

C. 研究結果

1. 薬物性肝障害の発症予測に繋げるための大規模データベースの構築

○DILI 発症頻度の性差

各種臨床検査値から DILI の発症リスクを評価するモデルを構築するために、2010 年 11 月～2011 年 12 月までの 13 か月間の入院患者の情報をモデル構築に用いることとした。まずカルテ上の記載をもとに DILI 発症の有無を調査した結果、DILI を発症しなかった (non-DILI) 患者 6,244 名に対し、抗がん剤などによる中毒性 DILI と考えられる患者が 55 名、特異体質性 DILI を発症したと考えられる患者が 218 名であった。また、肝機能検査値の異常が認められたが、原因がカルテ上の記載からは特定できなかった患者が 398 名であった。以降の解析では、

特異体質性 DILI を発症した患者と non-DILI 患者を比較することで、患者が特異体質性 DILI を発症するリスクを評価することとした。

集積された患者情報を基に、患者の年齢および性別が DILI 発症に関連するか否かを解析した結果、年齢に関しては DILI 発症との間に有意な相関性は認められなかった ($p=0.19$)。一方性別に関しては、男性の方が女性よりも DILI を発症しやすい傾向が認められ、そのオッズ比は 1.76 であった ($p<0.001$)。DILI の発症率における性差は過去にも複数報告されているが、統一的な見解は得られていない。今後、他施設・地域での検証を行う必要があると思われる。また、同定された起因薬は多岐に渡るが、過去に多く報告されているように、感染症等に使用される抗菌薬が多数認められた。

	DILI	non-DILI	(p -value)
<age>			
Age (year)	61±18	60±21	0.19
<gender>			
Total (n)	218	6244	<0.001
Male	142	3218	
Female	76	3026	

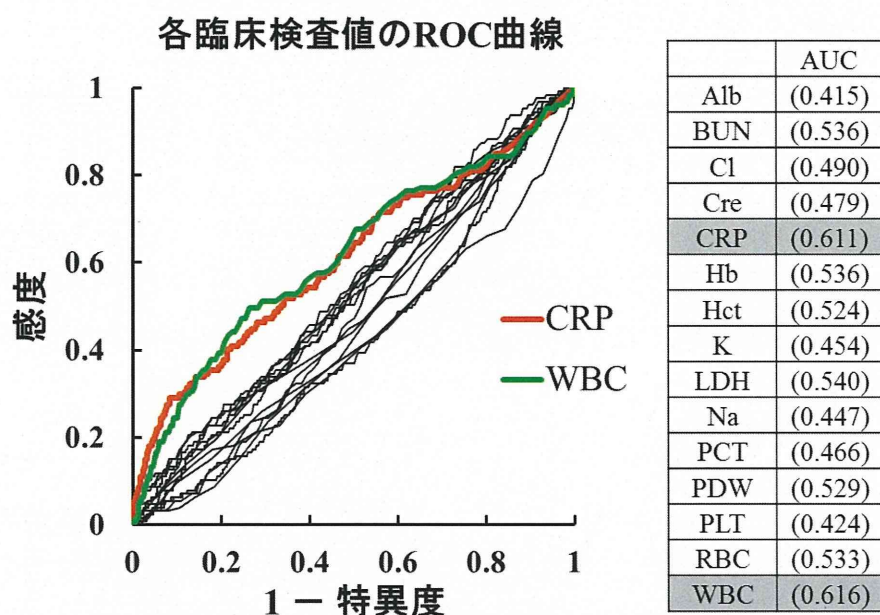
モデル構築セットとして採用した患者の特徴

モデル構築セットとして採用した 218 名の特異体質性 DILI 患者および 6,244 名の non-DILI 患者に関して、年齢および性別の傾向をまとめた。

○ROC 解析

DILI 発症に関連しうる患者側の要因を反映する臨床検査値が得られれば、患者が薬物の服用を開始する時点で、その患者の DILI 発症リスクを評価することができ、臨床上有用な指標となりうる。そこで臨床での実用性を考慮し、実臨床において高頻度に測定されていた 15 種類の臨床検査値を選択し、調査・解析を行った。DILI 患者に関し、DILI 発症の起因となった薬剤

の服用を開始した時点における各種臨床検査値を収集し、non-DILI 患者の臨床検査値（全入院期間内の全測定点）と比較することで、両患者群の分離が可能であるか否かを、ROC 曲線を用いて解析した。その結果、CRP および WBC の 2 種類の臨床検査値に関しては AUC 値が 0.6 を超え、DILI 発症と正の相関性が認められることが明らかとなった。



