

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007 ～ 2009
 課題番号：19590123
 研究課題名（和文）ヒト消化管での薬物動態に与えるプロバイオティクスの影響
 研究課題名（英文）Effects of probiotics on human intestinal absorption and metabolism of drugs.

研究代表者
 清水 美貴子（SHIMIZU MIKIKO）
 慶應義塾大学・薬学部・講師
 研究者番号：90396391

研究成果の概要（和文）：ヒト消化管モデル Caco-2 細胞およびラットを用いた実験により、医薬品が小腸で CYP3A4 代謝や抱合反応を受ける場合、BCRP により輸送される場合には、その体内動態がプロバイオティクス（*Lactobacillus casei*）との併用により変化することを明らかにした。また、既に発表された臨床試験論文を収集し、系統的な統計解析（メタアナリシス）を行うことにより、脂質異常症の予防、更に心疾患リスクの軽減にプロバイオティクス摂取が有用であることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）： In experiments using human intestinal epithelial-like Caco-2 cells and rats, we clarified that probiotics containing *Lactobacillus casei* affect the pharmacokinetics of coadministered drugs, which are metabolized by CYP3A4, subjected to the conjugation reaction, or transported by BCRP in the small intestine. In a meta-analysis, we also clarified that probiotic supplementation may lead to reductions in risk factors for cardiovascular disease and could be useful in the primary prevention of hyperlipidemia.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	800,000	240,000	1,040,000
2008 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：消化管、小腸、薬物動態、プロバイオティクス、薬物代謝酵素、薬物輸送担体、脂質異常症、メタアナリシス

1. 研究開始当初の背景

近年、医療費負担の増加などを背景に、様々なサプリメントを含む健康食品が販売され、使用されている。特に乳酸菌食品などの“プロバイオティクス”には、生活習慣病やがん予防効果、免疫調節作用など、様々な有益な作用があることが報告されている。しかし、その信憑性・有用性については、様々な研究レベルの情報が錯綜しており、科学的な基礎および臨床研究により評価を行う必要がある、と申請者らは考えた。

一方、様々な食品成分が消化管に存在する薬物代謝酵素や薬物輸送担体の機能に影響を与え、医薬品の効果や副作用に影響を及ぼす事例が報告されている。今後、健康食品を摂取している国民が薬物療法を受ける機会も増加すると考えられるが、医薬品の適正使用に必要な情報である“医薬品とプロバイオティクスの相互作用”に関する研究は全く行われていない。申請者らは、プロバイオティクスは、免疫系への作用を介して薬物代謝酵素および薬物輸送担体機能に影響を与える可能性が高いと考えた。さらに、薬物代謝酵素は、解毒だけでなく、外来異物を代謝活性化することで発がん等に関与するため、プロバイオティクスによるがん予防作用は、薬物代謝酵素活性の制御によるかもしれないと考えた。

2. 研究の目的

当該分野における国内外の動向を踏まえ、本研究では、(1)プロバイオティクスの生活習慣病の予防・治療効果の検証、(2)ヒト小腸での薬物代謝酵素および薬物輸送担体の遺伝子発現や機能に対するプロバイオティクスの影響ならびにその制御機構の解明、について基礎から臨床までを包括的に評価することに主眼を置いた。そして、これらの結果を利用し、疾患予防や薬物療法の効率化等、プロバイオティクス摂取の臨床的意義を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1)メタアナリシスを用いた血清脂質濃度に対するプロバイオティクス摂取の有用性の評価

Pub Med®(MEDLINE 1948-2008年8月)、Cochrane Central Register of Controlled Trials(3rd Quarter 2008)、医中誌Web(医学中央雑誌 1983-2008年8月)の国内外の3つのデータベースを用いて論文を検索した。論文採択基準は、1)臨床試験、2)無作為化比較試験、3)プロバイオティクス摂取とプラセボ摂取(または非摂取)との比較、4)血清脂質濃度の記載有りとした。統計解析はReview Manager 5を用いて行った。

(2)小腸の薬物代謝酵素および薬物輸送担体に対する *Lactobacillus casei* の影響

In vitro:

ヒト小腸のモデル系である3週間培養したCaco-2細胞に、プロバイオティクスとして *Lactobacillus casei* (*L.casei*, 10^6 - 10^9 CFU/mL)を暴露した。

P450 機能

*L.casei*を暴露したCaco-2細胞からRNAを抽出し、リアルタイムPCR法にてCYP1A1、CYP1B1およびCYP3A4遺伝子の発現量を測定した。また、7-ethoxyresorufinおよびmidazolamを用いて、CYP1A活性およびCYP3A活性を評価した。さらに、Aryl hydrocarbon receptor (AhR) 誘導剤および阻害剤を用い、*L.casei*によるCYP1A活性の誘導機構の解明を試みた。

