

令和 2 年 5 月 8 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11092

研究課題名(和文)薬物性肝障害におけるホエイペプチドの肝障害保護効果の基礎的研究と臨床応用

研究課題名(英文)Basic research and clinical application of the protective effect of whey peptide on drug-induced liver injury.

研究代表者

平手 博之(Hirate, Hiroyuki)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・研究員

研究者番号：20363939

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文):高齢化に伴い、多疾患により多くの薬物を処方される患者が増加傾向にあるため、集中治療室での薬物性肝障害の治療は、今後重要性が増すと考えられる。本研究では、肝保護作用のある「ホエイペプチド」に着目し、薬物性肝障害の患者へのホエイペプチドの投与による肝保護効果の検討を目的とした。C57BL/6マウスにホエイペプチド含有流動食を1週間投与した後、四塩化炭素を腹腔内投与した。ホエイペプチド群で投与後4時間の血清ASTとALTが有意に低く、肝炎抑制効果が示唆されたが、組織等での検討は困難だった。アセトアミノフェンでも検討を行い、血清AST、ALT、LDHの上昇を確認したが、肝炎像の確認には至らなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回、明らかにすることはできなかったが、ホエイペプチドの肝保護効果が明らかになれば、今後の栄養学の発展に寄与するとともに、肝障害患者に利用可能な栄養剤の開発につながる可能性がある。また、ホエイペプチド投与により、薬物性肝障害の改善が期待される。薬物性肝障害以外の肝障害やその他の合併症も予防できる可能性がある。さらに、比較的安価な栄養剤により、合併症の減少や入院期間の短縮ができ、患者の身体的負担の軽減や医療費の削減に貢献できる可能性がある。

研究成果の概要(英文):With the aging of the population, the number of patients prescribing more drugs due to multiple diseases tends to increase, so that the treatment of drug-induced liver injury in the intensive care unit is expected to become more and more important in the future. In this study, we focused on "whey peptide", which has a hepatoprotective effect, and aimed to investigate the hepatoprotective effect of administration of whey peptide to patients with drug-induced liver injury.

C57BL/6 mice were administered whey peptide-containing liquid diet for 1 week, and then carbon tetrachloride was intraperitoneally administered. Serum AST and ALT in the whey peptide group were significantly decreased 4 hours after administration, suggesting a hepatitis-suppressing effect. In addition, we examined acetaminophen hepatitis model mice and confirmed that serum AST, ALT, and LDH were elevated, but the hepatitis image was not confirmed.

研究分野：集中治療医学

キーワード：ホエイペプチド 薬物性肝障害

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

高齢化に伴い、多疾患に罹患し、多くの薬物を処方されている患者が増加傾向にある。また、多剤の使用により薬物相互反応も生じやすく、肝障害を起こしやすい環境にある。薬物性肝障害の発症率は 0.01~0.001%でまれと言われているが、診断のためのガイドラインが国際的にも制定されておらず、正確な患者数は不明である。集中治療室 (ICU) では様々な薬物を投与することが多いため、薬物性肝障害の発症率は病棟より高いと考えられる。また、ICU では薬物性肝障害を起こしやすい抗菌薬、抗てんかん薬、アミオダロンなどを頻用している (Lescot T, et al: Anesthesiology, 2012)。患者の高齢化に伴い、ICU における薬物性肝障害の治療は、今後ますます重要になると考えられる。

薬物性肝障害の基本治療としては、被疑薬の同定を速やかに行い、早期にその薬物の投与を中止することが第一である。中等度以上の肝細胞障害や黄疸を呈する場合は、安静臥床、食事療法、そしてウルソデオキシコール酸やグリチルリチン酸などの薬物を投与するが、肝庇護薬を含めた薬物療方は、それ自体が肝障害を引き起こすこともありうるため、慎重な投与が必要である。

