

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461009

研究課題名(和文) ミニマル肝性脳症に対するL-カルニチンの効果に関する基礎的・臨床的研究

研究課題名(英文) Experimental and clinical studies on the effects of L-carnitine in minimal hepatic encephalopathy

研究代表者

鈴木 一幸 (Suzuki, kazuyuki)

岩手医科大学・医学部・名誉教授

研究者番号：00137499

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：臨床的研究成果：肝硬変(LC)患者の血清カルニチン(CA)動態、二次性CA欠乏症の頻度(11%)、腎機能(クレアチニン、推定糸球体濾過率)との相関、血清遊離脂肪酸濃度との関連を明らかにした。ミニマル肝性脳症(MHE)の合併率、MHEの臨床的背景・生化学検査値の特徴を明らかにし、予測バイオマーカーを探索した。LC患者14例にL-CA製剤を3か月間経口投与し約46%に血液アンモニア濃度の低下を認めた。

基礎的研究成果：正常ヒトアストロサイトをを用いてアンモニア負荷に対するL-CAの影響をメタボローム解析より検討し、BCAAを含むアミノ酸代謝異常の是正が細胞障害性を改善する可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Clinical study: The levels of serum carnitine in patients with liver cirrhosis (LC) were almost within normal range. Approximately 11% of LC patients had serum CA levels < 45 μmol/L. The serum CA levels did not correlate with severity of liver damage and the existence of MHE, but were closely associated with renal dysfunction. The serum free fatty acid levels strongly correlated with serum Ac-CA levels and the Ac-CA to T-CA ratio. The improvement of hyperammonemia was observed 46% of LC patients administrated L-CA.

Experimental study: Cell viability and intracellular total ROS and LDH leakage of human astrocytes were significantly increased after treatment with NH₄Cl, while cotreatment with L-CA significantly improved these cytotoxic changes. In metabolome analysis, although the expression levels of the all essential amino acids showed high in the NH₄Cl-treated cells, these changes were improved in cotreatment with L-CA. L-CA may protect astrocytes against the toxic effects of NH₄Cl.

研究分野：肝臓病学

キーワード：カルニチン ミニマル肝性脳症 肝硬変 アンモニア 血清遊離脂肪酸 アストロサイト

1. 研究開始当初の背景

(1)肝硬変(Liver cirrhosis; LC)に伴うミニマル肝性脳症(Subclinical hepatic encephalopathy; SHE)の診断法及び治療法については確立されていない。その診断には種々の精神神経機能検査法が用いられるが、我が国でもコンピューターを用いた精神神経機能検査法(NP-test)が開発され、LCにおける罹患率やその病態解析が進められてきている。我々は、NP-testの開発に関わり、その有効性を報告してきた。また病態解析では、SHEでは脳内ブドウ糖代謝率(PETによる解析)が非SHE例に比し有意に低下していることを報告している。

(2)SHEの治療は、基本的には顕性肝性脳症(Overt hepatic encephalopathy; OHE)と同様に考えられているが、その予測可能なバイオマーカーは確立されていない。しかし、高アンモニア血症を伴う例では、合成二糖類の経口投与が有効であり、蛋白・エネルギー低栄養(Protein-energy malnutrition; PEM)を合併する例では、分岐鎖アミノ酸(BCAA)製剤の経口投与などが行われている。また、アンモニア代謝異常の改善を目的として亜鉛製剤、最近ではカルニチン(CA)製剤の投与も行われるようになってきている。

(3)CAは、ミトコンドリアにおける長鎖脂肪酸の酸化に必須のビタミン用物質であり、75%が肉類などの食事より摂取され、肝ではリジンとメチオニンの二つのアミノ酸より合成される。CAの大部分は骨格筋(98%)、心筋、肝臓、脳などに蓄えられており、血中CA濃度(総CA=遊離CA+アシルCA)レベルは一定に保たれている。一方、LCは二次性カルニチン欠乏症を来す疾患の一つとして知られているが、実際に、LC患者における血清CA動態を検討し、二次性CA欠乏症の頻度、肝機能を含めた肝病態との関連を検討した報告はほとんど認められていない。

