

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2014

課題番号：22590122

研究課題名(和文)生活習慣病の予防・治療におけるプロバイオティクスの臨床的有用性の評価

研究課題名(英文)Evaluation of the clinical usefulness of probiotics for the prevention and treatment of lifestyle-related disease

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト小腸モデルCaco-2細胞を用いた実験により、小腸でのコレステロールの吸収およびエステル化を抑制するビフィズス菌種を見出した。また、プロバイオティクスとの併用により、脂質異常症治療薬の体内動態および効果が変化する可能性が示唆された。更に、医療経分析の結果、軽度の脂質異常者に対するプロバイオティクス製品の摂取は、費用対効果に優れている事が示された。

研究成果の概要(英文)：In experiments using human intestinal epithelial-like Caco-2 cells, we found a bifidobacteria strain that inhibits the absorption and esterification of cholesterol in the small intestine. The possibility that the pharmacokinetics and pharmacological effects of antihyperlipidemic drugs are changed by coadministration with probiotics was suggested. In addition, the results of pharmaco-economic analysis showed that the ingestion of probiotic preparations in patients with mild hyperlipidemia is cost-effective.

研究分野：臨床薬理学

キーワード：プロバイオティクス 脂質異常症治療薬 消化管 薬物代謝酵素 薬物輸送担体 コレステロール

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、予防医学の重要性が指摘され、健康食品への関心が高まっているが、その有用性は必ずしも確立されていない。また、服用中の医薬品に対する食品成分の影響(いわゆる、相互作用)も問題となっている。

一方、生活習慣病の一つである脂質異常症は、心疾患の原因となる動脈硬化の危険因子の一つであり、血清脂質濃度を改善することで心疾患を予防できることが、臨床試験により明らかにされている。また、小腸からのコレステロール(Cho)吸収を抑制する事の重要性が指摘されている。乳酸菌をはじめとする“プロバイオティクス”には生活習慣病やがん予防など、様々な有益な作用があることが報告されている。申請者は既に、軽度の脂質異常を示すヒトがプロバイオティクスを摂取することで、血清脂質濃度が有意に低下することをメタ解析により証明している。また、ヒト培養細胞を用いた基礎研究により、*Lactobacillus casei* (*L.casei*) が消化管での Cho の取り込みを阻害すること、およびその制御機構を明らかにし、これが血清脂質濃度低下の一因になっている可能性を見出した。ただし、プロバイオティクス摂取による血清脂質濃度低下メカニズムは複雑であり、さらに網羅的な解析が必要であると申請者は考えた。次に、脂質異常症の患者では治療薬とプロバイオティクスを併用する機会が増加することが予想される。申請者は、これまでの研究により、*L.casei* が消化管での薬物代謝酵素や薬物輸送担体の遺伝子発現や機能を阻害あるいは誘導し、医薬品の体内動態を変化させることが明らかにしている。従って、プロバイオティクスとの併用により、脂質異常症治療薬の体内動態が変化し、効果および副作用の発現に影響を与える可能性があると考えた。

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、脂質異常症の予防・治療における“プロバイオティクス”摂取の臨床的意義を明確にすることを目的に、医薬品との相互作用とその制御機構の解明、血清脂質濃度低下機構の解明、医療経済学的効果、の観点から、基礎から臨床までの包括的な評価を行う。本研究により、脂質異常症の予防・治療におけるプロバイオティクス摂取の臨床的有用性と、脂質異常症治療薬の適正使用に関する情報を発信することができる。

3. 研究の方法

ヒト小腸のモデルとして 3 週間培養した Caco-2 細胞に、プロバイオティクスとして、代表的な腸内細菌である *Lactobacillus* 属の *L.casei* と、その整腸作用により“特定保健用食品”として市販されている

Bifidobacterium 属の菌種 (*Bif*) の培養液および培養濾液を暴露した。

(1) 医薬品との相互作用と制御機構の解明

消化管の薬物代謝酵素・薬物輸送担体に対する影響評価

薬物代謝酵素・薬物輸送担体遺伝子の発現量を Real-time PCR 法にて、タンパク発現および核移行を Western Blot 法および免疫染色法により測定した。酵素活性および機能は、特異的基質を用いて評価した。薬物輸送担体のプロモーター領域と転写調節因子との結合は、ChIP assay にて測定した。

薬物動態に対する影響評価

液体クロマトグラフィー質量分析法 (LC/MS/MS 法) を用いて、ヒト生体試料中の脂質異常症治療薬および活性代謝物の定量法の確立を行った。

3 週間極性培養した Caco-2 細胞に simvastatin または活性代謝物である simvastatin acid と *L.casei* 培養液を添加し、simvastatin および simvastatin acid の濃度を LC/MS/MS により定量した。

