

## 抗生物質を投与するとリトコール酸産生菌の減少に伴ってマウスの肝臓における Cyp3a が減少する

戸田雄大, 大井かんな, 工藤敏之, 吉田友行,  
五十嵐信智, 伊藤清美, 杉山 清\*

### Antibiotics Suppress Cyp3a in the Mouse Liver by Reducing Lithocholic Acid-producing Intestinal Flora

Takahiro TODA, Kanna OHI, Toshiyuki KUDO, Tomoyuki YOSHIDA,  
Nobutomo IKARASHI, Kiyomi ITO, and Kiyoshi SUGIYAMA\*  
*Department of Clinical Pharmacokinetics, Hoshi University, 2-4-41 Ebara,  
Shinagawa-ku, Tokyo 142-8501, Japan*

(Received November 14, 2008; Accepted January 31, 2009)

We previously demonstrated that ciprofloxacin (CPX), a new quinolone antibiotic, suppresses Cyp3a in the mouse liver by reducing the hepatic level of lithocholic acid (LCA) produced by intestinal flora. The present study investigated the possibility that other antibiotics with antibacterial activity against LCA-producing bacteria also cause a decrease in the LCA level in the liver, leading to reduced expression of Cyp3a11. While the mRNA expression of Cyp3a11 in the liver was significantly reduced when SPF mice were administered antibiotics such as ampicillin, CPX, levofloxacin, or a combination of vancomycin and imipenem, no significant changes were observed after antibiotic treatment of GF mice lacking intestinal flora. LCA-producing bacteria in the feces as well as the hepatic level of the taurine conjugate of LCA were significantly reduced in the antibiotic-treated SPF mice, suggesting that the decrease in Cyp3a11 expression can be attributed to the reduction in LCA-producing intestinal flora following antibiotic administration. These results suggest that the administration of antibiotics with activity against LCA-producing bacteria can also cause a decrease in the LCA level in humans, which may lower CYP3A4 expression. The intestinal flora are reported to be altered not only by drugs, such as antibiotics, but also by stress, disease, and age. The findings of the present study suggest that these changes in intestinal flora could modify CYP expression and contribute to the individual differences in pharmacokinetics.

**Key words**—antibiotics; intestinal flora; germ-free; Cyp3a; lithocholic acid

## 緒 言

われわれは以前, 腸内細菌が存在しない germ-free (GF) マウスと比較して Specific Pathogen Free (SPF) マウスの方が肝臓における Cyp3a の発現量及び活性が高いという事実を見出し, 腸内細菌の有無によりマウスの肝臓における Cyp3a の発現が変動する可能性を示唆した (manuscript submitted). この要因として, 腸内細菌の産生する lithocholic acid (LCA) により farnesoid X receptor (FXR) 及び pregnane X receptor (PXR) が活性化され, それに伴って SPF マウスの肝臓において Cyp3a11 の発現が増加した可能性が考えられた. LCA は,

Cyp3a の発現量を調節している核内受容体である farnesoid X receptor (FXR), pregnane X receptor (PXR) 及び vitamin D receptor (VDR) の強力なリガンドとなること<sup>1-5)</sup>が報告されており, 生体内の LCA 量の変動すると Cyp3a の発現量が増加することは既に知られている.<sup>2)</sup> LCA は 7 $\alpha$ -dehydroxylase 活性を有する腸内細菌により chenodeoxycholic acid より産生される.<sup>6)</sup> *Clostridium* 属<sup>7,8)</sup>及び *Bacteroides* 属<sup>9)</sup>は, 腸内細菌の中でも高い 7 $\alpha$ -dehydroxylase 活性を有する.

一方, ニューキノロン系抗菌薬であるシプロフロキサシン (CPX) をラットに投与すると, 肝臓における CYP3A の発現が減少するとの報告がある<sup>10)</sup>が, その詳細なメカニズムは明らかにされていなかった. 最近, われわれはマウスにおいても CPX の

星薬科大学薬動学教室

\*e-mail: sugiyama@hoshi.ac.jp

投与により肝臓における Cyp3a の発現が減少することを示し、これは LCA 産生菌の減少に伴い肝臓における LCA 量が減少したことに起因する可能性を示唆した (manuscript submitted).

本研究では、*Clostridium* 属や *Bacteroides* 属等の LCA 産生菌にスペクトルを有する CPX 以外の抗生物質を投与した場合にも、LCA 産生菌の減少に伴い肝臓における Cyp3a11 の発現が減少するのではないかとの仮説を立て、種々の抗生物質をマウスに投与して Cyp3a11 に対する影響を検討した。抗生物質としては、いずれも広い抗菌スペクトルを有するアンピシリン (ABPC)、CPX、レボフロキサシン (LVX)、バンコマイシン (VCM) とイミペネム (IPM) の混合剤 (VCM+IPM) を用いた。ペニシリン系抗生物質である ABPC は、<sup>11)</sup> *Bacteroides* 属や *Clostridium* 属などのグラム陽性菌<sup>12)</sup> やグラム陰性菌<sup>13)</sup> に抗菌スペクトルを持ち、ニューキノロン系抗菌薬である CPX 及び LVX は、*Bacteroides* 属、*Clostridium* 属、*Mycoplasma* 属や *Mycobacterium* 属など様々なグラム陽性菌、グラム陰性菌及び真正細菌に抗菌スペクトルを持つ。<sup>14,15)</sup> また、グリコペプチド系抗生物質である VCM は *Staphylococcus* 属、*Streptococcus* 属、*Pneumococcus* 属、*Enterococcus* 属、*Clostridium* 属などのグラム陽性菌に抗菌スペクトルを持ち、<sup>16)</sup> カルバペネム系抗生物質である IPM は *Staphylococcus* 属、*Streptococcus* 属、*Clostridium* 属、*Escherichia coli*、*Bacteroides* 属などグラム陽性菌、グラム陰性菌に広い抗菌スペクトルを持つ。<sup>17)</sup> IL-10 ノックアウト GF マウスに腸内細菌を感染させると潰瘍性大腸炎を自然発症するが、VCM と IPM の混合剤を投与すると、潰瘍性大腸炎の発症が劇的に抑制され、また盲腸内の嫌気性細菌もほとんど検出されなかったとの報告がある。<sup>18)</sup>