各臨床検査値における DILI 発症リスク予測精度の評価

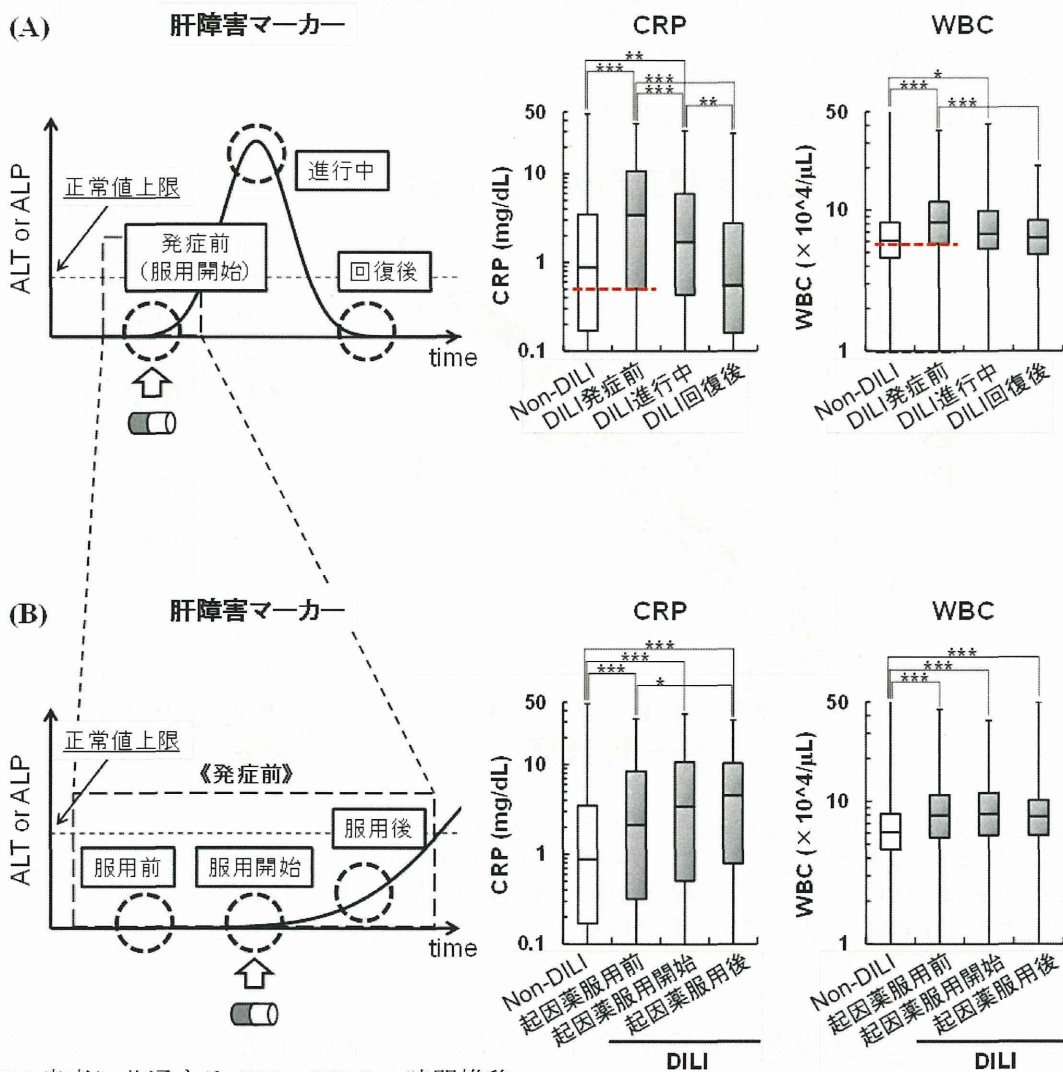
予検討において頻回に測定することが確認された 15 種類の臨床検査値に関して、DILI 発症患者を non-DILI 患者からどの程度分離するか ROC 曲線により評価した。右表には、そのときの各検査値の AUC 値を示している。このとき、AUC 値が 0.6 を超えた検査値については灰色地で表示した。

そこで次に、これら 2 種類の臨床検査値に関して、DILI 発症患者における検査値変動の時間推移を詳細に検証することとした。起因薬の服用開始時点、および肝障害マーカー値がピークとなった時点、さらに、休薬に伴って

DILI から回復したと考えられる時点の 3 点における測定値を抽出した。前述の ROC 曲線を用いた解析からも示唆されているように、DILI 患者においては、CRP、WBC とともに、起因薬の服用開始時点で既に non-DILI 患者と比較し

て高値を示していることが確認された。また、肝障害の進展に伴って大きく上昇することはなく、むしろ若干低下していく傾向が観察された。次いで、このような検査値の高値傾向が起因薬の服用による影響であるか否かを検証するため、起因薬の服用開始前後における検査値の経時的な変化を解

析した。するといずれの臨床検査値に関しても、起因薬の服用を開始する以前の段階から、non-DILI 患者と比較して有意に高値を示していることが明らかとなり、これら臨床検査値の高値は、起因薬の服用に伴うものではなく、DILI 発症患者が有する原疾患などの影響を反映するものと考えられた。



DILI 患者に共通する CRP、WBC の時間推移

(A) 起因薬の服用開始時点、肝障害マーカー値がピークをとる時点、DILI からの回復以降の 3 点における CRP、WBC 値を抽出し、DILI 発症前から回復後までの経時的な変化を追った。また、赤色の点線は、起因薬の服用開始時点での CRP、WBC 値における、偽陰性率が 25% となるような閾値を表している。

(B) 起因薬の服用前後における CRP、WBC 値の経時的な変化を追った。

(***): $p < 0.001$, (**): $p < 0.01$, (*): $p < 0.05$

○DILI 発症リスク予測モデル

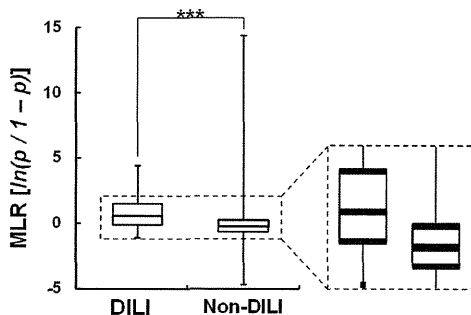
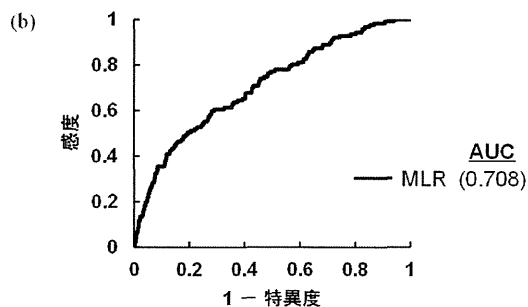
一般的に、バイオマーカーを用いたリスク評価手法に関して、その予測性・有効性は ROC 曲線解析における AUC 値が 0.7 未満の場合には十分とは言えないと考えられている。起因薬の服用開始時点での CRP、WBC 値をそれぞれ単独で評価指標として用いた場合の予測精度を検証するため、偽陰性率が 25%になるように各検査値の閾値を設定して解析を行った。すると、CRP、WBC いずれの臨床検査値に関しても、50%以上の non-DILI 患者を DILI 患者と判別することができなかった。患者の母数も併せて考慮すると、CRP あるいは WBC 値を単独で指標として用いるだけでは DILI 患者を分離するのに十

