- 12) SABALSELECT™, indena[®], <http://www.indena.com/pdf/sabalselect.pdf>
 - 13) Yamada, S., Ashizawa, N., Ushijima, H., Nakayama, K., Hayashi, E. and Honda, K.: α -Adrenoceptors in human prostate: Characterization and alteration in benign prostatic hypertrophy. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 242: 326-330, 1987
 - 14) Oki, T., Kimura, R., Saito, M., Miyagawa, I. and Yamada, S.: Demonstration of bladder selective muscarinic receptor binding by intravesical oxybutynin to treat overactive bladder. *J. Urol.*, 172: 2059-2064, 2004
 - 15) Yamada, S., Kimura, R., Harada, Y. and Nakayama, K.: Calcium channel receptor sites for (+)-[³H]PN 200-110 in coronary artery. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 252: 327-332, 1990
 - 16) Michel, A. D. and Humphrey, P. P. A.: Effects of metal cations on [³H] α , β -methylene ATP binding in rat vas deferens. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 350: 113-122, 1994
 - 17) Bennett, J. P.: Methods in binding studies. *In Neurotransmitter Receptor Binding*. Ed. By Yamamura, H. I., Enna, S. J. and Kuhar, M. J. 57-90, Raven press, New York, 1978
 - 18) Yamada, S., Yamamura, H. I. and Roeske, W. R.: Characterization of α -1 adrenergic receptors in the heart using [³H]WB4101: Effect of 6-hydroxydopamine treatment. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 215: 176-185, 1980
 - 19) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275, 1951
 - 20) Gutierrez, M., Garcia de Boto, J. J., Cantabrana, B. and Hidalgo, A.: Mechanisms involved in the spasmolytic effect of extracts from *Sabal serrulata* fruit on smooth muscle. *Gen. Pharmacol.*, 27: 171-176, 1996
 - 21) Gutierrez, M., Hidalgo, A. and Cantabrana, B.: Spasmolytic activity of a lipidic extract from *Sabal serrulata* fruits: Further study of the mechanisms underlying this activity. *Planta Medica*, 62: 507-511, 1996
 - 22) Ordway, R. W., Singer, J. J. and Walsh, Jr, J. V.: Direct regulation of channels by fatty acids. *Trends Neurosci.*, 14: 96-100, 1991
 - 23) Birder, L. A. and de Groat, W. C.: Increased c-fos expression in spinal neurons after irritation of the lower urinary tract in the rat. *J. Neurosci.*, 12: 4878-4889, 1992
 - 24) Nangaku, M., Miyata, T., Sada, T., Mizuno, M., Inagi, R., Ueda, Y., Ishikawa, N., Yuzawa, H., Koike, H., van Ypersele de Strihou, C. and Kurokawa, K.: Anti-hypertensive agents inhibit *in vivo* the formation of advanced glycation end products and improve renal damage in a type 2 diabetic nephropathy rat model. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 14: 1212-1222, 2003
 - 25) Persson, K., Pandita, R. K., Spitsbergen, J. M., Steers, W. D., Tuttle, J. B. and Andersson, K. E.: Spinal and peripheral mechanisms contributing to hyperactive voiding in spontaneously hypertensive rats. *Am. J. Physiol.*, 275: R1366-R1373, 1998
 - 26) Spitsbergen, J. M., Clemow, D. B., McCarty, R., Steers, W. D. and Tuttle, J. B.: Neurally mediated hyperactive voiding in spontaneously hypertensive rats. *Brain Res.*, 790: 151-159, 1998.
 - 27) Clemow, D. B., McCarty, R., Steers, W. D. and Tuttle, J. B.: Efferent and afferent neuronal hypertrophy associated with micturition pathways in spontaneously hypertensive rats. *NeuroUrol. Urodyn.*, 16: 293-303, 1997
 - 28) Fetrow, C. W. and Avila, J. R.: *Professional's Handbook of Complementary and Alternative Medicines*. Springhouse, PA: Springhouse; 1999
 - 29) Yamada, S., Isogai, M., Kagawa, Y., Takayanagi, N., Hayashi, E., Tsuji, K. and Kosuge, T.: Brain nicotinic acetylcholine receptors. Biochemical characterization by neosurugatoxin. *Mol. Pharmacol.*, 28: 120-127, 1985
 - 30) Anderson, G. F. and Navarro, S. P.: The response of autonomic receptors to castration and testosterone in the urinary bladder of the rabbit. *J. Urol.*, 140: 885-889, 1988
 - 31) Van Coppenolle, F., Le Bourhis, X., Carpentier, F., Delaby, G., Cousse, H., Raynaud, J.-P., Dupouy, J.-P. and Prevarskaya, N.: Pharmacological effects of the lipidosterolic extract of *Serenoa repens* (Permixon[®]) on rat prostate hyperplasia induced by hyperprolactinemia: Comparison with finasteride. *The Prostate*, 43: 49-58, 2000
 - 32) Paubert-Braquet, M., Richardson, F. O., Servent-Saez, N., Gordon, W. C., Monge, M. C., Bazan, N. G., Authie, D. and Braquet, P.: Effect of *Serenoa repens* extract (Permixon[®]) on estradiol/testosterone-induced experimental prostate enlargement in the rat. *Pharmacol. Res.*, 34: 171-179, 1996
 - 33) 安田耕作, 井川靖彦, 山西友典, 北原聡史: 排尿障害の薬物治療. p.144-151, 三輪書店(東京), 2000
 - 34) Rhodes, L., Primka, R. L., Berman, C., Vergult, G., Gabriel, M., Pierre-Malice, M. and Gibelin, B.: Comparison of finasteride (Proscar[®]), a 5 α reductase inhibitor, and various commercial plant extracts in *in vitro* and *in vivo* 5 α reductase inhibition. *The Prostate*, 22: 43-51, 1993