はじめに、SPF マウスを用いて、抗生物質投与が Cyp3a11 の発現に及ぼす影響を real-time RT PCR を用いて mRNA レベルで調べるとともに、Cyp3a の特異的な基質であるトリアゾラム<sup>19)</sup> を用いてその活性変化についても検討した。このときの腸内細菌の減少を確認するために、腸内細菌叢の中で多く存在し、高い  $7\alpha$ -dehydroxylase 活性を有する *Bacteroides fragilis*、*Clostridium scindens* 及び *Clostridium sordelli* の量を real-time PCR を用いて

定量するとともに、肝臓中の LCA 量の変化を HPLC を用いて定量した。さらに、本研究でみられた Cyp3a11 の変化が、投与した薬物の直接的な影響ではないことを確認するために、GF マウスに抗生物質を投与し、Cyp3a11 の発現変化を real-time RT PCR を用いて定量した。

## 材料と方法

**1. 試料** RNeasy Mini Kit, QIAamp DNA stool mini kit, RNase Free Water は Qiagen Inc. (Valencia, CA, USA) より購入した。Tris EDTA buffer (TE buffer) はナカライテスク株式会社 (Kyoto, Japan) から購入した。High capacity cDNA synthesis kit は Applied Biosystems (Tokyo, Japan) より購入した。iQ SYBR Green Supermix, DC protein assay kit は Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA) より購入した。各種プライマーは Invitrogen (Tokyo, Japan) より購入した。Ampicillin, ciprofloxacin, levofloxacin, vancomycin, imipenem, acetonitrile, triazolam, LCA, tauroolithocholic acid (TLCA), glycolithocholic acid (GLCA) は和光純薬工業株式会社 (Osaka, Japan) より購入した。 $\alpha$ -Hydroxytriazolam, 4-hydroxytriazolam は BIOMOL (Exeter, UK) より購入した。NADPH リジェネレーションシステムは日本ベクトン・ディッキンソン株式会社 (Tokyo, Japan) より購入した。Pregnanetriol はシグマアルドリッチ株式会社 (Tokyo, Japan) より購入した。その他の試薬は市販されているもののうち、最もグレードの高い物を購入した。

**2. 実験動物** 8 週齢の c57/BL6J 系雄性 SPF マウスを三協ラボサービス (Tokyo, Japan) より購入した。飼育中、摂餌及び飲水は自由摂取とし、また餌は粉末飼料 (オリエンタル酵母, Tokyo, Japan) を用いた。

また、8 週齢の IQI 系雄性 GF 及び SPF マウスを実験動物中央研究所 (Tokyo, Japan) から購入した。GF マウスは器具、器材、ケージ、床敷が高圧蒸気滅菌された環境で飼育され、飼育中、摂餌及び飲水は自由摂取とした。飲水は高圧蒸気滅菌した水を用い、餌は CL-2 (日本クレア, Tokyo) を高圧蒸気滅菌したものをを用いた。

本動物実験は、実験動物の適正な使用及び管理について定められた、星薬科大学薬学部実験動物ガイ

ドラインに準じて、同大学動物実験施設で行われた。

**3. 抗生物質の投与** SPF の c57/BL6J マウス及び GF の IQI マウスに ABPC, CPX, LVX (SPF のみ) 又は VCM と IPM の混合薬物 (VCM+IPM) を混餌投与した。1 日当たりの投与量が ABPC は 100 mg/kg,<sup>12)</sup> CPX 及び LVX は 200 mg/kg,<sup>10)</sup> VCM+IPM はそれぞれ 50 mg/kg<sup>18)</sup> となるように混餌し、それぞれ 5 日間自由摂食させた。投与開始 5 日目にジエチルエーテルで麻酔下マウスを解剖し、肝臓及び糞便を採取した。

GF マウスについては、投与終了時にケージ内の糞便を採取し菌の検査を行った結果、いずれの糞便からも菌は検出されなかった。

#### 4. Cyp3a11 の発現解析

**4-1. 組織サンプルからの RNA 調製** 摘出した肝臓を PBS<sup>-</sup> で洗浄し、重量を測定、記録したのち、液体窒素を用いて凍結させた。凍結した肝臓約 15 mg から RNeasy Mini Kit を用いて RNA を抽出した。RNA 抽出方法は、RNeasy Mini Kit のプロトコールに従って行った。得られた溶液を TE buffer を用いて 50 倍希釈し、分光光度計 [U-2800 型、(株)日立ハイテクノロジーズ] にて 260 nm 及び 280 nm の吸光度を測定することで純度の確認及び RNA 濃度 ( $\mu\text{g/ml}$ ) の算出を行った。