薬物性肝障害を発症すると入院期間が延長し、患者の身体的負担になるだけでなく、医療経済にも影響する。肝移植が必要になる症例もあり予後不良となる可能性もあるにも関わらず、薬物性肝障害についての研究は進んでおらず、積極的な治療法も確立していない。

そこで本研究では、肝保護作用のある「ホエイペプチド (乳清ペプチド)」に着目し、薬物性肝障害の患者へのホエイペプチドの投与による肝保護効果の検討を目的とした。申請者の研究室では、以前、ラットのホエイペプチド投与による肝保護作用を報告しており (Takayanagi T et al.: JPEN, 2011)、これを応用した。

まず、マウスの薬物性肝障害の安定したモデルを確立し、ホエイペプチド添加栄養剤を投与して肝保護作用を確認する。また、ホエイペプチドを 100kD で高分子と低分子に分画して、マウスの肝細胞を分画成分添加培地で培養した後に薬物性肝障害を起こし、どちらの分画の成分に肝保護作用があるか検討を進める予定とした。マウスに分画成分を投与して肝保護効果を確認できたら、最終的には臨床研究でホエイペプチドまたは有効成分を ICU 入室中の薬物性肝障害患者に投与し、その効果を確認する計画とした。

ホエイペプチドにより薬物性肝障害が改善し、早期退院の可能性が上がると、総合的には入院期間が短縮し、医療費抑制にも役立つと考えた。

### 2. 研究の目的

本研究の申告期間内の目標は、下記の 4 点とした。

#### (1) マウスの薬物性肝障害モデルの確立とホエイペプチドの肝保護作用の確認

薬物性の肝障害モデルであるマウス四塩化炭素 (CCL4) 誘発急性肝炎モデルやアセトアミノフェン (APAP) 肝障害モデルを確立し、ホエイペプチドの肝保護作用を確認する。

#### (2) 培養系によるホエイペプチドの有効成分の同定

ホエイペプチドを 100kD の透析膜で高分子と低分子に分画する。マウスの肝細胞株をホエイペプチド分画添加培地で培養し、CCL4 や APAP を投与して細胞障害抑制を確認する。細胞障害抑制を確認できた分画をさらに再分画し、肝細胞を分画添加培地で培養し、薬物を投与して細胞障害抑制を再確認する。これを繰り返し、有効成分を同定する。

#### (3) マウスの薬物性肝障害モデルによるホエイペプチドの有効成分の同定

(1) で作成した薬物性肝障害モデルを使用し、(2) で同定したホエイペプチド分画の肝保護作用を確認する。さらに、有効成分のみ増量し、肝保護作用が増強するか確認する。

#### (4) ヒトにおけるホエイペプチドの肝保護作用の確認

(3) の結果を踏まえ、薬物性肝障害の ICU 患者にホエイペプチド (またはホエイペプチド分画) を投与して、肝保護効果を臨床研究で確認する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 四塩化炭素 (CCL4) 肝炎モデルの確立とホエイペプチドの肝保護作用の確認

CCL4 肝炎モデルの作製とホエイペプチドの肝保護作用の確認

C57BL/6 マウス (6 週齢、オス) にホエイペプチド含有流動食 (対照群としてカゼイン含有流動食) を 1 週間投与後、CCL4 を 2mL/kg 腹腔内投与 (IP) した (対照群はコーン油を同量 IP)。24 時間後に血清を採取し、AST、ALT、LDH を評価した。

また、CCL4 の投与量を検討し直し、3mL/kg に増量したため、上記と同様にホエイペプチド含有流動食を 1 週間投与した後に CCL4 を 3mL/kg IP し、投与後 2、4、8、12 時間で肝酵素の比較

を行った。

#### 肝障害の程度の組織学的確認

肝炎像が CCL4 投与後、何時間から組織学的に評価可能か確認するため、固形食を与えたマウスに CCL4 を 3mL/kg IP し、2、4、24 時間後の肝組織を HE 染色と PAS 染色で評価した。

