

研究分担報告書

いわゆる「健康食品」摂取による薬物相互作用：薬物酵素誘導の評価-2

研究分担者 細川正清 千葉科学大学薬学部薬物動態学研究室

研究要旨：本研究においては、いわゆる「健康食品」による、薬物代謝酵素誘導が関与する薬物間相互作用を検証するにあたり、昨年度に引き続き標準的なプロトコルの作成を目的として検討を行うと共に、市販のサプリメントを用いて、酵素誘導を調べた。その結果、3-1-10 細胞および5-1 を用いた場合の薬物の曝露時間は 48 時間が適切であり、サプリメントからの抽出方法に関しては、エタノールが最適であることが示された。これらの条件を用いて市販のサプリメントについて酵素誘導を調べたところ、3-1-10 細胞に対してピクノジェノールが酵素誘導を示した。

A. 研究目的

本研究においては、いわゆる「健康食品」による、薬物代謝酵素誘導が関与する薬物間相互作用を検証するにあたり、酵素誘導の標準的なプロトコルの作成を目的として検討を行うとともに、市販のサプリメントを用いて酵素誘導の有無を調べた。

B. 研究方法

細胞：本実験に用いた細胞は、東北薬科大学薬学部永田清教授より提供された CYP3A4 レポーター遺伝子安定発現細胞株（3-1-10 細胞）および、CYP1A2 レポーター遺伝子安定発現細胞株（5-1 細胞株）を用いた。

ルシフェラーゼアッセイ（1）

CYP3A4 レポーター遺伝子安定発現細胞株（3-1-10 細胞）を用いた場合、ルシフェラーゼアッセイは次のように行った。

3-1-10 細胞を 1×10^5 cells/well になるよう 10% FBS-DMEM 中(NEAA, pen-st)で調整し、24 穴プレートに播種し、37°C、5% CO₂ 存在下で培養した。播種 24 時間後に、薬物の入った培地

に交換することで、誘導剤の曝露を開始した。薬物曝露 24 時間または 48 時間後に、培地を除去後 PBS で 2 回洗浄を行った後、1 xPBL を 0.1mL/well それぞれ添加した。室温でプレートを 160 r.p.m で 30 分間浸透した後、エッペンドルフチューブに移した後、12,000 x g, 2 分間延伸を行い、得られた上清を別のエッペンドルフチューブに移した。上清 20μL に Luciferase Assay System (Promega #E1501) 25μL を加えて、TD-20/20 Luminometer (Turter designs, Sunnyvale, CA, USA)により測定した。

ルシフェラーゼアッセイ（2）

CYP1A2 レポーター遺伝子安定発現細胞株（5-1 細胞）を用いた場合、ルシフェラーゼアッセイは次のように行った。

5-1 細胞を 5×10^4 cells/well になるよう 10% FBS-DMEM 中(NEAA, pen-st)で調整し、24 穴プレートに播種し、37°C、5% CO₂ 存在下で培養した。播種 24 時間後に、薬物の入った培地に交換することで、誘導剤の曝露を開始した。薬物曝露 24 時間または 48 時間後に、培地を除去後 PBS で 2 回洗浄を行った後、1 xPBL を

0.1mL/well それぞれ添加した。室温でプレートを 160r.p.m で 30 分間浸透した後、エッペンドルフチューブに移した後、12,000 x g, 2 分間延伸を行い、得られた上清を別のエッペンドルフチューブに移した。上清 20 μ L に Luciferase Assay System (Promega #E1501) 25 μ L を加えて、TD-20/20 Luminometer (Turtter designs, Sunnyvale, CA, USA)により測定した。

タンパク定量法

タンパク定量はウシ血清アルブミンをスタンダードとし、DC protein assay kit II (Bio-Rad Laboratories)を用いて行った。マイクロプレートに sample protein 5 μ L、A 試薬 25 μ L、B 試薬 200 μ L を添加し室温で 15 分間静置した後、750nm の吸光度を Multispectro Microplate Reader VARIOSKAN (Thermo Electron Corporation) を用いて測定した。

C. 研究結果および考察

1) CYP3A4 レポーター遺伝子安定発現細胞株 3-1-10 細胞を用いた酵素誘導の検討

昨年度に引き続き、東北薬科大学から提供された、CYP3A4 レポーター遺伝子安定発現細胞株である 3-1-10 細胞を用いて、酵素誘導に関する検討を行った。リファンピシンの曝露時間について検討したところ、48 時間では、酵素誘導倍率が最も高かったため、この実験においては、曝露時間を 48 時間とした。

リファンピシンを 1 から 5 μ M の濃度で曝露した結果、濃度依存的に誘導が認められた。さらに、ハイパーフォリンについて同様な検討を行ったところ、濃度依存的な酵素誘導が認められた。また、市販のセントジョーンズワート (DHC) を用いて、抽出方法の検討を行ったところ、エタノールを用いた場合が、抽出が高いことが示され、以後の実験ではエタノールを用いて抽出を行った。

2) CYP1A2 レポーター遺伝子安定発現細胞株 5-1 細胞株を用いた酵素誘導の検討

1) で用いた 3-1-10 細胞は、CYP3A4 レポーター遺伝子安定細胞株であるが、ここでは CYP1A2 の酵素誘導を調べる方法を確立するために、CYP1A2 レポーター遺伝子安定細胞株である 5-1 細胞を用いて酵素誘導に関する検討を行った。ここでは標準的な酵素誘導剤として、オメプラゾールを用いた。3-1-10 細胞と同様に曝露時間を検討したところ、48 時間が最適であることが示された (Data not shown)。また、オメプラゾールを 30 μ M および 100 μ M の濃度で曝露した結果、濃度依存的に誘導が認められた (図 1)。さらに、セントジョーンズワートの CYP1A2 誘導成分であるヒペリシンを用いて検討したところ、125 μ M の濃度の曝露で酵素誘導が認められた (図 2)。さらに、また、市販のセントジョーンズワート (DHC) を用いて、抽出方法の検討を行ったところ、3-1-10 細胞同様にエタノールを用いた場合が、抽出が高いことが示された (図 2)。

3) 市販のサプリメントを用いた酵素誘導の検討 (3-1-10 細胞)

プエラミリフィリカ (DHC)、ピクノジェノール (DHC) をエタノールで抽出し、セントジョーンズワートと同様な方法で酵素誘導を調べた。その結果、ピクノジェノールでは誘導効果が見られたので、来年度はピクノジェノールの誘導成分であるプロシアジニンについて詳細に検討する必要がある (図 3)。

E. 結論

今回の検討により、CYP3A4 の誘導評価系である 3-1-10 細胞を用いた場合は、被検物質曝露時間は 48 時間で、抽出にはエタノールが最適であることが示された。実際に、この条件で市販のサプリメントについて、検討したところピクノジェノールで酵素誘導が示された。また、CYP1A2 の誘導評価系である 5-1 細胞を用いた場合も被検物質

暴露時間は 48 時間で、抽出にはエタノールが最適であることが示された。これらの結果により評価の方法が各区率されたため、来年度は、市販のサプリメントについて、スクリーニングを行う予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

T Hori, L Jin, A Fujii, T Furihata, Y Nagahara, K Chiba, M Hosokawa, Dexamethasone-mediated transcriptional regulation of rat carboxylesterase 2 gene, Xenobiotica in press

2. 著書

Satoh T and Hosokawa M, Carboxylesterases: Overview, structure, function and polymorphism. Anticholinesterase Pesticides: Metabolism, Neurotoxicity, and Epidemiology (EDs, Satoh T and Gupta RC) 2011 A John Wiley & Sons, INC., Hoboken, New Jersey, USA

