

# 腸管の水輸送機構の破綻に対するプロバイオティクスの有効性と そのメカニズムの解明

今 理 紗 子

星薬科大学薬動学教室 博士課程

## 緒 言

腸管は水の移動が多く、成人では1日に約9Lもの水が腸管に流入する。そのうち、約99%の水分は腸管から吸収され、糞便には約200 mL以下の水分が排泄されるのみである。大腸は、小腸から流入した水分とイオンの大部分を吸収して内容物を一定の塊にし、便として排泄する。すなわち大腸では、Na<sup>+</sup>イオン、K<sup>+</sup>イオン、Cl<sup>-</sup>イオンなどの電解質やグルコースなどの吸収によって局所的に浸透圧勾配が生じているため、水は浸透圧の低い腸管側から浸透圧の高い血管側へと移動し、便が濃縮されるものと考えられている。一方、大腸の上皮細胞はタイトジャンクションが強固であり、傍細胞(paracellular)経路の輸送では、浸透圧の変化に伴った迅速な水の移動は困難であるとされてきた。このような背景の中、近年、水を選択的に透過させる膜タンパク質『アクアポリン(aquaporins; AQP)』が発見された。AQPはヒトにおいて様々な臓器に発現していることが知られており、現在AQP0からAQP12までの13種類が同定されている。腸管においても、多数のAQPファミリーの発現が認められており、特に、大腸粘膜上皮細胞にはAQP3が優位に発現している<sup>1)</sup>。我々はこれまでに、AQP3の機能や発現の変化が、便秘や下痢の発症に大きく関与していることを明らかにした<sup>2-8)</sup>。これらの知見は、AQP3が大腸内の水分量を適正に保つ役割を担っていることを示唆するものであった。

感染症などに罹患すると抗菌薬が処方されるが、下痢や軟便の副作用が多く報告されている。この症状は、抗菌薬関連下痢症(antibiotic associated diarrhea; AAD)と呼ばれ、患者のQOLを著しく低下させるばかりでなく、薬剤耐性菌の増殖や偽膜性大腸炎などの合併症を招くこともあり、非常に問題である。現在、AADの治療や予防のために乳酸菌製剤などのプロバイオティクスが使用されているが、その有効性については、一定の見解が得られていない。その理由は、これまでAAD

は腸内細菌の変動によって発症するものと考えられてきたが、その分子生物学的なメカニズムはほとんど明らかになっていなかったためである。加えて、種々のプロバイオティクスの有効性や、作用発現時間などが全く考慮されず使用されていたためである。

本研究では、AADに対するプロバイオティクスの有効性およびその作用メカニズムを明らかにする目的で、以下に示す検討を行った。まず、抗菌薬シプロフロキサシンを用いて、AADの発症における大腸AQP3の役割について解析した。次に、*Bifidobacterium longum* (*B. longum*)によるAADの改善メカニズムについて、AQP3に着目し、検討した。

## 結 果

### 1. ラットにシプロフロキサシンを投与した際の下痢の評価および大腸AQP3の発現量の変化

ラットに0.25%シプロフロキサシン混合食を自由摂取させた際の糞中水分量は、投与1日目から増加し、投与3日目では投与前の約2倍となった。シプロフロキサシン投与10日目においても、糞中水分量は投与前に比べて有意に高かった(図1)。このとき、排便回数および

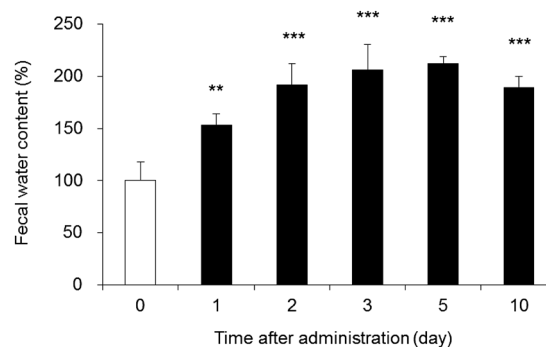


図1 シプロフロキサシンを投与した際の糞中水分量の変化

ラットに0.25%シプロフロキサシン混合食を10日間自由摂取させ、糞中水分量を継続的に測定した。(平均値±標準偏差、n=6, Dunnett's test: \*\**p*<0.01, \*\*\**p*<0.001 vs. 0 day.)