分とは言えず、他の因子を組み合わせる必要性が考えられた。

そこで CRP、WBC に加えてその他の臨床検査値を組み合わせた DILI リスクの予測モデルを構築し予測精度の向上を図るため、検査値間の相関性が高く従属的にふるまう検査値を除いた上で、MLR 手法を用いた解析を行った。得られた MLR モデルに関して ROC 曲線を用いて解析したところ、AUC 値は 0.7 以上を示し、各種臨床検査値を単独で使用した場合よりも高い精度で DILI 発症患者を non-DILI 患者から分離できることが示された。前述同様、偽陰性率を 25%に設定してその予測精度を検証したところ、偽陽性率は 50%を下回った。

(p : DILIを発症する確率)

$$(a) \ln\left(\frac{p}{1-p}\right) = -0.31 \times \text{Alb} + 0.53 \times \text{CRP} + 0.44 \times \text{Hb} - 0.13 \times \text{PDW} - 0.45 \times \text{PLT} + 0.35 \times \text{WBC}$$



複数の要因に基づいた患者個々のリスク評価モデル構築セットとして採用した患者データに対して、DILI 発症リスクを予測する MLR モデルを構築し(a)、これを用いた際の DILI 発症の予測精度を、ROC 曲線を用いて解析した(b)。 (***: $p < 0.001$)

また、上述したように、DILI 発症率に関して男女間での有意な差が認められたため、性別ごとに層別化した上で、上述と同様の手法での解析も試みた。得られた MLR モデルに関して ROC 曲線を用いて解析したところ、男女ともに AUC 値は 0.7 以上を示した (male: 0.734, female: 0.731)。またこのとき、性別に依らず MLR モデルに組み込まれる因子としては、CRP、WBC 値の上昇に加え、PLT 値の低下が挙げられた。さらに、DILI 発症率の高い男性群において、RBC 値の上昇が最も係数の大きな因子として組み込まれることも明らかとなった。各検査値に関して、その値の分布 (分散) が異なるため、単純にその項の係数の大小を比較することで DILI 発症に与える影響を評価することは出来ないが、これらの指標の変動が示す何らかの患者背景が、DILI のリスク因子となっている可能性が示唆された。

さらに、患者全体の情報を基に構築した MLR モデルの妥当性を検証するため、モデル構築セットとは異なる期間 (2012 年 4 月～2012 年 7 月) に入院された患者を対象としてバリデーションを行った。モデル構築セットと同様に、DILI 発症の有無を調査した結果、DILI を発症しなかった (non-DILI) 患者 2,111 名に対し、抗がん剤などによる中毒性 DILI と考えられる患者が 14 名、特異体質性 DILI を発症したと考えられる患者が 70 名であった。また、

肝機能検査値の異常が認められたが、原因がカルテ上の記載からは特定できなかった患者が 103 名であった。そこでこの期間を対象として、構築した MLR モデルが DILI 発症患者と non-DILI 患者を分離可能であるか、ROC 曲線解析により検証した。その結果、モデル構築セットと同程度の AUC 値を示すことが明らかとなり (0.709)、構築した MLR モデルが妥当であることが示唆された。

2. 薬物性肝障害の劇症化頻度に関する調査

劇症肝炎の発症頻度は極めて低い
ため、劇症化に至った患者の検体を集積して解析を行うことは非常に困難であり、劇症化機構には未解明な点が多く存在する。一般に免疫系の過剰な活性化によって DILI の症状が極度に増悪した結果だと漠然と考えられてきたが、これまでこの点を実証した例はない。本研究では、DILI 発症リスクの評価モデルの構築を試みると共に、DILI と劇症肝炎の包含関係について、統計的な面からの検証も行った。

「DILI は起因薬に依らず一定の頻度で劇症化する」という仮説のもと、日米欧 3 地域の医薬品規制当局である医薬品医療機器総合機構 (Pharmaceuticals and Medical Devices Agency; PMDA)、アメリカ食品医薬品局 (Food and Drug Administration; FDA)、欧州医薬品庁

(European Medicines Agency; EMA) が公開する副作用データベースから、起因薬ごとに DILI および劇症肝炎報告数を抽出した。全 DILI 報告数に占める劇症肝炎報告数を劇症化頻度と定義し、薬物ごとの劇症化頻度の推定法として、多変量の推定に優れたギブスサンプリングを用いたベイズ推定を採用した。このとき、薬物ごとに算出した劇症化頻度を全体の平均値で規格化した値の 99% CI が 1 を含むか否かで、その薬物が仮説に従う薬物であるかを検証することとした。PMDA に肝障害症例が報告された 374 薬物のうち 372 薬物 (99.5%)、FDA に関しては 351 薬物のうち 337 薬物 (96.0%)、さらには EMA に関しては 258 薬物のうち 250 薬物 (96.9%) が、劇症化頻度の 99% CI が 1 を含むことが明らかとなった。そのため、ほとんどの薬物に関して、DILI は起因薬に依らず一定の頻度で劇症化すると考えて大きな矛盾は生じないことが示唆された。十分な根拠が乏しい状態で想定されていた DILI と劇症肝炎の関係性について、統計的に傍証したに過ぎないが、この結果は DILI 発症頻度が高い薬物ほど劇症化症例の出現リスクも高いことを示唆している。そのため、ほとんどの薬物に関しては、本研究で構築した評価モデルによって DILI 発症リスクを事前に予測し、DILI 発症前の段階で、代替薬への切り替えや頻繁な肝機能検査の実施などの適切なリスク管理

を行うことが出来れば、結果として劇症化を防ぐことに繋がるものと期待される。

3. 消化管障害バイオマーカーの検討

実験—1

○胃潰瘍面積

表 2 に結果を記載した。

投与後、いずれの群においても死亡はみられなかった。アスピリンの 3 mg/kg 群では、投与後いずれの剖検時にも消化管障害を示す所見は認められなかった。アスピリンの 300 mg/kg 群では、投与後約 5 及び 8 時間で全例に腺胃粘膜の赤色巣が認められ、投与後約 24 時間では 1 例 (No. 60) で腺胃粘膜の赤色巣が認められた。胃潰瘍 (粘膜の赤色巣) の面積が最大であったのは投与後約 5 時間であった。

