

乳タンパク質 α -ラクトアルブミンの
肝疾患抑制効果に関する研究

日本大学大学院生物資源科学研究科

府川 明佳

2021

目次

略語集.....	1
緒論.....	3
第1章 乳タンパク質 α -ラクトアルブミンの急性肝炎に対する影響.....	6
第1節 緒言	6
第2節 材料と方法	7
第3節 結果	11
第4節 考察	19
第2章 乳タンパク質 α -ラクトアルブミンの慢性肝炎に対する影響.....	24
第1節 緒言	24
第2節 材料と方法	25
第3節 結果	27
第4節 考察	35
第3章 乳タンパク質 α -ラクトアルブミンの腸肝軸に対する影響.....	38
第1節 緒言	38
第2節 材料と方法	39
第3節 結果	42
第4節 考察	49
総合的考察.....	52
総括.....	55
謝辞.....	56
引用文献	57

略語集

Abca1	ATP-binding cassette, sub-family A, member 1
ALP	アルカリフォスファターゼ
ALT	アラニンアミノトランスフェラーゼ
AST	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ
Atp6v0d2	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal V0 subunit D2
COX-2	シクロオキシゲナーゼ-2
DEG	発現変動遺伝子
DMN	ジメチルニトロソアミン
Egr2	early growth response 2
eNOS	内皮型一酸化窒素合成酵素
FBS	ウシ胎児血清
FDR	False Discovery Rate
GalN	D-ガラクトサミン
GO	Gene Ontology
HPRT	hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase
IGF-1	インスリン様成長因子-1
IL	インターロイキン
iNOS	誘導型一酸化窒素合成酵素
α LA	α ラクトアルブミン
L-NAME	NG-nitro-L-arginine methyl ester
LPS	リポポリサッカライド
MAPKs	マイトジェン活性タンパクキナーゼ
MDA	マロンジアルデヒド
MMP-2	マトリックスメタロプロテアーゼ-2

Myc	myelocytomatosis oncogene
NO	一酸化窒素
NOS	一酸化窒素合成酵素
PPAR γ	peroxisome proliferator-activated receptor γ
RIN	RNA インテグリティナンバー
SOD	スーパーオキシドジスムターゼ
SST-RMA	Signal Space Transformation-Robust Multichip Analysis
STAT6	signal transducer and activator of transcription-6
TAA	チオアセトアミド
TLR	トール様受容体
TNF- α	腫瘍壊死因子- α
ZO-1	zonula occludens-1

緒論

肝臓は成人で 800～1200 g と人間の体内で最大の臓器である。消化管から取り込んだ栄養を利用しやすい形に変える代謝、毒物を分解する解毒、脂肪の乳化やタンパク質の分解を促す胆汁の生成・分泌などの生命を支えるための重要な多くの働きを担っている[1]。

肝臓において炎症が生じると肝細胞が破壊される状態となるが、肝炎においては特有の症状はなく多くの場合は血液検査の異常において発見される。肝炎は B 型・C 型肝炎ウイルス感染、多量・長期の飲酒、過栄養、自己免疫などにより起こる[2]。肝炎が持続すると肝細胞が破壊された跡に線維が沈着し、肝臓が硬化する肝線維化が生じ、肝硬変になる。肝硬変が進行すると浮腫、腹水、黄疸などの症状が見られるようになる。さらに肝線維化の進行に伴い肝細胞がんの発生率が高くなる[3]。進行した肝臓病である肝硬変や肝癌を引き起こす主な要因は、日本では B 型と C 型のウイルス性肝炎であり、肝硬変・肝癌の原因の 7 割程度を占めている[4]。一方で、近年では肝細胞がんを引き起こす別の成因として非ウイルス性、非アルコール性の脂肪性肝炎の罹患率が上昇しており問題視されている[4]。

2014 年人間ドックの現況によると生活習慣病関連の主要 6 項目（肝機能異常、肥満、高コレステロール、高血圧、耐糖能異常、高中性脂肪）について成績を比較したところ、肝機能異常者の割合が約 33% と最も高い頻度を示しており、過去約 30 年間の間にその数値は約 3 倍に増加していた[5]。この要因としては専門学会による判定基準ガイドラインの採用、人間ドック受診者の高齢化、社会環境の悪化、食習慣の欧米化と身体活動量の低下等が考えられている。このように肝機能異常者の人口割合が増加している状況を鑑みても、肝疾患を発症する前に予防する仕組みが求められていると考えられる。

小腸と肝臓が連携して生体防御に関わる密接な関係を腸肝軸と呼ぶ[6]。肝臓に送り込まれる血液の約 70～80% が門脈を通過し小腸から供給される。肝臓は消化吸收の産物だけでなく、リポポリサッカライド（LPS）のような菌体成分を含む腸由来の物質にもさらされている[7]。腸管は有害物質や病原性微生物の侵入を阻害する腸管バリア機能を有する。腸管バリアが障害を受け、小腸透過性が増加すると、肝臓は小腸由来の炎症性物質、毒性因

子や菌体に曝され、肝炎ひいては肝硬変の病態を引き起こす[8-10]。肝硬変患者において小腸粘膜の構造的、機能的変化が生じており、そのために細菌やその代謝産物の小腸透過性が増加したことが報告されている[11]。一方で肝疾患が進行すると腫瘍壊死因子- α (TNF- α) やインターロイキン (IL) -6 などの炎症性サイトカインが産生される[12]。これらの炎症性サイトカインは小腸透過性を亢進する[13]。また、小腸透過性が亢進し病原性の LPS が血中に移行するエンドトキシン血症が発症すると肝硬変が悪化し、炎症状態が亢進するとさらに小腸透過性が亢進するという悪循環が発生する[14]。したがってこの悪循環を断ち切ることが腸管バリアの維持および肝疾患発症および進展の防止につながる。

乳製品と肝疾患との関係について定説や疫学調査報告がある。慢性肝炎の食事療法では普通食にプラス1日コップ1杯の牛乳摂取が推奨されている[15]。慢性肝炎の患者では肝臓のタンパク質不耐症により血清分岐鎖アミノ酸が減少しているためアミノ酸インバランスを生じることできまざまな障害を引き起こす。その予防のために牛乳はアミノ酸バランスのよいタンパク質源を摂取することができるという観点で推奨されている。また疫学調査に関しては、ギリシャ[16]、イタリア[17]で行われたケースコントロールスタディにおいて、牛乳・乳製品の摂取と肝細胞癌のリスクの間に負の相関があったと報告されている。これらの報告より、乳製品が肝疾患の発症抑制に関連する可能性が示唆されているがその作用機序については明らかになっていない。

ホエイタンパク質は乳タンパク質の20%を占め、 β -ラクトグロブリン、 α ラクトアルブミン (α LA)、イムノグロブリン、ウシ血清アルブミン、ラクトフェリンなどのタンパク質から構成されている[18]。ホエイタンパク質は抗酸化作用[19, 20]、抗菌作用[21]、抗ウイルス作用[22]、抗癌作用[23]、血圧降下作用[24]、免疫調整作用[25]などの様々な機能が報告されている。また、肝疾患に関する報告としてはホエイタンパク質とホエイペプチドがガラクトサミンによる急性肝障害モデルにおいて肝障害発症を抑制することが明らかになっている[26]。また、ホエイペプチド含有免疫調整流動食がコンカナバリン A 誘発肝炎[27]ジメチルニトロソアミン (DMN) 誘発ラット肝硬変[28]を抑制したと報告されている。

ホエイタンパク質中の約 20%を占める α LA は、カラゲニン足浮腫モデルおよびアジュバンド関節炎モデルにおいて抗炎症作用を示すことが報告されている[29]。また、 α LA は小腸虚血再灌流したラットにおいて一酸化窒素 (NO) 産生を介して炎症性サイトカインの分泌を抑制したことが示されている[30]。このように α LA は炎症抑制作用が報告されているが肝障害に対する作用についての報告はこれまでなされていない。 α LA は分子量約 14,100 の球状タンパク質であり、セロトニン前駆体であるトリプトファン含量が高い[31]。 α LA は進化の過程でリゾチームより変化したためにリゾチームとアミノ酸配列[32]、立体構造[33]が類似していることが報告されている。リゾチームはヒトにおいて経口摂取後に血液循環へ移行されることが確認されている[34]。 α LA についてもラットの十二指腸内に投与後、未分解の状態でも門脈血中より α LA が検出されたことが確認されており[30]、これはリゾチームと相同性を持つことから同様の α LA が未分解の状態でも小腸からの吸収が起こる吸収機構を介していることが想定される。したがって、 α LA は未分解の状態でも吸収されて直接肝臓へ作用する可能性と、消化・吸収される際に生じた構成アミノ酸やペプチドが作用する可能性が考えられる。

本研究では乳タンパク質の一種である α LA の肝疾患に対する機能性について研究した。肝疾患は急性肝炎、慢性肝炎、肝線維化へと進行すること、肝臓は腸と密接な関わりを持つことが知られている。そこで本研究では α LA の急性肝炎に対する作用 (D-ガラクトサミン/リポ多糖誘発急性肝炎モデル)、慢性肝炎に対する作用 (ジメチルニトロソアミン誘発慢性肝炎モデル)、腸肝軸機能不全に対する作用 (チオアセトアミド誘発腸肝軸機能不全モデル) に対する作用および作用機序について検討した。

第1章 乳タンパク質 α -ラクトアルブミンの急性肝炎に対する影響

第1節 緒言

D-ガラクトサミン (GalN) と LPS の投与によって誘発される急性肝障害モデルは、ヒトの劇症肝炎に病理学的に類似している[35]。LPS すなわちエンドトキシンは肝マクロファージに作用し、TNF- α や他の炎症性サイトカインを産生し、局所的に障害を引き起こす[36, 37]。一方で、GalN はウリジンヌクレオチドの貯蔵量を枯渇させタンパク合成を阻害し、LPS の作用を増強する[38]。GalN/LPS 誘発肝障害において TNF- α 産生は炎症、酸化亢進の引き金となり、肝障害を引き起こすことが知られている[39-41]。

α LA は、カラゲニン足浮腫モデルおよびアジュバンド関節炎モデルにおいて抗炎症作用を示すこと[29]、小腸虚血再灌流したラットにおいて NO 産生を介して炎症性サイトカインの分泌を抑制すること[30]が示されている。したがって α LA は抗炎症作用により肝疾患における炎症を抑制する可能性があると考えた。 α LA の急性肝炎に対する効果、すなわち TNF- α を中心として引き起こされる炎症に対する α LA の効果はこれまでに明らかになっていない。そこで、本章では GalN/LPS 誘発急性肝炎ラットモデルにおいて、 α LA 混合飼料を事前に給餌することによって急性肝炎の α LA による肝保護作用および抗炎症作用を検討することを目的とした。

マクロファージは、自然免疫の主要なエフェクターと考えられており、主に単球に由来している。マクロファージは病原体やアポトーシス細胞を直接貪食して抗原を提示し、免疫エフェクターを産生することにより、組織の恒常性の維持、適応免疫反応の形成、炎症、組織の修復において重要な役割を果たしている[42-44]。したがって、急性肝炎の発症におけるマクロファージによる炎症誘導を想定し、本研究ではマクロファージにおける α LA の評価を行うことは、動物における肝炎抑制効果のメカニズムを解析する上で意義があると考えられる。炎症に関与するマクロファージに対する α LA の影響は完全には解明されていないため、本章では DNA マイクロアレイを用いてマクロファージの遺伝子発現を網羅的に解析し、

α LA の抗炎症作用のメカニズムを検討した。

第2節 材料と方法

1. 試験試料

実験1では、 α LA（商品名 BioPURE Alphalactalbumin；タンパク質 97.8%、脂質 0.2%、灰分 1.9%、水分 5.0%、 α LA 94.7%（タンパク質中含量%））を Davisco Foods International Inc.（Eden Prairie, MN, USA）より入手した。GalN、LPS は和光純薬株式会社（大阪）より入手した。イソフルラン吸入麻酔液はファイザー（東京）より入手した。試験飼料には販売飼料である AIN-93M[45]（対照飼料）、改変 AIN-93M 飼料（ α LA 含有飼料）を使用し、これらはフナバシファーム株式会社（千葉）より購入した(Table 1-1)。

実験2では実験1と同様の α LAを使用した。LPS、ダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)、ペニシリン、ストレプトマイシンは和光純薬株式会社（大阪）より入手した。

Table 1-1. Diet compositions

Ingredients	Control diet	α LA-containing diet
Corn starch	46.6 %	46.6 %
Casein	14.0 %	7.0 %
α -Lactalbumin	0.0 %	7.0 %
α corn starch	15.5 %	15.5 %
Sucrose	10.0 %	10.0 %
Soy oil	4.0 %	4.0 %
Cellulose powder	5.0 %	5.0 %
Mineral mix (AIN-93M)	3.5 %	3.5 %
Vitamin mix (AIN-93)	1.0 %	1.0 %
L-cystine	0.18 %	0.18 %
Choline bitartate	0.25 %	0.25 %
Tertiary butylhydroquinone	0.0008 %	0.0008 %
Total	100 %	100 %

2. α LA の GalN および LPS 惹起急性肝炎ラットモデルに対する効果の検討

Sprague-Dawley 系の雄性ラット（6 週齢）を日本 SLC 株式会社（静岡）より購入し、1 週間の馴化期間を経て試験に使用した。飼育環境は室温 $22 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 15\%$ 、明期 7:00 から 19:00、暗期 19:00 から 7:00 とした。すべての動物実験は、株式会社 明治の動物実験倫理委員会のガイドラインに則り実施した（動物実験承認番号 2017_3878_0078）。

馴化期間終了後、平均体重が均等となるように 3 群に群分けした。群構成は 1 群：正常群（ $n=4$ ）、2 群：GalN/LPS 群（ $n=8$ ）、3 群：GalN/LPS+ α LA 群（ $n=8$ ）とした。馴化期間終了後、1、2 群は対照飼料である AIN-93M 飼料、3 群は α LA 含有飼料に切り替え、自由摂取させた。飼料を切り替えて 1 週間経過後、GalN/LPS 処理のラットには 400 mg/kg の GalN と $30 \mu\text{g/kg}$ の LPS を腹腔内投与し、正常群のラットには生理食塩水を投与した。血液サンプルは GalN/LPS 投与 2、4、6、8 時間後に尾静脈から採取した。GalN/LPS 投与 10 時間後に 3%イソフルラン吸入麻酔下にて腹部大動脈から血液を採取し、安楽死後、肝臓を摘出した。採取した血液をヘパリン処理後 $1,500\times\text{g}$ 、 4°C で 15 分間遠心分離し、血漿を得た。

血漿中のアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）およびアラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）の活性をフジドライケム（富士フィルム、東京）を用いた比色スライド法で測定した。肝臓の中間葉を 3 倍量の PBS と混合し、ホモジナイズした後、 $10,000\times\text{g}$ 、 4°C にて 10 分間遠心分離した。得られた上清を用いて IL-6、TNF- α の濃度を測定した。IL-6、TNF- α 濃度は ELISA キット（R&D systems, Minneapolis, MN, USA）を用いて添付のプロトコルに従って測定した。上清中のタンパク質濃度は BCA protein assay kit（タカラバイオ、滋賀）を用いて測定した。

3. α LA のマウスマクロファージに及ぼす影響の検討

(1) 細胞培養

マウスマクロファージ由来細胞 RAW264.7 は ATCC（Manassas, VA, USA）から購入した。継代維持の培地には D-MEM/10% FBS、1%抗生物質（100 U/ml ペニシリン、100 $\mu\text{g/ml}$ ストレプトマイシン）を用い、5%CO₂条件下で培養した。

(2) 細胞生存率

細胞生存率の評価は以下の方法で実施した。96 ウェルプレートに細胞が 5×10^4 cells/well となるように D-MEM/10% FBS、1% 抗生物質を用いて調整、播種して 24 時間培養した。培養後 α LA が 100、500、1000 μ g/ml となるように調製した培地に上清を交換して 24 時間後、細胞生存率の評価を行った。細胞生存率の評価には The Cell Counting Kit-8 (同仁化学、熊本) を使用し、添付プロトコルに従って測定した。

(3) LPS 単回刺激による炎症性サイトカイン分泌の影響

96 ウェルプレートに細胞が 5×10^4 cells/well となるように D-MEM/10% FBS、1% 抗生物質を用いて調製、播種して 24 時間培養した。 α LA が 100、500、1000 μ g/ml となるように調製した培地に上清を交換し 24 時間培養した。培養後、LPS が 20 ng/ml となるように調製した培地に上清を交換して 6 時間後、上清を回収した。マウス TNF- α 測定 ELISA キット (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA)、マウス IL-6 測定 ELISA キット (BD Biosciences) を用いて上清の TNF- α 、IL-6 濃度を測定した。