排便総重量も有意に増加していた。このことから、ラットにシプロフロキサシンを投与すると、下痢を発症することがわかった。

次に、ラットにシプロフロキサシンを投与した際に生じる下痢が、大腸 AQP3 の発現変動に起因したものであるかどうかを調べた。大腸 AQP3 の mRNA 発現量は、シプロフロキサシン投与1日目から有意に低下し、この発現低下は投与10日目まで持続していた (図2A)。シプロフロキサシン投与後の AQP3 のタンパク質発現量をウェスタンブロットティングにより解析したところ、AQP3 のタンパク質は 27 kDa および 30~40 kDa 付近に検出された。これらはそれぞれ、糖鎖が結合していない AQP3 と糖鎖が結合している AQP3 であることが報告されている<sup>1)</sup>。糖鎖修飾の有無は、AQP3 の安定性や細胞膜への移行量に差は見られるものの、水の透過機能には差が認められないことが知られている<sup>9)</sup>。本研究では、これらのバンドの総和を AQP3 のタンパク質の発現量として解析した。大腸の AQP3 のタンパク質発現量は、シプロフロキサシン投与1日目から有意に低下し、投与2日目の AQP3 のタンパク質発現量は投与前の 40% であった。また、この発現低下は投与10日目まで持続していた (図2B)。これらのことから、シプロフロキサシン投与時には、大腸 AQP3 の発現量が低下することがわかった。

## 2. シプロフロキサシン投与時の大腸 AQP3 の発現低下要因の探索

シプロフロキサシン投与時の大腸 AQP3 の発現低下が、シプロフロキサシンによる直接作用かどうかを調べた。結腸癌由来 HT-29 細胞にシプロフロキサシンを添加した際の AQP3 の mRNA 発現量は、添加3日後までコントロールと比べて変化は認められなかった (図3)。

そこで次に、シプロフロキサシンの投与によって腸内細菌が変動し、間接的に AQP3 の発現量を低下させた可能性について調べた。グラム陽性菌として

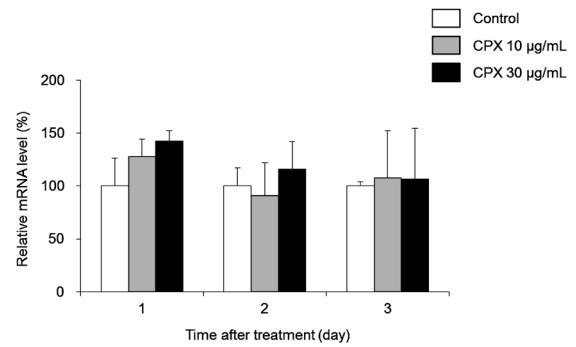
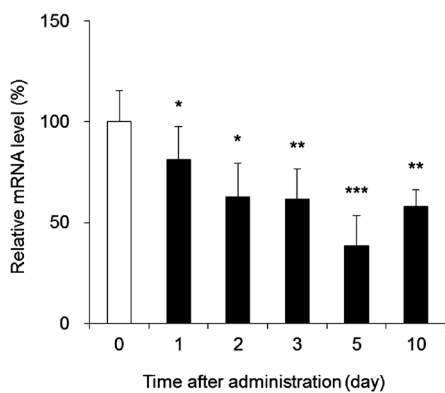


図3 HT-29細胞にシプロフロキサシンを添加した際の AQP3 の発現変化

HT-29細胞にシプロフロキサシン (CPX; 10 µg/mL, 30 µg/mL) を添加し、3日後までの AQP3 の mRNA 発現量を解析した (平均値±標準偏差、n=6)。

### A



### B

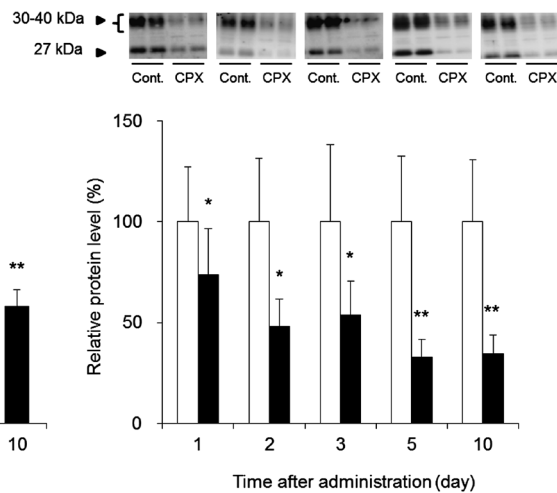


図2 シプロフロキサシンを投与した際の大腸 AQP3 の発現変化

ラットに0.25%シプロフロキサシン混合食 (CPX; ■) あるいは無添加飼料 (Control; □) を10日間自由摂取させ、大腸 AQP3 の mRNA 発現量 (A) およびタンパク質発現量 (B) を解析した。(平均値±標準偏差、n=6、Dunnnett's testあるいはStudent's t-test: \**p*<0.05, \*\**p*<0.01, \*\*\**p*<0.001 vs. 0 day or Control.)