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当無し

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

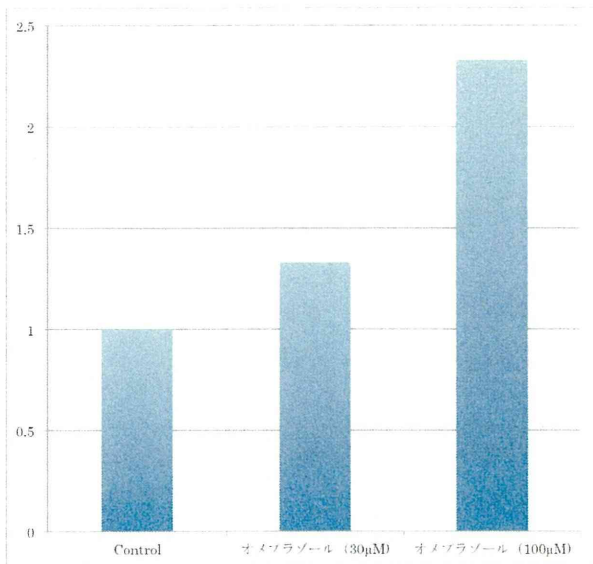


図1 CYP1A2 レポーター遺伝子安定発現細胞株である5-1細胞を用いたオメプラゾールに対する酵素誘導

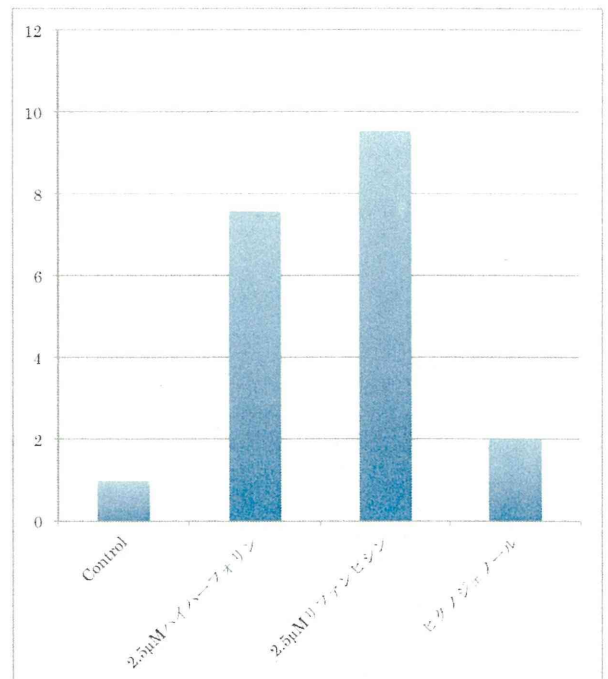


図3 CYP3A4 レポーター遺伝子安定発現細胞株である3-1-10細胞を用いたピクノジェノールに対する酵素誘導

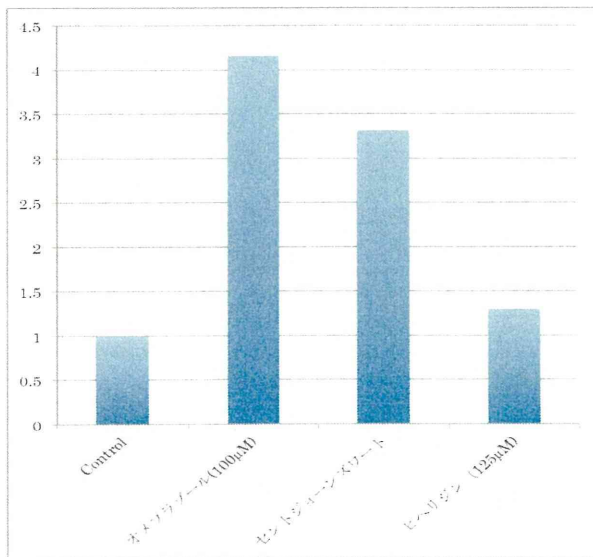


図1 CYP1A2 レポーター遺伝子安定発現細胞株である5-1細胞を用いたオメプラゾール、セントジョーンズワートおよびヒペリジンに対する酵素誘導

研究分担報告書

肝分化 iPS 細胞における肝特異的転写因子 HNF6 の薬物代謝酵素発現に対する影響

研究代表者 永田 清 東北薬科大学 薬学部 教授

研究協力者 佐々木崇光 東北薬科大学 薬学部 助教

研究要旨：医薬品相互作用等の薬物動態研究は、人工多能性幹細胞（iPS 細胞）が樹立されたことから、ヒト型薬物動態機能を十分に反映した新規ヒト肝臓モデル細胞による発展が期待されている。本研究は、昨年度に同定した iPS 細胞の肝分化誘導におけるキー遺伝子（肝特異的転写因子 HNF6）の影響を検討した。iPS 細胞の肝分化誘導過程に HNF6 をアデノウイルスを用いて導入し、薬物代謝酵素発現量の変化を測定した結果、多くの CYP 分子種で発現量の増大が認められた。特に CYP3A4 は、HNF6 発現アデノウイルス非感染肝分化 iPS 細胞と比較して、約 1400 倍もの発現量の増大が認められた。本研究は、HNF6 が iPS 細胞の肝分化誘導に重要であることを証明し、さらに初めて CYP3A4 等の薬物代謝酵素の発現に関与することも明らかにした。

A. 研究目的

現在までに我々は、ヒト iPS 細胞から肝細胞に分化誘導した肝分化 iPS 細胞を用い、薬物代謝酵素誘導について検討を行ってきた。その結果、AhR を介した薬物代謝酵素誘導機構が十分に機能していることを明らかにした。しかしながら、本肝分化 iPS 細胞の薬物代謝酵素発現量は、未だヒト肝初代細胞と比較して著しく低い状況にある。しかし、本研究課題において、iPS 細胞の肝分化誘導におけるキー遺伝子「肝特異的転写因子 HNF6」の同定に成功した。肝特異的転写因子（LETf）は、肝細胞の発生から成人肝細胞の機能維持に至る過程において非常に重要な役割を果たしており、中でも HNF6 は、HNF1 α 、HNF3 β 、HNF4 α と共に、他の LETf や肝機能に重要な酵素群の発現調節に関与する key regulator に位置づけられている。しかしながら、HNF6 は薬物代謝酵素発現調節への関与はもとより、iPS 細胞の肝分化誘導へ寄与に関する知見は報告されていない。そこで、本研究においては、HNF6 に着目し、iPS 細胞の効率的肝分化誘導法の確立と共に薬物代謝酵素発現調節への寄与について検討を行

った。

B. 研究方法

HepG2 細胞、ヒト胎児肝細胞（HFL 細胞）、ヒト肝初代培養細胞を用いた HNF6 の薬物代謝酵素発現誘導の測定

HepG2 細胞を 1.0×10^5 cells/well (24-well) で播種し、24 時間後に HNF6 発現アデノウイルスを感染させた。HFL 細胞及びヒト肝初代培養細胞については、それぞれ 5.0×10^4 cells/well 及び 1.0×10^5 cells/well (コラーゲンコート 24-well) で播種した。72 時間後、細胞を TRI REAGENT を用いて回収し、total RNA の抽出を行った。次に、SYBR Premix Ex Taq (TaKaRa) を用いたリアルタイム PCR 法により薬物代謝酵素発現量の変化を測定した。

肝分化 iPS 細胞を用いた HNF6 の薬物代謝酵素発現誘導の測定

ヒト iPS 細胞（10 cm ディッシュ 1 枚）を既に確立した肝分化プロトコール（松永分担報告書参照、図 1）（18、22、25 日間培養、24-well plate 使

用)に従い、肝分化 iPS 細胞を作製した。この肝分化誘導過程中の day 15、day 19、day 22 に HNF6 発現アデノウイルスを感染させ、72 時間後に細胞を TRI REAGENT を用いて回収し、total RNA の抽出を行った。次に、SYBR Premix Ex Taq (TaKaRa) を用いたリアルタイム PCR 法により薬物代謝酵素発現量の変化を測定した。