イブプロフェンの 8 mg/kg 群では、投与後いずれの剖検時にも消化管障害を示す所見は認められなかった。イブプロフェンの 800 mg/kg 群では、投与後約 2 時間に 1 例 (No. 86) で腺胃粘膜の赤色巣が認められ、投与後約 5、8 及び 24 時間でも全例で腺胃粘膜の赤色巣が認められた。胃潰瘍 (粘膜の赤色巣) の面積の合計が最大であったのは投与後約 5 時間であった。

○胃抽出物中のメタボローム解析

CE-MS での測定により 580 の低分子代謝物の臓器内濃度を決定する事が出来た。さらに由来となった代謝物を同定できないピークも観察されたが、今回は同定されたもののみを解析対

表 6 に結果を記載した。

投与後、いずれの群においても死亡はみられなかった。

Control 群を除く全ての群で全例に腺胃粘膜の赤色巣が認められた。

○胃抽出物中のメタボローム解析

CE-MS での測定により 576 の低分子代謝物の臓器内濃度を決定する事が出来た。さらに由来となった代謝物を同定できないピークも観察されたが、今回は同定されたもののみを解析対象とした。

PCA の結果、各サンプルの PC1 及び PC2 のスコアを 2 次元プロットで示したものを図 9 に示す。アスピリン及びエタノールで胃潰瘍を誘発したモデルは Control 群と明確な差を示したが、ストレスにより胃潰瘍を誘発した動物は Control 群とほぼ同じような位置にプロットされた。

実験-1 でバイオマーカー候補として挙げられた 6 代謝物の変化を図 10 に示す。citrate、cis-aconitate、及び 0-acetylcarnitine の減少はアスピリンモデル以外では検出されな

かった。3-hydroxybutanoic acid の減少もアスピリンモデルのみで検出され、ストレスモデルでは変化せず、エタノールモデルでは増加した。一方で hydroxyproline の減少については今回検討した全てのモデルで確認された。

○血清のメタボローム解析

CE-MS での測定により 577 の低分子代謝物の臓器内濃度を決定する事が出来た。さらに由来となった代謝物を同定できないピークも観察されたが、今回は同定されたもののみを解析対象とした。

臓器内において 2 モデル以上で変化がみられた 3-hydroxybutanoic acid、hydroxyproline についてモデルごとの血中濃度の変化を図 11 に示す。血中においても 3-hydroxybutanoic acid 及び hydroxyproline は臓器内と同様の傾向を示した。

D. 考察

今年度の検討では、これまでの研究結果から DILI との関連性が示唆された、炎症反応や酸化ストレスといった患者側の因子を反映する指標だけではなく、その他の検査値の変動と DILI 発症の関連性を、改めて包括的に検証することで更なるリスク因子の探索を行った。その結果、また実臨床において広く用いられる臨床検査値に基づいて、起因薬に依らない、患者側の DILI 発症リスクを定量的に評価した初めての試みであり、複数の検査値を組み合わせた MLR モデルを構築することでその予測性改善に成功し、臨床現場においても直ちに利用可能な手法を構築出来たものと考えている。

包括的な臨床検査値の調査から、DILI を発症する以前から CRP および WBC の 2 種類が高値傾向にあることが明らかとなった。いずれも炎症反応に伴い上昇することが知られる CRP、WBC 値と DILI 発症との間に関連性が見出されたことは、炎症反応の存在が DILI の発症リスクになるという、これまでの仮説を裏付ける結果となった。また、これらの臨床検査値はいずれも炎症反応が存在する場合に高値を示す傾向が知られているにもかかわらず、検査値間の相関性はあまり高くない、DILI リスクを評価するために構築した MLR モデルには互いに独立した変数として組み込まれている。その理

由としては、以下の2点が考えられる。第一に、WBC が上昇する要因は炎症反応以外にも存在することが挙げられ、白血病などの血液疾患や薬物の影響に伴い増減することもある。これに対して、CRP は炎症マーカーとして一般に用いられている急性相反応物質であり、感染症やリウマチなどの様々な炎症性疾患に応じて上昇する。そのため、患者の病態および服薬状況によっては両検査値の時間推移は必ずしも一致しないものと考えられる。また第二に、炎症反応に伴う CRP、WBC 値の上昇には一般的にタイムラグが生じることが知られている。代表的な炎症性疾患である感染症を例にとると、感染初期にマクロファージから分泌される顆粒球コロニー刺激因子により、肝臓や肺などに貯蔵されている好中球の放出が促進され血中の WBC 増加が早期に観察される一方、CRP はマクロファージから産生されるインターロイキン-6 を肝臓が受容した後に合成されるため、WBC よりも値が上昇するタイミングは遅れる。このような炎症反応に伴う各検査値の上昇時期のずれにより互いの相関性が低くなっている可能性が考えられ、炎症反応を反映するこれらの臨床検査値を包含する MLR モデルの予測精度向上に繋がる一因となったものと思われる。

解析対象とした患者群でも認めら

れたが、一般的に、感染症等に使用される抗菌薬の DILI 発症率が高いことが知られている。これまでは薬物自体の DILI 誘発リスクが高いものと考えられてきたが、本研究結果を踏まえると、DILI 発症に必要な炎症状態等の条件を満たしやすい感染症患者を対象に使用されていることが、発症頻度を押し上げる理由の一つになっている可能性が想定された。関節リウマチや消化性潰瘍など、炎症性疾患は数多いが、あるいは原疾患別に層別化した上で DILI 発症に寄与する因子の探索を行うことで、さらなるリスク因子の同定に繋がる可能性も考えられる。

過去の調査研究でも議論にあるように、本研究においても DILI 発症率において性差が認められた。相反する報告も多いため、他施設・地域でのバリデーションを行う必要はあるが、男女間で層別化した上で DILI 発症を予測する MLR モデルを構築した結果、DILI 発症率の高い男性群において、RBC 値の上昇が最も係数の大きな因子として組み込まれた。赤血球中には、ヘモグロビンの構成成分として鉄が多量に含まれているが、鉄の肝臓への過剰蓄積は肝臓での酸化ストレスの発生と肝細胞傷害を誘発することが知られている。これまでの検討より、起因薬を問わず、酸化ストレスの DILI 発症への関与が示唆されている点と併せて考えると、RBC 値が高値を示す患者においては、肝臓に鉄が過剰に取