(2) 血清脂質濃度低下機構の解明

Cho の取り込み・代謝・合成に関わる遺伝子の発現量を Real-time PCR 法にて、タンパク質発現量を Western Blot 法にて測定した。また、ミセル化した [³H]Cho の細胞内取り込み量を液体シンチレーションカウンターにて測定した。 [¹⁴C]Cho ミセル添加後、細胞内の Cho エステル量を TLC を用いて分離定量した。プロバイオティクス暴露により産生される生理活性物質の培地中および細胞内濃度は HPLC により定量した。また、それら物質の添加による Cho エステル合成量への影響を評価した。

(3) 医療経済学的効果

日本人の冠動脈疾患 (Coronary Heart Disease : CHD) 予防に対するプロバイオティクス摂取の社会的意義を明らかにする事を目的に、医療経済学的評価を行った。分析視点は社会の立場とし、プロバイオティクスを日常的に摂取した場合としなかった場合の CHD 発症前の状態から死亡状態までの stage を移行するマルコフモデルを構築し、費用対効果分析を行なった。分析には Tree Age Pro 2011 を用いた。

4. 研究成果

(1) 医薬品との相互作用と制御機構の解明

消化管の薬物代謝酵素・薬物輸送担体に対する影響評価

市販菌種 *Bif* の培養液および培養濾液の暴露により、Caco-2 細胞の数種の薬物輸送担体、Cytochrome P450 (CYP)、UDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT) および硫酸転移酵素 (SULT) の遺伝子発現および活性に影響が認められた。

Bif により、Breast Cancer Resistance Protein (BCRP) の遺伝子発現量およびタンパク発現量および輸送活性が有意に増加したことから、さらにその発現調節機構の解明を行った。その結果、本菌種による BCRP の転写活性化は、複数の転写因子と BCRP 遺伝子のプロモーター領域との結合量の増加および相互作用に起因することが明らかとなった。

薬物動態に対する影響評価

LC/MS/MS 法を用いて、HMG-CoA 還元酵素阻害剤である Statin 類 (atorvastatin、simvastatin、rosuvastatin、pitavastatin、fluvastatin) の、ヒト生体試料 (血漿、尿) および Caco-2 (細胞、培地) 中濃度の定量法を確立した。

L.casei 培養液暴露により、simvastatin 添加後の培地中の simvastatin 量は有意に増加し、一方、simvastatin acid 量は有意に減少した。このことから、*L.casei* が simvastatin から simvastatin acid への加水分解反応の阻害作用を有する可能性を示唆された。さらに、simvastatin acid 添加後の消化管 (apical) 側の simvastatin acid 量は *L.casei* により有意に減少した。これは、*L.casei* による Multiple drug resistance 1 (MDR1) の輸送機能が阻害されたためと考えられた。結果として、*L.casei* による血管 (basolateral) 側への simvastatin および simvastatin acid の排泄の増大が起こっており、これは、*L.casei* 併用時に、門脈血や肝臓に到達する両化合物の量が増加することを示している。従って、*L.casei* を含む食品との併用により、simvastatin のコレステロール低下効果が増大する可能性がある事が明らかとなった。

(2) 血清脂質濃度低下機構の解明

市販菌種 *Bif* の培養液および培養濾液の暴露により、Cho 吸収トランスポーター (Niemann-Pick C1 like 1 Protein ;NPC1L1) の遺伝子発現およびタンパク質の発現が有意に減少した。また、Cho 合成に関与する因子 (HMG-CoA-reductase 等) や、Cho 代謝に関与する因子 (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ 等) の遺伝子発現およびタンパク質の発現にも変化が認められた。一方、*L.casei* 暴露による、これら遺伝子発現に対する有意な変化は認められなかった。

[³H]Cho の細胞内取り込み量および [¹⁴C]Cho エステル合成量は、LKM512 の培養液および培養濾液の暴露により有意に抑制された。また、培地中の菌体への Cho の吸着が認められた。

また、本菌種の刺激により、Caco-2 内で合成され、細胞内での Cho エステルの合成を抑制する物質を見出すことができた。

これらのことから、市販菌種 *Bif* が産生する物質が、小腸での Cho 吸収抑制およびそれに伴う細胞内 Cho 動態を変化させる事、さらに Cho のエステル化を抑制することで、血清脂

質濃度を低下させる可能性が示唆された。本作用は、市販菌種 *Bif* 摂取による脂質異常症の予防につながる事が期待できる。また市販菌種 *Bif* の刺激により Caco-2 細胞で合成される生理活性物質がこれらの効果の一員である可能性が示唆された。

(3) 医療経済学的効果

プロバイオティクス摂取群の期待生存年は、非摂取群と比較して 0.11 年長かった。またプロバイオティクス摂取群の総費用は、非摂取群と比較して 23.3 万円高かった。治療により期待生存年を 1 年得るために追加的に発生する費用 (増分費用) は、257.8 万円/年と算出された。日本人の CHD 予防において、プロバイオティクスの摂取は、費用対効果において優れていることが示された。従って、軽度の脂質異常者には、積極的なプロバイオティクス製品の摂取が推奨される。そのことにより、CHD の発症が予防され、国民医療費の増加の抑制に寄与できると考えられる。

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)

[雑誌論文] (計 4 件)

Shimizu M., Hashiguchi M., Shiga T., Nakamura K., Tamura H., Mochizuki M. Determination of pilsicainide in microscale samples of human biological fluids using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J.Chromatogr.B.* 985:175-179, 2015 (査読有).