C. 研究結果および考察

HepG2 細胞、HFL 細胞、ヒト肝初代培養細胞における HNF6 の薬物代謝酵素発現量への影響

HepG2 細胞を用いて、主に薬物代謝に関与する CYP に対し、HNF6 の影響について検討したところ、CYP2C9、CYP2C19、CYP3A4、CYP3A7 の著しい発現量の上昇が認められた (図 2)。一方、CYP1A1、CYP1A2、CYP2D6 については、HNF6 発現アデノウイルスの感染による影響は認められなかった。また、HNF6 は、肝細胞のマーカー遺伝子であるアルブミン (ALB) や α -フェトプロテイン (AFP) の発現にも寄与することが明らかになった。HFL 細胞に関しては、HepG2 細胞と同様に CYP の発現に影響を及ぼすことが確認され、特に CYP3A4 においては、その mRNA 発現上昇は最大で約 120 倍と強い誘導が認められた (図 3)。次に、HNF6 の胎児肝レベルでの CYP3A4 発現誘導への寄与が明らかになったことから、ヒト成人肝細胞であるヒト肝初代培養細胞においても同様の検討を行った。その結果、ヒト肝初代培養細胞においては、HNF6 は CYP3A4 の発現誘導へは関与していない可能性が示唆された (図 4)。以上、本研究より HNF6 は、薬物代謝に関与する多くの CYP に対し、発現調節に寄与していることが初めて明らかとなった。また、各種細胞を用いた検討から、HNF6 は、CYP の発現に対し、ヒト成人肝細胞における寄与よりむしろ、肝細胞が成熟するに至る過程において発現調節に寄与している可能性が示唆された。

肝分化 iPS 細胞における HNF6 の薬物代謝酵素発現量への影響

iPS 細胞の肝分化誘導過程中に HNF6 発現アデノウイルス感染させた結果、CYP3A4 mRNA 発現量は約 1400 倍と極めて強い発現誘導が認められ、ヒト肝初代培養細胞における CYP3A4 発現量の約 1/10 程度に達した (図 5)。また、CYP3A7 は約 8 倍、CYP1A2 は約 40 倍の発現上昇が確認された。一方、CYP1A1、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 については著しい発現上昇は認められなかった。また、ALB 及び AFP については HNF6 発現アデノウイルスの感染による影響は認められなかった。以上の結果から、HNF6 は、iPS 細胞の肝分化誘導過程中に発現させることで、一部の薬物代謝酵素発現量を上昇させることが明らかとなった。しかしながら、HFL 細胞及びヒト肝初代培養細胞の結果から明らかのように、HNF6 は、肝細胞が成熟するに至る過程において薬物代謝酵素発現に寄与する可能性が高いことから、本肝分化 iPS 細胞は、未だ未成熟な肝細胞であることが示唆された。

E. 結論

HNF6 は、薬物代謝酵素発現調節に寄与していることが種々の細胞を用いた検討から明らかになった。また、iPS 細胞の肝分化誘導過程中に HNF6 を発現させることで CYP3A4 は、成人レベルに極めて近い発現量に達することが確認できた。今後は、HNF6 と同様に iPS 細胞の肝分化誘導におけるキー遺伝子として同定した C/EBP α を導入することで、よりヒト成人肝細胞に類似した肝分化 iPS 細胞の樹立を目指す。

F. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

1. 山田健太、佐々木崇光、高橋昌悟、松永民秀、永田 清: iPS 細胞を用いた肝分化誘導法の検討 第 50 回記念日本薬学会東北支部大会、2011 年 10 月 (仙台)。

2. Takamitsu Sasaki, Yutaka Tanaka, Shogo Takahashi, Takeshi Kumagai, Shuhei Sakaguchi, Tamihide Matsunaga, Kiyoshi Nagata: Hepatocyte nuclear factor-6 enhances expression of CYP3A4 in HepG2 cells and hepatocyte-like cells differentiated from human induced pluripotent stem cells. 26th JSSX Annual Meeting, November 2011 (広島)

- 2. 実用新案登録
該当なし
- 3. その他

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

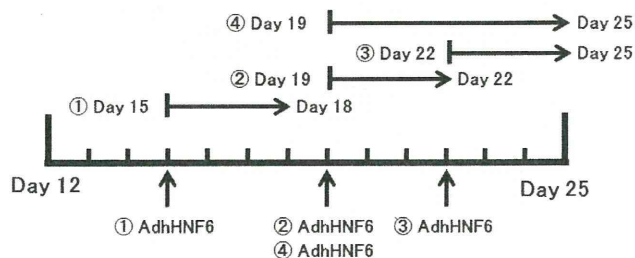
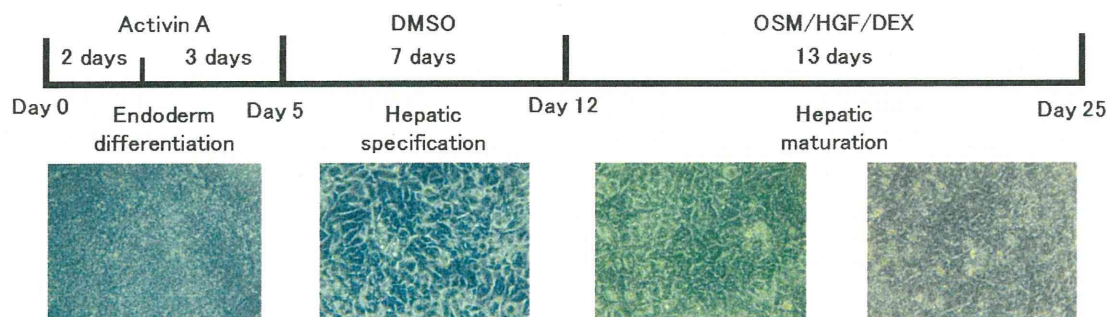