**4-2. Real-time RT PCR** RNA 1  $\mu\text{g}$  から High capacity cDNA synthesis kit を用いて cDNA を合成した。これを TE buffer にて 20 倍希釈し、cDNA TE buffer 溶液とした。Table 1 に示すプライマーを作成し real-time PCR を行い Cyp3a11 の発現を検出した。すなわち、Multiplate<sup>®</sup> PCR Plates 96-

well clear (Bio-Rad Laboratories) の各 well へ iQ SYBR Green Supermix 25  $\mu\text{l}$ , Cyp3a11 の Forward primer (5 pmol/ $\mu\text{l}$ ) 3  $\mu\text{l}$ , Reverse primer (5 pmol/ $\mu\text{l}$ ) 3  $\mu\text{l}$ , cDNA TE buffer 溶液 4  $\mu\text{l}$ , RNase Free Water 15  $\mu\text{l}$  を加えた。ハウスキーピング遺伝子の 18S rRNA においては、cDNA TE buffer 溶液として上記の溶液を TE buffer によりさらに 20 倍希釈した溶液 4  $\mu\text{l}$  を用いた。温度条件は denaturation temperature として 95°C で 15 秒, annealing temperature として 56°C で 30 秒, elongation temperature として 72°C で 30 秒とした。増幅過程の蛍光強度を My iQ<sup>™</sup> Single Color Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories) によりモニタリングした。

#### 5. Cyp3a11 の活性の測定

**5-1. Microsome preparation** 凍結した肝臓約 70 mg を、dissecting buffer (0.3 M sucrose, 25 mM imidazole, 1 mM EDTA, pH 7.2, containing 8.5  $\mu\text{M}$  leupeptin, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride) を用いてホモジナイズした。その懸濁液を 9000 g で 15 分間遠心分離し、その上清を 105000 g で 1 時間遠心分離した。その沈殿物を dissecting buffer を用いて再懸濁した。すべての操作は 4°C で行った。タンパク質濃度は、Lowry 法<sup>19)</sup> を用いて測定した。標準品には牛血清アルブミンを用いた。

**5-2. Triazolam 代謝試験<sup>20)</sup>** 各種濃度 triazolam 溶液 (最終濃度 0–750  $\mu\text{M}$ )、肝ミクロソーム懸濁液 (最終濃度 0.25 mg/ml)、NADPH リジェネレーションシステム溶液をそれぞれ 37°C、15 分間プレインキュベーションしたのち、それぞれ 50  $\mu\text{l}$ 、47  $\mu\text{l}$ 、3  $\mu\text{l}$  ずつエッペンドルフ型チューブに入れ、

Table 1. Primer Sequences

Primer sequences for mouse mRNA				
Target	Accession number	Forward primer (5' to 3')	Reverse primer (5' to 3')	Amplicon size (bp)
Cyp3a11	NM_007818	CGCCTCTCCTTGCTGTCACA	CTTTGCCTTCTGCCTCAAGT	260
18S rRNA	X00686	GTCTGTGATGCCCTTAGATG	AGCTTATGACCCGCACTTAC	177
Primer sequences for intestinal flora				
Target		Forward primer (5' to 3')	Reverse primer (5' to 3')	Amplicon size (bp)
<i>Bacteroides fragilis</i>		CTGAACCAGCCAAGTAGCG	CCGCAAACCTTTCACTACTGACTTA	230
<i>Clostridium scindens</i>		GCAACCTGCCTGCACT	ACCGAATGGCCTTGCCA	712
<i>Clostridium sordelli</i>		TCGAGCGACCTTCGG	CACCACCTGTACCAT	944

37°C, 30 分間インキュベーションした. Acetonitrile 200  $\mu$ l を加え氷冷させることにより反応を停止し, 除タンパク処理を行った. その後 16000 $\times$ g, 4°C で 15 分間遠心分離し, 上層を 180  $\mu$ l ずつ取り, 窒素ガスにより乾固したのち, 残渣を移動相 60  $\mu$ l に溶解させ, HPLC-UV により 4-hydroxytriazolam 及び  $\alpha$ -hydroxytriazolam を定量した.

### 5-3. HPLC による Triazolam 代謝物の定量

HPLC 装置は, Waters 2695 Separations Module [日本ウォーターズ㈱] 及び Waters 2489 UV/Visible Detector [日本ウォーターズ㈱] から構成され, 測定したデータの記録及び解析には解析用ソフトウェア Empower [日本ウォーターズ㈱] を用いた. カラムは Inertsil C18 ODS-3 平均粒子サイズ 5  $\mu$ m, 4.6 $\times$ 250 mm (GL Sciences Inc.) を用いた. 移動相には acetonitrile : methanol : 10 mM potassium phosphate buffer (4 : 7 : 9, pH 7.4) を使用し, 流速は 1.0 ml/min, 温度は 40°C, 検出波長は 220 nm とした.<sup>20)</sup>

**5-4. Triazolam 代謝の速度論解析** Triazolam 濃度と代謝速度との関係を, 非線形最小二乗法プログラム MULTI<sup>21)</sup> を用いて (1) 式 (4 位水酸化) あるいは (2) 式 ( $\alpha$  位水酸化) に fitting し, 速度論パラメータ (最大代謝速度  $V_{max}$ , ミカエリス定数  $K_m$ , 基質阻害定数  $K_s$ ) を算出した.

$$V = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad (1)$$

$$V = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m + [S] \times \left(1 + \frac{[S]}{K_s}\right)} \quad (2)$$

さらに, 各々の代謝経路について固有クリアランス  $CL_{int} = V_{max}/K_m$  を算出し, 両代謝経路の  $CL_{int}$  の和を求めた.