Shiga T., Hashiguchi H., Nakamura K., Shimizu M., Shimizu K., Suzuki A., Mochizuki M., Hagiwara N. Lack of pharmacokinetic interaction between pilsicainide and rifampicin in healthy volunteers. *Jpn. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 44:301-305, 2013(査読有).

Hashiguchi M., Shimizu M., Takeuchi O., Hayashi T., Inoue S., Tanaka T., Tsuru T., Irie S., Kurokawa T., Mochizuki M. Relationship between genetic polymorphism and mRNA expression of dihydrofolate reductase enzyme in a healthy Japanese population. *Jpn. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 44:185-192, 2013(査読有).

Shimizu M., Hashiguchi M. Interaction between probiotics and lipid-lowering drugs. *Recent Advances in clinical Pharmacology.* 33: 66-74, 2012.

[学会発表] (計 11 件)

清水美貴子, 森重ちひろ, 清水駿, 橋口 正行, 田村悦臣: システムティックレビューによるイソフラボン摂取と乳がん発症リスクとの関連性の検討、日本薬学会第

135 年会、2015 年 3 月 28 日、神戸サンポ
ーホール(神戸)。

清水美貴子、橋口正行、田村悦臣、望月
眞弓：間接比較法を用いた St. John's Wort
の抗うつ効果の有用性の検討、第 34 回日
本臨床薬理学会年会、2014 年 12 月 4 日、
ひめぎんホール(松山)。

清水美貴子、吉田美咲、橋口正行、望月眞
弓、田村悦臣：メタ解析を用いた日本の大
腸がん発症に対するコーヒー摂取の有用
性評価、日本薬学会第 134 年会、2014 年
3 月 28 日、熊本市総合体育館(熊本)。

清水美貴子、橋口正行、志賀剛、中村統一、
田村悦臣、望月眞弓：LC/MS/MS を用い
たヒト生体試料中ピルシカイニドの定量
法の確立、第 33 回日本臨床薬理学会年会、
2013 年 12 月 5 日、東京国際フォーラム(東
京)。

清水美貴子、粟田口知美、浅和 絵里香、
砂生詩織、松本 光晴、杉田 隆、田村 悦
臣：ピフィス菌 LKM512 は、ヒト小
腸モデルCaco-2 細胞でのコレステロール
吸収を阻害する、日本薬学会第 133 年会、
2013 年 3 月 29 日、パシフィコ横浜(横
浜)。

清水美貴子、堀内一成、田村悦臣：冠動
脈疾患予防におけるプロバイオティクス
摂取の医療経済分析、第 33 回日本臨床薬
理学会年会、2012 年 11 月 30 日、沖縄コ
ンベンションセンター(沖縄)。

清水美貴子、尾形梨名、田村悦臣：乳酸
菌による Caco-2 細胞の CYP3A4 制御機構
の解明、日本薬学会第 132 年会、2012 年
3 月 31 日、高等教育推進機構(札幌)。

清水美貴子、増子由樹、田村悦臣：小腸
の抱合反応および薬物輸送担体機能に対
する乳酸菌の影響、第 32 回日本臨床薬理
学会年会、2011 年 12 月 3 日、アクトシ
ティ浜松コンgresセンター(浜松)。

清水美貴子、尾形梨名、田村悦臣：ヒト
小腸モデルCaco-2 細胞における乳酸菌の
CYP3A4 阻害機構、日本薬学会第 131 年
会、2011 年 3 月 30 日、ツインメッセ静
岡(静岡)。

清水美貴子、波崎利恵、田村悦臣：メタ
アナリシスを用いた心血管疾患の予防・
改善効果に対するビタミンの有用性評価、
日本臨床薬理学会第 31 会年会、2010 年
12 月 1 日、国立京都 国際会館(京都)。

M. Shimizu, R. Namisaki, H. Tamura:
Meta-analysis: Preventive effects of vitamin
supplementation on the progression of
cardiovascular disease., World Congress of
Pharmacy and Pharmaceutical Sciences 2010,
70th Congress of FIP, 2010/08/30, Lisbon,
Portugal.

慶應義塾大学・薬学部・講師
研究者番号：90396391

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

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

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

(4)連携研究者

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

6 . 研究組織

(1)研究代表者

清水 美貴子 (SHIMIZU MIKIKO)