抱合反応および薬物輸送担体機能

<グルクロン酸抱合反応>

グルクロン酸転移酵素(UGT)の遺伝子発現をリアルタイムPCR法により、Naphthol (NP)添加時のグルクロン酸抱合体(NAG)の培地中濃度をHPLCにより定量した。またCaco-2細胞から得たミクロソームと $[^{14}C]$ UDP-GAを用いてUGT活性を測定した。

<硫酸抱合反応および薬物輸送担体機能>

硫酸転移酵素(SULT)の遺伝子発現をリアルタイムPCR法により、acetaminophen (AAP)添加時の培地中の硫酸抱合体(AAP-Sulphate: AS)量をHPLCにより定量した。またCaco-2細胞から得た可溶性画面分と $[^{35}S]$ PAPSを用いてSULT活性を測定した。BCRPおよびMRPs活性は、それぞれ $[^3H]$ estrone sulfateおよびCalcein-AMを用いて評価した。

In vivo:

<ラットを用いたAAPの体内動態>

一晩絶食したSD系雄性ラットに、ペントバルビタール麻酔下、*L.casei*を十二指腸投与すると同時に、AAPを静脈内、十二指腸または門脈内に投与した。血漿中のAAP、AAP-glucuronide (AG)、AS濃度をHPLCにて定量した。

4. 研究成果

(1)メタアナリシスを用いた血清脂質濃度に対するプロバイオティクス摂取の有用性の評価

論文検索を行い、内容を吟味した結果、8報が今回のメタアナリシスの論文採択基準を満たした。解析の結果、プロバイオティク

ス摂取により、総コレステロール (TC) 値 (mean difference [95%CI]: -0.09[-0.15, -0.03] mmol/L) および LDL コレステロール (LDL-C) 値 (mean difference [95%CI]: -0.16[-0.23, -0.08] mmol/L) が有意に低下した。一方、HDL コレステロール値およびトリグリセリド値には、プロバイオティクス摂取群と非摂取群で、統計学的な有意差はなかった。層別化解析の結果、長期間 (>4 週間) のプロバイオティクス摂取により、TC 値および LDL-C 値の有意な低下が認められた。

最近の疫学調査から、血清 TC 値、LDL-C 値の低下と心疾患リスクの減少には正の相関があることが示されている。今回の解析により、プロバイオティクス摂取は、血清 TC 値および LDL-C 値低下作用を介して、脂質異常症の予防、更に心疾患リスクの軽減に有用であると考えられる。

(2) 小腸の薬物代謝酵素および薬物輸送担体に対する *L.casei* の影響

In vitro :

P450 機能

CYP1A1 および CYP1B1 遺伝子発現は *L.casei* の濃度および暴露時間依存的に誘導された。また、*L.casei* 暴露により CYP1A 活性の誘導が認められたが、この効果は -naphthoflavone (-NF) によって完全に抑制された。さらに、低濃度の -NF による CYP1A 活性の誘導に対し、*L.casei* は相加・相乗効果を示したが、高濃度の -NF の誘導効果に対しては阻害作用を示した。以上のことから、*L.casei* による CYP1A の誘導は AhR を介して起こることが明らかとなった。また、他の強力な AhR アゴニストと併用した場合、*L.casei* は AhR の部分アゴニストとして働き、CYP1A 活性を抑制することが明らかとなった。従って、*L.casei* は、小腸で AhR との相互作用を介して経口摂取された発がん物質の過度な代謝活性化を抑制すると考えられ、この作用が *L.casei* による発がんリスクの軽減作用および予防効果につながっている可能性がある。

一方、CYP3A4 遺伝子発現および活性は、*L.casei* の濃度および暴露時間依存的に減少した。現在、この制御機構の解明を行っている。

抱合反応および薬物輸送担体機能

< グルクロン酸抱合反応 >

NAG の生成量は、*L.casei* の菌体濃度依存的に有意に減少した (図 1)。また NAG 生成に対する阻害物質は、*L.casei* が産生する分子量 1 万以下の低分子であることが明らかになった。

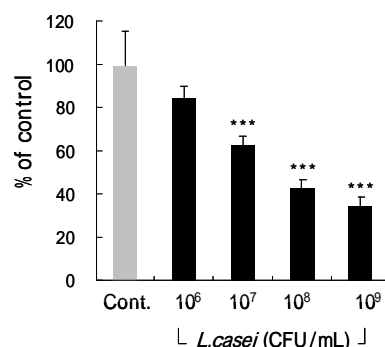


図 1 Caco-2 細胞に *L.casei* を 24 時間暴露したときの NAG の生成量の変化

グラフの数値は 3 例の平均 ± 標準偏差を示す。

*** $p < 0.001$; Cont. との比較

L.casei 添加により、マイクロソームの UGT 活性は有意に減少したが、UGT1A6 遺伝子発現に対する影響は認められなかった。従って、*L.casei* による UGT 活性の阻害は、遺伝子の転写レベルではなく、酵素に対する直接作用である可能性が示唆された。