(4) マイクロアレイ

RAW264.7 細胞を 12 ウェルプレートに 5×10^5 cells/well の密度で播種し、24 時間培養した。 α LA (1000 μ g/mL) で 24 時間処理した後、Maxwell RSC simplyRNA Cells キット (Promega, Madison, WI, USA) を用いて Maxwell RSC Instrument を使用しメーカーの指示に従って RAW264.7 細胞から RNA を抽出・精製した。抽出・精製した RNA の量的および質的適性は、NanoDrop ND-1000 分光光度計 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA) を用いて、260:280 nm の吸光度を測定することにより評価した。260:280 の比が 1.8 以上の抽出した RNA をマイクロアレイ解析に用いた。また各サンプルの RNA について Agilent Bioanalyzer RNA Nano 6000 チップで追加解析し、全サンプルの RNA インテグリティナンバー (RIN) は 7 以上であることを確認した。GeneChip Whole Transcript Amplification kit (Thermo Fisher

Scientific, Waltham, MA, USA) を用いて、メーカーのプロトコルに従い RNA から cDNA を合成した。その後、センス cDNA を断片化し、GeneChip Whole Transcript Terminal labeling kit を用いて末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼでビオチン標識した。その後、Affytrix Clariom™ S Assay, Mouse を用いて、Affymetrix (Santa Clara, CA, USA) のマイクロアレイ解析を行った。標識した DNA ターゲット約 5.5 μ g を 45°C で 16 時間、Affymetrix GeneChip Array にハイブリダイズさせた。ハイブリダイズしたアレイを GeneChip Fluidics Station 450 で洗浄、染色し、GCS3000 Scanner (Affymetrix) でスキャンした。アレイデータのエクспорт処理と解析は、Affymetrix® GeneChip Command Console® Software を用いて行った。ソフトウェアは Affymetrix Power Tools (<https://www.thermofisher.com/jp/ja/home/life-science/microarray-analysis/microarray-analysis-partners-programs/affymetrix-developers-network/affymetrix-power-tools.html>) と R 3.5.1 (<https://www.r-project.org/>) を使用した。

データは Affymetrix® Power Tools に実装されている Signal Space Transformation-Robust Multichip Analysis (SST-RMA) 法を用いて正規化した。遺伝子レベルの SST-RMA 解析を行った結果をエクспортし、発現変動遺伝子 (DEG) を決定するための解析を行った。

発現データの統計的有意性は、帰無仮説として群間に差がないとした場合の独立 t 検定および変動比を用いて判定した。得られた p 値には False Discovery Rate (FDR) を用いて補正 p 値を算出した。DEG については、完全連結法とユークリッド距離を類似性の尺度として用い、階層的クラスタリング解析を行った。どのような機能性に関する発現変動遺伝子リストが有意に凝縮されているかについては、Gene Ontology (GO) (<http://geneontology.org>) を用いて、アノテーション分析を行った。GO term は補正後の p 値が 0.05 以下、かつ term size が 10~500 のものを抽出した。すべてのデータ解析と DEG[46]の抽出には統計解析言語環境 R を用いて行った。

4. 統計解析

得られたデータは平均値 \pm 標準誤差で示した。有意差の検定は Bartlett の検定を用いて等分散性を検定した後に、等分散の場合は一元配置分散分析を行い、続いて Tukey-Kramer の

検定を行った。不等分散の場合は Kruskal-Wallis 検定を用い、Steel-Dwass の検定を行った。いずれの検定も有意水準は両側 5%とした。これらの検定には、エクセル統計（社会情報サービス、東京）を使用した。

第3節 結果

1. α LA の GalN および LPS 惹起急性肝炎ラットモデルに対する効果

(1) GalN/LPS 投与ラットにおける血漿 AST,ALT の変化に対する α LA の影響

AST と ALT は肝障害のマーカーとして最もよく使われているためこれらを測定した。GalN/LPS による血漿中の AST および ALT の活性上昇に対する α LA の効果について示す (Fig. 1-1)。GalN/LPS 投与 4、6、8、10 時間後の AST および ALT の活性は、GalN/LPS 群が正常群に比較して有意に高かった。同じ時点で、GalN/LPS+ α LA 群の AST および ALT の活性は GalN/LPS 群よりも有意に低かった。

(2) GalN/LPS 投与ラットにおける肝臓中 IL-6、TNF- α に対する α LA の影響

GalN/LPS の肝障害が発症時には、まず TNF α が上昇し、続いて IL-6 が上昇し、肝細胞が障害を受けて ALT と AST が上昇する。そこで、肝障害のマーカーである ALT と AST の上昇に伴う炎症性サイトカインを測定した。GalN/LPS 投与後 10 時間における GalN/LPS 投与による肝 TNF- α および IL-6 の上昇に対する α LA の効果を示す (Fig. 1-2)。GalN/LPS による肝 TNF- α 濃度の上昇は、 α LA の混餌投与によって軽減された (Fig. 1-2A)。肝 IL-6 濃度は、GalN/LPS+ α LA 群で、正常群または GalN/LPS 群のいずれよりも有意に低かった (Fig. 1-2B)。

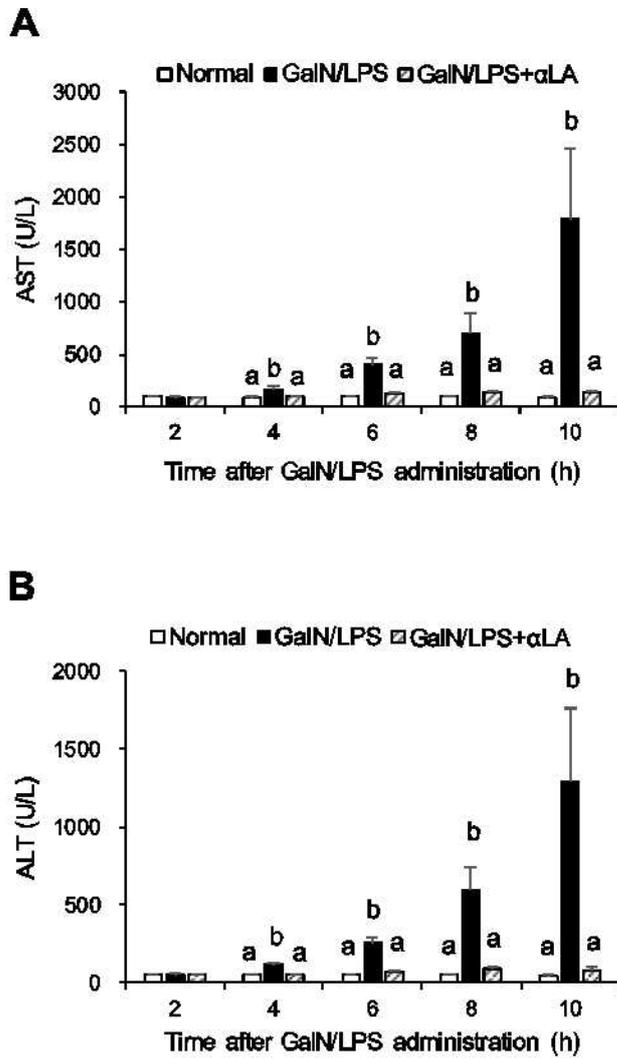


Fig. 1-1. Effects of α LA on the plasma activities of AST (A) and ALT (B) in GalN/LPS-treated rats.

Rats were fed a standard AIN-93M diet or an α LA-enriched diet for 7 days. After one week from starting the diets, rats were intraperitoneally injected with GalN/LPS or saline. Blood samples were obtained at 2, 4, 6, 8, and 10 h after the GalN/LPS injection. The activities of AST and ALT in plasma were measured by colorimetric slides using Fuji Dri-Chem. Each value represents the mean \pm SEM (n = 4–8). The different letters at each measured time represent the statistical differences at $p < 0.05$ among the groups by Tukey-Kramer test or Steel-Dwass test.

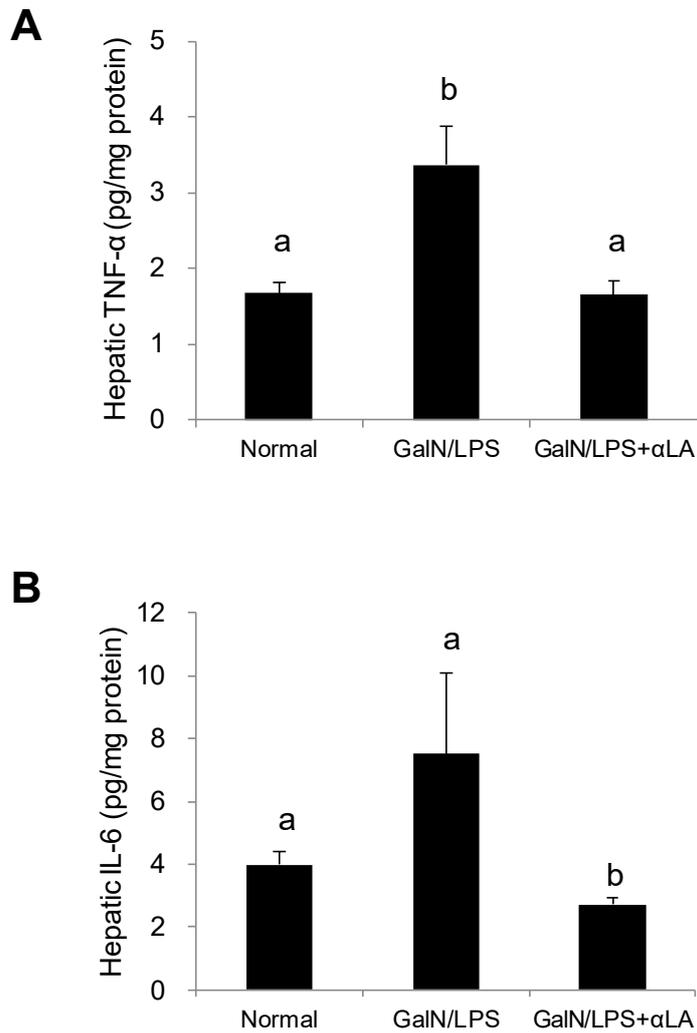


Fig. 1-2. Effects of α LA on the hepatic levels of TNF- α (A) and IL-6 (B) in GalN/LPS-treated rats.

Rats were fed a standard AIN-93M diet or an α LA-enriched diet for 7 days. After one week from starting the diets, rats were intraperitoneally injected with GalN/LPS or saline. Livers were excised at 10 h after the GalN/LPS injection. Hepatic TNF- α and IL-6 were measured by ELISA. Each value represents the mean \pm SEM (n = 4-8). The different letters at each measured time represent the statistical differences at $p < 0.05$ among the groups by Tukey-Kramer test or Steel-Dwass test.

2. α LA のマウスマクロファージに及ぼす影響の検討

(1) LPS 刺激 RAW264.7 マクロファージ細胞における上清中 TNF- α 、IL-6 濃度に対する

α LA の影響

肝マクロファージが産生する炎症性サイトカインは、炎症の重要な因子であり、肝臓の炎症時に作用することから、*in vitro* 試験では炎症の指標として炎症性サイトカイン TNF- α と IL-6 を測定した。LPS 未処理の場合、 α LA は 1000 μ g/mL の濃度まで RAW264.7 マクロファージに対して細胞傷害作用を示さなかった（データ非表示）。また、 α LA を前処理すると、LPS によって誘導される TNF- α および IL-6 の産生が用量依存的に有意に抑制された（Fig. 1-3）。これらの結果から、 α LA は RAW 264.7 マクロファージの細胞障害作用を示さない濃度において、LPS による炎症性サイトカインの産生を抑制することが明らかになった。

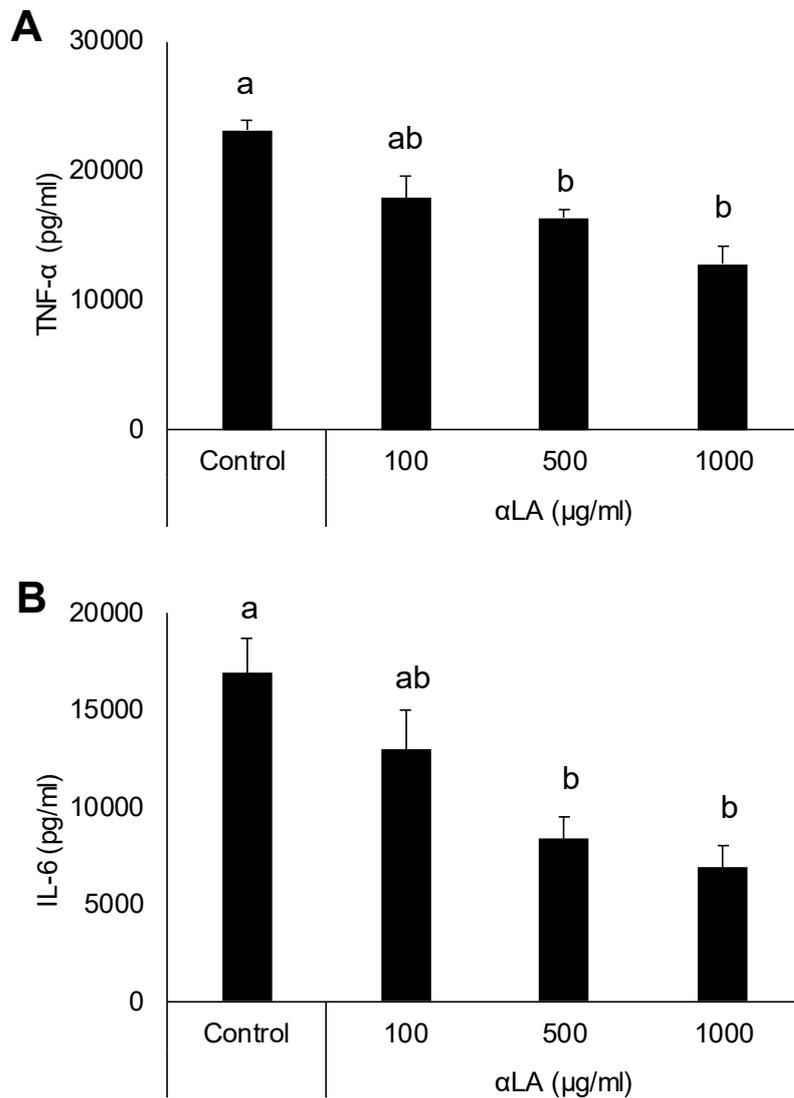


Fig. 1-3. Effects of α LA on LPS-stimulated production of TNF- α (A) and IL-6 (B) in RAW 264.7 macrophages.

Cells were preincubated with 100-1000 μ g/mL α LA for 24 h and then treated with 20 ng/mL LPS for 6 h. Concentrations of TNF- α and IL-6 in the conditioned medium were determined by ELISA. Each value represents the mean \pm SEM of three independent experiments. The different letters at each measured time represent the statistical differences at $p < 0.05$ among the groups by Tukey-Kramer test or Steel-Dwass test.

(2) マイクロアレイ解析

RAW264.7 細胞に α LA を 1000 $\mu\text{g/ml}$ 、24 時間処理した後、マイクロアレイを実施した結果、階層的クラスタリング解析では発現パターンが異なることが明らかになった (Fig. 1-4)。また、合計 84 個の DEG が同定された ($\text{fold change} \geq 1.5$ 、 ≤ -1.5 、 $p < 0.05$)。このうち α LA 処理により発現が亢進した遺伝子が 62 個、 α LA 処理により発現が抑制された遺伝子が 22 個であった。発現が亢進あるいは抑制していた各々上位 20 個の遺伝子について示した (Table 1-2、1-3)。

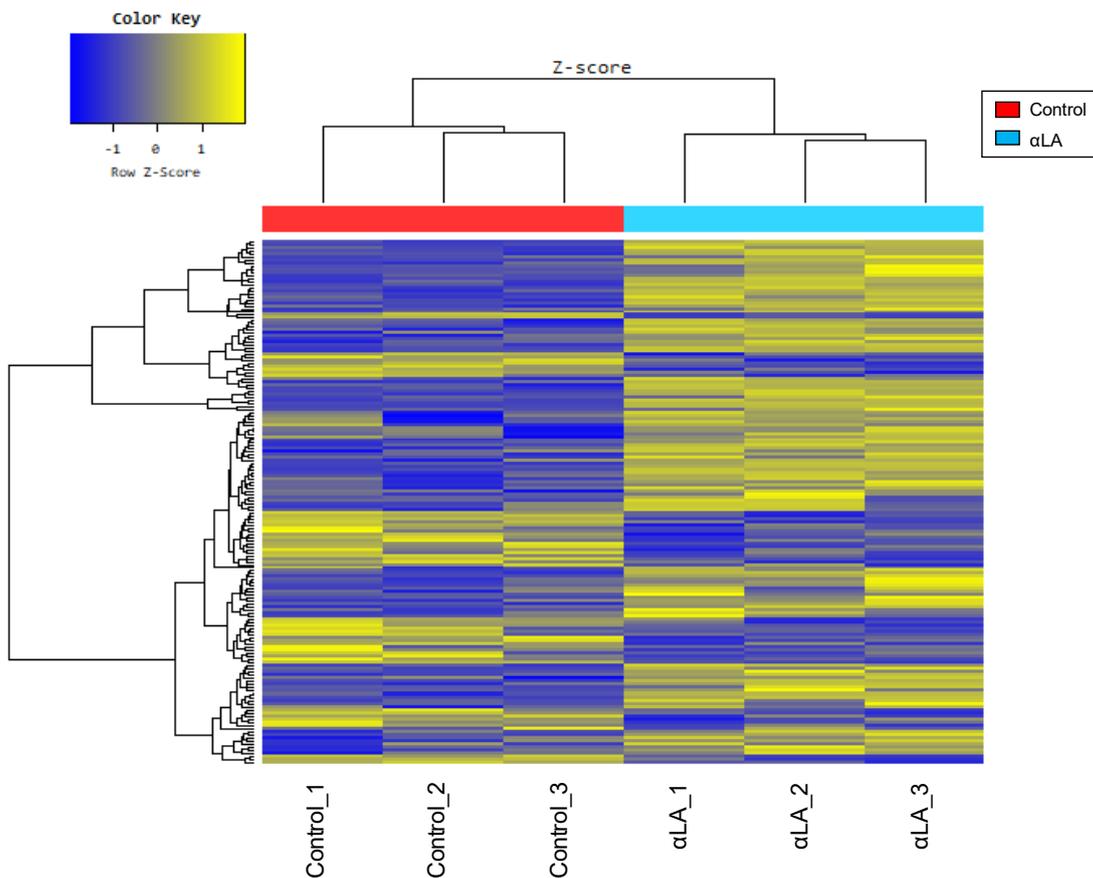


Fig. 1-4. Heat map of differentially expressed genes (DEGs) with fold-change expression > 1.5.