図 1. iPS 細胞の肝

分化誘導プロトコール

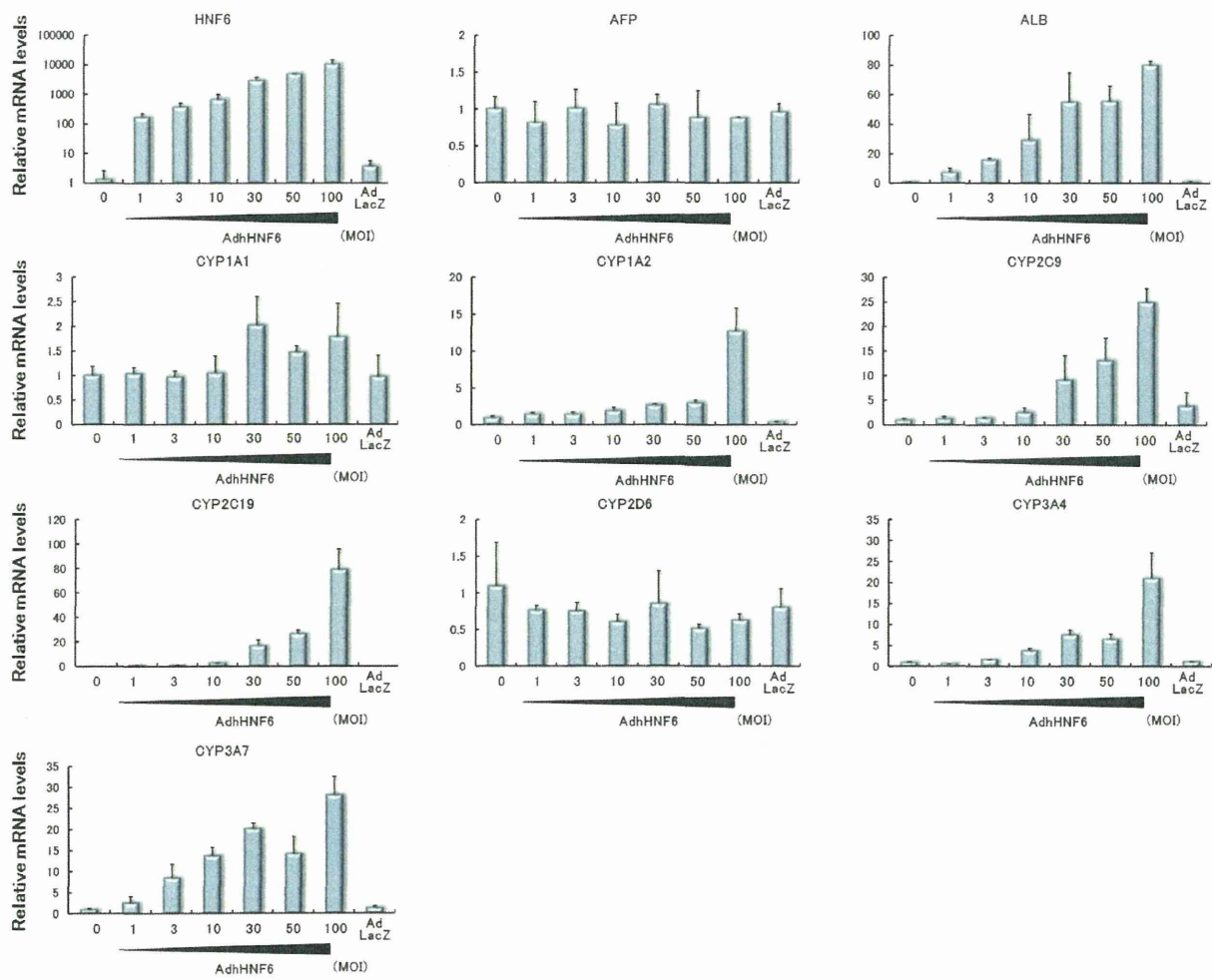


図 2. HepG2 細胞における HNF6 の薬物代謝酵素発現量への影響

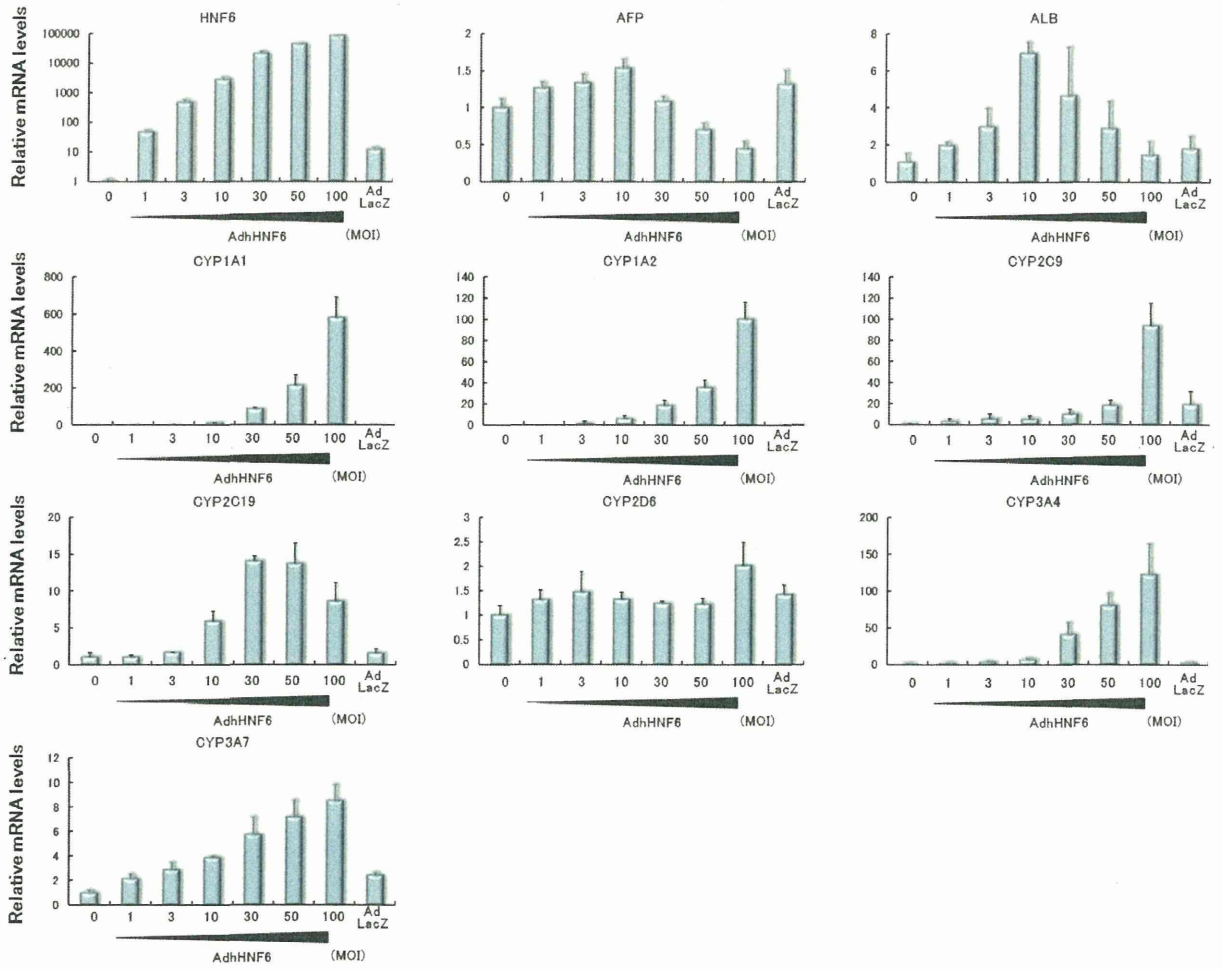


図 3. HFL 細胞における HNF6 の CYP3A 発現量への影響

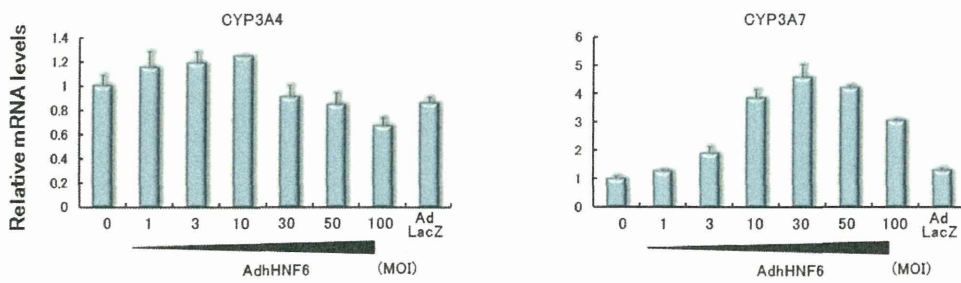


図 4. ヒト肝初代培養細胞における HNF6 の CYP3A 発現量への影響

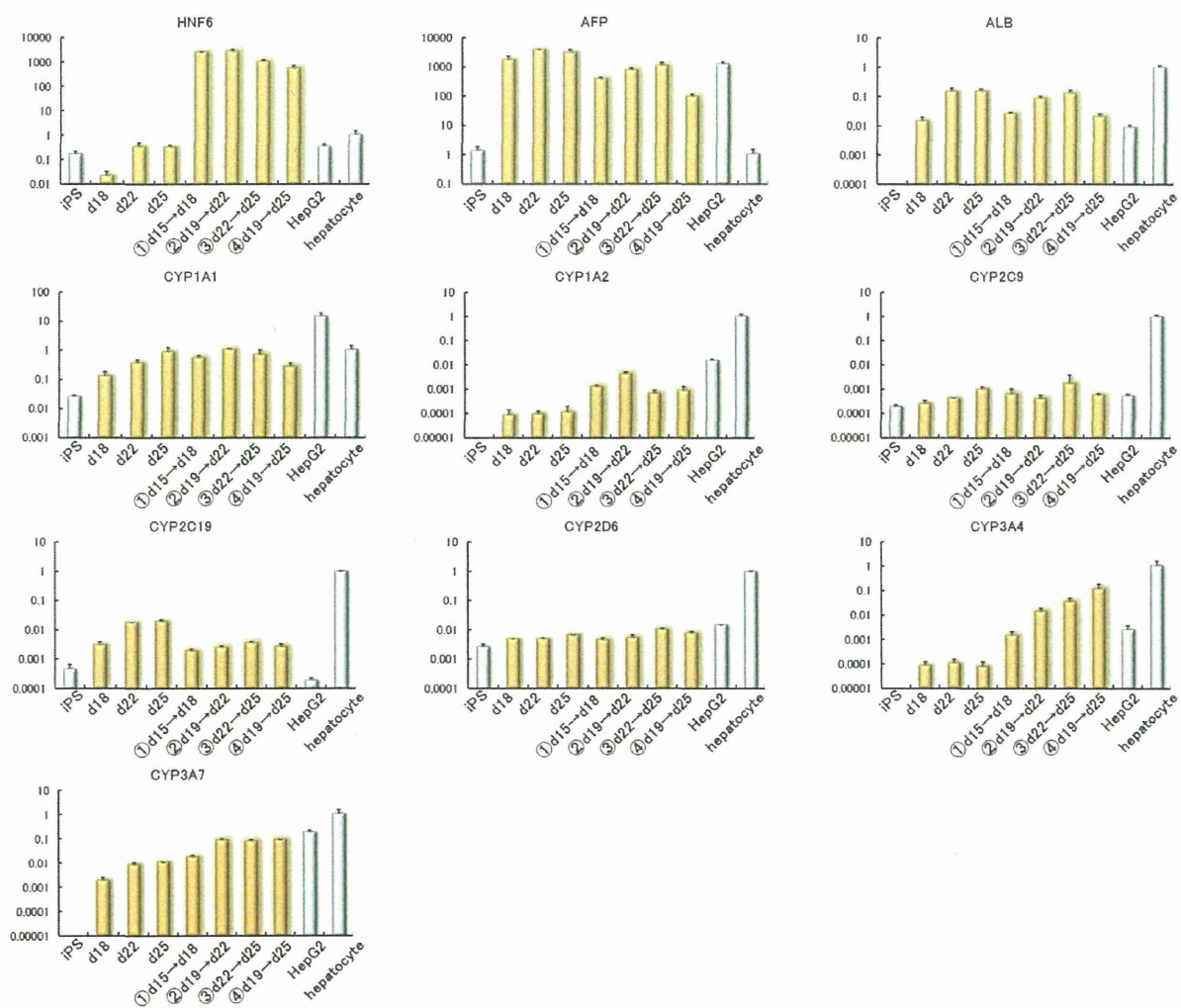


図 5. 肝分化 iPS 細胞における HNF6 の薬物代謝酵素発現量への影響

研究分担報告書

ヒト iPS 細胞から肝・腸管上皮細胞への分化および誘導評価

研究分担者	松永 民秀	名古屋市立大学	大学院薬学研究科・教授
研究協力者	前田 徹	名古屋市立大学	大学院薬学研究科・講師
研究協力者	岩尾 岳洋	名古屋市立大学	大学院薬学研究科・助教
研究協力者	近藤 祐樹	名古屋市立大学	大学院薬学研究科・博士後期課程 1 年
研究協力者	佐藤 大介	名古屋市立大学	大学院薬学研究科・博士後期課程 1 年

研究要旨：ヒト人工多能性幹細胞（iPS 細胞）は、薬物代謝研究の新規材料として期待されている。ヒト iPS 細胞の肝細胞への分化誘導において低分子化合物 X を添加することにより肝細胞マーカーである albumin および tyrosine aminotransferase は各々約 31 倍および 4 倍、核内受容体 pregnane X receptor は約 21 倍 mRNA 発現の増加が認められた。また、小腸上皮細胞マーカーの mRNA が発現しており小腸上皮細胞様細胞に分化していることが明らかとなった。さらに、分化誘導した腸管上皮様細胞は、ペプチドトランスポーターの基質である β -Ala-Lys-AMCA の取り込みが認められ、かつ腸管上皮細胞に特異的に存在する sucrase-isomaltase の発現も認められた。

A. 研究目的

薬物動態研究において、ヒト初代肝細胞が用いられているが、ロット間差が大きく、良質の肝細胞を安定して入手することが難しいため、研究の障害となっている。人工多能性幹細胞（iPS）細胞は、多能性と高い増殖性を有するため、細胞の安定した供給源として創薬研究への利用が期待されている。現在、iPS 細胞から肝細胞への分化誘導方法がいくつか報告されている。その主な方法として分化誘導に増殖因子等の液性因子が用いられているが、分化効率の面で不十分なうえに、非常に高価であることが課題となっている。本研究では、ロット間差が少なく安価な低分子化合物を分化誘導因子として用いて、ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化に与える影響を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1. ヒト iPS 細胞の肝細胞様細胞への分化

iPS 細胞は国立成育医療研究センターにおいて

樹立されたヒト iPS 細胞株（Windy）を用いた。