*Clostridium sordelli*量を解析したところ、シプロフロキサシン投与1日目から著明に低下し、投与3日目以降では投与前の5%未満であることがわかった。また、グラム陰性菌である *Bacteroides fragilis* 量についても同様

に、シプロフロキサシンの投与により著明に低下し、投与1日目の時点で、投与前の3%であった(図4)。これらのことから、シプロフロキサシンの投与により、腸内細菌が著明に低下することが確認できた。さらに、腸内

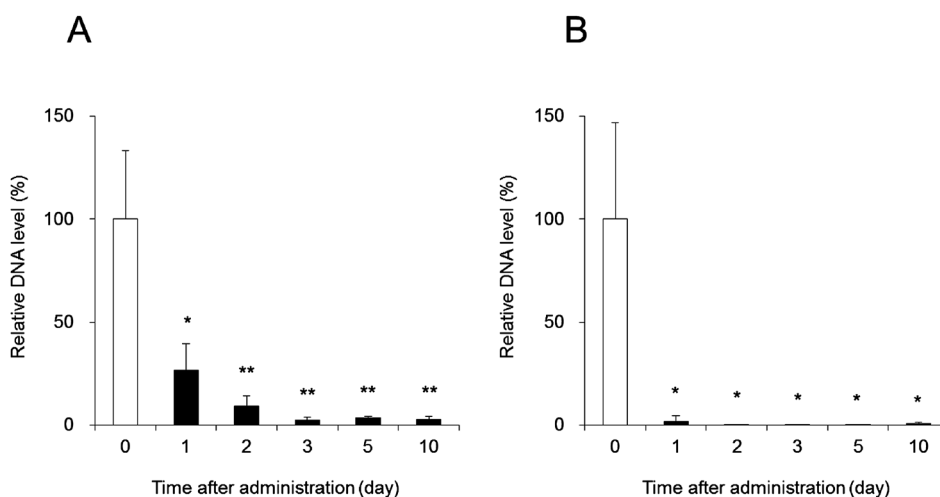


図4 シプロフロキサシンを投与した際の腸内細菌の変化

ラットに0.25%シプロフロキサシン混合食を10日間自由摂取させ、糞中の *Clostridium sordelli* (A) および *Bacteroides fragilis* (B) 量を測定した。(平均値±標準偏差、 $n=6$ 、Dunnett's test: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs. 0 day.)