RAW 264.7 macrophages were treated with 1000 $\mu\text{g/mL}$ α LA for 24 h ($n = 3$) or with the vehicle control ($n = 3$). Rows represent genes and columns represent samples. Yellow blocks represent high and blue blocks represent low expression relative to the vehicle-treated cells.

Table 1-2: List of the 20 genes upregulated by α LA

Gene symbol	Fold-change	p-value	Gene description
Myc	3.1761	4.5.E-04	myelocytomatosis oncogene
Olfml3	2.6369	9.6.E-04	olfactomedin-like 3
Abca1	2.5640	6.5.E-04	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 1
Itgax	2.5163	3.5.E-02	integrin alpha X
Egr2	2.4663	2.4.E-03	early growth response 2
Egr1	2.3076	2.2.E-03	early growth response 1
Dcstamp	2.2408	2.8.E-02	dendrocyte expressed seven transmembrane protein
Mmp12	2.2008	6.8.E-04	matrix metalloproteinase 12
Atp6v0d2	2.0057	4.6.E-05	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal V0 subunit D2
Il13ra2	1.9762	1.2.E-03	interleukin 13 receptor, alpha 2
Nes	1.9701	7.9.E-04	nestin
Ocstamp	1.9532	7.7.E-03	osteoclast stimulatory transmembrane protein
Prss46	1.9484	2.3.E-04	protease, serine 46
Tmem26	1.9303	4.8.E-03	transmembrane protein 26
Il1rn	1.9064	2.5.E-05	interleukin 1 receptor antagonist
Irg1	1.8817	4.0.E-04	immunoresponsive gene 1
Cd3d	1.7601	1.3.E-02	CD3 antigen, delta polypeptide
Plk2	1.7526	9.0.E-03	polo-like kinase 2
Olf1045	1.7348	3.1.E-03	olfactory receptor 1045
Dusp1	1.7178	2.3.E-03	dual specificity phosphatase 1

Table 1-3: List of the 20 genes downregulated by α LA

Gene symbol	Fold-change	p-value	Gene description
Tsga13	-1.9957	4.7.E-02	testis specific gene A13
Angptl3	-1.8219	1.6.E-02	angiopoietin-like 3
Gm10377	-1.7667	1.7.E-02	predicted gene 10,377 (Gm10377), mRNA.
Sspn	-1.7232	2.7.E-02	sarcospan
Cldn34-ps	-1.7211	4.0.E-04	claudin 34, pseudogene
Plekhg3	-1.6966	1.0.E-02	pleckstrin homology domain containing, family G (with RhoGef domain) member 3
Tbx22	-1.6404	3.6.E-02	T-box 22
Abcd2	-1.6278	6.0.E-03	ATP-binding cassette, sub-family D (ALD), member 2
Gm19549	-1.6143	2.7.E-02	PREDICTED: predicted gene, 19,549 (Gm19549), miscRNA.
Vmn1r72	-1.6143	4.1.E-02	vomer nasal 1 receptor 72
Gas6	-1.6081	1.6.E-03	growth arrest specific 6
Ift122	-1.6048	7.0.E-03	intraflagellar transport 122
Dgkg	-1.5796	3.7.E-02	diacylglycerol kinase, gamma
Rangrf	-1.5602	1.3.E-02	RAN guanine nucleotide release factor
Nccrp1	-1.5396	1.3.E-02	non-specific cytotoxic cell receptor protein 1 homolog (zebrafish)
Gpr22	-1.5382	4.3.E-02	G protein-coupled receptor 22
Tlr8	-1.5359	4.1.E-02	toll-like receptor 8
Vmn2r71	-1.5286	1.7.E-02	vomer nasal 2, receptor 71
Tgtp2	-1.5215	3.8.E-02	T cell specific GTPase 2
Tll1	-1.5187	2.1.E-04	tolloid-like

(3) Gene Ontology (GO) 解析

Gene ontology は、多様な遺伝子データベース間の情報の共有を目的に 1998 年に設立された Gene Ontology Consortium によって管理されている遺伝子機能の表現方法であり、いくつかのキーワード (term) の組み合わせにより、個々の遺伝子機能を表現するものである[47]。 α LA の処理後、遺伝子発現の変化に関与した上位 14 の GO terms を示す (Table 1-4)。変化した遺伝子数が多かった GO terms として、LPS に対する応答 (response to lipopolysaccharide)、細菌分子に対する応答 (response to molecule of bacterial origin)、生物刺激に対する細胞応答 (cellular response to biotic stimulus)、LPS に対する細胞応答 (cellular response to lipopolysaccharide)、細菌分子に対する細胞応答 (cellular response to molecule of bacterial origin)、白血球分化の調節 (regulation of leukocyte differentiation) が見出された。

Table 1-4: Enrichment of gene GO categories

Gene ontology term	Term	No.genes ¹	Adjusted <i>p</i> -value
response to lipopolysaccharide	GO:0032496	9	0.032
response to molecule of bacterial origin	GO:0002237	9	0.036
cellular response to biotic stimulus	GO:0071216	7	0.036
cellular response to lipopolysaccharide	GO:0071222	7	0.036
cellular response to molecule of bacterial origin	GO:0071219	7	0.036
regulation of leukocyte differentiation	GO:1902105	7	0.039
response to glucocorticoid	GO:0051384	6	0.036
response to corticosteroid	GO:0031960	6	0.038
response to retinoic acid	GO:0032526	5	0.036
anion homeostasis	GO:0055081	4	0.036
phospholipid homeostasis	GO:0055091	3	0.021
negative regulation of cell division	GO:0051782	3	0.032
membrane disruption in other organism	GO:0051673	3	0.032
natural killer cell differentiation	GO:0001779	3	0.039

¹The number of transcripts overexpressed in each GO category.

第4節 考察

げっ歯類に GalN と LPS を投与するモデルは急性肝障害モデルとしてよく用いられている[41, 48]。このモデルは様々な食品素材の肝保護作用について評価するためによく使用されている[49-52]。GalN/LPS 誘発肝障害は、免疫反応に関与しており、肝臓への単核球の浸潤や、AST、ALT などの血漿中アミノトランスフェラーゼの増加を伴う[41, 53, 54]。本試験においても GalN/LPS の投与によって GalN/LPS 群では有意に ALT および AST の活性が有意に上昇したが、GalN/LPS+ α LA 群ではその上昇が抑制された。

TNF- α は GalN/LPS 誘発肝炎において産生される最も重要な炎症性サイトカインである[55, 56]。TNF- α は IL-6 などの他のサイトカインや NO を誘導する炎症カスケードのトリガーとなる[39, 57]。様々な薬剤が TNF- α を制御することによって GalN/LPS による肝障害を予防することが示されている[58, 59]。本試験の結果において、 α LA は GalN/LPS による肝 TNF- α 、IL-6 の上昇を抑制した。これまでに、 α LA には抗炎症作用があり、げっ歯類の虚血

再灌流モデルにおいてサイトカインの放出が減少することを報告している[30]。また、アゾキシメタンおよびデキストラン硫酸ナトリウムによって誘発される大腸の炎症および発癌においても α LA は血漿 TNF- α 、IL-1 β の上昇を抑制することにより抗炎症作用を示すことを報告している[60]。本試験結果は、 α LA が TNF- α や IL-6 を抑制することによって抗炎症作用を示した点で、これまでの試験結果と一致している。

α LA を十二指腸に投与すると、血漿中に未分解の状態で行きわたることが示されている[30]。したがって、本試験においても混餌投与した α LA の一部は未分解の状態で行きわたる肝臓に直接影響を及ぼす可能性があると考えられる。また、 α LA の消化吸収後に血中に行きわたったアミノ酸やペプチドが、本試験の結果に寄与している可能性もある。タンパク質を構成するアミノ酸として、 α LA はカゼインと比較してアスパラギン酸/アスパラギン、システイン、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、スレオニン、トリプトファンを多く含有する（フナバシファーム株式会社提供資料と Davisco Foods International Inc. 開示資料より比較、データ非表示）。これらのアミノ酸の中には肝保護作用を持つものも報告されている[61-64]。例えば、メチオニン、システイン、セリンのアミノ酸混合物がアセトアミノフェン惹起肝炎マウスにおいて肝毒性を改善したことが報告されている[61]。また、分岐鎖アミノ酸が肝虚血再灌流による肝不全ラットにおいて保護作用を示したことも報告されている[62]。さらに、各種アミノ酸の GalN 誘発肝炎に対する影響について検討した結果、アスパラギン、グルタミン、グリシン、ヒスチジン、リジン、セリン、トリプトファンに肝保護作用があったと報告されている[63]。またリジン、トリプトファン、ヒスチジン、アルギニンが培養肝細胞および GalN/LPS 処置ラットにおいて NF- κ B 活性の抑制によって炎症性メディエーターの発現を抑制したことが報告されている[64]。血漿中のアミノ酸濃度が不均衡になるとアミノ酸濃度の特異的なプロファイルが得られることから、このアミノ酸濃度プロファイルが特定の病態の診断または予測マーカーとして使用されている[65]。これより、病態異常を防ぐためには適切なアミノ酸の供給が有効な手段としてあげられている[66]。本試験で用いた α LA 含有飼料を構成するアミノ酸が血漿アミノ酸の均衡を保つ役割を担い、最終的に急性肝炎の発症には予防的な働きとして肝保護的な効果を示した可能性も考えら

れる。

ラットにおいて α LA 混餌投与により GalN/LPS 誘発血漿 ALT、AST、肝臓中 TNF- α 、IL-6 の上昇が有意に抑制された。この結果より、 α LA は炎症性サイトカインの産生を抑制し、肝炎を抑制する作用をもつことが示唆された。サイトカイン産生に主に関与している細胞はマクロファージ細胞、すなわち肝臓においてはクッパー細胞である。そこでマウスのマクロファージ細胞である RAW264.7 細胞を用いて、 α LA の抗炎症作用メカニズムについて検討した。 α LA は LPS 刺激による RAW264.7 細胞の炎症反応の誘導時に TNF- α 、IL-6 産生量増加を有意に低減し、抗炎症作用を示した。この結果は動物試験の結果と一致するものである。続いて、 α LA がマクロファージ細胞の遺伝子発現に与える影響を網羅的に解析するために DNA マイクロアレイを実施した。

本研究は α LA のマクロファージ細胞に対する作用について網羅的遺伝子発現解析を使用して検討した初めての研究である。解析には α LA 処理群と未処理群を用いて比較解析を行った。得られた DNA マイクロアレイのデータを用いて、初めに階層的クラスタリング解析を実施した結果、 α LA 処理群と未処理群とで遺伝子発現パターンが異なることが明らかになった。続いて、発現量に変化のあった次の遺伝子、myelocytomatosis oncogene (骨髄細胞腫症腫瘍遺伝子：Myc)、ATP-binding cassette, sub-family A, member 1 (ATP 結合カセットトランスポーター A1：Abca1)、early growth response 2 (初期成長応答タンパク質 2：Egr2)、ATPase, H⁺ transporting, lysosomal V0 subunit D2 (ATPase、H⁺輸送、リソソーム V0 サブユニット D2：Atp6v0d2)、toll-like receptor 8 (トールライクレセプター 8：Tlr8) について後述する。

Myc は α LA 処理によって発現が亢進した。Myc は、細胞、組織、生体レベルで細胞死、増殖、代謝を調整するために多数の標的遺伝子の発現を促進する転写因子として機能する [67, 68]。Myc は IL-4 下流のシグナル伝達メディエーターである signal transducer and activator of transcription-6 (シグナル伝達性転写因子 6：STAT6) および peroxisome proliferator-activated receptor γ (ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 γ ：PPAR γ) と協調して、代替活性化プログラムに関連する遺伝子の主要サブセットの発現を誘導する [69]。これらの研究によって Myc がマクロファージにおいて免疫調節機能を担う上で重要であることが示唆されている。

本試験においても Myc の発現が上昇することによって各種遺伝子発現が活性化し、 α LA 処置後の LPS 投与に対する免疫応答に順応性を発揮した可能性が考えられる。

Abca1 は α LA 処理によって発現が亢進した。Abca1 欠損マウスおよび Abca1 欠損マクロファージにおいて、LPS 刺激による炎症反応が増強することが報告されている[70-73]。さらに Abca1 発現の増加により LPS の排出が促進されることが報告されている[74]。本試験においても LPS に対する炎症反応の低減、LPS の排出促進に Abca1 の発現量増加が関与した可能性が考えられる。

Egr2 は α LA 処理によって発現が亢進した。IL-4 や IL-13 などによる M2 マクロファージの極性化の刺激は Egr2 の発現の増加をもたらす[75]。M2 マクロファージは IL-10 などの抗炎症性サイトカインを発現し、炎症の制御や炎症後の組織修復に関与する[76, 77]。また EGR2 は EGR3 とともに SOCS1 や SOCS3 などの抗炎症調節因子の発現を誘導することも報告されている[78, 79]。本試験において Egr2 発現が増加していたことから α LA 処理により M2 マクロファージへの極性化が亢進し、炎症を制御する方向に動いた可能性が考えられる。

Atp6v0d2 は α LA 処理によって発現が亢進した。ATP6V0D2 は細胞内小胞の酸性化において中心的な役割を果たしている液胞型 H⁺アデノシントリホスファターゼの構成成分である[80]。ATP6V0D2 欠損細胞においてトール様受容体 (TLR) 4 アゴニストである LPS に対して、炎症性サイトカイン産生および NF- κ B 活性化が亢進した[81]。この結果より ATP6V0D2 依存性小胞内酸性化が TLR4 インターナリゼーション (内在化) に必要であり、過剰な LPS 誘発性炎症の予防に重要である可能性が示されている。また、ATP6V0D2 はオートファゴソーム-リソソーム膜融合を促進することも報告されており、細菌のクリアランスに重要である可能性がある[82]。

Tlr8 は α LA 処理によって発現が低下した。TLR8 はウイルスや細菌由来の一本鎖 RNA を認識する[83]。TLR8 認識によって Myd88 を経由して下流のマイトジェン活性タンパクキナーゼ (MAPKs) および I κ B キナーゼ複合体に作用し、NF- κ B の発現が亢進する[84]。NF- κ B の発現亢進は TNF α や IL-6 などの炎症性サイトカイン産生を促進する。また、多価不飽和脂肪酸や色素を含む藻類抽出物が LPS 刺激 THP-1 マクロファージにおいて炎症を低減し、

この際 TLR8 の発現量が低減していたことが報告されている[85]。本試験においても α LA 処理による Tlr8 の発現量の低下が、Tlr8 リガンドの Tlr8 への結合の低減につながり結果的に炎症抑制の方向に働いた可能性が考えられる。

GO 解析は多くのハイスループット実験研究において標準的な手法として用いられる。本試験において GO terms として LPS に対する応答 (response to lipopolysaccharide)、白血球分化の調節 (regulation of leukocyte differentiation) が検出された。上述した発現が亢進あるいは低減した Myc、Abca1、Egr2、Atp6v0d2、Tlr8 の遺伝子は、検出された GO terms の機能に関与していると考えられる。

本章では α LA 処理マクロファージのマイクロアレイ解析により、LPS 応答と白血球分化に関与する種々の遺伝子の発現の変化が明らかになった。動物実験における α LA の混餌投与が GalN/LPS 誘発肝障害を抑制する機構は、LPS に対する肝マクロファージの反応性の変化とマクロファージの分化能に関連する可能性が示唆された。