## 6. LCA 産生菌の定量

**6-1. 糞便中の DNA 抽出** 糞便サンプル約 200 mg から QIAamp DNA Stool Mini Kit を用いて細菌の DNA の抽出を行った. DNA 抽出方法は QIAamp DNA Stool Mini Kit 付属のプロトコールに従い, すべての操作は室温で行った. 得られた溶液を TE buffer を用いて 50 倍希釈し, 分光光度計 [U-2800 型, ㈱日立ハイテクノロジーズ] にて 260 nm 及び 280 nm の吸光度を測定することで純度の確認及び DNA 濃度 ( $\mu$ g/ml) の算出を行った.

**6-2. Real-time PCR<sup>8,22)</sup>** Table 1 に示すプライマーを作成し real-time PCR を行い各腸内細菌の量を定量した. Multiplate<sup>®</sup> PCR Plates 96-well clear (Bio-Rad Laboratories) の各 well へ iQ SYBR Green Supermix 25  $\mu$ l, 目的遺伝子の Forward primer (5 pmol/ $\mu$ l) 3  $\mu$ l, Reverse primer (5 pmol/ $\mu$ l) 3  $\mu$ l, DNA TE buffer 溶液 (50 ng/ $\mu$ l) 2  $\mu$ l, RNase Free Water 17  $\mu$ l を加えた. *Bacteroides fragilis* 定量のための温度条件は denaturation temperature として 95°C で 30 秒, annealing temperature として 58°C で 30 秒, elongation temperature として 72°C で 1 分とした. *Clostridium scindens* 及び *Clostridium sordelli* 定量のための温度条件は denaturation temperature として 95°C で 30 秒, annealing temperature として 60°C で 30 秒, elongation temperature として 72°C で 1 分とした. 増幅過程の蛍光強度を My iQ<sup>™</sup> Single Color Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories) によりモニタリングした.

**7. 肝臓中の胆汁酸の定量<sup>23)</sup>** 肝臓を濃度 200 mg/ml となるように, 精製水を用いてホモジナイズした. ホモジナイズ液 500  $\mu$ l に 2 nmol の pregnanetriol を含む 2 ml の ethanol を混合し, 85°C で 1 分間インキュベートしたのち, 1000 $\times$ g で 5 分間遠心分離した. その上清を別の試験管に移し, 沈澱には 1 ml の ethanol を加え懸濁したのち, 再度遠心分離を行った. この操作を 2 回行った. 上清を併せて窒素ガスで乾固したのち, 200  $\mu$ l の methanol で溶解した. HPLC には FP-2020 Plus fluorescence detector (Jasco, Tokyo, Japan) を用いた. 胆汁酸抽出液を Bilepak II column (4.6 $\times$ 125 mm) (Jasco) を用いて 25°C で分離したのち, 3 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase が固定化された Enzymepak 3 $\alpha$ -HSD column (Jasco) で NAD<sup>+</sup> 溶液と反応させ, 生成する NADH を励起波長 220 nm, 測定波長 280 nm で検出した. HPLC の条件は, 流速 1.0 ml/min, 移動相 A (acetonitrile/methanol/30 mM ammonium acetate (20/20/60)), 移動相 B (acetonitrile/methanol/30 mM ammonium acetate (30/30/40)) とし, A/B 100/0 (0 min)—0/100 (32 min, 28 min hold)—100/0 (20 min) とした. 溶出液は, C 溶液 (10 mM phosphate buffer, pH 7.2, 1.0 mM EDTA, 0.05% 2-mercaptoethanol, 0.3 mM NAD<sup>+</sup>) と 1 : 1 で混合したのち, 3 $\alpha$ -HSD column に通した. LCA, その

抱合体である TLCA, GLCA について, 各々の検量線を用いて定量した。

**8. 統計処理** データは平均±標準偏差 (mean±S.D.) として表示した。統計学的有意差検定には Student's *t* 検定を用いた。

## 結 果

**1. 抗生物質投与による肝臓における Cyp3a11 発現量の変化** SPF 及び GF マウスに ABPC, CPX, LVX あるいは VCM+IPM を 5 日間投与したのち, 肝臓中の Cyp3a11 の発現量を real-time RT PCR により解析した結果を Fig. 1 に示す。SPF マウスにおける Cyp3a11 の mRNA 発現量は, コントロール群と比較して ABPC, CPX, LVX 及び VCM+IPM 投与群のいずれにおいても有意に低い値を示した。一方, GF マウスにおいては, ABPC 及び VCM+IPM 投与群で増加傾向を示したもののいずれの投与群においても有意な変化はみられなかった。