り込まれ酸化ストレスを生じており、薬物毒性に対する感受性が亢進している可能性が考えられた。肝臓中の酸化還元状態の間接的な指標である血清中 γ -グルタミルジペプチド濃度の変動と比較することで、より詳細な解析が可能だと思われるが、簡便に測定出来る RBC や鉄濃度が酸化ストレスの程度を反映する指標として機能するならば、臨床応用には適している可能性も考えられる。

また、性別に関係なく MLR モデルに組み込まれた因子として、CRP、WBC 値の上昇に加え、PLT 値の低下が挙げられた。肝硬変などによる門脈圧亢進時には脾臓での血小板破壊が亢進されることや、肝機能低下時には血小板前駆細胞の分化・増殖因子であるトロンボポエチンの肝臓における産生量が低下することが知られている。そのため、PLT 値の低下は、肝障害マーカー値の上昇を伴わない肝機能低下を反映している可能性も想定されるが、他に肝機能を反映することが知られている血清マーカーであるアルブミン等との相関性は認められなかった。血小板数の低下を伴う疾患背景が DILI 発症にどのように寄与するかは現時点では不明であり、今後、PLT との相関性の高い検査値の探索や、動物を用いた検討から DILI 発症との関連性を検証する必要がある。

構築した MLR モデルにより、DILI 発症リスクの高い患者を事前に予測

することが可能となったが、高いスコアを示す患者には non-DILI 患者も多く含まれており、更なる改善が必要だと思われる。頻回に測定される臨床検査値だけでは DILI 発症に寄与する患者要因を完全には網羅できていないことも理由の一つとして考えられる一方で、同程度の MLR スコアを示す患者が同一の薬物を服用した場合でさえも反応性が異なることから、何らかの遺伝的な因子の関与も想定される。過去に報告されているように、特定の薬物による DILI 発症リスクを特定の HLA クラス II 遺伝子型が高める例が複数報告されていること、また薬物の反応性代謝物がタンパク質と共有結合することで形成されるプロテインアダクトの生成量とその DILI 誘発リスクに相関が認められることなどを併せて考えると、以下のような一連の DILI 発症スキームが推測される。すなわち、①炎症反応、酸化ストレスやその他の病的な要因により肝細胞の薬物への応答性が亢進し、②細胞死に至った一部の細胞から放出されたプロテインアダクトが近縁に存在する樹状細胞などの抗原提示能を持つ細胞に取り込まれる。③細胞内のプロテアソームにおいて分解・生成されたプロテインアダクト由来ペプチド断片は、特定の HLA ジェノタイプを発現する場合にのみ細胞表面に提示され、④免疫系を賦活化することで更なる炎症反応を誘発し、肝細胞死を拡大

させるという一連のスキームが想定される。本研究で構築した MLR モデルでの閾値を満たす患者が全体の 30%程度であり、多くの HLA 遺伝子型のアリル頻度が 1%未満であることを考えると、全ての条件を満たす患者の確率は、臨床で遭遇する個々の薬物による DILI 発症率とおおよそ等しくなる。

また、将来的に特に重要な検討項目となる事としては、劇症症例の問題が挙げられる。薬物性肝障害の発症症例の中には、頻度は低いものの劇症化する症例が含まれていることが知られている。劇症肝炎を発症した際の死亡率は 5 割近くにも達し、また治療法も肝移植などに頼らざるを得ない。このため、劇症化症例を未然に防ぐことが出来れば、臨床的な有用性は非常に高い。本研究で見出された酸化ストレス・バイオマーカーと CRP 値を用いて薬物性肝障害発症の高リスク群を予測することが可能となった場合、この劇症化症例が漏れることなく予測できるか否かが重要である。薬物性の劇症肝炎の発症頻度は非常に低いため、現状では情報が少なく劇症化のメカニズムが不明の状況であるが、この点を解決すべく情報集積の努力を行っていきたい。

続いて、消化管障害を反映するバイオマーカーの探索に関しての考察を記載する。実験-1 では、代表的な NSAIDs であるアスピリン及びイブプ

ロフェンをラットに単回経口投与して、胃潰瘍を惹起させ、その程度を経時的に調べるとともに、その動物から採取した胃の抽出物及び血中の内因性代謝物がどの様に変化するかを調べた。胃潰瘍が惹起された動物と胃潰瘍が惹起されなかった動物との間で内因性代謝物の臓器内濃度が異なるか否かを検討し、胃潰瘍が惹起された動物で特異的に変化した代謝物を胃潰瘍のバイオマーカー候補とし、さらに抽出されたバイオマーカー候補が血中でも同様に変化するか否かを確認して、臓器内での変化が血中においても確認できるような代謝物をバイオマーカー候補とした。

その結果、胃潰瘍の惹起により臓器内で有意に減少する内因性代謝物として citrate、cis-aconitate、succinate、0-acetylcarnitine、3-hydroxybutanoic acid、proline、hydroxyproline が見出された。これらのうち succinate を除く 6 つの代謝物は臓器内における変化が血中濃度の変化として捉えられる事が分かった。また 6 つのうち citrate を除く 5 つの代謝物は血中においても胃潰瘍の惹起した動物群で有意な減少を示しており、胃潰瘍の惹起を血中で検出出来るバイオマーカー候補として有望であると考えられた。