ヒト iPS 細胞を activin A 処理することで内胚葉に、続いて dimethyl sulfoxide にて肝芽細胞に分化させ、oncostatin M, dexamethasone, hepatocyte growth factor によって成熟させる方法にて肝細胞への分化誘導を行った。また、分化の際に低分子化合物 X を添加（72 時間、168 時間もしくは 312 時間処理）し、肝細胞への分化に及ぼす影響について検討した。なお、分化終了 48 時間前より CYP3A の誘導剤である rifampicin（RIF）の処理を行い、薬物応答性についても検討を行った。分化終了後、iPS 細胞由来肝細胞様細胞の mRNA 発現をリアルタイム RT-PCR 法により解析した。

2. ヒト iPS 細胞の小腸上皮細胞様細胞への分化

ヒト iPS 細胞を、0.5% FBS, 100 ng/mL activin A を含む RPMI + GlutaMax medium で 48 時間培養後、2% FBS, 100 ng/mL activin A を含む RPMI + GlutaMax medium で 24 時間培養した。引き続き、

2% FBS, 1% GlutaMax を含む DMEM/F12 で 4 日間培養した。このとき, 250 ng/ml FGF2 もしくは FGF4 と 50 ng/ml の Wnt3a を組み合わせ, 腸管幹細胞様細胞への最適な分化条件の検討を行った。その後, Accutase を用いて継代し, あらかじめヒト iPS 細胞用培地で 30 倍に希釈した GFR Matrigel でコートした 24 well-plate に播種した。2% もしくは 10% FBS, 20 ng/mL epidermal growth factor (EGF), B27 supplement, N2 supplement, 2 mM L-glutamine, 1% NEAA, 100 units/mL penicillin G, 100 µg/mL streptomycin sulfate を含む DMEM/F12 で 19 日間培養後 mRNA 測定用サンプルとして細胞を回収した。分化させた細胞を用いて, 腸管上皮細胞特異的なペプチドトランスポーターの基質である β -Ala-Lys-AMCA の取り込みおよび腸管上皮細胞の特異的マーカーである sucrase-isomaltase の免疫蛍光染色を行い, 共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

C. 研究結果

1. ヒト iPS 細胞の肝細胞様細胞への分化

分化後の mRNA 解析を行ったところ, 肝細胞マーカーである albumin (ALB), α -fetoprotein (AFP), tyrosine aminotransferase (TAT), 主要な薬物代謝酵素である CYP3A4 の発現が認められた。また, 低分子化合物 X の添加時期について検討を行ったところ, 低分子化合物 X をある時期に 168 時間添加すると, 分化後の細胞において ALB で約 31 倍, TAT で約 4 倍, pregnane X receptor (PXR) で約 21 倍の mRNA 発現の増加が認められた。CYP3A4 については, 低分子化合物 X 168 時間添加群で約 8 倍の mRNA 発現の増加が認められた。CYP3A の誘導剤である rifampicin (RIF) 処理を行ったところ, 低分子化合物 X の添加により増加した CYP3A4 の mRNA 発現が, さらに約 12 倍に誘導された (Fig. 1, 2)。