**2. 肝臓におけるトリアゾラム代謝活性** SPF マウスに ABPC, CPX, LVX あるいは VCM+IPM を 5 日間投与したのち, 肝ミクロソーム画分におけるトリアゾラム代謝活性を検討した結果を Fig. 2 に示す。 $\alpha$ 位水酸化活性 ( $\alpha$ -OH) については, コントロール群と比較して ABPC, CPX, LVX 及び VCM+IPM 投与群のいずれにおいても  $V_{max}$  が有意に低い値を示した。また  $K_m$  値はコントロール群と比較して各群ともに有意な差はみられず, 各群ともに弱い基質阻害がみられた (コントロール;  $K_s = 1215 \pm 695 \mu\text{M}$ , ABPC;  $K_s = 1210 \pm 645 \mu\text{M}$ , CPX;  $K_s = 1172 \pm 112 \mu\text{M}$ , LVX;  $K_s = 1604 \pm 428 \mu\text{M}$ , VCM+IPM;  $K_s = 2977 \pm 1646 \mu\text{M}$ )。CLint はコントロール群と比較して ABPC, CPX, LVX 投与群において有意に低い値を示し, また VCM+IPM 投与群は有意な差は認められなかったものの低い値を示した。4 位水酸化活性 (4-OH) については,  $V_{max}$  はコントロール群と比較して ABPC, CPX 及び VCM+IPM 投与群において有意に低い値を示し, また LVX 投与群は有意な差は認められなかったものの低い値を示した。 $K_m$  値はコントロール群と比較して各群ともに有意な差はみられず, CLint は ABPC, CPX, LVX 及び VCM+IPM 投与群のいずれにおいても有意に低い値を示した。 $\alpha$ -OH 及び

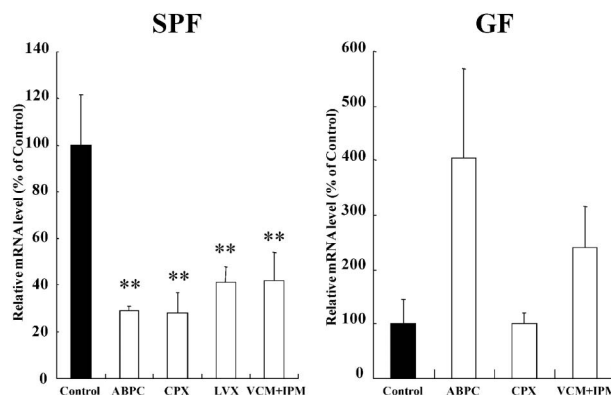


Fig. 1. Effects of Antibiotics Administration on the Expression of Cyp3a11 in the Liver

The mRNA expression of hepatic Cyp3a11 was investigated by real-time RT PCR following daily administration of ABPC (100 mg/kg), CPX (200 mg/kg), LVX (200 mg/kg; only SPF) or VCM+IPM (50 mg/kg each) to SPF and GF mice for 5 days. Expression of Cyp3a11 was corrected against 18S rRNA and compared in relation to the mean value in control mice (100%). Means±S.D.,  $n=3-5$ , \*\* $p<0.01$  by Student's *t*-test.

4-OH の CLint の合計値はコントロール群 ( $32.2 \pm 7.0 \mu\text{l}/\text{min}/\text{mg}$  protein) と比較して ABPC ( $10.5 \pm 4.5 \mu\text{l}/\text{min}/\text{mg}$  protein), CPX ( $12.1 \pm 1.7 \mu\text{l}/\text{min}/\text{mg}$  protein), LVX ( $14.6 \pm 5.9 \mu\text{l}/\text{min}/\text{mg}$  protein) 及び VCM+IPM ( $15.4 \pm 1.7 \mu\text{l}/\text{min}/\text{mg}$  protein) 投与群のいずれにおいても有意に低い値を示した。

**3. LCA 産生菌の定量** SPF マウスに ABPC, CPX, LVX あるいは VCM+IPM を 5 日間投与したのち, 糞便中の細菌の DNA を real-time PCR で解析した結果を Fig. 3 に示す。 *Bacteroides fragilis*, *Clostridium scindens* 及び *Clostridium sordelli* の量はコントロール群と比較して ABPC, CPX, LVX 及び VCM+IPM 投与群のいずれにおいても有意に低い値を示した。

**4. 抗生物質投与による肝臓中 LCA 量の変化** SPF マウスに ABPC, CPX, LVX あるいは VCM+IPM を 5 日間投与したのち, 肝臓中の TLCA 量を HPLC により解析した結果を Fig. 4 に示す。肝臓における TLCA 量は, コントロール群と比較して CPX あるいは VCM+IPM 投与群において有意に低い値を示した。ABPC 及び LVX 投与群は有意な差はみられなかったものの減少傾向がみられた。LCA 及び GLCA については, いずれの群においても検出限界 ( $20 \text{ ng}/\text{g}$  liver) 以下であった。

