

食品と医薬品間の相互作用に関する新規リスク評価系の構築

中村 和昭

独立行政法人国立成育医療研究センター
研究所薬剤治療研究部実験薬理研究室 室長

諸言

食品中の化学物質と医薬品との相互作用は、医薬品との飲み合わせの観点から医薬品相互作用と同様の基準で評価される必要がある。しかし、食品中の化学物質のリスク評価には化学物質単独での発がん性や催奇形性、生殖毒性等の動物や微生物等を用いた評価は行われているものの、ヒトを試験対象とした医薬品との相互作用の観点からの実験的な検討は十分に行われていない。医薬品間の相互作用の機序としては代謝過程における相互作用が重要であり、そのほとんどが薬物代謝酵素チトクロム P450 (CYP) の阻害または誘導に起因する。食品中の化学物質と医薬品の相互作用も同様の機構と考えられ、食品と医薬品の相互作用により有害事象を引き起こす代表的な例として、グレープフルーツジュースや西洋弟切草による CYP の阻害・誘導作用が挙げられる¹⁾。医薬品間の相互作用は処方時に留意されるのに対し、食品と医薬品との相互作用は消費者の食生活に依るところが大きく、日常生活において予期せずに生じる可能性が高い。服用された薬物は体内へ吸収された後、その 90% 以上が肝臓により代謝されることから、食品中の化学物質による肝臓への影響は、服用する医薬品の薬物動態を変化させ、副作用を増悪させる恐れがある。したがって、食品中の化学物質による健康障害の予防の観点から、食品中の化学物質によるヒト肝臓への影響に対する評価系が必要である。しかし、これまでにヒト肝細胞を用いた食品中の化学物質の安全性を評価する系は確立されていない。本研究では、食品中の化学物質と医薬品との相互作用を検討するための実験系確立の基礎として、生体肝移植手術の際に生じる摘出肝から肝細胞の単離・培養を行い、ヒト新鮮肝細胞を用いた食品中の化学物質による肝細胞毒性試験系を検討した。さらに、ES 細胞を用いた生殖発生毒性試験系により、食品中の化学物質による胎生期の安全性についても評価可能な試験系の構築を試みた。

実験方法

1. 肝移植時に摘出された肝組織からの肝細胞調整

国立成育医療研究センター倫理委員会の承認に基づき、提供に同意を得られた検体に対して、肝組織切断面より門脈もしくは中心静脈を確保し、血管腔へカニューレを挿入後血管周囲とともにカニューレを結索することにより固定し、灌流路を確保した。コラゲナーゼ環流法にて組織を分散し、細胞懸濁液をガーゼとナイロンメッシュにて濾過することにより大型の細胞塊を除去し、肝細胞懸濁液を得た²⁾。

2. ヒトにおける食品中の化学物質による肝細胞毒性並びに発生毒性の検討

単離したヒト新鮮肝細胞を用いて、モデル食品としてヒペルホリンの肝細胞毒性を検討した。また、マウス ES 細胞を用いた発生毒性試験法である Embryonic Stem Cell Test (EST 法)^{3,4)}により、ヒペルホリンの発生毒性を検討した。さらにヒペルホリンの ES 細胞の未分化マーカー発現への影響をリアルタイム PCR 法により検討し⁵⁾、ヒペルホリン細胞死誘導効果を細胞死検出 ELISA キットにより測定した。

結 果

本研究に用いるヒト肝細胞を調整するため、ドナー余剰肝臓・レシピエント摘出肝臓から肝細胞を分離した。研究期間中、ドナー 5 検体、胆道閉鎖症 13 検体、肝線維症、糖原病 Ib が各 2 検体および CPS1 欠損症、カロリー病、糖原病 IIIa、アラジール症候群が各 1 検体、合計 27 検体より、肝細胞単離を行った。

単離したヒト新鮮肝細胞を用いて、ヒペルホリンの肝細胞毒性を検討した結果、肝細胞生存率に対する IC50 (50% 細胞生存率抑制濃度) は 5.36 μ M であった (図 1)。EST 法による発生毒性試験では、マウス ES 細胞に対