第2章 乳タンパク質 α -ラクトアルブミンの慢性肝炎に対する影響

第1節 緒言

肝線維化はウイルス性肝炎、アルコール性肝炎、自己免疫性肝炎、非アルコール性脂肪性肝疾患などから起こる様々な肝疾患の最終像である[86, 87]。肝線維化は進行すると肝硬変、最終的には肝細胞癌へと移行する。肝線維化の原因にかかわらず、細胞外マトリックスタンパク質の蓄積が認められ、肝線維化に伴い、肝細胞壊死、炎症が生じることがわかっている。肝線維化が進展する過程において、肝星細胞は活性化されて細胞外マトリックス、特にコラーゲンを過剰に産生する[88, 89]。肝星細胞はコラーゲン沈着や線維化の進展を引き起こすだけでなく、類洞内皮細胞の収縮により肝臓中の血流を制御する[88, 90]。肝星細胞の収縮は血管弛緩性物質である NO と拮抗する[91]ことから、NO 産生を誘導することは肝星細胞活性化の抑制、肝線維化の抑制につながると考えられている。

α LA は、シクロオキシゲナーゼ-2 抑制による抗炎症作用[29]、大腸癌抑制作用[60]、乳癌抑制作用[92]、耐糖能改善作用[93]、胃粘膜保護作用[94]などの機能が報告されている。また、 α LA は小腸虚血再灌流したラットにおいて NO 産生誘導により炎症性サイトカインの分泌を抑制したことが示されている[30]。しかし α LA が NO を介して肝線維化を抑制するかどうかは明らかにされていない。

第1章にて α LA が炎症性サイトカイン産生を抑制することにより急性肝炎の発症、悪化を抑制すること、急性肝炎抑制機序として、マクロファージにおける M2 型への分化誘導、LPS に対する応答性改善が関与する可能性を示した。急性肝炎から慢性肝炎へと進行し、さらに肝線維化にまで発展する段階においては炎症に加えて肝血流障害が生じる。そこで、本章では炎症と肝血流障害の両者に関与すると考えられる NO に着目し、 α LA が NO 産生を介して肝硬変抑制効果を示すか検討した。まずはジメチルニトロソアミン (DMN) 誘発ラット肝硬変モデルを用いて α LA の肝臓の炎症および肝線維化に対する影響について検討した。次に、NO 合成阻害薬を同時に投与したときの影響について検討し、 α LA の肝線維化抑

制メカニズムに NO が関連するか評価した。

第2節 材料と方法

1. 試験試料

α LA は第1章で用いたものを使用した。DMN は和光純薬株式会社(大阪)から入手した。NG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) は Sigma (St.Louis, MO, USA) から入手した。ペントバルビタールナトリウム溶液 (Somnopentyl) は共立製薬(東京)から入手した。試験飼料には第1章で用いた飼料を使用した (Table 1-1)。

2. DMN 惹起肝線維化ラットモデル

Sprague-Dawley 系の雄性ラット (7週齢) を日本 SLC 株式会社 (静岡) より購入し、1週間の馴化期間を経て試験に使用した。飼育環境は室温 $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55\pm 15\%$ 、明期 7:00 から 19:00、暗期 19:00 から 7:00 とした。すべての動物実験は、株式会社 明治の動物実験倫理委員会のガイドラインに則り実施した (動物実験承認番号 2013_3871_0173、2014_3871_0248)。

実験1では、ラットを1群：正常群、2群：DMN群、3群：DMN+ α LA群の3群 (各 $n=9$) に群分けし、AIN-93M 標準飼料または α LA 含有飼料を与えた (Table 1-1)。飼料を開始して1週間後、ラットに DMN (10 mg/kg) を毎週3日連続で3週間腹腔内投与し、正常群のラットには生理食塩水を投与した。最初の DMN 投与から6日後、13日後、20日後に尾静脈から血液を採取した。最初の DMN 投与から28日後に、ペントバルビタールナトリウム溶液 (50 mg/kg) 腹腔内投与による麻酔下にて腹部大動脈から血液を採取し、安楽死後に肝臓と脾臓を摘出した。採取した血液をヘパリン処理後、 $1,500\times\text{g}$ 、 4°C で15分間遠心分離し血漿を得た。肝臓と脾臓を摘出し、重量を測定した。肝臓は組織切片作製のために10%中性緩衝ホルマリンで直ちに固定した。

実験2ではラットを1群：DMN投与群、2群：DMNおよび α LA投与群、3群：DMN、

α LA および L-NAME 投与群、4 群：DMN および L-NAME 投与群の 4 群（各 n=9）に群分けした。ラットには AIN-93M 標準飼料または α LA 含有飼料を給餌した(Table 1-1)。飼料を開始して 1 週間後、ラットに DMN（10 mg/kg）を毎週 3 日連続で 3 週間腹腔内投与し、正常群のラットには生理食塩水を投与した。L-NAME 投与群には DMN 投与 1 週間前から実験終了まで 0.02%L-NAME 混合水を飲水投与した。最初の DMN 投与から 3 日後、10 日後、17 日後に尾静脈から血液を採取、20 日後にペントバルビタールナトリウム溶液（50 mg/kg）腹腔内投与による麻酔下にて腹部大動脈から血液を採取し、安楽死後に肝臓と脾臓を摘出した。採取した血液をヘパリン処理後、1,500×g、4°Cで 15 分間遠心分離し血漿を得た。

3. 生化学的分析

血漿中の AST、ALT、アルカリホスファターゼ(ALP)の活性および総ビリルビン濃度についてフジドライケム（富士フィルム、東京）を用いた比色スライド法で測定した。血漿中のヒアルロン酸濃度は、ELISA キット (Biotech Trading Partners, Encinitas, CA, USA)を用いて、添付のプロトコルに従って測定した。血漿中のマトリックスメタロプロテアーゼ-2 (MMP-2) 濃度は蛍光アッセイキット（Anaspec, Fremont, CA, USA）を用いて添付のプロトコルに従って測定した。

4. 肝組織所見

肝臓標本を固定しパラフィン包埋した後に脱パラフィンし、マッソントリクローム染色を行った。線維化はグレード化（グレード-：検出されない、グレード±：稀少に発現、グレード+：軽度発現、グレード++：中等度発現、グレード+++：顕著に発現）することによってスコアリングした[95]。

5. 統計解析

得られたデータは平均値±標準誤差で示した。順序変数は累積 χ^2 検定を用いて統計解析を行った。連続変数は Bartlett の検定を用いて等分散性を検定した後に、等分散の場合は

Dunnett の検定、不等分散の場合は Steel の検定を用いて分析した。いずれの検定も有意水準は両側 5%とした。

第3節 結果

1. 血中 ALT および AST 活性に対する α LA の影響

DMN 投与により、血漿中の ALT および AST の活性が顕著に上昇した (Fig. 2-1)。13 日目の DMN+ α LA 投与ラットの血漿中 ALT および AST の活性 (73.6 ± 12.6 IU/L、 138.8 ± 13.9 IU/L) は、DMN 群 (123.2 ± 12.6 IU/L、 230.0 ± 21.5 IU/L) に比べて有意な低値を示した ($p < 0.01$)。

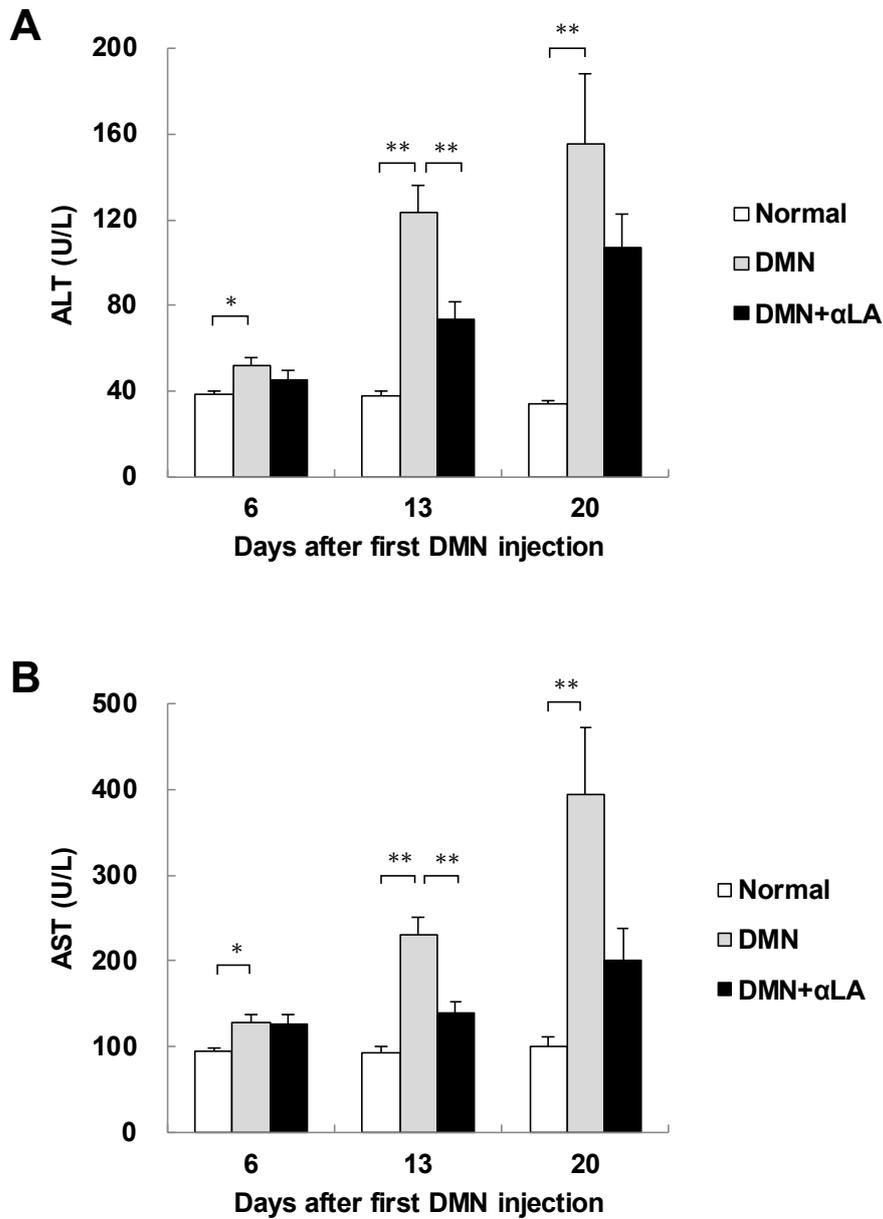


Fig. 2-1. Effect of α LA on ALT (A) and AST (B) activities in plasma of DMN-treated rats.

Rats were fed a standard AIN-93M diet or an α LA-enriched diet. The plasma parameters were determined at 6, 13, 20 days after first intraperitoneally administration of DMN (1% dissolved in saline; 1 mL/kg). DMN was administered consecutively for three days each week for three weeks. Data are presented as mean \pm SEM (n = 9). *, ** Significant difference from the DMN group (p < 0.05, p < 0.01).

2. 肝臓および脾臓の重量に対する α LA の影響

DMN 投与により、肝臓の臓器重量および相対臓器重量が有意に減少した (Table 2-1)。脾臓の臓器重量および相対臓器重量は、DMN 処理により有意に増加した。DMN+ α LA 投与ラットの肝臓の絶対臓器重量は、DMN 投与群に比べて有意な高値を示した。DMN+ α LA 投与ラットの脾臓の絶対臓器重量および相対臓器重量は、DMN 投与群に比べて有意な低値を示した ($p < 0.01$)。

Table 2-1. Effect of α LA on the weights of the liver and spleen in rats treated with DMN.

	Normal	DMN	DMN+ α LA
Body weight(g)	401.9 \pm 5.7 **	316.1 \pm 10.0	330.8 \pm 7.3
Absolute organ weight (g)			
Liver	13.82 \pm 0.37 **	9.27 \pm 0.82	11.84 \pm 0.76
Spleen	0.63 \pm 0.03 **	1.20 \pm 0.07	0.94 \pm 0.07 *
Relative organ weight (g/kg body weight)			
Liver	34.4 \pm 0.7 *	28.9 \pm 1.9	35.6 \pm 1.8 *
Spleen	1.57 \pm 0.06 **	3.83 \pm 0.26	2.88 \pm 0.25 *

DMN was administered consecutively for three days each week for three weeks. Rats were sacrificed at 28 days after the first DMN injection. Data are presented as mean \pm SEM (n = 9). *, ** Significant difference from the DMN group ($p < 0.05$, $p < 0.01$).

3. 血漿成分に対する α LA の影響

血漿中の ALT、AST、総ビリルビン、ヒアルロン酸、MMP-2 レベルは DMN 処理により有意に上昇した (Fig. 2-2)。DMN+ α LA 投与ラットの剖検時の血漿中の総ビリルビンおよび MMP-2 レベル (0.14 ± 0.02 mg/dL, 21.7 ± 1.3 ng/mL; $p < 0.01$) は、DMN 群 (0.33 ± 0.10 mg/dL, 32.6 ± 3.4 mg/dL; $p < 0.01$) に比べて有意な低値を示した。

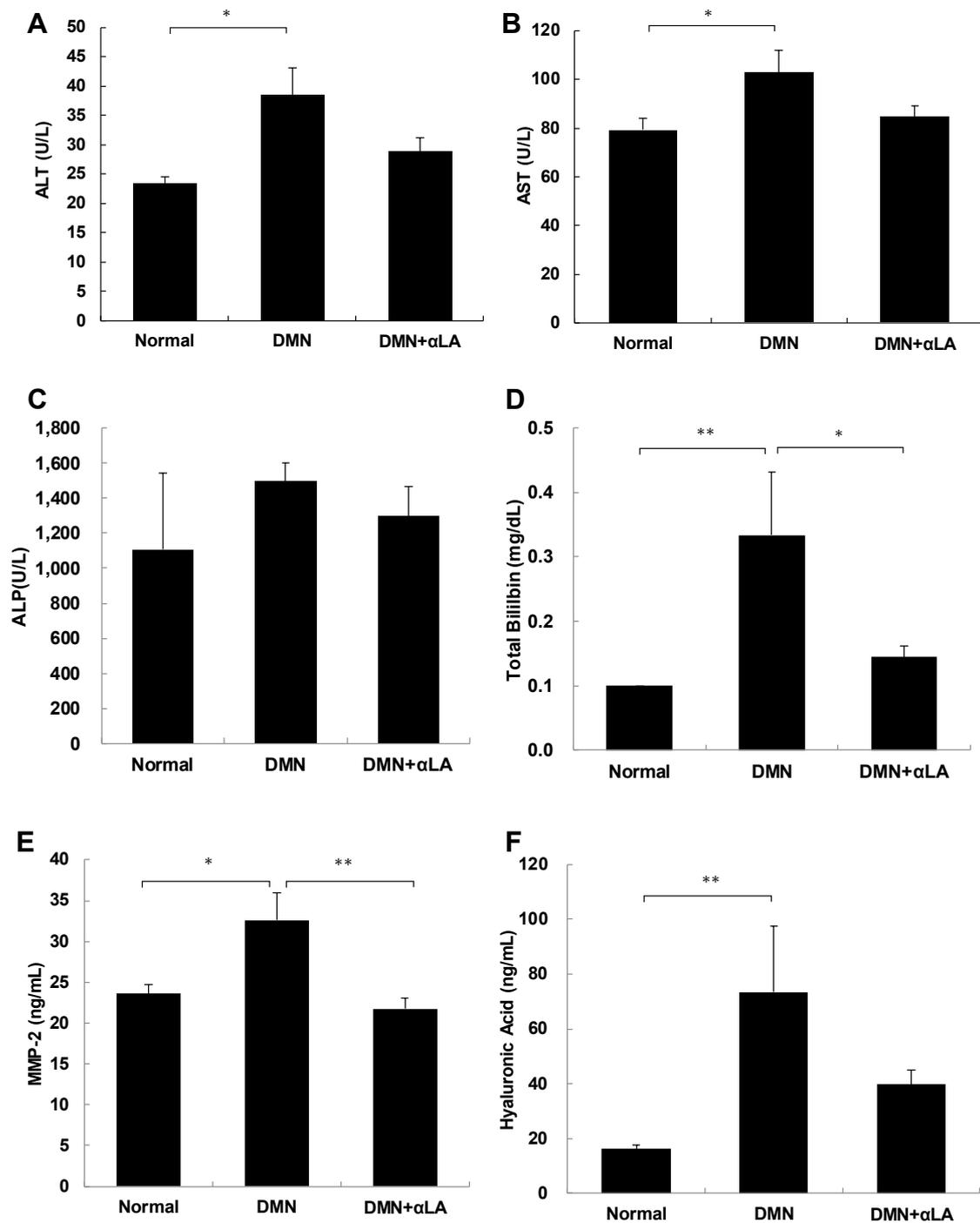


Fig. 2-2. Effects of α LA on ALT (A), AST (B), ALP (C), total bilirbin (D), MMP-2 (E), and hyaluronic acid (F) levels in plasma of DMN-treated rats.