#### 肝障害の生化学的確認

固形食を与えたマウスに CCL4 を 3mL/kg IP し、ELISA で血清 TNF- $\alpha$ 、IL-1 を測定した。

### (2)アセトアミノフェン (APAP) 肝炎モデルの確立

APAP 肝炎モデルは、文献検索の結果、C57BL/6 マウス (オス、8 週齢) を overnight の絶食の後、APAP300mg/kg を IP して作成した。予備試験として n=3 で APAP 投与後 0、6、24 時間の AST、ALT、LDH を測定した。

## 4. 研究成果

### CCL4 肝炎モデルの作製とホエイペプチドの肝保護作用の確認

市販の経口栄養流動食にホエイペプチドを一定量混ぜて溶解したもの (ホエイペプチド含有流動食) を、対照群としてはホエイペプチドの代わりにカゼインを溶解したもの (カゼイン含有流動食) を作成した。ホエイペプチド含有流動食とカゼイン含有流動食のタンパク含有量が等しくなるように調製した。これをパックに入れ、マウスが自由摂取できるようにノズルを装着し、毎日 2 回、分離や腐敗する前に交換した。マウスがこれらを十分に摂取し、両群間に体重差が出ず、肝酵素にも影響がないことを確認した。以上の準備ができたところで、C57BL/6 マウス (6 週齢、オス) に流動食を 1 週間、自由摂取させた。

流動食を 1 週間摂取したマウスに CCL4 (対照群はコーン油) を 2mL/kg IP し、24 時間後の血清を採取し、AST、ALT、LDH の変化を評価した。対照群、ホエイペプチド群ともに AST、ALT、LDH は高値となり肝障害を起こしていたが、いずれの項目も両群間の有意差は認められず、ホエイペプチド含有流動食の肝保護作用は認められなかった。

そこで、肝保護作用が認められないのは肝炎の重症度が足りないためと考え、投与する CCL4 の量を 3mL/kg に増やした。ホエイペプチド含有流動食またはカゼイン含有流動食を 1 週間自由摂取させた後に CCL4 を 3mL/kg IP し、2、4、8、12 時間後の AST、ALT、LDH の値を比較した。その結果、CCL4 投与 4 時間後の血清 AST と ALT で、ホエイペプチド群がカゼイン群に比べ有意に低くなり ( $p < 0.05$ )、ホエイペプチドの肝炎抑制効果の可能性が示唆された。その後、再現性をみるため、同様に実験を行ったが、AST と ALT の有意な低下を再現できなかった。この原因として、n=5 で実験を行っており、個体差によるばらつきが大きいことが挙げられた。しかし、流動食は手作り、カゼインの溶解に時間がかかることから、一度に大量の調整はできず、また長時間の保管が不可能なため、飼育するマウスの数を増やすのは難しかった。n=10~15 程度で実施すれば、ばらつきの影響を減らすことができた可能性がある。

### 肝障害の程度の組織学的確認

肝炎像が CCL4 投与後、何時間から組織学的に評価可能か確認するため、固形食を与えたマウスに CCL4 を 3mL/kg IP し、2、4、24 時間後の肝組織を HE 染色と PAS 染色で評価した。

その結果、4 時間後に小葉中心性の変性と好酸球浸潤等の肝炎所見を確認できた。また、ホエイペプチド群とカゼイン群でも同条件で組織学的評価を行ったが、肝の変性は認められるものの、両群間に明らかな差は認められなかった。

### 肝障害の生化学的確認

と同じく固形食を与えたマウスに CCL4 を 3mL/kg IP し、0、2、4 時間後の血清を採取して、ELISA で TNF- $\alpha$ 、IL-1 を測定した。しかし、いずれも検出限界値以下だった。ELISA の検量線、ポジティブコントロールともに正常に測定されていることから、肝炎モデルの問題と考え、次の検討を行った。