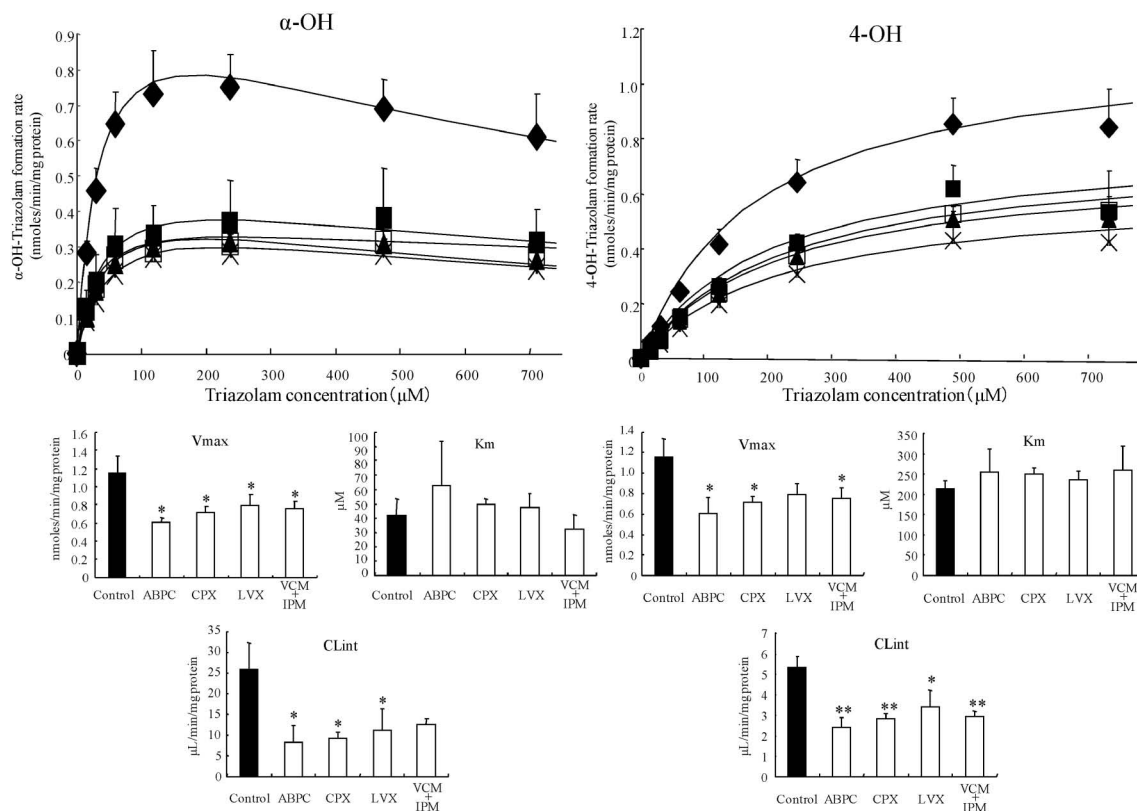


Fig. 2. Effects of Antibiotics Administration on Triazolam Metabolic Activity in the Liver

The microsomes were extracted from the livers of control (◆) and ABPC (×), CPX (▲), LVX (■) or VCM+IPM (□)-treated SPF mice in order to measure the  $\alpha$ -hydroxylation ( $\alpha$ -OH) and 4-hydroxylation (4-OH) activities of triazolam.  $V_{max}$ ,  $K_m$  and  $CL_{int}$  were calculated according to equations (1) and (2). Means  $\pm$  S.D.,  $n=3$ , \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  by Student's  $t$ -test.

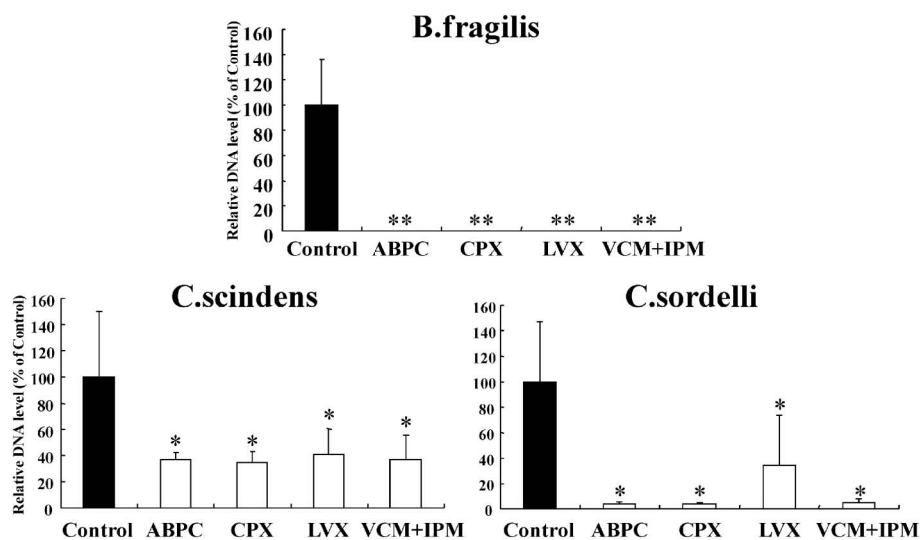


Fig. 3. Effects of Antibiotics Administration on the Bacterial Content in the Feces

The feces from the SPF mice treated with daily doses of ABPC (100 mg/kg), CPX (200 mg/kg), LVX (200 mg/kg) or VCM+IPM (50 mg/kg each) for 5 days were analyzed for the bacterial DNA by real-time PCR, and compared with control (100%). Means  $\pm$  S.D.,  $n=5$ , \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  by Student's  $t$ -test.