臓器内で見られた変化を代謝マップ上にプロットしたところ、NSAIDs を投与したことにより TCA サイクル、脂質

の β 酸化と言ったミトコンドリア機能の低下と細胞外におけるコラゲナーゼの活性化が疑われた。

NSAIDs はミトコンドリアの膜電位を調整する mitochondria permeability pore を開口して (Szewczyk and Wojtczak, 2002) ミトコンドリアの膜電位を喪失させ、ミトコンドリアの機能を失わせることが知られている。胃潰瘍は胃酸やペプシンなどの攻撃因子と防御因子のバランスが崩れることによって起こるとされている。NSAIDs による胃潰瘍の惹起に関しては幾つかの理論が言われているが、その中の一つがミトコンドリアの機能障害による胃粘膜保護作用の低下である。(Somasundaram et al., 1997) 本実験では citrate や cis-aconitate といった TCA 回路の中間代謝物の濃度が減少する一方で代謝マップ上 TCA 回路の上流にあり、ミトコンドリア外で行われる解糖系に関連する代謝物には影響は認められなかった。また脂質の代謝経路の一つである β 酸化はその最終産物として 0-acetylcarnitine 及び 3-hydroxybutanoic acid を産生することが知られているが、本実験においてはこれらも減少した。この事からこれらの変化は NSAIDs によるミトコンドリアの機能低下及びそれに続く胃粘膜保護作用の低下を反映しているものと考えられた。

上記に加えて、proline 及び hydroxyproline の減少も確認された。

hydroxyproline は生体内においてコラーゲンの中に特異的に含まれるアミノ酸であることが知られている。また proline も hydroxyproline の様なコラーゲン特異性は無いものの、コラーゲンを構成するアミノ酸の一つとして知られているアミノ酸である。この事から proline 及び hydroxyproline の減少は臓器内におけるコラーゲン量の減少を示唆しているものと考えられた。潰瘍部位においてはコラーゲンを分解するコラゲナーゼの活性が上昇し、コラーゲン量が増加している事が報告されており、(Hasebe et al., 1987) 本試験で見られたコラーゲン量の減少はコラゲナーゼの活性上昇を反映したものであると考えられた。さらに proline 及び hydroxyproline の減少を経時的に観察すると、その減少は投与後1時間には既に観察されており、5時間で最小になった後、24時間では回復傾向を示した。剖検時の胃の観察では1時間では異常が認められなかったが、5時間で最もひどい胃潰瘍になり、その後24時間に向けて回復しており、今回の proline 及び hydroxyproline の減少はそれらを反映している様に思われた。また、剖検時の観察では異常が認められていなかった投与後1時間においてもその変化が観察されていることから proline 及び hydroxyproline の減少は目視(臨床でいう内視鏡検査)よりも良いバイオマーカーとなり

うと思われた。実験-2 では実験-1 において2つの NSAIDs に共通して変動する複数のバイオマーカー候補を見出した事を受けて、これらのバイオマーカー候補の変動機序を明らかにするために、胃酸の放出を抑制する事で NSAIDs による胃潰瘍の惹起を抑制する作用がある事が知られている (Takeda et al., 1982) ヒスタミン H2 受容体拮抗薬(ファモチジン)及びプロトンポンプインヒビター(オメプラゾール)をアスピリンの投与30分前に投与した場合の低分子代謝物の変化を調べた。つまり、アスピリンの単独投与で見られた変化がファモチジンやオメプラゾールを共投与する事でその変化が正常に戻った場合はそのマーカー候補が胃潰瘍が惹起されることにより変化するバイオマーカーすなわち胃潰瘍のバイオマーカーであることが分かる。一方でアスピリンの単独投与で見られた変化がファモチジンやオメプラゾールを共投与しても正常に戻らなかった場合は、それは NSAIDs による胃潰瘍の危険を示すマーカーとなりうると考えられた。その結果、アスピリンのみを投与した群では citrate、 cis-aconitate、 0-acetylcarnitine 、 3-hydroxybutanoic acid 、 hydroxyproline の減少が確認された。一方で proline の減少は確認されなかった。proline の減少は実験-1 においてもそれほど大きなものではなかつ

たが、実験-2 では実験-1 に比べアスピリンの用量を下げている、それが proline の減少を捕えられなかった理由であると考えられた。アスピリンのみの投与で確認された変化のうち citrate、cis-aconitate、の有意な減少はファモチジンとアスピリンを共投与する事で、hydroxyproline の有意な減少はファモチジンもしくはオメプラゾールを共投与する事で Control 群と同等レベルまで回復した。また血中においてはアスピリンの単独投与群で 3-hydroxybutanoic acid の有意な減少が観察され、ファモチジンもしくはオメプラゾールを共投与しても変化は見られなかったが、hydroxyproline の有意な減少はファモチジンもしくはオメプラゾールを共投与する事で Control 群と同等レベルまで回復した。0-acetylcarnitine 及び 3-hydroxybutanoic acid は脂質の β 酸化の最終産物の一つであり、その減少はミトコンドリアにおけるエネルギー産生の低下を意味している。アスピリンをはじめとする NSAIDs はミトコンドリアの膜電位を調整する mitochondria permeability pore を開口して (Szewczyk and Wojtczak, 2002) ミトコンドリアの膜電位を喪失させ、ミトコンドリアの機能を失わせることが知られている。またこのミトコンドリアの機能障害が胃粘膜保護作用の低下を招き (Somasundaram et al., 1997) これが NSAIDs による胃潰瘍の原

因とされている。今回のデータからファモチジンもしくはオメプラゾールでは胃粘膜保護作用の低下は抑制できず、 β 酸化の低下を示すバイオマーカーは NSAIDs による胃潰瘍の発現の危険性を示すマーカーとなりうると期待された。

TCA 回路の中間体である citrate 及び cis-aconitate の有意な減少はアスピリン投与群及びオメプラゾールとアスピリンを投与した群では確認されたが、ファモチジンとアスピリンを投与した群では確認されなかった。実験-1 の結果から TCA 回路の中間体の減少も β 酸化同様 NSAIDs によるミトコンドリアの機能障害によるものと考えられるがファモチジンが TCA 回路に与える影響について検討した試験は存在せず、その原因は不明である。しかしながらファモチジンと同じ H2 ブロッカーであるシメチジンを前投与したラットに NSAIDs を投与した動物の尿のメタボローム解析 (Um et al., 2012) において、NSAIDs 投与により TCA 回路の中間体である 2-oxoglutarate が減少するが、シメチジンを共投与する事により回復傾向を示すことが報告されている。この事からファモチジンを含む H2 ブロッカーには NSAIDs による TCA 回路の活性低下を何らかの形で回復させる能力があるものと考えられた。