Rats were fed a standard AIN-93M diet or an α LA-enriched diet for 35 days. DMN was administered consecutively for three days each week for three weeks. Blood samples were collected from the abdominal aorta at 28 days after the first DMN injection. Data are presented as mean \pm SEM (n = 9).

*, ** Significant difference from the DMN group ($p < 0.05$, $p < 0.01$).

4. 肝線維化に対する α LA の影響

マッソントリクロームで染色した正常な肝臓では、小さな中心静脈壁周辺にのみコラーゲンが観察された (Fig. 2-3(A))。一方、DMN を投与したラットの正常肝では、門脈部から小葉部にかけてコラーゲンが沈着していた (Fig. 2-3(B))。これらの変化は、DMN+ α LA 処理したラットの肝臓では顕著に減少した (Fig. 2-3(C))。最初の DMN 投与から 28 日後、DMN 群の 9 個体のラットのうち 3 個体では、肝線維化の程度が+++ : 「顕著に発現」を示した (Table 2-2) が、 α LA 投与により線維化のグレードが有意に低下した。

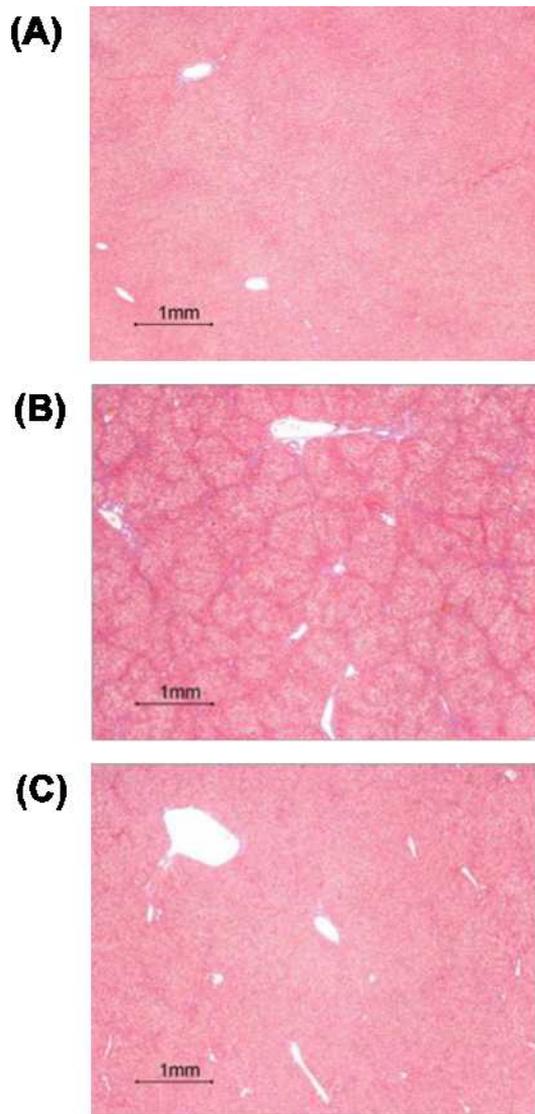


Fig. 2-3. Histological analysis of liver sections.

The liver of the normal rat (A), the DMN-treated rat (B) and the DMN + α LA-treated rat (C). The sections were stained with Masson trichrome. DMN was administered consecutively for three days each week for three weeks. Rats were sacrificed at 28 days after the first DMN injection.

Table 2-2. Effect of α LA on the fibrosis grade in Masson trichrome-stained liver sections prepared from rats at 28 days after the first DMN injection.

	Grade					
	—	±	+	++	+++	
Normal	9	0	0	0	0	
DMN	0	2	1	3	3] *
DMN+ α LA	0	1	7	1	0	

DMN was administered consecutively for three days each week for three weeks. Rats were sacrificed at 28 days after the first DMN injection. *Significant difference from the DMN group ($p < 0.05$).

5. α LA による ALT および AST 値の抑制に対する NO 阻害剤の効果

血漿中の ALT および AST レベルの抑制は、L-NAME によって部分的にだが有意に減少した (Fig. 2-4)。また、L-NAME は、DMN による血漿中の ALT および AST 濃度の上昇には影響しなかった。

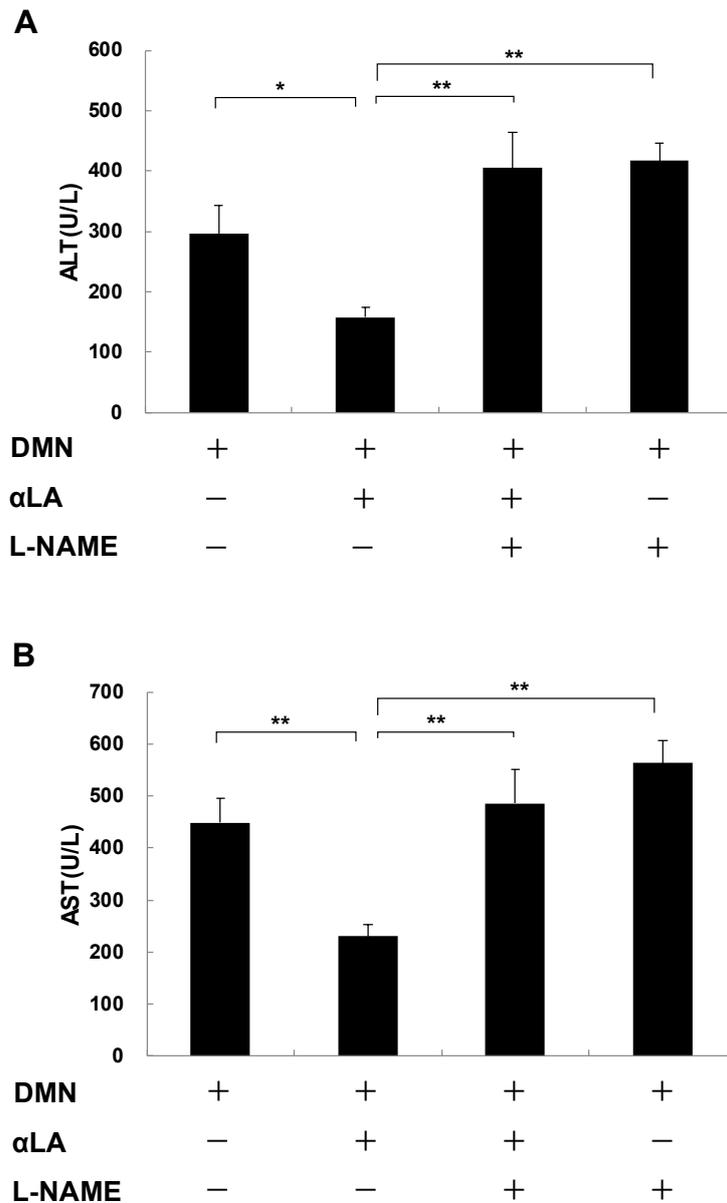


Fig. 2-4. Effect of α LA on ALT (A) and AST (B) activities in plasma of DMN-treated rats.

Rats were fed a standard AIN-93M diet or an α LA-enriched diet for 17 days. The plasma parameters were determined at 10 days after first intraperitoneally administration of DMN (1% dissolved in saline; 1 mL/kg). DMN was administered consecutively for three days each week for three weeks. The L-NAME-treated groups given 0.02% L-NAME in drinking water, starting one week before the DMN injection. Data are presented as mean \pm SEM (n = 9). *, ** Significant difference from the DMN group (p < 0.05, p < 0.01).

6. α LA による脾臓の重量増加抑制に対する NO 阻害剤の効果

α LA による脾臓の重量増加の抑制は、L-NAME によって部分的に、しかし有意に抑制された (Fig. 2-5)。L-NAME は、DMN による脾臓の重量増加に影響を与えなかった。

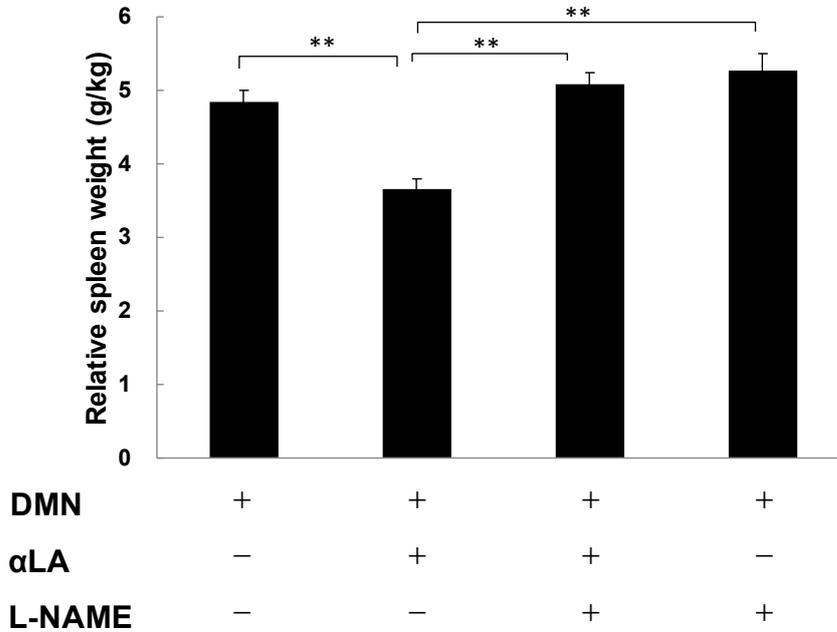


Fig. 2-5. Effect of α LA on relative spleen weight in rats treated with DMN.

Rats were fed a standard AIN-93M diet or an α LA-enriched diet for 27 days. DMN was administered consecutively for three days each week for 3 weeks. The L-NAME-treated groups were given 0.02% L-NAME in drinking water, starting one week before the DMN injection. Rats were sacrificed at 20 days after the first DMN injection. Data are presented as mean \pm SEM (n = 9). *, ** Significant difference from the DMN group ($p < 0.05$, $p < 0.01$).

第4節 考察

実験1の結果より、DMN投与後すぐにALT、ASTの値が上昇し、剖検時には肝臓が萎縮、脾臓は肥大し、血中ヒアルロン酸、MMP-2が上昇していることからDMN誘発肝線維化が進行していることが確認された。 α LAの投与により、DMNによる肝臓の萎縮、脾臓の肥大化が抑制され、肝臓組織所見上においても線維化の抑制が認められた。また、生化学値にお

いても α LA の投与により ALT、AST、総ビリルビン、MMP-2 の上昇が抑制された。

DMN は肝毒性、発癌性、変異原性物質であることが知られている[96]。DMN 惹起肝硬変モデルでは、門脈圧上昇、腹水、病理組織、生化学的变化においてヒトの肝線維化の進展と類似している[97]。このように DMN 惹起肝硬変は肝線維化を評価するために適した動物モデルである。そこで本試験では DMN 惹起肝硬変モデルを用いて α LA の効果を評価した。

DMN 惹起肝線維化モデルでは肝臓の萎縮、脾臓の肥大[98]、生化学値の変動すなわち ALT、AST、ALP、総ビリルビン、ヒアルロン酸の上昇が引き起こされる[28, 99]。また、MMP-2 は活性化肝星細胞から分泌され、タイプIコラーゲン存在下で増加する酵素であるが、DMN 誘発肝線維化ラットにおいて MMP-2 遺伝子発現の上昇が認められている[100, 101]。本試験においても DMN によって血漿中 MMP-2 濃度の上昇が認められ、 α LA がその上昇を抑制したことが明らかになった。

実験2の結果より、 α LA の DMN によって誘発された ALT、AST の上昇を抑制する効果が、NO 合成酵素阻害薬である L-NAME により減弱した。また、臓器重量の結果においても α LA の DMN によって誘発された脾臓の肥大化を抑制する効果が、L-NAME により減弱した。すなわち、 α LA の肝線維化抑制メカニズムには NO 産生誘導が関与することが示唆された。

DMN 誘発肝障害ラットにおいても NO 産生と肝硬変進展との関連についていくつかの報告がある[102-104]。NO 合成阻害薬である L-NAME を投与することによって NO 産生を抑制すると血管内で血液が凝固し、肝障害が悪化したこと[102]、NO ドナーである亜硝酸ナトリウムの投与により、血清中マーカーおよび組織所見が改善したこと[103]が報告されている。一酸化窒素合成酵素 (NOS) には内皮型 NOS (eNOS) と誘導型 NOS (iNOS) のアイソフォームがあり、eNOS は肝臓内で血行を改善するが、一方で iNOS は肝障害を悪化させる[105]。DMN 惹起肝硬変マウスにおいても、肝星状細胞の活性化が起こり、eNOS 発現が低下、iNOS 発現が亢進したことが報告されている[104]。本試験では、 α LA が NO 誘導することによって DMN 誘発肝硬変を抑制したことが示唆されたが、NO が誘導された中でも eNOS 発現が誘導されたことによって肝臓の血流抵抗が減弱した可能性がある。今後は肝線維化

における NO 産生細胞の同定が検討課題であると考えられる。

α LA は小腸虚血再灌流後の NO 産生を増加することによって IL-6 を抑制する[30]。また、NO は NF- κ B の転写活性を抑制することによって、TNF- α 、IL-8、IL-1 β 、IL-2、IL-6 などの炎症性サイトカインの産生を抑制することが報告されている[106, 107]。したがって、本試験においても α LA が NO 産生を介して NF- κ B 転写活性を抑制することによって DMN 誘発肝障害を抑制したことが示唆される。

DMN 誘発肝障害において、マロンジアルデヒド (MDA) の増加、スーパーオキシドジスムターゼ (SOD) の減少など酸化が亢進する [108]。ホエイペプチドを多く含有した流動食が DMN 誘発肝障害において、MDA の上昇を抑制し抗酸化作用を示す[28]。また、 α LA を酵素処理して得られたペプチドはインドール基を持つトリプトファンやフェノール基を持つチロシンを多く含有することから高い抗酸化能を示す[109]。本試験においては MDA、SOD の測定を実施しなかったが、先の報告のように混餌で給与した α LA が消化、吸収される過程で生じたペプチドやアミノ酸が抗酸化作用を示す可能性はあると推測する。

本章では、DMA 誘発の肝線維化を α LA が抑制すること、またそのメカニズムの一環として NO 産生誘導が影響している可能性が示唆された。 α LA の長期摂取が肝障害予防に有効である可能性が考えられる。

第3章 乳タンパク質 α -ラクトアルブミンの腸肝軸に対する影響

第1節 緒言

小腸と肝臓が連携して生体防御に関わる密接な関係を腸肝軸と呼ぶ[6]。腸管バリアが障害を受け、透過性が増加すると、肝臓は小腸由来の炎症性物質、毒性因子や菌体に曝され、肝炎ひいては肝硬変の病態を引き起こす[8-10]。一方で肝疾患が進行すると TNF- α や IL-6 などの炎症性サイトカインが産生され、これらの炎症性サイトカインは小腸透過性を亢進する[13]。また、小腸透過性が亢進しエンドトキシン血症が発症すると肝硬変が悪化し、炎症状態が亢進するとさらに小腸透過性が亢進するという悪循環が発生する[14]。したがってこの悪循環を断ち切ることが腸管バリアの維持および肝疾患発症および進展の防止につながる。

腸管上皮を通過して腸管内細菌が体内に移行する状態をバクテリアルトランスロケーションと呼ぶ。シクロオキシゲナーゼ-2 (COX-2) 阻害剤[110]、多糖類[111]、インスリン様成長因子-1 (IGF-1) [112, 113]など腸管上皮バリアの維持に寄与する物質が、バクテリアルトランスロケーションを阻害することによって肝硬変を改善することが報告されている。 α LA は COX-2 阻害作用によりカラゲニン足浮腫モデルおよびアジュバンド関節炎モデルにおいて抗炎症作用を示すことが報告されている[29]。また、乳タンパク質のホエイタンパク質には小腸バリアを増強することが *in vitro*[114, 115]、*in vivo*[116]の系で報告されている。しかし、 α LA のバクテリアルトランスロケーションに対する作用や、小腸バリア機能に対する作用についてはこれまで明らかにされていない。

肝障害に対する効果としては、これまで第1章において α LA がマクロファージに作用することによって炎症性サイトカイン産生を抑制し GalN/LPS 誘発急性肝炎を抑制することを報告した。さらに第2章において α LA の混餌投与が NO 産生を介して DMN 誘発肝線維化を抑制することを報告した。そこで第3章では肝臓と密接な関係性を持つ小腸との関連性について調べるために α LA が腸肝軸の機能不全を改善することによって小腸透過性を改善