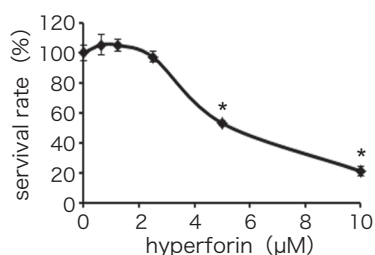


図1 ヒペルホリンのヒト肝細胞に対する毒性

ヒペルホリンは、ヒト新鮮肝細胞に対して細胞毒性を示した。

してヒペルホリンは細胞毒性を示し、その IC_{50} は $5.89 \mu M$ であった (図 2A)。ヒペルホリンはマウス繊維芽細胞 (NIH-3T3 細胞) に対しても細胞毒性を示し、その IC_{50} は $2.38 \mu M$ であった (図 2B)。

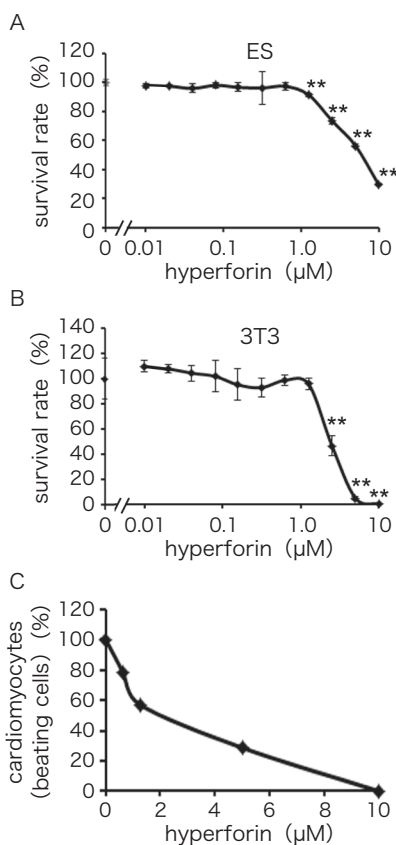


図 2 ヒペルホリンによる発生毒性の検討

(A) ES 細胞に対する細胞毒性、(B) 繊維芽細胞に対する細胞毒性、(C) ES 細胞の心筋分化に対する影響。ヒペルホリンは ES 細胞、繊維芽細胞に対して細胞毒性を示した。

また、ヒペルホリンはマウス ES 細胞の心筋への分化を抑制し、 ID_{50} (50% 分化抑制濃度) は $1.76 \mu M$ であった (図 2C)。高濃度のヒペルホリンはマウス ES 細胞において、未分化マーカーである Oct3/4 および Sox2 遺

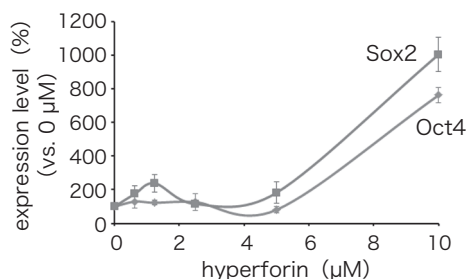


図 3 ヒペルホリンによるマウス ES 細胞未分化マーカー発現への影響

高濃度のヒペルホリンにより ES 細胞の未分化マーカー発現が亢進する。

伝子発現を亢進させた (図 3)。

マウス ES 細胞および繊維芽細胞に対するヒペルホリンの生存率低下効果を検討するため、ヒペルホリン添加時の両細胞のアポトーシスを検討した結果、ヒペルホリンは繊維芽細胞に対しては細胞死誘導効果を示したが (図 4A)、ES 細胞に対しては細胞死誘導効果を示さなかった (図 4B)。

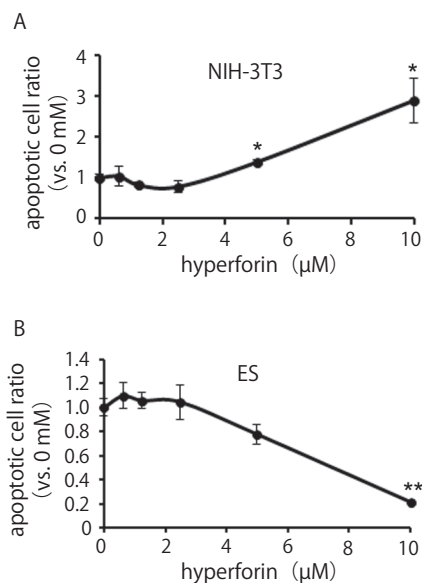


図 4 ヒペルホリンによる細胞死誘導効果

(A) 繊維芽細胞、(B) ES 細胞。
ヒペルホリンは繊維芽細胞に対しては細胞死を誘導するが、ES 細胞に対しては細胞死を誘導しなかった。

考 察

これまで、実験的にヒト肝細胞を用いる場合にはヒト凍結肝細胞を使用する以外に有効な手段はなかったが、肝細胞は肝機能を一定以上に維持しつつ、凍結保存をすることが困難であり、ヒト凍結肝細胞の使用は必然的に