アスピリンの単独投与群で認められた hydroxyproline の減少はファモチ

ジンもしくはオメプラゾールを共投与する事でControl群と同等レベルまで回復した。hydroxyprolineは生体内においてコラーゲンの中に特異的に含まれるアミノ酸であることが知られている。この事からhydroxyprolineの減少は臓器内におけるコラーゲン量の減少を示唆しているものと考えられた。また、潰瘍部位においてはコラーゲンを分解するコラゲナーゼの活性が上昇し、コラーゲン量が減少している事が報告されており、(Hasebe et al., 1987) 本試験で見られたコラーゲン量の減少はコラゲナーゼの活性上昇を反映したものであると考えられた。今回hydroxyprolineの減少が同量のアスピリンを投与してもファモチジンもしくはオメプラゾールを共投与して胃潰瘍を抑制すると認められなかったことからhydroxyprolineの減少が潰瘍による臓器内のコラーゲンの減少を示しており、これがNSAIDsによる胃潰瘍惹起のマーカーとなる事が示唆された。血中においても3-hydroxybutanoic acid及びhydroxyprolineは同様の傾向を示した。一方で0-acetylcarnitine citrate及びcis-aconitateは血中では変化を確認できなかった。この事から血中のhydroxyprolineの減少は胃潰瘍が惹起された事を示すマーカーとして、血中の3-hydroxybutanoic acidの減少はNSAIDsにより誘発された胃潰瘍リ

スクのマーカーとして、利用可能であると考えられた。実験-3では、実験-1において2つのNSAIDsに共通して変動する複数のバイオマーカー候補を見出した。また実験-2においてヒスタミン H2 受容体拮抗薬(ファモチジン)及びプロトンポンプインヒビター(オメプラゾール)をアスピリンと共投与して、バイオマーカー候補の変動パターンを見る事で、それらの変動する原因をおおよそ確認する事が出来た。胃潰瘍の原因については胃潰瘍は胃酸やペプシンなどの攻撃因子と防御因子のバランスが崩れることを起因として多くの要因が関わって惹起されると言われているがその明確なメカニズムについては良く分かっていない。(Choi et al., 2009)また、胃潰瘍を惹起する動物モデルは実験-1、-2で用いたNSAIDsによるモデル以外にもエタノールやストレスで誘発するものを代表に多くのもが知られている。(Shaker et al., 2010)そこで実験-3ではNSAIDs以外のモデルで胃潰瘍を誘発させたモデルについてもバイオマーカー候補の変動パターンを見る事で、バイオマーカー候補の変動する原因を再確認するとともに、バイオマーカー候補がどの様な目的に使えるかを明らかにする事を試みた。その結果、実験-1で見られた変化のうち、citrate、cis-aconitate、及び0-acetylcarnitineの減少はアスピリンモデル以外では検出されなかった。

3-hydroxybutanoic acid の減少もアスピリンモデルのみで検出され、ストレスモデルでは変化せず、エタノールモデルでは増加した。一方で hydroxyproline の減少については今回検討した全てのモデルで確認された。

実験-1、-2 において、citrate、cis-aconitate、O-acetylcarnitine 及び 3-hydroxybutanoic acid の減少は NSAIDs の胃潰瘍惹起の原因の一つとされるミトコンドリアの機能障害が原因であると考察してきた。エタノールによる胃潰瘍の惹起についてはエタノールそのものが壊死性の物質であり、この作用により胃粘膜を破壊する事によりよるものと言われている。(Wallace and Granger, 1996) ストレスによる胃潰瘍についてはその原因は未だ明確になっていないが、最終的に胃酸の過産生と胃粘膜の減少により胃潰瘍に至るとされている。(Honda et al., 1994) 以上の事からアスピリン、エタノール及びストレスにより誘発される胃潰瘍はそれぞれ原因が異なっていると考えられる。今回ミトコンドリアの機能障害を反映していると思われるマーカー群の変化がそれぞれのモデルで異なっていた事は実験-1 及び実験-2 で見られたミトコンドリアの機能障害が NSAIDs の作用である事、これらの変化は胃潰瘍そのものの変化を示すものではなく、NSAIDs による胃潰瘍のリスクを示

すものであることが示唆された。

一方で hydroxyproline の減少については今回検討した全てのモデルで確認された。実験 -1、-2 で hydroxyproline の減少は潰瘍部位においてはコラーゲンを分解するコラゲナーゼの活性が上昇し、コラーゲン量が減少している事が報告されており、(Hasebe et al., 1987) 本試験で見られたコラーゲン量の減少はコラゲナーゼの活性上昇を反映したものであると考察してきた。今回実施した3モデルはいずれも胃潰瘍を惹起している。また Hasebe らは NSAIDs 以外の原因による胃潰瘍においてもコラゲナーゼの活性上昇及びコラーゲン量の減少が見られる事を報告しており、これは原因を問わず胃潰瘍全般で見られる現象であると思われる。(Hasebe, 1987) (Hasebe et al., 1987) 以上の事から hydroxyproline の減少は潰瘍部位のコラーゲン量の減少を示すマーカーであり、胃潰瘍の原因を問わず用いることが出来る胃潰瘍のマーカーであると期待された。

血中においても 3-hydroxybutanoic acid 及び hydroxyproline は同様の傾向を示した。この事から血中の hydroxyproline の減少は NSAIDs により胃潰瘍が惹起された事を示すマーカーとして、血中の 3-hydroxybutanoic acid の減少は NSAIDs による胃潰瘍リスクのマーカーとして、利用可能であると考えられ

た。

E. 結論

本年度の検討により、実臨床において頻繁に測定する臨床検査値を用いて、薬物の服用開始前に DILI 発症リスクを評価できる MLR モデルを構築することに成功した。簡便な計算式で、一定の予測精度を持つモデルを構築できたことは非常に重要な成果であると考えている。本解析で対象とした患者群では、過去の調査間でも統一的な見解が得られていない DILI 発症率における性差が観察されたため、他施設・地域でのバリデーションを行うことでこの点をさらに実証する必要がある。また、DILI 発症に寄与する因子として、先行研究で示唆された炎症反応や酸化ストレスに加えて、血小板の減少が寄与している可能性が新たに示唆され、今後のさらなる解析から DILI 発症機構の解明に繋がる糸口になるものと思われる。