(4)CA製剤は、SHE及びOHE治療法の一つとして注目され、その有効性(脳症改善効果、高アンモニア血症の改善効果)が報告されているが、我が国での検討した成績は少ない。また、CAの肝性脳症改善作用として、脳(アストロサイト)におけるエネルギー代謝異常の改善が考えられているが、アストロサイトを用いてCAの作用機序を直接検討した成績はない。

2. 研究の目的

本研究では、臨床的検討として、LC患者における血清CA動態を検討して、二次性CA欠乏症の頻度、肝機能および腎機能との関連、SHEとの関連を明らかにし、LC患者におけるCA製剤の効果を検討すること、基礎的検討として、アンモニア負荷ヒト脳アストロサイト培養細胞に対するCAの影響をメタボローム解析より明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1)臨床的検討：岩手医科大学消化器内科通院

または入院中のLC患者71例を対象として、血清CA濃度を測定し、肝機能、腎機能及び栄養学的指標との関連性を検討した。また、対象のうち、36例に対してはNPテストを施行してSHE例と非SHE例とに分けて血液生化学検査値を比較検討し、SHEの予測因子の探索を行った。さらに、LC患者14例(男9例、女5例、平均年齢62.1歳)にCA製剤(1日900~1800mg;それぞれ6例、8例)を3カ月間経口投与し、昏睡度及び血液アンモニア濃度に対する影響を検討した。

(2)基礎的検討：実験に用いた正常ヒトアストロサイトの生化学的特性を確認し、アンモニア負荷時の細胞毒性及び細胞増殖抑制作用とL-CA添加時の変化を検討した。さらに、メタボローム解析を行い、細胞内における炭水化物、脂肪酸及びアミノ酸代謝に関わる物質の動態を検討した。すなわち、正常ヒトアストロサイト(1x10⁶/ml)に対して、アンモニア(10μM)添加群、アンモニア(10μM)とL-CA(2.5 μg/ml)との同時添加群及びコントロール群に分けて実験を行った(各群n=3)。処理4時間及び24時間後、試料をプロトコールに従って洗浄及び回収し、ヒューマン・メタボローム・テクノロジー株式会社(山形県鶴岡市)にて、細胞内代謝産物の測定と各群間の比較解析を行った。細胞障害性は培養液中LDH濃度より判定し、酸化ストレスはROS産生の有無より判定した。

4. 研究成果

(1)臨床的研究成果：

LC患者の血清CA動態、すなわち、総CA(T-CA)、遊離CA(F-CA)、アシルCA(Ac-CA)は大部分が基準値域内にあり、血清CA濃度とChild-Pugh分類の重症度との関連性は明らかでなかった(図1)。

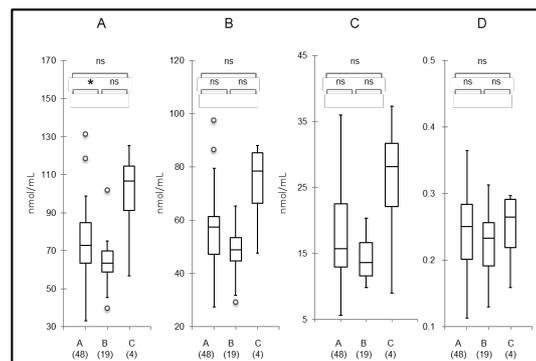


図1. Child-Pugh分類との関連

A, T-CA; B, F-CA; C, Ac-CA, D, Ac-CA/T-CA

血清CA濃度から、二次性CA欠乏症(T-CA<45nmol/L)と判定される例は約11%のみであった。また、腎機能と関連では、T-CA、Ac-CA濃度は血清クレアチニン(CRN)濃度とは有意の正の相関、推定糸球体濾過率(eGFR)とは有意の負の相関を示し、血清CA動態が腎機能の影響を受けることが明らかとなった(図2)。一方、血清CA濃度と血液アンモニア濃度との相関性は認められなかつ