し、肝硬変の進行を抑制するという仮説を立て検証した。

第2節 材料と方法

1. 試験試料

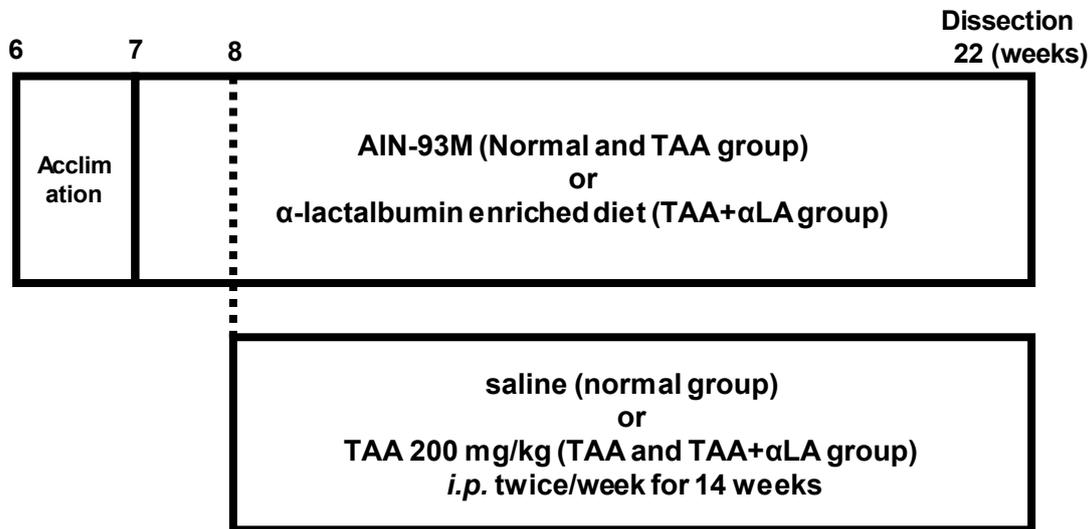
第1章で用いた α LA と同じものを使用した。チオアセトアミド (TAA) は和光純薬株式会社 (大阪) より入手した。イソフルラン吸入麻酔液はファイザー (東京) より入手した。試験飼料は第1章で用いた飼料を使用した (Table1-1)

2. TAA 惹起腸肝軸不全モデル

Sprague-Dawley 系の雄性ラット (6 週齢) を日本 SLC 株式会社 (静岡) より購入し、1 週間の馴化期間を経て試験に使用した。飼育環境は室温 $22 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 15\%$ 、明期 7:00 から 19:00、暗期 19:00 から 7:00 とした。動物実験は、株式会社 明治の動物実験倫理委員会のガイドラインに則り実施した (動物実験承認番号 2017_3878_0038)。

馴化期間終了後、平均体重が均等となるように各群 15 匹になるよう 3 群に群分けした。群構成は 1 群: 正常群、2 群: TAA 群、3 群: TAA + α LA 群とした。馴化期間終了後、1、2 群は AIN-93M 飼料、3 群は α LA 含有飼料に切り替えた。飼料を切り替えて 1 週間経過後から、生理食塩水あるいは TAA (200 mg/kg) を 1 週間あたり 2 回、14 週間、腹腔内投与した (Fig3-1)。TAA を投与してから 14 週間後に 3% イソフルラン吸入麻酔下で門脈から採血し、安楽死後、肝臓、小腸を採取した。採取した血液はヘパリン処理後、 $1,500 \times \text{g}$ 、 4°C で 15 分間遠心分離し血漿を得た。肝臓と小腸組織は組織染色のために直ちに 4% パラホルムアルデヒド溶液に浸漬した。また小腸の一部を mRNA 発現評価のために、RNA later® Stabilization Solution (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) に浸漬し、 -80°C に保存した。

Fig. 3-1. Experimental protocol for injection of TAA or saline and administration of the diet to Sprague-Dawley rats.



3. 血漿中 AST、AST 活性、ヒアルロン酸濃度、LPS 濃度の測定

血漿 AST、ALT 活性はフジドライケム（富士フィルム、東京）を用いた比色スライド法で測定した。血漿ヒアルロン酸濃度を ELISA キット（R&D systems, Minneapolis, MN, USA）を用いて添付のプロトコルにしたがい測定した。血漿 LPS 濃度を ELISA キット（LifeSpan BioSciences, Inc. Seattle, WA, USA）を用いて添付のプロトコルに従い測定した。

4. 小腸組織からの RNA 抽出および cDNA の合成

小腸からの RNA 抽出には、Nucleo spin RNA (Macherey- Nagel, Duren, Germany)を使用した。total RNA 抽出後 RNA 6000 Nano LabChip kit (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA)を用いて Bioanalyzer 2100 により濃度の測定及び品質の確認を行った。次に Takara PrimeScript RT Master Mix (タカラバイオ、滋賀)を使用して逆転写反応を行い cDNA を合成した。液量が 10 μ L になるように 5X PrimeScript RT Master Mix を 2 μ L、RNA を 500 ng、RNase-free dH₂O を混合し、37°C15 分間で逆転写反応させ、85°C、5 秒間で逆転写酵素を失活させた。

5. 定量リアルタイム PCR による遺伝子発現解析

mRNA の解析には定量リアルタイム PCR を用いた。反応溶液は SYBR premix Ex Taq II (2×) (タカラバイオ)が 12.5 µl、鋳型 cDNA (最終濃度 0.5 ng/µl)が 2 µl、滅菌水 8.5 µl、各種プライマーが最終濃度 400nM となるように調製した。リアルタイム PCR の増幅反応には Thermal Cycler Dice Real Time System Software (タカラバイオ)を用いた。PCR 反応は 95°C、30 秒間加熱後、90°C、5 秒間 (変性反応) と 60°C、30 秒間 (アニーリングと伸長反応) を 40 サイクル繰り返し、各サイクルの終了時に反応液の蛍光強度を測定した。その後、融解曲線分析を行い、増幅反応の特異性を検証した。cDNA 定量化のために、増幅曲線から交点を決定するために二次導関数を使用し、発現レベルを検量線法により算出した。検量線を作成するために、鋳型 cDNA の 4 倍希釈系列を使用した。この時同時に、内部標準に hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (HPRT) を用いて遺伝子発現量を補正し、結果は正常群に対する比として示した。プライマーの配列は Table 3-1 に示す。

Table 3-1. List of primers for qRT-PCR

Gene	GeneBank Accession NO.		Sequence Primers(5'-3')
Claudin-4	NM_001012022.1	F	ACGAGACCGTCAAGGCCAAG
		R	GTCCAGGACACAGGCACCATAA
E-cadherin	NM_031334.1	F	GAGCCAGACACATTCATGGAACA
		R	CTCAGCCCGAGTGGAAATGAC
Occludin	NM_031329.2	F	ACCACTATGAAACCGACTACAC
		R	ATTCATCAGCAGCAGCCA
ZO-1	NM_001106266.1	F	CTGCCAAGCCAGTCCATTCTC
		R	CCATAGCATCAGTTTCGGGTTTC

F, Forward primer; R, Reverse primer; ZO-1, zonula occludens-1

The primers for HPRT were purchased from Takara Bio (Rat Housekeeping Gene Primer Set).

6. 組織染色

剖検時に固定した肝臓、小腸組織をパラフィン包埋し、4 µm に薄切した。薄切した切片を脱パラフィン化し、肝臓切片はヘマトキシリンエオジン染色とマッソントリクローム染色

を行い、小腸切片はヘマトキシリンエオジン染色を行った。

7. 統計解析

得られたデータは平均値±標準誤差で表示した。正常群と TAA 群間、TAA 群と TAA+ α LA 群間の等分散性について F 検定を用いて検定した後に、平均値間の有意差検定を群間の等分散性が仮定できる場合は、Student's *t* 検定により、群間の等分散性が仮定できない場合は Welch の方法を用いて行った。いずれの検定も有意水準は両側 5%とした。

第3節 結果

1. α LA の血漿 AST、ALT、ヒアルロン酸に及ぼす影響

剖検時に採取した血漿中の AST、ALT、ヒアルロン酸の結果を Fig 3-2 に示す。AST、ALT、ヒアルロン酸において、正常群に比較して TAA 群は有意な高値を示した。 α LA の給餌によって TAA 投与による AST、ALT、ヒアルロン酸の上昇が抑制された。

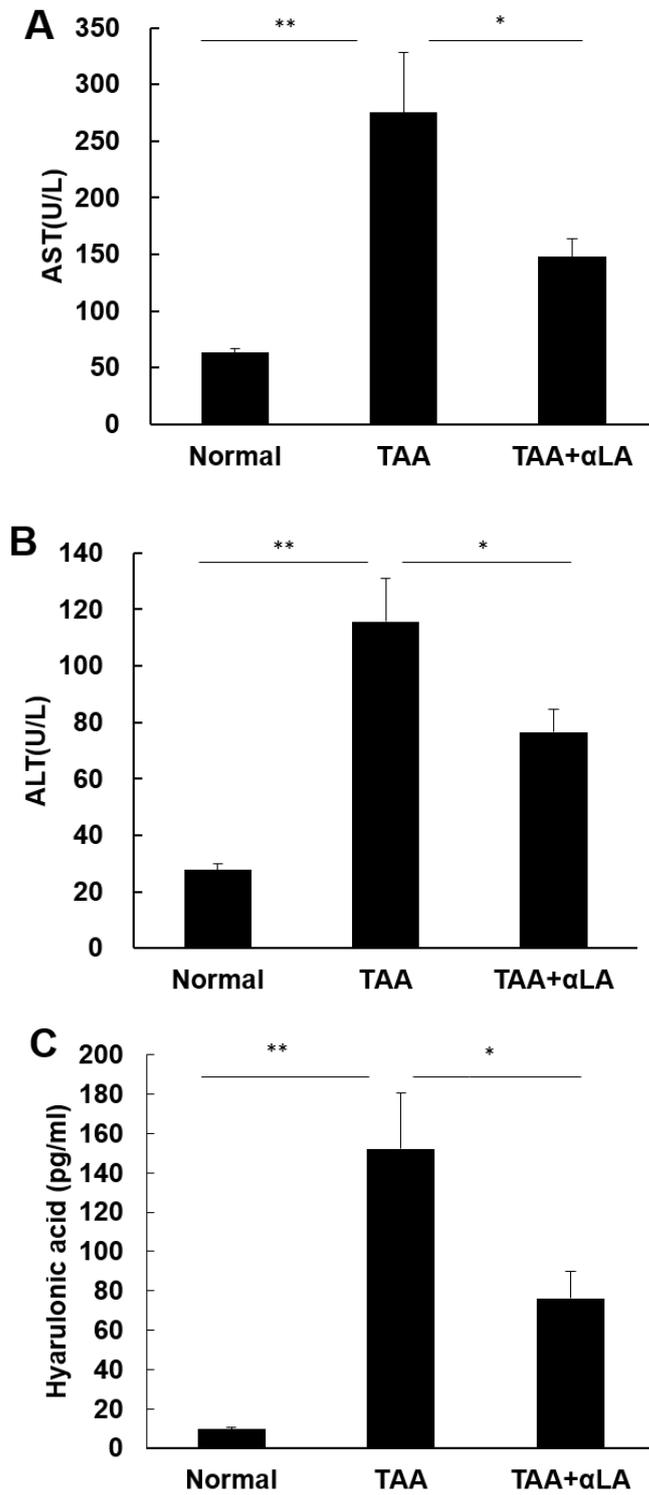


Fig. 3-2. Effects of dietary α LA on the plasma levels of AST (A), ALT (B) and hyaluronic acid (C) in rat.

Rats were fed a standard AIN-93M diet or an α LA-enriched diet for 15 weeks. TAA was administered

twice each week for 14 weeks. Blood samples were collected from the abdominal aorta at 14 weeks after the first TAA injection. Each value is the mean \pm SEM (n = 15 in each group). *, ** Significant difference from the TAA group (p < 0.05, p < 0.01, respectively).

2. 肝臓組織における病理変化に及ぼす α LA の影響

α LA の TAA 誘発肝線維化に対する効果について、肝臓組織のマッソントリクローム染色により評価した (Fig 3-3)。コラーゲンが沈着している箇所はマッソントリクローム染色により青色に染色される。正常群では門脈周辺のみわずかな範囲にのみコラーゲン沈着が観察された。TAA 群では主に小葉中心部および門脈路でコラーゲン沈着の箇所が広範囲で見られ、線維架橋および再生結節の形成が観察された。一方、TAA + α LA 群ではコラーゲン組織の沈着が TAA 群より少ないことが観察された。

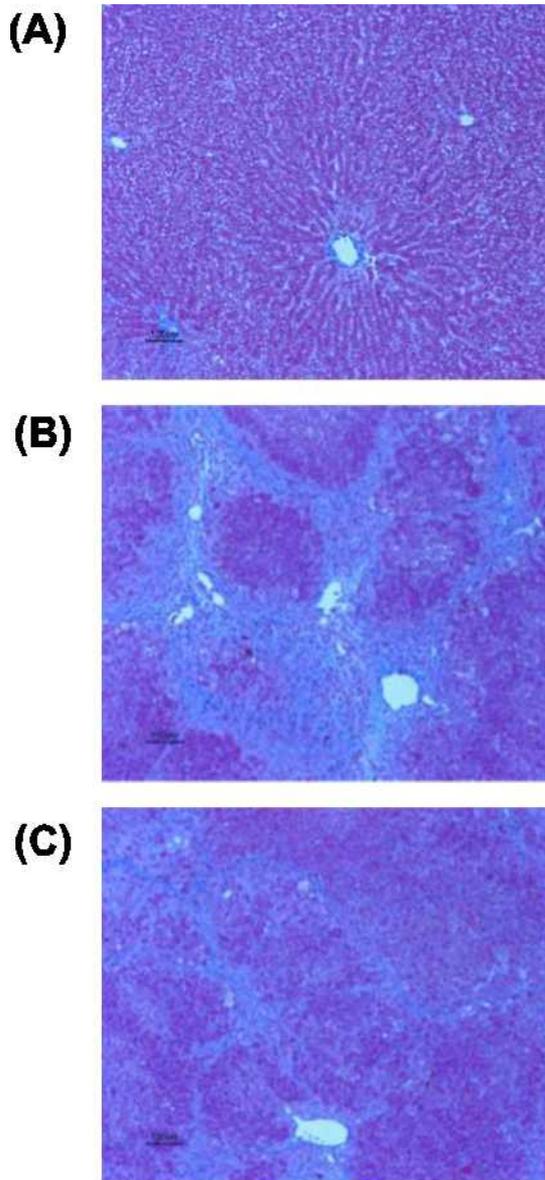


Fig. 3-3. Representative histopathological changes in liver tissues following treatment with dietary α LA assessed using Masson trichrome staining.

Sections were examined at a magnification of 100 x. Normal (A), TAA treatment (B), and TAA+ α LA treatment (C). The sections were stained with Masson trichrome. TAA was administered twice each week for 14 weeks. Rats were sacrificed at 14 weeks after the first TAA injection.

3. α LA の血漿 LPS に及ぼす影響

剖検時に採取した血漿中の LPS の結果を Fig 3-4 に示す。正常群と TAA 群の間に有意差

は認められなかったが、TAA 群に比較して TAA + α LA 群は有意な低値を示した。

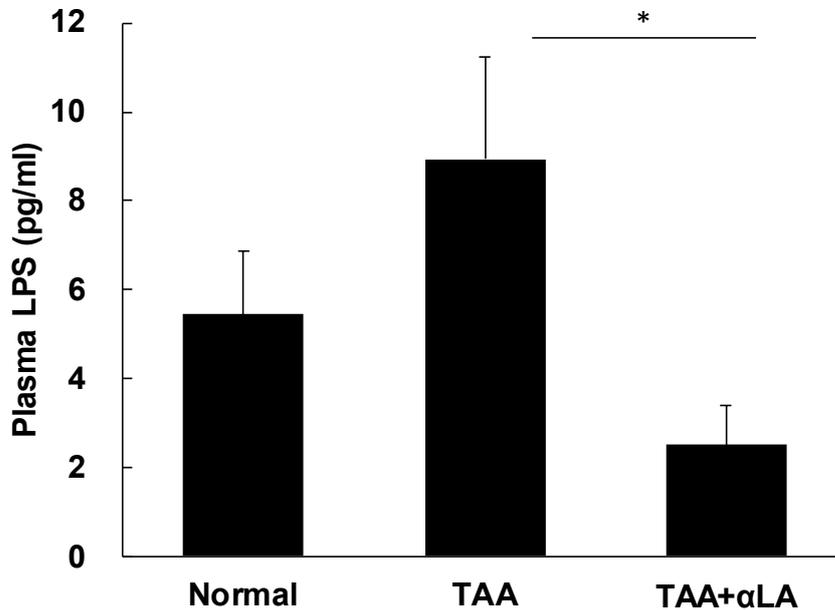


Fig. 3-4. Effects of dietary α LA on the plasma levels of LPS.