## 考 察

われわれは以前、腸内細菌の有無によりマウスの

肝臓における Cyp3a の発現が変動する可能性を示唆した。さらに、CPX の投与による肝臓における Cyp3a の発現変動<sup>10)</sup>が、LCA 産生菌の減少に伴い

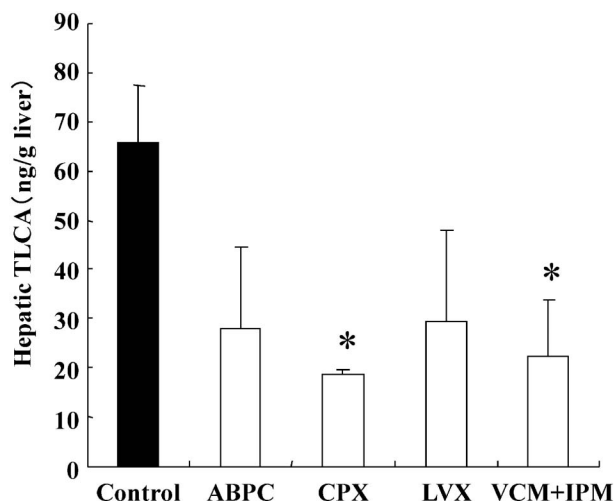


Fig. 4. Effects of CPX Administration on the TLCA Content in the Liver

The TLCA content in the livers from SPF mice treated with daily doses of ABPC (100 mg/kg), CPX (200 mg/kg), LVX (200 mg/kg) or VCM+IPM (50 mg/kg each) for 5 days was analyzed by HPLC and compared with control. Means  $\pm$  S.D.,  $n=3$ , \*  $p<0.05$  by Student's  $t$ -test.

肝臓における LCA 量が減少したことに起因する可能性を示唆した (manuscript submitted). 本研究では, CPX 以外の抗生物質についても, 腸内細菌の減少に伴う肝臓中の Cyp3a11 の発現低下をもたらす可能性について検討した.

SPF マウスに ABPC, CPX, LVX 及び VCM と IPM の混合剤を連続投与することにより, 肝臓における Cyp3a11 の mRNA 発現量の有意な低下が認められた (Fig. 1). また, マウス Cyp3a の基質であるトリアゾラム<sup>20)</sup>を用いて肝ミクロソームの活性を比較したところ, トリアゾラムの代謝活性は ABPC, CPX, LVX 及び VCM+IPM 投与群のいずれにおいてもコントロール群と比較して有意に低かった.  $\alpha$ 位水酸化及び4位水酸化ともに  $V_{max}$  が抗生物質投与群において低く, Cyp3a の発現量の相違を反映しているものと考えられた (Fig. 2).

次に, Cyp3a11 の発現減少に, 腸内細菌により特異的に産生される LCA の減少が関与しているかどうかを調べる目的で, マウスの糞便中の LCA 産生菌を定量した. その結果, 糞便中の *Bacteroides fragilis*, *Clostridium scindens* 及び *Clostridium sordeilli* の量はコントロール群と比較していずれの抗生物質投与群においても有意に低い値を示した (Fig. 3). また, 肝臓中の TLCA 量は, コントロール群と比較していずれの抗生物質投与群においても

低い値を示した (Fig. 4). LCA は検出限界以下であったが, 肝臓中においてその大部分が TLCA として存在することが知られているため,<sup>23)</sup> 肝臓における TLCA 量は LCA の量を反映していると考えられる.

LCA は FXR や PXR の強力なリガンドとなり, PXR の発現量を増加させることにより, 肝臓の Cyp3a の発現を増加させることが報告されている.<sup>1-3)</sup> したがって, 本研究でみられた抗生物質投与による肝臓における Cyp3a11 の減少は, 肝臓中の LCA 量の減少が1つの要因である可能性が考えられた.

SPF マウスへの抗生物質投与による肝臓の Cyp3a11 の減少が, 抗生物質の肝細胞に対する直接的な作用によるものではないことを立証するために, 腸内細菌が存在しない GF マウスに同様に抗生物質を投与して肝臓における Cyp3a11 を定量した. その結果, いずれの抗生物質投与群においても GF マウスのコントロール群と比較して Cyp3a11 の減少はみられなかった (Fig. 1) ため, 本研究でみられた SPF マウスの肝臓における Cyp3a11 の減少は, 抗生物質投与による腸内細菌の減少に起因する可能性が示唆された. ABPC 投与群において増加傾向が認められた要因としては, ABPC による PXR 活性化作用の関与が考えられる.<sup>24)</sup>

ヒトの肝臓における主要な薬物代謝酵素である CYP3A4 についても, PXR によりその発現が制御されており, LCA による PXR の活性化作用はマウス PXR と比較してヒト PXR の方が顕著に高いとの報告がある.<sup>1)</sup> また, ヒトの腸内細菌の構成についても, マウスと同様に LCA を産生する *Clostridium* 属及び *Bacteroides* 属は優勢菌として存在することが知られている.<sup>25)</sup> したがって, 本研究で使用した抗生物質をヒトに投与した場合にも, 肝臓中の LCA 量の減少に伴って CYP3A4 の発現減少が起こり得る可能性が考えられる.