2. ヒト iPS 細胞の小腸上皮細胞様細胞への分化

腸管幹細胞様細胞への分化において各種因子

類の検討を行ったところ, FGF2 と比較して FGF4 を添加することで, CDX2 (中腸/後腸のマーカー) の発現レベルは数倍高かったが, 逆に LGR5 (腸管幹細胞のマーカー) の発現レベルは FGF2 添加群で 4 倍程度高かった。なお, 両マーカー発現に対して, Wnt3a の影響は認められなかった (Fig. 3)。腸管上皮細胞への分化において, 血清の影響を検討したところ, 濃度を 2% とすることで LGR5 や sucrase-isomaltase, あるいは主要な薬物代謝酵素である CYP3A4 やペプチドトランスポーター SLC15A1 の発現レベルが高い傾向にあった (Fig. 4)。また, CDX2 や腸管上皮に豊富に存在する dipeptidyl peptidase-4 (DPP4) や葉酸トランスポーター SLC46A1 の mRNA 発現はヒトの成人小腸と同レベルであった (Fig. 5)。また, 分化誘導した腸管上皮細胞は, ペプチドトランスポーターの基質である β -Ala-Lys-AMCA の取り込みが認められ, かつ腸管上皮細胞に特異的に存在する sucrase-isomaltase の発現も認められた (Fig. 6)。

D. 考察

ヒト iPS 細胞が肝細胞様細胞に分化したことが示唆された。また, 低分子化合物 X を 168 時間添加することは, ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化を促進し, RIF に対する応答性が肝細胞と類似していることが明らかとなった。

近年, 腸管幹細胞に関する研究が進みつつあるが未解明な部分が多い。また, 腸管への分化に関してもマウスおよびヒトの iPS 細胞から 3 次元的に培養を行うことで腸管組織を作製することができたと報告されたが, これらは再生医療を目指しており, 薬物動態試験に利用できるまでの機能評価はされていない。今回の我々の検討では, 腸管幹細胞のマーカーである LGR5 や, 腸管上皮に豊富に存在する sucrase-isomaltase, DPP4 に加え, 薬物動態学的に重要な代謝酵素である CYP3A4 や, SLC15A1, SLC46A1 などのトランスポーター発現も認められた。さらに, 腸管上皮細胞に特異的に存在する sucrase-isomaltase が発現する細胞においてペプチドトランスポーターの基質である

β -Ala-Lys-AMCA の取り込みも認められたことから、ヒト iPS 細胞から腸管上皮細胞と類似した機能を有する細胞へ分化誘導することができたと考えられた。しかし、各マーカー遺伝子の発現レベルから、今回行った方法での分化誘導効率は十分ではなく、より効率的に、均一な腸管上皮様細胞を得ることが必要であると考えられる。さらに、薬物動態試験に応用するためには、より高いトランスポーターや代謝酵素の発現が望まれる。したがって、今後は効率的な分化誘導法の検討や薬物動態学的な機能解析に加え、薬物動態試験に適した均一な細部集団を得るためにセレクションなども行っていく予定である。

E. 結論

低分子化合物 X の 168 時間添加は、ヒト iPS 細胞から肝細胞への分化誘導において、分化効率あるいは機能獲得に有用であることが明らかとなった。

F. 研究発表

1. 松永民秀, 近藤祐樹, 岩尾岳洋, 大森栄: ヒト iPS 細胞の肝細胞様細胞への分化と薬物代謝酵素の発現. 日本法中毒学会第 30 年会, 2011 年 6 月 (長崎).
2. 近藤祐樹, 岩尾岳洋, 三森佳代, 吉橋幸美, 大森栄, 松永民秀: ヒト人工多能性幹細胞からの肝細胞への効率的な分化方法の検討. 第 57 回日本薬学会東海支部総会・大会, 2011 年 7 月 (名古屋).
3. Takahiro Iwao, Kiyoshi Nagata, Tamihide Matsunaga: Differentiation into the enterocyte-like cells from human induced pluripotent stem cells. 26th JSSX Annual Meeting, November 2011 (広島).
4. Yuki Kondo, Takahiro Iwao, Masayoshi Saito, Takuro Niwa, Koichi Kurose, Kiyoshi Nagata, Tamihide Matsunaga: Effect of quercetin on differentiation into hepatocyte-like cells from human induced pluripotent stem cells. 26th JSSX Annual Meeting, November 2011 (広島).
5. 近藤祐樹, 杉山留理, 三森佳代, 吉橋幸美, 岩尾岳洋, 黒瀬光一, 松永民秀: ヒト人工多能性幹細胞から肝細胞への分化に対する低分子化合物の効果. 第 34 回日本分子生物学会年会, 2011 年 12 月 (横浜).
6. 中村克徳, 近藤祐樹, 杉山留理, 相川香織, 松永民秀, 大森 栄: ヒト人工多能性幹細胞から分化させた肝細胞様細胞による薬物代謝酵素の酵素誘導評価. 日本薬学会第 132 年会. 2012 年 3 月 31 日 (札幌).
7. 松永民秀: 薬物動態研究における実験材料及び評価系開発の最近の動向. *Drug Metab Pharmacokinet* 26:5-6, 2011.
8. 岩尾岳洋, 松永民秀: ヒト ES および iPS 細胞から肝細胞様細胞および腸管組織への分化誘導. *Drug Metab Pharmacokinet* 26:7-14, 2011.
9. 岩尾岳洋, 松永民秀: 薬物動態研究におけるヒト多能性幹細胞の活用. *薬剤学* 72: 88-94, 2012.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

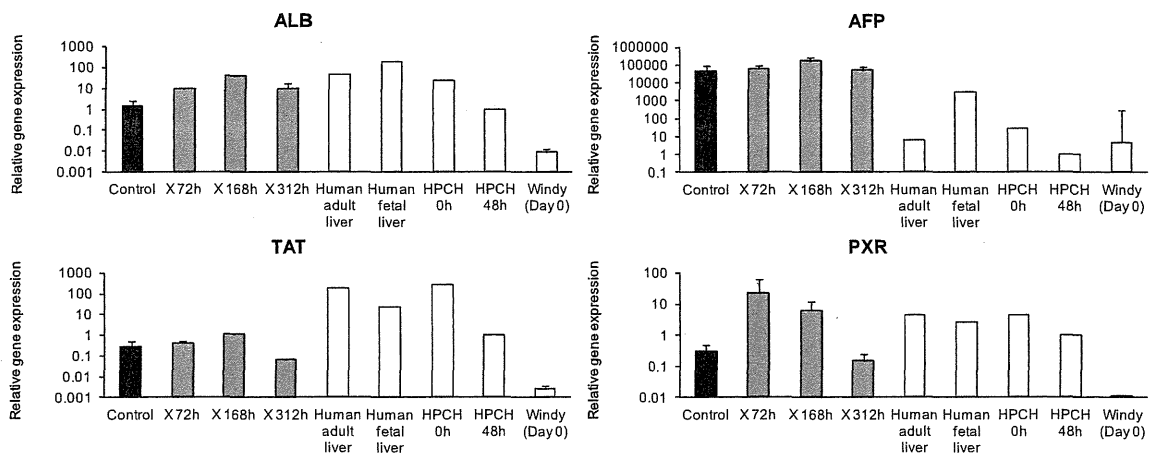


Fig. 1. mRNA expression levels of hepatocyte markers in the cells differentiated from human iPS cells. Each bar represents mean \pm SD from triplicate experiments. Values were normalized to the levels of GAPDH mRNA. The graph represents the relative gene expression level when the level in the HPCH 48 h (pooled cryopreserved human hepatocytes cultured for 48 hours) was taken as 1.