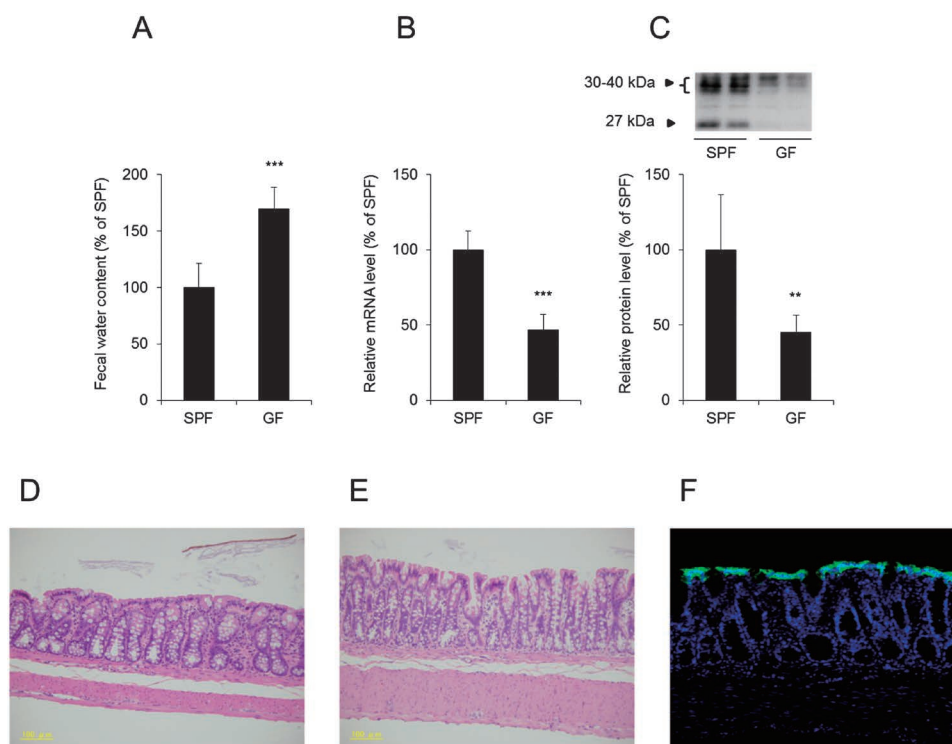


図5 SPFラットおよびGFラットにおける糞中水分量と大腸AQP3の発現変化

SPFラットおよびGFラットの糞便を採取し、糞中水分量(A)を測定した。また、大腸AQP3のmRNA発現量(B)およびタンパク質発現量(C)を解析した(平均値±標準偏差、 $n=6$ 、Student's *t*-test: \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs. SPF)。さらに、SPFラット(D)およびGFラット(E)の大腸をHE染色した。また、SPFラットの大腸におけるAQP3(Green)および核(Blue)を免疫組織化学染色法により染色した(F)。

細菌が存在するSPFラットと腸内細菌が存在しないGFラットの糞中水分量を解析したところ、GFラットではSPFラットと比べて約2倍有意に高かった(図5A)。このとき、GFラットの大腸においては器質的な変化が生じていないにも関わらず、大腸粘膜上皮細胞のAQP3の発現量が、SPFラットと比べて約50%有意に低下していることがわかった(図5B-F)。以上のことから、腸内細菌が存在しない場合には、大腸AQP3の発現量が低下し、糞中水分量が増加することが明らかとなった。

### 3. *B. longum* 併用投与時のシプロフロキサシン誘発下痢症の改善効果

ここまでの結果から、腸内細菌が大腸AQP3の発現量を変動させる因子である可能性が示唆された。そこで、プロバイオティクスを用いて腸内細菌を補充することにより、シプロフロキサシンによる下痢が改善するかどうかを調べた。ラットにシプロフロキサシンおよび*B. longum*を併用投与した際の糞中水分量は、コントロール群に比べて高値であったものの、シプロフロキサシン単独投与群と比べては低く、下痢は改善傾向にあった(図6A)。このときの大腸AQP3のタンパク質発現量は、コントロール群に比べて低下していたものの、シプロフロキサシン単独投与群と比べて有意に高かった(図6B)。以上のことから、シプロフロキサシン投与時に発症する下痢に、*B. longum*が有効であることがわかった。

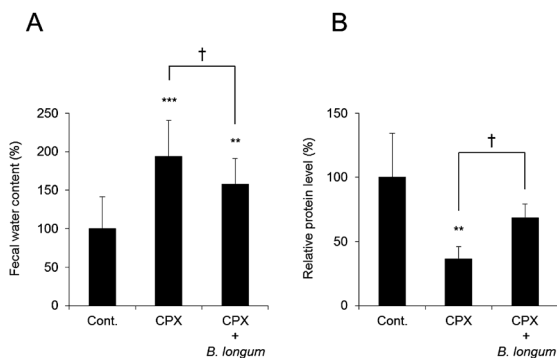


図6 シプロフロキサシンと*B. longum*を併用投与した際の糞中水分量と大腸のAQP3発現量の変化

ラットにシプロフロキサシン単独(CPX)あるいは*B. longum*と併用投与(CPX+*B. longum*)した際の糞中水分量(A)および大腸AQP3のタンパク質発現量(B)を解析した。(平均値±標準偏差、n=6、Tukey's test: \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs. Control, † $p < 0.05$  vs. CPX.)

### 考 察

ヒトの腸管には約1,000種類もの細菌が存在し、腸内細菌叢を構成している。最近、腸内細菌叢は宿主(ヒト)の生理機能と密接に関与していることが明らかになりつつあり、腸内細菌叢を正常に保つことは、ヒトが健康を維持するために非常に重要であると考えられる。本研究では、腸内細菌が最も多く存在する大腸の機能タンパク質AQP3の発現に及ぼす腸内細菌の影響について検討した。