抗生物質等の薬物だけでなく, ストレス,<sup>26)</sup> 炎症性腸疾患,<sup>27)</sup> 加齢<sup>28)</sup>等によっても腸内細菌が変動することが知られている. 本研究の結果は, これらの変動に伴って CYP の発現も変動する可能性を示すものであり, 腸内細菌の変動が薬物動態の個人差の変動の一因となっている可能性を示唆するものである.

## REFERENCES

- 1) Staudinger J. L., Goodwin B., Jones S. A., Hawkins-Brown D., MacKenzie K. I., LaTour A., Liu Y., Klaassen C. D., Brown K. K., Reinhard J., Willson T. M., Koller B. H., Kliewer S. A., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **13**, 3369–3374 (2001).
- 2) Xie W., Radominska-Pandya A., Shi Y., Simon C. M., Nelson M. C., Ong E. S., Waxman D. J., Evans R. M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **13**, 3375–3380 (2001).
- 3) Zhang J., Huang W., Qatanani M., Evans R. M., Moore D. D., *J. Biol. Chem.*, **19**, 49517–49522 (2004).
- 4) Makishima M., Lu T. T., Xie W., Whitfield G. K., Domoto H., Evans R. M., Haussler M. R., Mangelsdorf D. J., *Science*, **296**, 1313–1316 (2002).
- 5) Tu H., Okamoto A. Y., Shan B., *Trends Cardiovasc. Med.*, **10**, 30–35 (2000).
- 6) Madsen D., Beaver M., Chang L., Bruckner-Kardoss E., Westmann B., *J. Lipid Res.*, **17**, 107–111 (1976).
- 7) Doerner K. C., Takamine F., LaVoie C. P., Mallonee D. H., Hylemon P. B., *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 1185–1188 (1997).
- 8) Kitahara M., Sakamoto M., Benno Y., *Microbiol. Immunol.*, **45**, 263–266 (2001).
- 9) Hirano S., Masuda N., *J. Lipid Res.*, **23**, 1152–1158 (1982).
- 10) Xie H. J., Broberg U., Griskevicius L., Lundgren S., Carlens S., Meurling L., Paul C., Rane A., Hassan M., *Bone Marrow Transplant.*, **31**, 197–203 (2003).
- 11) Acred P., Brown D. M., Turner D. H., Wilson M. J., *Br. J. Pharmacol. Chemother.*, **18**, 356–369 (1962).
- 12) Ednie L. M., Jacobs M. R., Appelbaum P. C., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **42**, 2459–2462 (1998).
- 13) Schaedler R. W., *Proc. Nutr. Soc.*, **32**, 41–47 (1973).
- 14) Prabhala R. H., Rao B., Marshall R., Bansal M. B., Thadepalli H., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **26**, 785–786 (1984).
- 15) Takahata M., Mitsuyama J., Yamashiro Y., Yonezawa M., Araki H., Todo Y., Minami S., Watanabe Y., Narita H., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **43**, 1077–1084 (1999).
- 16) Watanakunakorn C., *Rev. Infect. Dis.*, **3**, 210–215 (1981).
- 17) Fukuoka T., Ohya S., Utsui Y., Domon H., Takenouchi T., Koga T., Masuda N., Kawada H., Kakuta M., Kubota M., Ishii C., Ishii C., Sakagawa E., Harasaki T., Hirasawa A., Abe T., Yasuda H., Iwataki M., Kuwahara S., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **41**, 2652–2663 (1997).
- 18) Hoentjen F., Harmsen H. J., Braat H., Torrice C. D., Mann B. A., Sartor R. B., Dieleman L. A., *Gut*, **52**, 1721–1727 (2003).
- 19) Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J., *J. Biol. Chem.*, **193**, 265–275 (1951).
- 20) Perloff M. D., von Moltke L. L., Court M. H., Kotegawa T., Shader R. I., Greenblatt D. J., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **292**, 618–628 (2000).
- 21) Yamaoka K., Tanigawara Y., Nakagawa T., Uno T., *J. Pharmacobiodyn.*, **4**, 879–885 (1981).
- 22) Liu C., Song Y., McTeague M., Vu A. W., Wexler H., Finegold S. M., *FEMS Microbiol. Lett.*, **16**, 9–16 (2003).
- 23) Kitada H., Miyata M., Nakamura T., Tozawa A., Honma W., Shimada M., Nagata K., Sinal C. J., Guo G. L., Gonzalez F. J., Yamazoe Y., *J. Biol. Chem.*, **278**, 17838–17844 (2003).
- 24) Yasuda K., Ranade A., Venkataramanan R., Strom S., Chupka J., Ekins S., Schuetz E., Bachmann K., *Drug Metab. Dispos.*, **36**, 1689–1697 (2008).
- 25) Mitsuoka T., Ono K., *Zentralbl. Bakteriolog. [Orig A]*, **238**, 228–236 (1977).
- 26) Suzuki K., Harasawa R., Yoshitake Y., Mitsuoka T., *Nippon Juigaku Zasshi*, **45**, 331–338 (1983).
- 27) Okayasu I., Hatakeyama S., Yamada M., Ohkusa T., Inagaki Y., Nakaya R., *Gastroenterology*, **98**, 694–702 (1990).
- 28) Savage D. C., Dubos R., Schaedler R. W., *J. Exp. Med.*, **127**, 67–76 (1968).