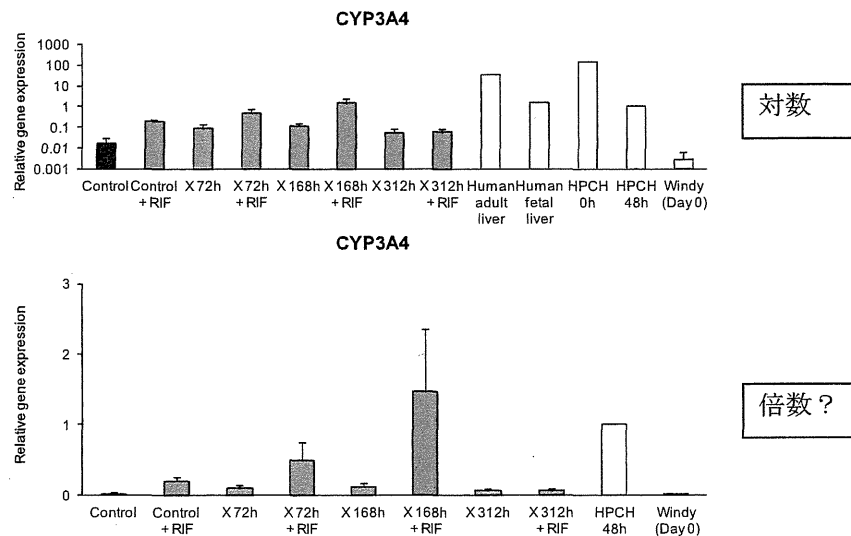


Fig. 2. Induction of CYP3A4 by rifampicin in the cells differentiated from human iPS cells. Each bar represents mean \pm SD from triplicate experiments. Values were normalized to the levels of GAPDH mRNA. The graph represents the relative gene expression level when the level in the HPCH 48h was taken as 1.

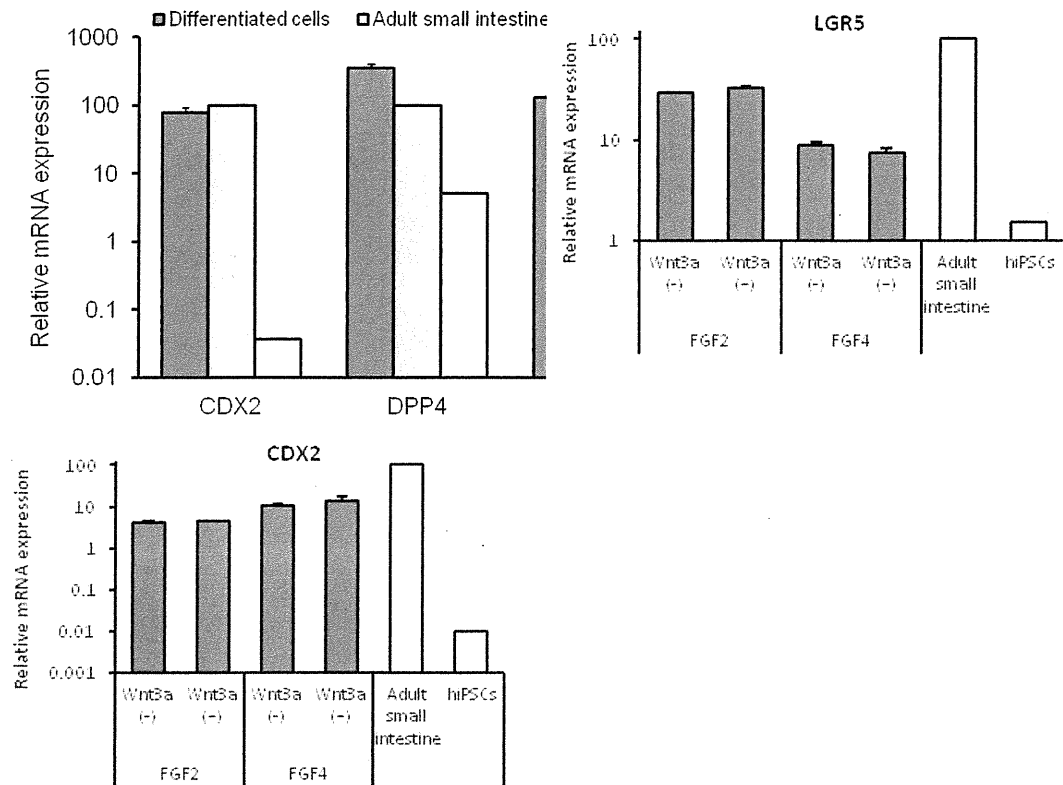


Fig. 3. Real-Time PCR analysis of intestinal stem cells markers for intestinal stem cell-like cells differentiation. Each bar represents mean \pm SD ($n = 3$). The level in the adult small intestine was taken as 100.

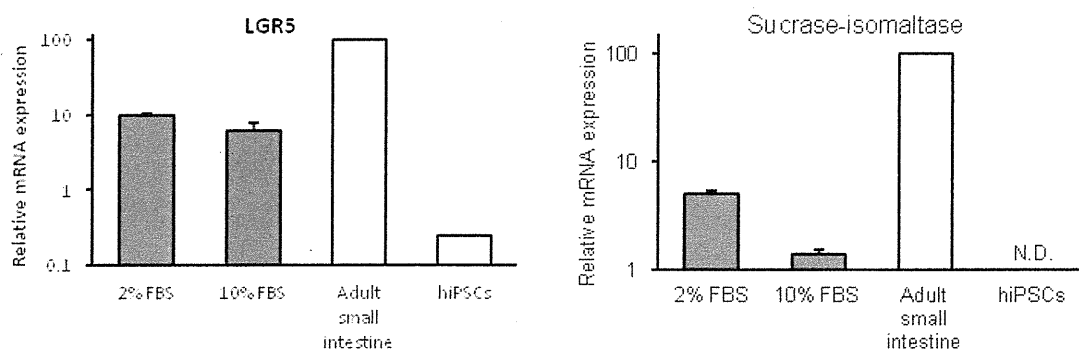


Fig. 4. Real-Time PCR analysis of intestinal stem cells and enterocytes markers for enterocyte-like cells differentiation.

Each bar represents mean \pm SD ($n = 3$). The level in the adult small intestine was taken as 100.

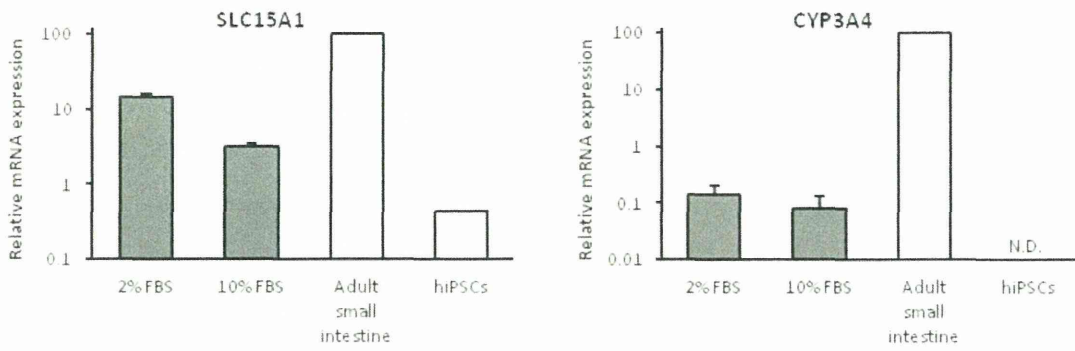


Fig. 5. Real-Time PCR analysis of enterocytes markers for enterocyte-like cells differentiation. Each bar represents mean \pm SD ($n = 3$). The level in the adult small intestine was taken as 100.

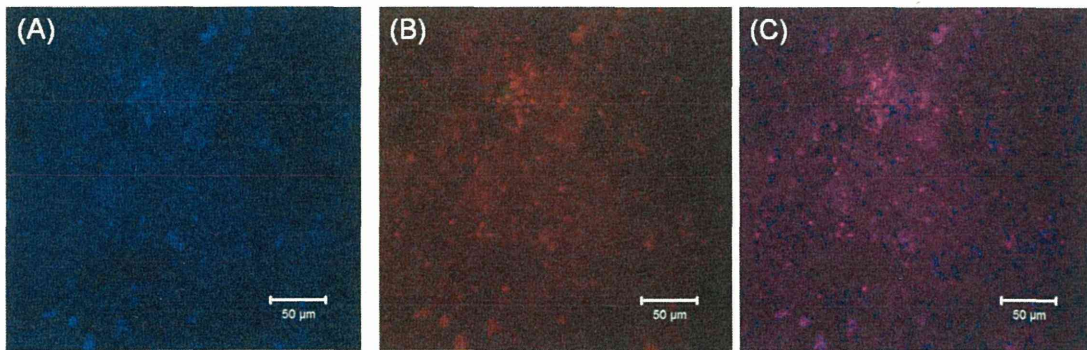


Fig 6. (A), Intracellular uptake of β -Ala-Lys-AMCA (blue); (B), immunofluorescence staining of sucrase-isomaltase (red); (C), overlay (Merge) image of β -Ala-Lys-AMCA and sucrase-isomaltase.