た。さらに、栄養学的指標であるアルブミン、亜鉛、分岐鎖アミノ酸/チロシン比(BCAA/Tyr ratio)、遊離脂肪酸(FFA)、血糖などの相関を検討したところ、Ac-CA、Ac-CA/T-CA 比と血清 FFA 濃度に強い正の相関が認められ、とくに Ac-CA/T-CA 比は細胞内ミトコンドリア機能障害を反映する指標として有用である可能性がある(掲載文献参照)。

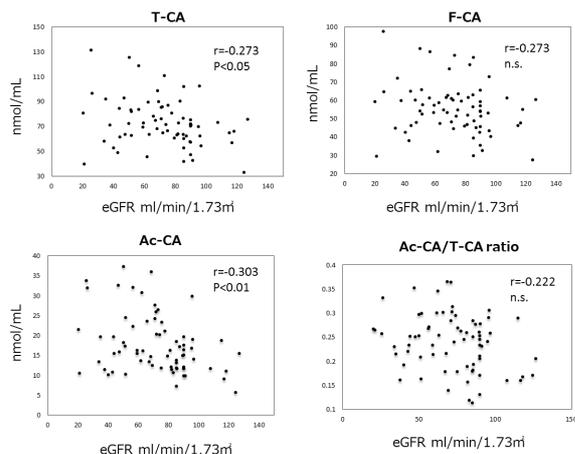


図2. 血清 CA 動態と eGFR との関連

SHE 例と非 SHE 例との血液生化学検査値を比較すると、血液アンモニア濃度、血清クレアチニン、EGFR に有意差を認めたが、血清 CA 濃度との関連性明らかでなかった(表1)。

検査項目	MHE陽性例 (10)	MHE陰性例 (26)	P value
T-Bil (mg/dL)	1.69 ± 1.39	1.51 ± 1.39	n.s.
Alb (g/dL)	3.54 ± 0.62	3.62 ± 0.56	n.s.
PT (PT-INR)	1.21 ± 0.20	1.22 ± 0.24	n.s.
BUN (mg/dL)	22.4 ± 11.2	16.9 ± 11.4	n.s.
CRN (mg/dL)	1.13 ± 0.59	0.85 ± 0.42	0.006
eGFR (ml/day/1.73m ²)	59.8 ± 20.1	73.2 ± 20.0	0.032
FPG (mg/dL)	119.7 ± 21.5	108.3 ± 26.3	n.s.
FFA (mEq/L)	876.8 ± 426.8	759.3 ± 354.9	n.s.
B-NH ₃ (μg/dL)	111.8 ± 60.7	64.8 ± 42.4	0.030
Zn (μg/dL)	73.9 ± 32.8	74.5 ± 21.6	n.s.
BTR	4.36 ± 2.69	4.60 ± 2.39	n.s.
Total carnitine (T-CA)	80.5 ± 20.8	76.2 ± 22.0	n.s.
Free-carnitine (F-CA)	59.1 ± 15.2	58.5 ± 16.3	n.s.
Acyl-carnitine (Ac-CA)	21.4 ± 8.1	17.7 ± 8.4	n.s.
Ac-CA/T-CA ratio	0.264 ± 0.058	0.229 ± 0.066	n.s.