ラットにシプロフロキサシンを投与したところ、糞中水分量が投与3日目まで経時的に増加し、それ以降はほぼ一定の値を示した(図1)。一方、大腸のAQP3のタンパク質発現量は、シプロフロキサシン投与1日目から有意に低下した(図2)。また、このAQP3の発現低下と糞中水分量の増加には、良い相関が見られた。これらのことから、シプロフロキサシンを投与している間は下痢の発症が持続し、このとき、大腸AQP3の発現低下も持続していることがわかった。大腸内の浸透圧は、血管側と比べて低いため、水は浸透圧勾配に従って腸管側から血管側へと輸送される。この大腸における水の移動は、粘膜上皮細胞の膜上に発現しているAQP3を介して行われており、水の移動量はAQP3の発現量に依存しているものと考えられている。したがって、シプロフロキサシンによってAQP3の発現量が低下すると、腸管側から血管側への水の移動が制限され、腸管内に水分が貯留するため、下痢が発症するものと考えられた。

次に、シプロフロキサシン投与時の大腸AQP3の発現低下要因の探索を行った。*In vitro*試験の結果、シプロフロキサシンが直接、大腸粘膜上皮細胞に作用しAQP3の発現量を低下させている可能性は低いものと考えられた(図3)。そこで、シプロフロキサシンによる大腸AQP3の発現低下が、腸内細菌の低下を介した作用であるかどうかを調べたところ、シプロフロキサシン投与群の腸内細菌量は、コントロール群と比べて著明に低下していることがわかった(図4)。また、腸内細菌が存在しないGFラットの大腸AQP3の発現量は、腸内細菌が存在するSPFラットに比べて有意に低く、このときのGFラットの糞中水分量は、SPFラットに比べて有意に高かった(図5)。以上のことから、腸内細菌は、大腸AQP3の発現量を制御し得る因子であり、大腸内の水分調節に大きく寄与していることが明らかとなった。

最後に、プロバイオティクスを用いて腸内に細菌を補充することにより、シプロフロキサシンによる下痢お

よび大腸 AQP3 の発現低下が抑制されるかどうかを調べた。その結果、シプロフロキサシンと *B. longum* を併用することにより、下痢の症状が改善するとともに、大腸 AQP3 の発現量も回復することがわかった (図6)。したがって、*B. longum* は大腸の AQP3 の発現をコントロールし得るプロバイオティクスであり、下痢を抑制する薬として有用であることがわかった。

本研究の結果から、腸内細菌の変化による下痢の発症に大腸 AQP3 の発現低下が関与していることがわかった。また、これまで不明であったプロバイオティクスの下痢抑制効果は、AQP3 の発現変動を介した大腸内の水分調節作用に起因することが初めて明らかとなった。今後、プロバイオティクスによる AQP3 発現制御メカニズムの詳細が明らかになることにより、プロバイオティクスの有用性が科学的に証明され、その適切な使用方法が確立できるものと考えられる。

## 要 約

本研究では、腸内細菌の変動に伴う下痢の発症と大腸における AQP3 との関係について解析した。ラットに抗菌薬シプロフロキサシンを投与したところ下痢が発症し、この際、腸内細菌量の著明な低下と大腸 AQP3 の発現低下が認められた。また、GF ラットと SPF ラットを

用いた解析結果から、シプロフロキサシンによる AQP3 の発現低下は、腸内細菌量の低下に起因している可能性が示唆された。一方、シプロフロキサシンによる下痢は、*B. longum* の投与により改善し、AQP3 の発現低下も抑制された。今後、AQP3 発現変動因子を明確にすることにより、腸内細菌が関与する下痢に対する新規治療法が提案できるものと考えられる。

## 謝 辞

本研究を遂行するにあたり、研究助成を賜りました公益財団法人三島海雲記念財団ならびに関係者の皆様に感謝申し上げます。

## 文 献

- 1) C. Silberstein, et al.: *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **32**, 1303–1313, 1999.
- 2) N. Ikarashi, et al.: *Biol. Pharm. Bull.*, **34**, 238–242, 2011.
- 3) N. Ikarashi, et al.: *Life Sci.*, **88**, 194–200, 2011.
- 4) N. Ikarashi, et al.: *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.*, **301**, G887–G895, 2011.
- 5) N. Ikarashi, et al.: *Eur. J. Pharm. Sci.*, **45**, 73–78, 2012.
- 6) N. Ikarashi, et al.: *Biol. Pharm. Bull.*, **35**, 957–962, 2012.
- 7) R. Kon, et al.: *J. Ethnopharmacol.*, **152**, 190–200, 2014.
- 8) R. Kon, et al.: *Toxicol. Sci.*, **145**, 337–347, 2015.
- 9) G. Hendriks, et al.: *J. Biol. Chem.*, **279**, 2975–2983, 2004.