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

研究課題： いわゆる「健康食品」と医薬品との併用に関わる 安全性評価に関する研究

研究分担報告書

健康食品と医薬品における薬物相互作用解明を目指した健康食品使用実態アンケート調査-1

研究代表者 永田 清 東北薬科大学 薬学部 教授
研究協力者 鈴木 匡 名古屋市立大学 大学院薬学研究科・教授
研究協力者 榊原 明美 名古屋市立大学 大学院薬学研究科・客員教授
研究協力者 佐々木崇光 東北薬科大学 薬学部 助教

研究要旨：健康志向が高い現代において、健康食品は副作用がないとの先入観から、医薬品との安易な併用による薬物相互作用に起因した健康被害が頻発する可能性が高い。しかしながら、健康食品による薬物相互作用情報はもとより、健康食品自体の使用状況すら把握できない状況にある。そこで、健康食品と医薬品における薬物相互作用解明を目的に調剤薬局の来局患者を対象とした健康食品の使用実態アンケート調査を実施した。約 1,000 名の来局者からアンケートを回収し、解析した結果、来局者の 60% は、医薬品と健康食品を併用しており、約 130 製品の健康食品の使用が確認された。これらの製品の服用頻度は、毎日及び週に 3～4 回の割合が 88%と高く、健康食品の服用による効果及び健康被害を感じている方は 58%と 3%であった。服用期間は、1 年以上が約半数を占め、健康食品の効果の有無には関わらず長期間服用していることが確認された。本研究から全国規模の健康食品使用実態が明らかとなり、今後の健康食品と医薬品相互作用解明を行う上で有益な情報が得られた。

A. 研究目的

いわゆる「健康食品」は保健機能食品とは異なり、安全性や有効性が明らかとなっていない多種多様な製品が流通し、その使用実態の把握及び医薬品との相互作用を予測することが難しい状況にある。一般に医薬品間の相互作用は、主にシトクロム P450 (CYP) が関与することから、本研究課題においては、医薬品及び代表的な健康食品有効成分による CYP の誘導及び阻害評価を進めてきた。しかし、より有益な情報を提供するためには、現在、市場に流通し、且つ服用されている健康食品について評価する必要がある。そこで、本研究では、健康食品と医薬品における相互作用解明を目的に健康食品の使用実態を明らかにするためのアンケート調査を行った。

B. 研究方法

健康食品使用実態調査のためのアンケート調査

全国約 100 店舗の調剤薬局を対象に、健康食品の使用状況を把握するためのアンケート調査を行った（図 1）。アンケートは、無記名による連結不可能匿名化で行い、東北薬科大学倫理委員会の審査及び規定に従い実施した。

C. 研究結果および考察

健康食品使用実態調査のためのアンケート調査

全国の調剤薬局を対象にアンケート調査を行ったところ、アンケート送付調剤薬局の店舗回収率は37.3%で、1,034件のアンケートが回収された。本アンケート調査に回答した来局者は、男性38%、女性62%であり、年齢は、20歳代9%、30歳代20%、40歳代13%、50歳代16%、60歳代16%、70歳代18%、80歳代8%と各世代が均等に分布した集団であった(図2)。アンケートを解析した結果、薬局来局者の60%は、医薬品と健康食品を併用しており(図3)、約130製品の健康食品の使用が確認された(図4)。これら製品の剤形は、錠剤が約半数を占め、次いでカプセル剤(19%)、粉剤(11%)、ドリンク剤(10%)の順であった(図5)。健康食品の服用による効果は、一定の効果を自覚している来局者が58%であるのに対し、効果不明あるいは効果なしと感じている来局者がそれぞれ29%及び7%であった(図6)。また、健康食品服用に起因した健康被害を経験した方は、3%であった。次に、健康食品の服用頻度は、毎日服用が69%と最も多く、次いで週に3~4回服用が20%であり、その使用期間については健康食品服用来局者の約半数が1年以上であった(図7)。即ち、本調査において、健康食品を服用している来局者の多くは、健康食品の効果の有無には関わらず、日常的に健康食品を服用していることが明らかになった。

健康被害発生事例

本調査において、健康食品服用来局者の3%で健康被害発生事例が認められた。

例1) 60歳女性、アムロジピン服用
→牡蠣エキス配合製品服用(症状;無回答)

例2) 78歳女性、アムロジピン、エチゾラム服用

→牡蠣エキス配合製品服用(症状;服用後にめまい、もやもやする感覚)

牡蠣エキス配合製品は、亜鉛含有量が高く、この亜鉛がCYP3A4活性を阻害することが報告されている(Toxicol Lett., 156, 341-350, 2005)。アムロジピン及びエチゾラムはCYP3A4により代謝されることから、牡蠣エキス配合製品との相互作用が示唆された。また、にんにく抽出エキス配合製品や中国の民間生薬類似製品においても医薬品との相互作用の可能性が示唆された。

E. 結論

本研究から全国規模の健康食品使用実態が明らかとなり、今後の健康食品と医薬品相互作用解明を行う上で有益な情報が得られた。しかしながら、薬局来局者を対象とした調査においては、アンケート回答者本人の主観的意見のみであるため、健康食品と医薬品との相互作用を十分に抽出できていない可能性が考えられた。そこで、今後は病院におけるカルテ調査をもとに、生化学的検査値等の客観的なデータと共に健康食品と医薬品との相互作用調査を実施する。

F. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

該当なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

図 1. アンケート調査用紙

健康食品の使用状況アンケート

年齢 : 満 () 歳 性別 : 男 ・ 女

☆ この印のある項目は、特に重要な情報となります。可能な限り詳細なご回答をお願い致します。

1) 現在、飲んでいる薬はありますか？

はい いいえ

☆ 2) 1) で「はい」と答えた方、使用している薬は何の薬ですか？また、薬の名前などわかる場合は記入して下さい。(当てはまるものをすべて選んで下さい)

血圧 尿酸値 心臓 肝臓 糖尿病 コレステロール 胃腸

喘息 アレルギー 鎮痛 ビタミン ミネラル

その他 ()

薬の名前など ()

3) 現在、健康食品やサプリメントを飲んでいますか？

はい いいえ

4) 3) で「はい」と答えた方、何種類の健康食品、サプリメントを使用していますか？

1種類 2種類以上

5) 3) で「はい」と答えた方、使用中の健康食品（サプリメント）についてお答えください。

※ 4) で「2種類以上」と答えた方は、2種類目以降は別紙 1 に記入して下さい。

☆ ● 商品名 ()

☆ ● メーカー名 ()

● 用途 ()

● 形状 錠剤 カプセル剤 粉剤 ドリンク剤 その他 ()

● 使用期間

1か月未満 1～3か月 3～6か月 6～12か月 1年以上 () 年)

● 使用頻度 毎日 週に3～4日 週に1～2日 その他 ()

● 使用タイミング (例：朝食後、疲労感があるときなど)
()

● この健康食品（サプリメント）を何で飲まれていますか？
(当てはまるものをすべて選んで下さい)

水 牛乳 お茶 ジュース ゼリー ヨーグルト その他 ()

● この健康食品（サプリメント）を選んだ理由はなんですか？
()

☆ ● この健康食品（サプリメント）を使用して効果はありましたか？

はい いいえ