< 硫酸抱合反応および薬物輸送担体機能 >

L.casei の添加により、消化管側 (Apical; AP) および血液側 (Basolateral; BL) の AS 量が有意に減少した。可溶性面分の SULT 活性および [³H]estrone sulfate の AP 側への排出は *L.casei* 添加により有意に減少したが、Calcein-AM の細胞外排出に対する影響は認められなかった。従って、*L.casei* は SULT 活性および BCRP 機能を阻害し、その結果 AS の消化管側および血液側量が減少したと考えられる。

In vivo :

< ラットを用いた AAP の体内動態 >

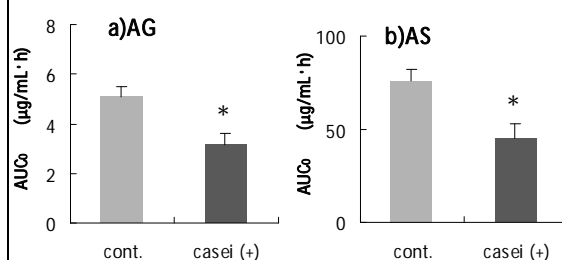


図 2 AP と *L.casei* をラットに十二指腸投与したときの AG および AS の AUC

グラフの数値は 3 例の平均 ± 標準偏差を示す。

* $p < 0.05$; Cont. との比較

ラットに AAP を十二指腸投与したとき、AG および AS の AUC は *L.casei* の併用により有意に減少した (図 2)。一方、AAP の静

脈内および門脈内投与時の AG および AS の AUC に対する *L.casei* の影響は認められなかった。従って、*in vivo* においても *L.casei* の小腸の抱合酵素活性および薬物輸送担体機能を変化させる可能性が示唆された。

今回、これまで明らかにされていなかった“医薬品とプロバイオティクスの相互作用”について、*in vitro* から *in vivo* までを包括的に評価することを目的に、研究を遂行した。その結果、医薬品が小腸で CYP3A4 代謝や抱合反応を受ける場合、BCRP により輸送される場合には、その体内動態がプロバイオティクス (*L.casei*) との併用により変化し、効果や毒性に影響を及ぼす可能性があることが示唆された。今回得られた結果は、プロバイオティクスと医薬品の有効かつ安全な使用のために有益な情報であると考えられる。現在、ヒト消化管での CYP3A4 および P-gp に対するプロバイオティクスの役割を評価する事を目的とした臨床試験を実施中であり、今後、更に有益な情報を発信する事が出来ると考える。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計 7 件)

清水美貴子、田中佑京、竹内修、永田由樹、田村悦臣：Caco-2 細胞における CYP1A/1B 誘導機構、フォーラム 2009 衛生薬学・環境トキシコロジー、2009 年 11 月 6 日、沖縄。

増子由樹、清水美貴子、上田恵理華、田村悦臣：ラットの薬物抱合反応に対する *Lactobacillus casei* の影響、第 53 回日本薬学会関東支部大会、2009 年 10 月 3 日、埼玉。

田中佑京、清水美貴子、永田由樹、田村悦臣：Caco-2 細胞の CYP1A/1B 遺伝子発現および機能に及ぼすプロバイオティクスの影響、日本薬学会 第 129 年会、2009 年 3 月 28 日、京都。

清水美貴子、杉田隆、竹内修、望月眞弓、田村悦臣：プロバイオティクスの科学的エビデンスの構築 基礎と臨床研究の統合 -(シンポジウム講演)、日本薬学会 第 129 年会、2009 年 3 月 27 日、京都。

内田怜、清水美貴子、望月眞弓、田村悦臣：メタアナリシスを用いた血清脂質濃度に対するプロバイオティクス摂取の有

用性の評価、日本薬学会 第 129 年会、2009 年 3 月 26 日、京都。

M. Shimizu, R. Uchida, M. Mochizuki, H. Tamura: Meta-analysis: effects of probiotic supplementation on serum lipid levels in humans., The 9th World Conference on Clinical Pharmacology and Therapeutics, 2008/07/31, Quebec City, Canada.

清水美貴子、増子由樹、杉田隆、田村悦臣：Caco-2 細胞の抱合反応に対するプロバイオティクスの影響、日本薬学会 第 128 年会、2008 年 3 月 26 日、横浜。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清水 美貴子 (SHIMIZU MIKIKO)
慶應義塾大学・薬学部・講師
研究者番号：90396391

(2) 研究分担者

橋口 正行 (HASHIGUCHI MASAYUKI)
慶應義塾大学・薬学部・准教授
研究者番号：10271355
(平成 19、21 年度)

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

杉田 隆 (SUGITA TAKASHI)
明治薬科大学・薬学部・准教授
研究者番号：10312076

竹内 修 (TAKEUCHI OSAMU)
(社)北里研究所・北里研究所病院・研究員
研究者番号：00249997