Rats were fed a standard AIN-93M diet or an α LA-enriched diet for 15 weeks. TAA was administered twice each week for 14 weeks. Blood samples were collected from the abdominal aorta at 14 weeks after the first TAA injection. Each value is the mean \pm SEM (n = 15 in each group). * Significant difference from the TAA group (p < 0.05, p < 0.01, respectively).

4. α LA の小腸 occludin、ZO-1、claudin-4、E-cadherin の mRNA 発現レベルに及ぼす影響

タイトジャンクションを構成する occludin、zonula occludens-1(ZO-1)、claudin-4、アドヘレンスジャンクションを構成する E-cadherin の小腸 mRNA 発現比率についての結果を Fig. 3-5 に示す。Occludin の mRNA 発現比率の結果、正常群と TAA 群の間に有意差は認められなかったが、TAA 群に比較して TAA + α LA 群は有意な低値を示した。ZO-1、claudin-4 の mRNA 発現比率の結果、正常群と TAA 群間、TAA 群と TAA + α LA 群間のいずれも有意差は認められなかった。E-cadherin の mRNA 発現比率の結果、正常群に比較して TAA 群は有意な低値を示したが、TAA 群と TAA + α LA 群間には有意差は認められなかった。

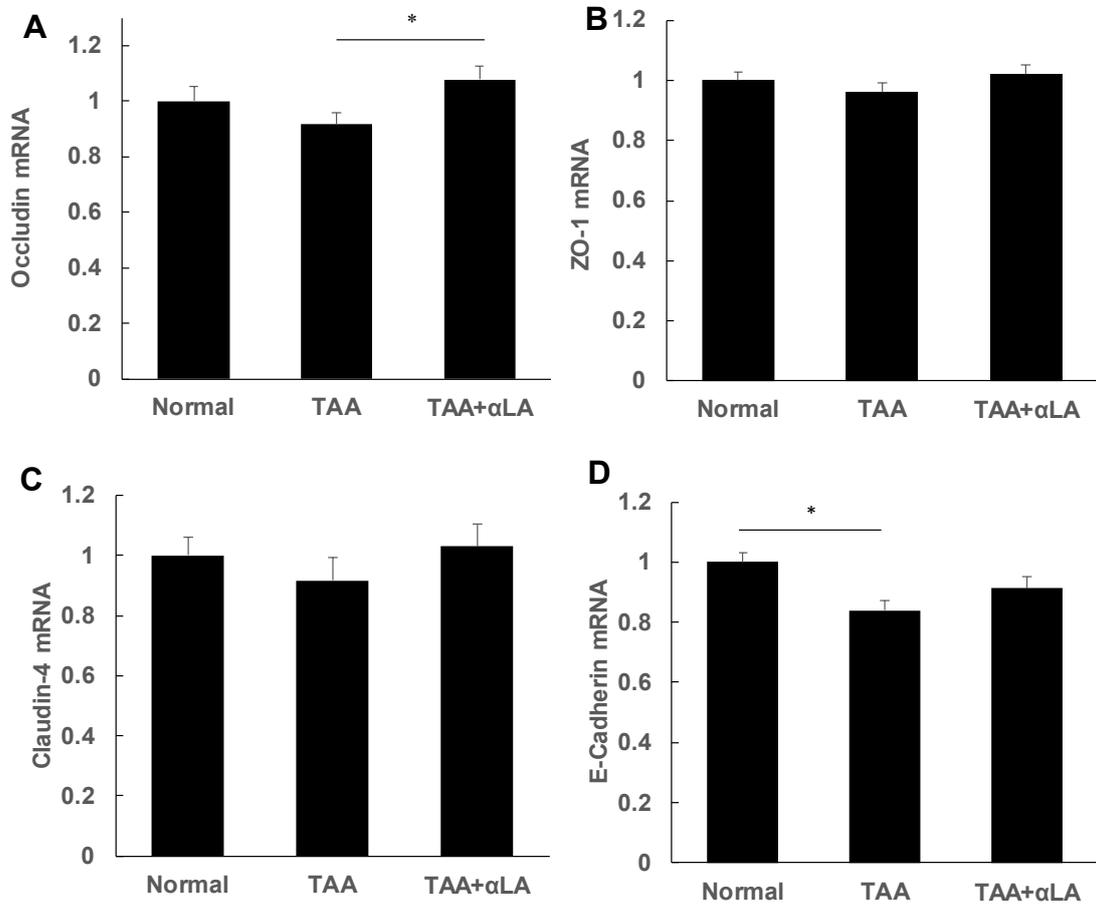


Fig. 3-5. Effects of dietary α LA on the mRNA levels of occludin (A), ZO-1(B), claudin-4 (C) and E-cadherin (D) in rat intestine tissues.

Rats were fed a standard AIN-93M diet or an α LA-enriched diet for 15 weeks. TAA was administered twice each week for 14 weeks. Intestine tissues were collected at 14 weeks after the first TAA injection. Each value is the mean \pm SEM (n = 15 in each group). * Significant difference from the TAA group (p < 0.05, respectively).

5. 小腸組織における病理変化に及ぼす α LA の影響

α LA の TAA 誘発腸肝軸不全に対する効果について、小腸組織のヘマトキシリンエオジン染色により評価した (Fig. 3-6)。小腸組織像において TAA 投与によって、小腸の絨毛が萎縮しており、粘膜下筋層径が短縮している像が確認された。一方、TAA + α LA 群では小腸の

絨毛の萎縮および筋層径の短縮が抑制された。

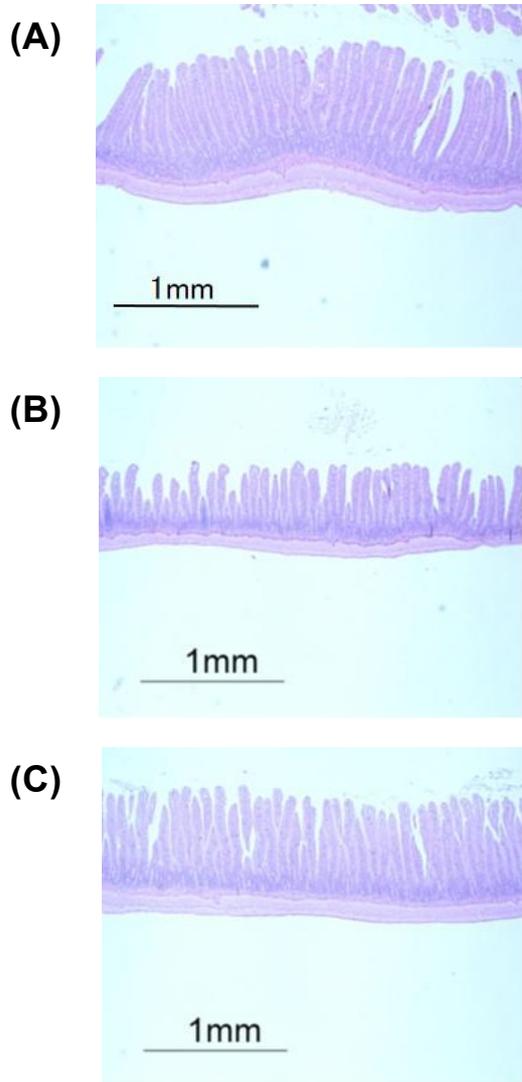


Fig. 3-6. Histopathological changes in intestine tissues.

The stained sections were examined at a magnification of 40 x. Representative intestine images are Normal (A), TAA group (B), and TAA+αLA group (C). The sections were stained with hematoxylin and eosin. TAA was administered twice each week for 14 weeks. Rats were sacrificed at 14 weeks after the first TAA injection.

第4節 考察

肝硬変は線維化と再生結節の形成を特徴とし、あらゆる慢性進行性肝疾患の終末像である。肝硬変のモデルとして TAA を使用した研究が行われており、天然由来成分や食品成分の有用性についても報告がなされている[117, 118]。ALT、AST は肝臓の炎症とともに上昇し、血中ヒアルロン酸は肝線維化のマーカーとして用いられる[119]。本試験において、TAA 群では血漿 ALT、AST、ヒアルロン酸が上昇したが、TAA+LA 群では ALT、AST、ヒアルロン酸の上昇が抑制された (Fig. 3-2)。また、肝臓の組織切片の結果、TAA 群では肝の線維化が観察されたが、TAA+LA 群では線維化が減少していた (Fig. 3-3)。これらの結果より、 α LA は TAA 誘発肝炎および肝線維化の進行を抑制したことが示唆された。

腸管上皮細胞は、細菌の侵入を防ぐ腸管バリアを形成している。TAA モデルでは肝硬変の発症とともに腸管バリアが破綻し、バクテリアルトランスロケーションが発生する[111, 120, 121]。腸管バリアが破綻すると細菌が血液中に侵入し、血中 LPS が増加する[122]。さらに LPS は、TNF α や IL-6 などの炎症性サイトカインの分泌を促進し、肝臓の炎症を惹起する[7]。本試験において血中 LPS 量を TAA+LA 群は TAA 群に比較して正常群より低い濃度にまで低減した (Fig. 3-4)。LPS の上昇を抑制することによって炎症性サイトカインの産生が抑制されることが示唆されている[123, 124]。また、これまでに第2章の LPS/ガラクトサミン誘発急性肝炎モデルに加えて、小腸虚血再灌流モデル[30]、デキストラン硫酸ナトリウム/アゾキシメタン誘発大腸癌モデル[60]において、 α LA によって TNF- α や IL-6 などの炎症性サイトカインの産生が抑制されることが報告されている。このことから α LA の直接的な炎症性サイトカイン産生抑制効果が本試験結果に寄与した可能性もあると考えられる。

タイトジャンクションとアドヘレンスジャンクションは細胞間接着構造であり、細胞間の透過性を制御している。小腸のタイトジャンクションバリアやアドヘレンスジャンクションバリアが破綻すると、身体に有害な物質が透過し、粘膜の免疫システムの脆弱化や炎症が起こり、最終的に腸疾患や全身疾患が生じる可能性がある[13]。主要なタイトジャンクションタンパクの一つである occludin の機能はまだ完全には明らかになっていないが、タイ

トジャンクション構造、小腸透過性において重要な役割を担っていることが動物や細胞を用いた試験において明らかになっている[125]。本試験において、タイトジャンクションとアドヘレンスジャンクションの RNA 量を測定した結果、TAA 群に比較して TAA+LA 群では occludin の mRNA 量が有意に高値であった (Fig. 3-5)。この結果より、 α LA は occludin の mRNA 発現を増加させることによって腸管バリア機能を維持している可能性が示唆された。COX-2 阻害薬であるセレコキシブが COX-2/プロスタグランジン E2/プロスタグランジン E2 レセプター-2/リン酸化 ERK を制御するメカニズムを介してタイトジャンクションに関与するタンパク質発現を亢進したことが報告されている[110]。 α LA は COX-2 阻害作用を持つことが明らかとなっていること[29]から、COX-2 阻害薬と同様のメカニズムを介して α LA がタイトジャンクションに関与するタンパク質の発現を増強した可能性も考えられる。 α LA のタイトジャンクションに対する影響について COX-2 阻害作用が関与しているかより詳しい検討が今後必要である。

小腸上皮組織において炎症が生じることによって絨毛径が短縮化することが報告されている[126]。TAA モデルにおいても炎症が生じることによって小腸の粘膜重量が減少すること[127]や、絨毛が短縮化すること[111]が明らかになっている。本試験においても、先の報告と一致して、TAA 群では絨毛が短縮化していたが、 α LA 投与により抑制されることが示された。

本試験では α LA を混餌投与したことから、消化吸収時に生じたペプチドやアミノ酸が結果に影響した可能性も考えられる。 α LA はトリプトファンやシステインを多く含有するタンパク質である[128]。本試験では、摂餌量よりトリプトファンおよびシステインの摂取量を計算すると、トリプトファン摂取量は TAA 群：24 mg/day、TAA+ α LA 群：61 mg/day、システイン摂取量は TAA 群：10 mg/day、TAA+ α LA 群：51 mg/day であった。Caco-2 細胞を用いた試験においてトリプトファンが電気抵抗値を上昇させたこと、ラットを用いた試験においてトリプトファンが小腸バリア機能を向上し、卵白アルブミン経口感作を抑制したことが報告されている[129]。Watanabe らはラットにトリプトファンを 10mg/day、10 週間経口投与することによって小腸バリア機能が向上したことを示している。本試験における

TAA 群のラット 1 匹あたりの平均食餌量、トリプトファン摂取量、システイン摂取量は、それぞれ 14.2 g/日、24 mg/日、10 mg/日であった。TAA+ α LA 群では、14.6 g/日、61 mg/日、51 mg/日であった。本試験では、TAA+ α LA 群のトリプトファン摂取量が TAA 群に比べて 37mg/日多かったことから、腸管バリア機能の改善に寄与したと考えられる。さらに、ブタを用いた試験において 0.25%L-システイン添加飼料の給餌により、NF- κ B および NF-E2 関連因子 2 (Nrf-2) のシグナル伝達経路を介して、LPS によって引き起こされる腸管バリア機能の低下が改善したことが示されている[130]。本研究では、システインの比率は、AIN-93M よりも α LA 含有飼料の方が 0.28%多かった。したがって、動物種による違いはあるもののシステインが多く含まれていることが腸管バリア機能維持に寄与した可能性がある。しかし、 α LA の構成成分であるこれらのアミノ酸が、本研究で認められた効果を説明することができるかは不明であり、更に詳細なメカニズムを解明するために α LA の酵素分解物の腸管バリア機能に対する影響について検討していくことが望ましいと考えられる。

本章により α LA が腸肝軸不全を改善し、腸管バリアの破綻および肝硬変を抑制することが明らかとなった。長期間の α LA 摂取は腸肝軸不全リスク低減に有用である可能性があることが示唆された。

総合的考察

第1章、第2章、第3章いずれにおいても薬剤による肝疾患惹起前に α LA混餌飼料を給与させることによって、急性肝炎、肝線維化を伴う慢性肝炎、腸肝軸機能不全に対して抑制効果を示すことを明らかにした。これらは肝疾患を発症する前の段階より α LAを摂取していることから、本研究では α LAの肝疾患予防効果を明らかにしたものとする。第1章ではマクロファージ細胞に α LAを作用させることによってLPSに対する応答性やマクロファージ分化能に関連する各種遺伝子の発現に変化が見られた。この結果より、動物試験の結果においても、肝疾患が発症する前から α LAを予防的に摂取することによってマクロファージ細胞の機能に変化が生じ肝疾患の発症・悪化を抑制することにつながったと考えられる。第2章ではDMN投与初日から6日後、13日後、20日後における肝炎指標のALT、ASTを測定した。6日目ではDMN群とDMN+ α LA群との間に有意差はなかったが、13日後、20日後では有意に抑制していることから発症後の肝障害の進展を α LAは遅らせていると考えられる。すなわち α LAの肝障害の進展を抑制する効果については期待することができる。

α LAの肝疾患治療効果については今後の検討課題であるとする。GalN/LPS急性肝炎モデルにおいて、GalN/LPS投与とほぼ同時に α LAを経口投与してその後の肝炎指標であるALT、ASTを測定した結果、 α LA投与群のALT、ASTの値は対照の水投与群と同等レベルで推移した(データ非表示)。この結果より、GalN/LPS急性肝炎モデルのような急激に肝障害が進行するようなモデルにおいては、発症と同時に α LAを摂取する条件では急性肝炎を抑制する効果は見られなかった。しかしながら、DMN惹起肝線維化モデル、TAA惹起腸肝軸不全モデルにおいては治療効果を検討した経験がないことから、比較的緩慢に肝障害が進行するモデルにおいて α LAに肝疾患治療効果があるのか検討する必要があるとする。

各種動物モデルにおける肝障害発症機序と α LAの肝障害抑制機序について以下に考察する。第1章で用いたGalN/LPS誘発急性肝炎モデルでは、LPSが肝マクロファージのTLR

4 に結合することによって TNF α が産生され、それがトリガーとなり肝臓の炎症が生じる [41]。さらに GalN は肝実質細胞中のヌクレオチドに結合し、アポトーシスを惹起するため、より炎症が悪化する状態となる [41]。 α LA は肝マクロファージに作用して M2 型への分化誘導、LPS に対する応答性改善に関与することによって炎症性サイトカイン産生を抑制し、急性肝炎の発症、悪化を抑制することが示唆された。第 2 章で用いた DMN は代謝産物がメチル化作用を示し、肝毒性や変異を引き起こす [96]。さらに DMN 誘発肝線維化ラットモデルは、門脈圧の亢進、腹水、組織学および生化学的な異常を起こすなどの特徴を有し、ヒトの肝線維化を反映する [97]。 α LA は NO 産生亢進による炎症性サイトカイン産生抑制、肝血流増進に関与することによって慢性肝炎、肝線維化の発症・悪化を抑制する可能性が示唆された。第 3 章で用いた TAA は生体内でモノオキシゲナーゼによる変換後に活性酸素種を産生し肝細胞壊死を引き起こす [131]。TAA 誘発肝硬変ラットモデルでは、小腸バリア破壊が生じ、それによりバクテリアトランスロケーションが起こる [111, 120] α LA は肝の炎症、線維化を抑制することにより、腸管バリアを維持し腸肝軸機能不全を改善すること、さらに腸管バリア機能の維持により血中 LPS を低く保ち、肝臓の炎症抑制に寄与することが示唆された。また高コレステロール血症治療薬であるシンバスタチンは TAA 処理ラット生存率を改善する作用があり、この作用は NO 阻害薬 L-NAME によって相殺されることから、NOS が保護的な役割を担っていることが示唆されている [131]。第 2 章において α LA は NO 産生を介して DMN 惹起肝線維化を抑制したことを示したが、第 3 章の TAA 投与モデルにおいても NO 産生を介した改善作用が影響した可能性が考えられる。