健康食品・サプリメントの有効性と 医薬品との相互作用

— 実験的検証と臨床評価へのアプローチ —

The efficacy of functional food/supplement and their interactions with medicines

— Evidence and Approach for Clinical Evaluation —

隠岐 知美 鈴木 真由美 内田 信也 山田 静雄

静岡県立大学薬学部 薬剤学教室 & 21世紀Center of Excellence (COE) プログラム

〒422-8526 静岡市駿河区谷田52-1 Tel: 054-264-5631 Fax: 054-264-5635 E-mail: yamada@ys7.u-shizuoka-ken.ac.jp

1 はじめに

近年、わが国においては、代替医療の普及と高齢者人口の増加に伴い、健康増進や疾患の予防・治療を目的として健康食品への関心が高まっている。欧米では、民間薬として伝承されてきたメディカルハーブを医療の現場において積極的に活用しており、本邦でも健康食品として容易に入手可能である。特に高齢者では、医薬品とともに健康食品の摂取率が高く、この傾向は今後益々増加すると予想される。一方において健康食品の使用頻度が増大するに従い、その過剰摂取による健康被害や医薬品と併用した場合の有害事象が報告されている。しかしながら、メディカルハーブを含めいわゆる健康食品に関しては医薬品の場合と比較して、有効性についてそのメカニズムを含めた科学的検証は未だ十分とは言えず、健康食品それ自体の有害事象や医薬品との相互作用に関して信頼できる情報の提供も行われていない。従って、いわゆる健康食品の適正な使用を確保するためには有効性及び安全性に関する科学的根拠の確立が急務といえる。本稿では、近年特に注目されている健康食品のうち、前立腺肥大による排尿症状の改善目的で使用されるノコギリヤシ果実抽出液と血液循環や老年性痴呆を緩和する目的で販売されているイチョウ葉エキスを取り上げ、それらの有効性、安全性及び臨床薬との相互作用・併用効果について、我々の最近の知見を中心に紹介する。

2 ノコギリヤシ果実抽出液

2.1 前立腺肥大症とノコギリヤシ果実抽出液

食生活の欧米化や高齢者人口の増加に伴い、前立腺肥大症患者が急増している。前立腺肥大症は排尿困難や残尿を呈する疾患であるが、この薬物治療は現在 α_1 遮断薬やホルモン剤が汎用される。これらの医薬品では起立性低血圧や性機能障害などの副作用が問題となっており、また前立腺肥大症患者の約半数においては頻尿症状も出現することから、抗コリン薬も併用される場合も多い。カンザス大学の泌尿器外来に来院する男性患者を対象に代替医療食品の使用率を調査したところ、302例中約半数の患者が前立腺の健康を目的にノコギリヤシを含めた何らかの代替医療食品を使用していた。これより、泌尿器系疾患の男性において、代替医療食品が普及していること、また年齢が上がるにつれその使用率も高まると報告している¹⁾。

ヤシ科シュロ属のノコギリヤシ果実抽出液 (*Serenoa repens*, Saw palmetto extract : SPE) は、北米原産の低灌木で、南東部の海岸地帯の砂丘の松林に生息している。現在報告されているノコギリヤシ果実抽出液の薬理作用としては、5 α -リダクターゼ阻害や抗アンドロゲン作用など主に前立腺の肥大を抑制する作用が報告されている²⁾。しかし、ノコギリヤシ果実抽出液の排尿機能に対