肝機能の低い肝細胞を使用せざるを得なかった。本研究から、手術摘出肝から得られたヒト新鮮肝細胞を用いて、ヒペルホリンによる肝細胞毒性の評価が可能であることが示された。医薬品と同様に食品中の化学物質の肝細胞に対する影響も、できる限り肝機能を高度に維持した肝細胞を用いることが生体内での作用を検討する上で重要であると考えられ、本研究の結果は、今後のヒト新鮮肝細胞を用いた医薬品および食品中の化学物質による肝毒性を検討する上で一つのモデル実験となると期待される。

これまでにヒペルホリンを服用した際の血中ヒペルホリン濃度のピーク値は 168.35ng/ml (約 30nM) と報告されており⁶⁾、また西洋弟切草として摂取した場合は血中にヒペルホリンは検出されないと報告されている⁷⁾。本研究によりヒペルホリンのヒト新鮮肝細胞に対する毒性が明らかとなったが、その IC₅₀ 値は前述の血中ヒペルホリン濃度の約 160 倍であった。また、本研究からマウス ES 細胞およびマウス繊維芽細胞に対するヒペルホリンの細胞毒性が明らかとなったが、その IC₅₀ 値はそれぞれ前述の血中ヒペルホリン濃度の約 200 倍および 100 倍であった。さらにヒペルホリンはマウス ES 細胞の心筋分化に対して影響を与えたが、その ID₅₀ 値は想定される血中ヒペルホリン濃度の約 60 倍であった。ヒペルホリンはこれまでも安全性の高い成分であると考えられてきたが、本研究の結果からも、通常西洋弟切草の摂取は肝毒性を示さず、発生毒性も極めて低いことが実験的に示された。

ヒペルホリンは繊維芽細胞に対しては細胞死を誘導するものの、ES 細胞に対しては細胞死を示さなかったことから、ヒペルホリンの効果は ES 細胞と繊維芽細胞に対しては異なることが示された。したがって、食品中の化学物質の安全性を評価する際には標的となる細胞での化学物質の作用およびその機構を詳細に解析することが必

要だと考えられる。

要 約

本研究では食品の安全性の観点から、食品中の化学物質と医薬品との相互作用を検討するための基礎研究として、西洋弟切草の有効成分であるヒペルホリンをモデル物質として用い、肝毒性および発生毒性試験系の検討を行った。本研究による検討から、高濃度のヒペルホリンはヒト新鮮肝細胞に対して細胞毒性を示したが、その作用はヒペルホリン摂取時に想定される血中ヒペルホリン濃度を考慮すると、肝毒性は低いと考えられた。またヒペルホリンはマウス ES 細胞に対して細胞毒性と分化抑制作用を示したが、この作用も血中ヒペルホリン濃度を考慮すると、通常摂取による催奇形性は低いと考えられた。本研究を発展させることにより、今後肝代謝を考慮した食品と医薬品の相互作用における肝毒性および発生毒性試験系の確立が可能であると考えられる。

謝 辞

本研究は、公益財団法人三島海雲記念財団の平成 23 年度「学術研究奨励金」により行われました。公益財団法人三島海雲記念財団ならびに関係者各位に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) 中島恵美：薬の生体内運命（中島恵美編）、pp194-211, ネオメディカル、2009.
- 2) Nakamura K., et al.,: *J. Biosci. Bioeng.*, 111, 78-84, 2011.
- 3) Spielmann H., et al.,: *In vitro toxicology*, 10, 119-127, 1997.
- 4) Nakamura K, et al.,: *Methodological Advances in the Culture, Manipulation and Utilization of Embryonic Stem Cells for Basic and Practical Applications* (A. Craig, ed) , pp413-428, Intech, 2011.
- 5) Kusakawa S et al.,: *Life sciences*, 83, 871-877, 2008.
- 6) Agrosi M, et al.,: *Phytomedicine*, 7, 455-462, 2000.
- 7) Vitiello B, et al.,: *J. Clin. Psychopharmacol.*, 25, 243-249, 2005.