その一方で、薬物側の DILI 誘発リスクを全ての患者に対して統一的に評価することは現時点では困難であり、薬物ごとに DILI 発症に関与しうる遺伝的要因が存在する可能性が想定された。起因薬となりうる薬物の種類の多さや DILI の発症頻度、また過去に報告のあるプロテインアダクトの生成量と DILI リスクとの関連性解析などから、薬物ごとの反応性の差を決定する主要因は患者が有する HLA の

遺伝子型ではないかと考えられた。本研究の研究成果を含めたこれまでの知見を総合して考えると、①炎症反応等の影響下で薬物曝露に伴う肝細胞の細胞死が生じ、②肝細胞内で形成されたプロテインアダクトが放出され、③抗原提示細胞に取り込まれた後、プロテインアダクト由来のペプチド断片が特定の HLA 依存的に抗原提示されることで、④免疫反応が賦活化して炎症反応が広まり、肝細胞死がさらに進行するという、DILI 発症の全体像が想定された。この一連のスキームの可能性を検証するために、まずは、臨床で認められた起因薬と HLA ジェノタイプの組み合わせで抗原提示が行われることを確認する必要がある。

また、消化管障害のバイオマーカー探索検討の成果としては、以下のように総括できる。

①胃潰瘍の血中マーカー候補として Hydroxyproline を見出した。

②Hydroxyproline のプロファイルとして以下の事を見出した

- Hydroxyproline は血中濃度を測定する事で、臓器中での変化を類推でき、その減少は胃潰瘍の発現を意味している。

- 胃潰瘍の発症及び回復の経時変化に伴って変化するため、血中の Hydroxyproline を経時的に測定する事により、病態の変化を追う事が出来ると期待できる。

- 臨床において唯一の NSAIDs 胃潰瘍

の検出方法である内視鏡と同レベルの胃潰瘍の検出能となると考えられる胃の目視よりも早く血中の濃度が増加する為、より早期に胃潰瘍を検出するマーカーとなりうる。

・臨床において胃潰瘍の予防に用いられるプロトンポンプインヒビター、H2ブロッカーを共投与して胃潰瘍の惹起を予防するとこのパラメーターは変化しない。

・NSAIDs が原因で惹起される胃潰瘍以外のモデルでも減少する事から、胃潰瘍の原因に関係なく利用できる可能性が高い。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. **Takeuchi, K.**, Ohishi, M., Ota, S., **Suzumura, K.**, **Naraoka, H.**, **Ohata, T.**, Seki, J., Miyamae, Y., **Honma, M.**, **Soga, T.**, "Metabolic Profiling to Identify Potential Serum Biomarkers for gastric ulceration induced by non-steroid anti-inflammatory drugs" **J. Proteome Res.** **12**, 1399-1407, 2013
2. Tanaka, S., Taga, H., Maehara, K., Kaneshima, A., Machino, M., Onuma, H., Kaneko, M., Sakagami, H., Sugimoto, M., **Soga, T.** and Tomita, M., "Pilot Study of Changes in Salivary Metabolic Profiles Induced by Template Therapy" **In Vivo.** **26**, 1015-1020, 2012.
3. Hirayama, A., Tomita, M., and **Soga, T.**, "Sheathless capillary electrophoresis-mass spectrometry with a high-sensitivity porous sprayer for cationic metabolome analysis" **Analyst** **137**, 5026-5033, 2012.
4. Kato, T., Niizuma, S., Inuzuka, Y., Kawashima, T., Okuda, J.,

Kawamoto, A., Tamai, Y., Iwanaga, Y., **Soga, T.**, Kita, T., Kimura, T., Shioi, T., "Analysis of Liver Metabolism in a Rat Model of Heart Failure" **Int. J. Cardiol.** **161**, 130-136, 2012.

5. Sugimoto, M., Sakagami, H., Yokote, Y., Onuma, H., Kaneko, M., Mori, M., Sakaguchi, Y., **Soga, T.**, Tomita, M., "Non-targeted metabolite profiling in activated macrophage secretion" **Metabolomics** **8**, 624-633, 2012.

著書

6. **曾我朋義** (分担執筆) : メタボロミクス「現代質量分析学」、高山光男、早川滋雄、瀧浪欣彦、和田芳直編、pp305-316, 化学同人、2013
7. 山下亮、**曾我朋義** (分担執筆) : メタボローム解析と創薬「新しい薬学事典」、笠原忠、木津純子、諏訪俊男編、pp77-80, 朝倉書店、2012
8. 平山明由、**曾我朋義** (分担執筆) : キャピラリー電気泳動「アミノ酸・生体アミン分析」日本分析化学会編 pp126-135, 丸善出版、2012

総説

9. **曾我朋義** : メタボロミクスによるがんの診断マーカー探索「現代化学3」 No. 504, pp52-56, 2013.

2. 学会発表

1. 曾我朋義 「メタボロミクスとがんの代謝」第 85 回日本生化学大会、シンポジウム：がんと代謝：がん研究の新たな展開、福岡国際会議場、2012 年 12 月 14 日
2. 曾我朋義 「メタボロミクスによる疾患バイオマーカーの探索」日本遺伝子診療学会：遺伝子診断・検査技術推進フォーラム公開シンポジウム 2012、コクヨホール、品川、2012 年 12 月 6 日
3. 曾我朋義 シンポジウム「メタボロミクスと生命科学」日本プロテオーム学会 2012 年大会、日本科学未来館 7 階、2012 年 7 月 26 日
4. 曾我朋義 総会長主導企画 1 「メタ

ボロミクスによる疾患バイオマーカーの探索」第 55 回日本腎臓学会学術総会、パシフィコ横浜、2012 年 6 月 1 日

5. 曾我朋義 特別講演「最新のメタボローム解析によるバイオマーカー探索」第 11 回京滋ハートセミナー、京都ホテルオークラ、2012 年 5 月 24 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

图 1