### 文献的検索によるモデルの再検討

本研究では、術前に患者にホエイペプチドを投与し、術後の薬物性肝障害を抑制することを目的としているため、急性肝障害の抑制がターゲットである。

実験開始当初、CCL4 の投与量を 2mL/kg とした。この根拠は参考にしたラットのホエイペプチド投与による肝保護作用の報告 (Takayanagi T et al.: JPEN, 2011) で、CCL4 の投与量が 2mL/kg だったことによる。実験開始時にも CCL4 投与量の検討をしていたが、マウスでの CCL4 投与では、慢性肝炎を作成しているものが多く、少ないながらも急性肝炎を作成できている文献から 0.3~2mL/kg の投与量を確認していた (Song JY 2007、謝共 1996、「厚生労働科学研究補助金 H22 年報告書：急性肝障害マウスモデルにおける骨髄細胞投与の検討」など参照)。

当時、マウスの系統を問わず、肝炎モデルの論文を検索していたが、近年の論文から今回の実

験で使用している C56BL/6 マウスに絞って再検索したところ、慢性肝障害の報告が多かった。また、急性肝障害と記載があるにもかかわらず、1 週間に渡って採血評価をしているものもあり、マウスにおける急性肝障害と慢性肝障害の区別は曖昧だった。また、CCL4 IP による致死量は 2.6 mL/kg や 6mL/kg という記載もあるが、急性と慢性に限らず、CCL4 を 3mL/kg 投与している報告はなかった。

以上から、本研究の CCL4 投与量が過剰だった可能性がある。さらに、CCL4 は慢性肝炎モデルで用いられることが多いため、本研究には適していなかったかもしれない。一方、研究計画で CCL4 モデルがうまくいかなかった場合に候補として挙げていた APAP 肝炎については急性肝障害の報告数も多く、すでに臨床で利用されている薬物のため臨床応用がしやすく、ホエイペプチドが作用するグルタチオンが肝障害に関与しているなど、CCL4 より適している可能性が高かった。マウスの系統も文献的に確認したが、APAP 肝炎では C57BL/6 マウスの報告が多いため、変更なしとした。

以上から、CCL4 肝炎モデルの検討を中止し、APAP 肝炎モデルへ変更した。

## (2)アセトアミノフェン (APAP) 肝炎モデルの確立

予備実験として C57BL/6 マウスを overnight の絶食の後、APAP300mg/kg を IP して作成し、APAP 投与後 0、6、24 時間 (n=3) の AST、ALT、LDH を測定した。その結果、投与後 6 時間でいずれの項目も有意な上昇を認めた ( $p < 0.05$ )。また、24 時間後でもマウスは全匹生存していた。

次に、この条件で肝障害の重症度の評価のため、肝の HE 染色と PAS 染色を実施しようとした。しかし、ホエイペプチドの肝障害抑制効果を組織で検討するには、APAP300mg/kg の量が多い可能性があり、投与量、サンプル採取時間の再検討を行った。また、CCL4 肝炎の時と同様に、n=5 で APAP 肝炎も実施しようとしていた。これはホエイペプチド含有流動食を投与できるマウスの数が流動食作成量に左右されるため、n=5 以上の飼育が難しいことが原因だったが、n=10 程度の数に増やさないと、以前と同様にばらつきが大きく結果に影響すると予想されたため、本研究の検討はここまでとなった。

CCL4 肝炎モデルマウスでの検討は困難だった。また、APAP 肝炎モデルマウスでの検討を行い、肝酵素の上昇を確認したが、肝炎像の確認には至らなかった。検査結果にばらつきの大きい実験のため、マウスの数の増加を検討したが、現状は難しかった。ホエイペプチド含有流動食やカゼイン含有流動食を容易に、また大量に作成できる環境を整えば、n=10 以上での検討も可能となる。今後、市販の流動食販売メーカーとも相談し、この問題を解決してホエイペプチドの肝炎抑制効果について検討を継続する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	祖父江 和哉  (Sobue Kazuya)  (90264738)	名古屋市立大学・薬学総合研究院(医学)・教授    (23903)	