表1. SHE 例と非 SHE 例との血液生化学検査値の差異

しかし、多変量解析を行ったところ、血液アンモニア濃度とともに血清 Ac-CA/T-CA 比も SHE 予測バイオマーカーとしての可能性を示唆する成績が得られた(論文投稿中)。

LC 患者 14 例に L-CA 製剤 3 か月間経口投与して、血液アンモニア濃度に対する影響を検討した結果、昏睡度は 4 例で改善し、不変 9 例、悪化 1 例であった。また、血液アンモニア濃度(平均値 ± 標準偏差)は、投与前 101.8

± 57.3 μg/dL、投与 3 か月目 87.0 ± 55.2 μg/dL と低下が認められたが、前値に対して 20% 以上低下した例を改善とみなすと、6 例(46.2%)で改善がみられた、不変(0-20%)は 23%、悪化(>20%)は 30.8%であった。

(2)基礎的研究成果:

今回の検討に用いた正常ヒトアストロサイトには GLUT1 の発現が確認され、添加した L-CA の取り込みは可能と判断された。アンモニア負荷群(4 時間)ではコントロール群に比し、細胞障害が惹起され、ROS の産生が亢進していたが、これらの変化は L-CA 同時添加群において軽減することが確認された。

メタボローム解析を行ったところ、アンモニア負荷群では細胞内蛋白質、脂肪、炭水化物の代謝過程に関わる多くの物質の変動が確認された(図3)。特に特徴的な変化として、BCAA を含む多くのアミノ酸の有意な上昇が認められた(図3において、で囲んだ箇所にすべてのアミノ酸が含まれた)が、これらの変化は L-CA 同時添加によりコントロール群レベルまで回復した(表2)。

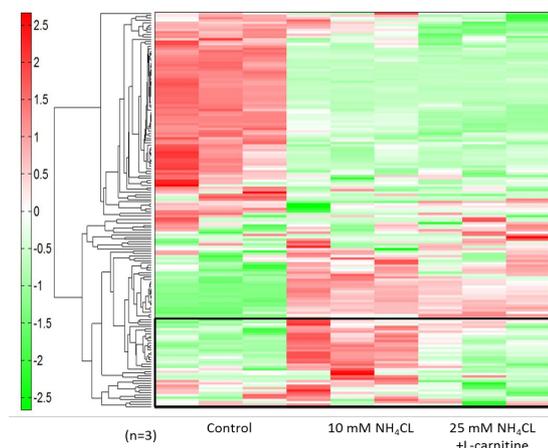


図3. ヒトアストロサイトにおける代謝産物の変化(Heat map)

Abbrev.	NH4Cl vs Control ratio	NH4Cl+L-CA vs NH4Cl ratio	NH4Cl+L-CA vs Control ratio
Lys	1.1*	0.9*	1
Arg	1.2**	0.9*	1
His	1.3***	0.9**	1.1*
Asp	1.1*	0.9**	1
Glu	1	0.9**	0.9*
Ser	1.5***	0.9*	1.4**
Thr	1.5**	0.9	1.4**
Asn	1.6**	0.9	1.5**
Gln	2.4***	0.9*	2.2***
Ala	1.3***	0.9*	1.1
Gly	1.2*	0.9	1.1*
Val	1.2*	0.9*	1
Ile	1.2**	0.8**	1
Leu	1.2**	0.9*	1
Phe	1.2**	0.8*	1
Tyr	1.2*	0.8*	1
Trp	1.3**	0.8**	1.1
Met	1.2	0.9	1.1
Cys	1.2**	0.9	1.1
Pro	1.4*	0.9	1.3**

表 2 . 各種アミノ酸の変化

*P<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

また、アンモニア負荷により、BCAA の代謝産物であり神経障害作用を持つ 4/3-Methyl-2-oxovaleric acid は上昇し、神経保護作用を持つ α -Acetylcarnitine は減少したが、L-CA 同時添加によりこれらの変化はコントロール群レベルまで回復した。一方、糖代謝、尿素サイクルに関連する代謝物質動態については、明らかな傾向を確認することが出来ず、今後、アンモニア代謝機構の異なる肝細胞あるいは骨格筋細胞を用いた更なる検討が必要と思われた。

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 17 件)

Yohei Kooka, Kei Sawara, Ryujin Endo, Akinobu Kato, Kazuyuki Suzuki, Yasuhiro Takikawa. Brain metabolism in minimal hepatic encephalopathy assessed by 3.0-Tesla magnetic resonance spectroscopy. *Hepatol Res*, 査読有、2016、269-276 . DOI: 10.1111/hepr.12519

永井田優衣、三輪孝士、鈴木一幸、佐原圭、遠藤龍人、滝川康裕、加藤章信 . 肝硬変患者における体格指数と蛋白・エネルギー低栄養との関連 . 盛岡大学紀要、査読有、2016、3 巻、75 - 79 .

佐藤寛毅、滝川康裕、鈴木一幸 . 内科症例から学ぶ 内科疾患の診断・治療のピットホール第 2 章 消化器 肝硬変 . 内科、査読なし、117 巻、2016、*** .

鈴木一幸、永井田優衣、佐原圭、遠藤啓、遠藤龍人、黒田英克、滝川康裕、加藤章信 . 高齢者肝硬変患者の蛋白・エネルギー代謝異常の特徴 . 日本高齢消化器病学会誌、査読有、18 巻、2016、32-35 .

鈴木一幸、佐原圭、小岡洋平、黒田英克、遠藤龍人、滝川康裕、加藤章信 . 肝硬変におけるミニマル完成脳症の合併率とその予測因子に関する検討 : 高齢者と非高齢者での検討 . 日本高齢消化器病学会誌、査読有、18 巻、2016、32-35 .

Yuichi Yoshida and Kazuyuki Suzuki. Effects of subcutaneous administration of pegylated interferon alpha-2b on the behavior and the cytokine levels of serum and brain in rats. *JIMA*, 査読有、66 巻、111-112 .

Yasuhiro Takikawa, Mari Harada, Ting Wang and Kazuyuki Suzuki. Usefulness and accuracy of the international normalized ratio and activity percent of prothrombin time in patients with

liver disease. *Hepatol Res*, 査読あり、2014、44 巻、92-101 . DOI:10.1111/hepr.12093.

Toru Nakamura, Michitaka Sata, Kazuyuki Suzuki, Hisataka Moriwaki, Hiroshi Fukui, Shigetoshi Fujiyama and Michio Imawari. Open-labeled randomized controlled trial to compare diuretic therapy with recombinant human serum albumin and diuretic therapy for therapeutic treatment of ascites in patients with advanced liver cirrhosis: An exploratory trial. *Hepatol Res*, 査読有、2014、44 巻、502-514 . DOI: 10.1111/hepr.12142

Ting Wang, Yasuhiro Takikawa, Asako Watanabe, Keisuke Kakisaka, Kanta Oikawa, Yasuhiro Miyamoto and Kazuyuki Suzuki. Proliferation of mouse liver stem/progenitor cells induced by plasma from patients with acute liver failure is modulated by P2y2 receptor-mediated JNK activation. *J Gastroenterol*, 査読有、2014、49 巻、1557-1566. DOI: 10.1007/s00535-013-0927-6

Kazuhiro Katayama, Masanori Saito, Kawaguchi Takumi, Endo Ryujin, Kei Sawara, Shuhei Nishiguchi, Akinobu Kato, Kazuyuki Suzuki (15 番目), 他 6 名 . Effect of zinc on liver cirrhosis with hyperammonemia: a preliminary randomized, placebo-controlled double-blind trial. *Nutrition*, 査読有、2014、30 巻、1409-1414. DOI: 10.1016/j.nut.2014.04.018

Takumi Katayama, Koichi Shiraishi, Toshufumi Ito, Kazutomo Suzuki, Kazuyuki Suzuki (27 番目), 他 26 名 . Branched-chain amino acids prevent hepatocarcinogenesis and prolong survival of patients with cirrhosis. *Hepatol Res*, 査読有、2014、12 巻、1012-1018. DOI: 10.1016/j.cgh.2013.08.050

鈴木一幸、佐原圭、小岡洋平、吉田雄一、小野寺美緒、遠藤龍人、滝川康裕、加藤章信 . 高アンモニア血症の治療の進歩 . 最新医学・別冊、査読なし、2014、114-124 . 遠藤龍人、佐原圭、遠藤 啓、滝川康裕、鈴木一幸 . 肝硬変治療の進歩(4)分岐鎖アミノ酸製剤による治療効果 . 臨牀消化器内科、査読なし、29 巻、2014、447-452 . 鈴木一幸、佐原圭、遠藤龍人、滝川康裕 . 内科疾患にみられる神経障害(疾患)肝疾患 肝性脳症 . 日本臨牀・別冊、2014、350-353 .

遠藤龍人、佐原圭、遠藤 啓、滝川康裕、加藤章信、鈴木一幸 . 臨牀消化器内科、査読なし、29 巻、2014、1119-1119 .

Akinobu Kato, Hiroto Tanaka, Takumi Kawaguchi, Hidenori Kanazawa, Motoh Iwasa, Isao Sakaida, Hisataka Moriwaki, Yoshikazu Murawaki, Kazuyuki Suzuki and Kiwamu Okita. Nutritional management contributes to improvement in minimal hepatic encephalopathy and quality of life in patients with liver cirrhosis: A preliminary, prospective, open-label study. *Hepatol Res* 査読あり、2013、43 巻、452-458. DOI: 10.1111/j.1872-034X.2012.01092.x

鈴木一幸、小野寺美緒、柿坂啓介、遠藤啓、佐原圭、及川寛太、王 廷、他2名。血清遊離脂肪酸濃度は肝硬変における血清カルニチン動態を反映する。肝臓、査読有、54 巻、2013、796-797。

〔学会発表〕(計 4 件)

小野寺美緒、鈴木一幸、滝川康裕、黒田英克、小岡洋平、佐原圭、王 廷、及川隆喜、遠藤龍人、加藤章信。肝硬変におけるミニマル肝性脳症の罹患率とその予診断的予測因子の検索。第 51 回日本肝臓学会総会、2015 年 5 月 21-22 日、熊本市。Kazuyuki Suzuki, Ting Wang, Keisuke Kakisaka, Kei Sawara, Miho Onodera, Hidekatsu Kuroda, Ryujin Endo, Akinobu Kato, and Yasuhiro Takikawa. L-carnitine prevents ammonia-induced cytotoxicity on human astrocytes: Results of metabolome analysis. *ASSLD*, 2015 年 10 月 16 日、シカゴ(米国)

鈴木一幸、永井田優衣、佐原圭、遠藤啓、遠藤龍人、黒田英克、滝川康裕、加藤章信。高齢者肝硬変患者の蛋白・エネルギー代謝異常の特徴。第 18 回日本高齢消化器病学会、2015 年、7 月 10 日、出雲市。鈴木一幸、佐原圭、小岡洋平、黒田英克、遠藤龍人、滝川康裕、加藤章信。肝硬変におけるミニマル完成脳症の合併率とその予測因子に関する検討：高齢者と非高齢者での検討。第 18 回日本高齢消化器病学会、2015 年、7 月 10 日、出雲市。

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)
なし

取得状況(計 0 件)
なし

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

鈴木 一幸 (Suzuki Kazuyuki)

岩手医科大学 名誉教授

研究者番号：00137499

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

佐原 圭 (Sawara Kei)

岩手医科大学内科学講座消化器内科肝臓分野・助教

研究者番号：40405816

王 挺(Ting Wang)

岩手医科大学内科学講座消化器内科肝臓分野・助教

研究者番号：70416171

(4)研究協力者

柿坂啓介(Kakisaka Keisuke)

岩手医科大学内科学講座消化器内科肝臓分野・助教

黒田英克(Kuroda Hidekatsu)

岩手医科大学内科学講座消化器内科肝臓分野・助教

加藤章信(Kato Akinobu)

盛岡市立病院院長・岩手医科大学客員教授