α LA はラットの十二指腸内に投与後、未分解の状態でも門脈血中より検出されたことが確認されている [30] が、さらに α LA の経口投与後に尾静脈から採取した末梢血中より α LA が検出されることを確認している (データ非表示)。この結果より、 α LA の一部は胃や腸での消化を免れて未分解の状態でも血液中に取り込まれることが示された。同試験において血漿中の α LA 濃度は約 250 ng/ml まで上昇することを確認しており、投与した α LA から算出すると投与後に血中に取り込まれる α LA の割合は約 0.0016% となる。しかしこの試験条件は単回投与であったため、日常的に混餌投与する場合は α LA の血中濃度や臓器蓄積量が

多い可能性はある。また α LAの分解されたあとのペプチドやアミノ酸が効果を示した可能性もある。ペプチドに関しては α LAから得られたペプチドが高い抗酸化能を示すことが報告されている[109]ことから、肝障害においてもペプチドが抗酸化能により改善作用を示した可能性が考えられる。 α LAはトリプトファンを多く含有することが特徴であるが、その他にもシステインや分岐鎖アミノ酸も多く含有する[31]。トリプトファンやシステインの摂取により小腸バリア機能が向上したこと[129, 130]、分岐鎖アミノ酸の摂取により肝障害が改善したこと[62]が報告されている。したがって、 α LAは肝障害の発症・悪化に予防的に作用するペプチド・アミノ酸から構成されるため、それらを効率的に摂取することができるタンパク質源であるとの考え方をすることもできる。

本研究では試験飼料中の7%を α LAに置換していた。これよりラットの体重を200gとして算出すると1日あたりの α LA摂取量は約7.0g/kgとなる。この値をヒトの摂取量に外挿すると7.0g/body摂取することになる。 α LAは牛乳中に240mg/200ml含有されており、ホエイタンパク質中には20%配合されている。プロテイン製品であるザバスホエイプロテインの1食分21g中にホエイプロテインは15.0g含まれる(<https://www.meiji.co.jp/sports/savas/products/bodymake/whey100.html>)。20%が α LAと換算すると3.0gとなり、この量を毎日摂ることは安全上問題ないと考えられる。本試験では α LAの投与量は1点のみであったため、さらに低い投与量でも肝障害抑制効果を示す可能性はあり、今後は α LAの有効用量についても検討することが課題であると考えられる。

本研究では α LAを予防的に摂取することによって急性肝炎、肝線維化、腸肝軸不全を抑制することができることを示した。本研究の成果は α LAの肝疾患発症予防のための食品開発における基礎的な知見を提供するものである。今後さらに α LAの活性本体を明らかにすること、肝疾患予防に加えて肝疾患治療効果についても明らかにすることができれば、医家向けサプリメントや治療薬としての開発に繋がることも期待される。

総括

肝臓は生体内最大の臓器であり、タンパクの合成、有害物質の解毒、胆汁の合成など多岐に渡る機能を有している。B型・C型肝炎ウイルス感染、多量・長期の飲酒、過栄養、自己免疫などにより肝炎が生じ、肝炎が持続すると線維化が生じ肝硬変になり、さらに進行すると肝細胞がんの発生率が高まる。したがって肝疾患を進展させる炎症や肝線維化を制御することは肝硬変や肝癌に対する防御にもつながるため重要である。

本研究では牛乳中のタンパク質に約4%含まれる α LAの機能性に着目して肝疾患に及ぼす影響を検討した。 α LAは未分解の状態では吸収されて生体内で生理機能を発揮すると考えられており、抗炎症作用を持つことが報告されている。これより、肝疾患に対しても機能性を発揮する可能性があると考え、 α LAの急性肝炎、慢性肝炎、肝線維化、腸肝軸の関係性に及ぼす影響について検討した。

第1章では、 α LAが炎症性サイトカイン産生を抑制することにより急性肝炎の発症、悪化を抑制することを明らかにした。急性肝炎抑制機序として、マクロファージにおけるM2型への分化誘導、LPSに対する応答性改善が関与する可能性が示唆された。

第2章では、 α LAがNO産生を介して慢性肝炎、肝線維化の発症、悪化を抑制することを明らかにした。NO産生亢進が炎症抑制、肝血流改善に寄与している可能性が示唆された。

第3章では、 α LAが肝炎、肝線維化を抑制することにより、腸管バリア機能を維持することを明らかにした。また、 α LAは腸管バリア機能の維持により血中LPSを低く保ち、肝臓の炎症抑制に寄与する可能性が示唆された。本結果より、 α LAが腸肝軸不全を改善することを明らかにした。

以上のように本研究では α LAを摂取することにより、急性肝炎、肝線維化、腸肝軸不全を抑制することができることを示した。本研究は α LAの肝疾患発症の予防のための食品開発における基礎的な知見を提供するものである。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、ご指導とご鞭撻を賜りました日本大学生物資源科学部食品生命学科食品生命機能学研究室 教授 細野 朗博士に心より厚く御礼申し上げます。また、本論文の作成にあたり、適切なお助言を賜りました日本大学生物資源科学部生命化学学科栄養生理化学研究室 教授 関 泰一郎博士、食品生命学科食品栄養学研究室 教授 長田 和美博士に深く感謝申し上げます。

社会人にして博士論文を作成する機会を与えていただき、多大なるご配慮をいただきました株式会社 明治 研究本部 管掌 伊藤 裕之博士、研究本部長 谷口 茂氏、栄養機能 G 参与 山地 健人博士、栄養開発部長 野間 晃幸博士に深く感謝申し上げます。本研究の遂行にあたり、研究計画の立案から論文執筆に至るまで多くのご指導をいただき、博士論文作成に際して深くご配慮いただきました山口 真博士に心より感謝申し上げます。また、実験を進めるにあたり、共同研究者としてご協力いただきました内田 勝幸博士、小林 おりえ氏、岩澤 佳織里氏、馬場 俊介氏をはじめとする株式会社 明治の関係者の皆様に深く感謝の意を表します。

最後に、論文執筆を進めるにあたり、温かく応援し、支えてくれた家族に心より感謝致します。

引用文献

1. 岡庭豊 (2016) 病気がみえる vol.1 消化器、メディックメディア. 東京.
2. 一般財団法人日本消化器病学会 (2019) 患者さんご家族のための肝硬変ガイド、Available from: https://www.jsgeorjp/guideline/disease/pdf/04_kankouhenpdf.
3. 一般社団法人日本肝臓学会 (2020) 肝臓病の理解のために 2020 年度版、Available from: https://www.jslorjp/lib/files/citizens/booklet/understanding_liver_diseasepdf.
4. Tateishi R, Uchino K, Fujiwara N, Takehara T, Okanoue T, Seike M, Yoshiji H, Yatsuhashi H, Shimizu M, Torimura T, et al (2019) A nationwide survey on non-B, non-C hepatocellular carcinoma in Japan: 2011-2015 update. J Gastroenterol, 54, 367-376.
5. 笹森齊, 高橋英孝, 中川高志, 松木隆央 (2015) 2014 年 人間ドック全国集計成績報告. 人間ドック (Ningen Dock), 30, 750-762.
6. Konturek PC, Harsch IA, Konturek K, Schink M, Konturek T, Neurath MF, Zopf Y (2018) Gut(-)Liver Axis: How Do Gut Bacteria Influence the Liver? Med Sci, 6.
7. Brandl K, Kumar V, Eckmann L (2017) Gut-liver axis at the frontier of host-microbial interactions. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 312, G413-g419.
8. Lu Y, Bao X, Sun T, Xu J, Zheng W, Shen P (2012) Triptolide attenuate the oxidative stress induced by LPS/D-GalN in mice. J Cell Biochem, 113, 1022-1033.
9. Usami M, Miyoshi M, Yamashita H (2015) Gut microbiota and host metabolism in liver cirrhosis. World J Gastroenterol, 21, 11597-11608.
10. Malaguarnera G, Giordano M, Nunnari G, Bertino G, Malaguarnera M (2014) Gut microbiota in alcoholic liver disease: pathogenetic role and therapeutic perspectives. World J Gastroenterol, 20, 16639-16648.
11. Bellot P, Frances R, Such J (2013) Pathological bacterial translocation in cirrhosis: pathophysiology, diagnosis and clinical implications. Liver Int, 33, 31-39.
12. Schwabe RF, Seki E, Brenner DA (2006) Toll-like receptor signaling in the liver.

- Gastroenterol, 130, 1886-1900.
13. Suzuki T (2013) Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions. Cell Mol Life Sci, 70, 631-659.
 14. Szabo G (2015) Gut-liver axis in alcoholic liver disease. Gastroenterol, 148, 30-36.
 15. 社団法人日本酪農乳業協会・牛乳乳製品健康科学委員会. 内藤周幸 (2009) 牛乳がわかる 50+3 問 牛乳と健康・ファクトブック. 東京.
 16. Kuper H, Tzonou A, Laggiou P, Mucci LA, Trichopoulos D, Stuver SO, Trichopoulou A (2000) Diet and hepatocellular carcinoma: a case-control study in Greece. Nutr Cancer, 38, 6-12.
 17. Talamini R, Polesel J, Montella M, Dal Maso L, Crispo A, Tommasi LG, Izzo F, Crovatto M, La Vecchia C, Franceschi S (2006) Food groups and risk of hepatocellular carcinoma: A multicenter case-control study in Italy. Int J Cancer, 119, 2916-2921.
 18. Walzem RL, Dillard CJ, German JB (2002) Whey components: millennia of evolution create functionalities for mammalian nutrition: what we know and what we may be overlooking. Crit Rev Food Sci Nutr, 42, 353-375.
 19. Xu R, Liu N, Xu X, Kong B (2011) Antioxidative effects of whey protein on peroxide-induced cytotoxicity. J Dairy Sci, 94, 3739-3746.
 20. Gad AS, Khadrawy YA, El-Nekeety AA, Mohamed SR, Hassan NS, Abdel-Wahhab MA (2011) Antioxidant activity and hepatoprotective effects of whey protein and Spirulina in rats. Nutrition, 27, 582-589.
 21. Iwamori T, Nukumi N, Itoh K, Kano K, Naito K, Kurohmaru M, Yamanouchi K, Tojo H (2010) Bacteriostatic activity of Whey Acidic Protein (WAP). J Vet Med Sci, 72, 621-625.
 22. Elattar G, Saleh Z, El-Shebini S, Farrag A, Zoheiry M, Hassanein A, El-Ghannam M, Shendy S, El-Dabaa E, Zahran N (2010) The use of whey protein concentrate in management of chronic hepatitis C virus - a pilot study. Arch Med Sci, 6, 748-755.
 23. Hakkak R, Korourian S, Ronis MJ, Johnston JM, Badger TM (2001) Dietary whey protein

- protects against azoxymethane-induced colon tumors in male rats. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 10, 555-558.
24. Pal S, Ellis V (2010) The chronic effects of whey proteins on blood pressure, vascular function, and inflammatory markers in overweight individuals. Obesity, 18, 1354-1359.
 25. Kloek J, Mortaz E, Van Ark I, Bloksma N, Garssen J, Nijkamp FP, Folkerts G (2011) A whey-based glutathione-enhancing diet decreases allergen-induced airway contraction in a guinea-pig model of asthma. Br J Nutr, 105, 1465-1470.
 26. Kume H, Okazaki K, Sasaki H (2006) Hepatoprotective effects of whey protein on D-galactosamine-induced hepatitis and liver fibrosis in rats. Biosci Biotechnol Biochem, 70, 1281-1285.
 27. Kume H, Okazaki K, Yamaji T, Sasaki H (2012) A newly designed enteral formula containing whey peptides and fermented milk product protects mice against concanavalin A-induced hepatitis by suppressing overproduction of inflammatory cytokines. Clin Nutr, 31, 283-289.
 28. Jobara K, Kaido T, Hori T, Iwaisako K, Endo K, Uchida Y, Uemoto S (2014) Whey-hydrolyzed peptide-enriched immunomodulating diet prevents progression of liver cirrhosis in rats. Nutrition, 30, 1195-1207.
 29. Yamaguchi M, Yoshida K, Uchida M (2009) Novel functions of bovine milk-derived alpha-lactalbumin: anti-nociceptive and anti-inflammatory activity caused by inhibiting cyclooxygenase-2 and phospholipase A2. Biol Pharm Bull, 32, 366-371.
 30. Yamaguchi M, Uchida M (2007) Alpha-lactalbumin suppresses interleukin-6 release after intestinal ischemia/reperfusion via nitric oxide in rats. Inflammopharmacology, 15, 43-47.
 31. 今井哲哉 (2007) ホエータンパク質の健康機能と利用. ミルクサイエンス, 55, 227-235.
 32. Nitta K, Sugai S (1989) The evolution of lysozyme and alpha-lactalbumin. Eur J Biochem, 182, 111-118.
 33. Acharya KR, Stuart DI, Walker NP, Lewis M, Phillips DC (1989) Refined structure of

- baboon alpha-lactalbumin at 1.7 Å resolution. Comparison with C-type lysozyme. J Mol Biol, 208, 99-127.
34. Hashida S, Ishikawa E, Nakamichi N, Sekino H (2002) Concentration of egg white lysozyme in the serum of healthy subjects after oral administration. Clin Exp Pharmacol Physiol, 29, 79-83.
 35. Wilhelm EA, Jesse CR, Roman SS, Nogueira CW, Savegnago L (2009) Hepatoprotective effect of 3-alkynyl selenophene on acute liver injury induced by D-galactosamine and lipopolysaccharide. Exp Mol Pathol, 87, 20-26.
 36. Hsu HY, Wen MH (2002) Lipopolysaccharide-mediated reactive oxygen species and signal transduction in the regulation of interleukin-1 gene expression. J Biol Chem, 277, 22131-22139.
 37. Goto S, Deguchi J, Nishio N, Nomura N, Funabashi H (2015) Hepatotoxicants induce cytokine imbalance in response to innate immune system. J Toxicol Sci, 40, 389-404.
 38. Stachlewitz RF, Seabra V, Bradford B, Bradham CA, Rusyn I, Germolec D, Thurman RG (1999) Glycine and uridine prevent D-galactosamine hepatotoxicity in the rat: role of Kupffer cells. Hepatology, 29, 737-745.
 39. Tiegs G, Wolter M, Wendel A (1989) Tumor necrosis factor is a terminal mediator in galactosamine/endotoxin-induced hepatitis in mice. Biochem Pharmacol, 38, 627-631.
 40. Oberholzer A, Oberholzer C, Bahjat FR, Edwards CK, 3rd, Moldawer LL (2001) Genetic determinants of lipopolysaccharide and D-galactosamine-mediated hepatocellular apoptosis and lethality. J Endotoxin Res, 7, 375-380.
 41. Maes M, Vinken M, Jaeschke H (2016) Experimental models of hepatotoxicity related to acute liver failure. Toxicol Appl Pharmacol, 290, 86-97.
 42. Auffray C, Sieweke MH, Geissmann F (2009) Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. Annu Rev Immunol, 27, 669-692.
 43. Gordon S, Taylor PR (2005) Monocyte and macrophage heterogeneity. Nat Rev Immunol,

- 5, 953-964.
44. Ginhoux F, Jung S (2014) Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. Nat Rev Immunol, 14, 392-404.
 45. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC, Jr. (1993) AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. J Nutr, 123, 1939-1951.
 46. Stahl EC, Haschak MJ, Popovic B, Brown BN (2018) Macrophages in the Aging Liver and Age-Related Liver Disease. Front Immunol, 9, 2795.
 47. Harris MA, Clark J, Ireland A, Lomax J, Ashburner M, Foulger R, Eilbeck K, Lewis S, Marshall B, Mungall C, et al (2004) The Gene Ontology (GO) database and informatics resource. Nucleic Acids Res, 32, D258-261.
 48. Inoue T, Horiai H, Aoki C, Kawamura I, Ota M, Mizuhara H, Tomoi M, Mutoh S (2003) Insulin-like growth factor-I prevents lethal acute liver failure induced by D-galactosamine and lipopolysaccharide in rats. In Vivo, 17, 293-299.
 49. Farghali H, Kgalalelo Kemelo M, Wojnarova L, Kutinova Canova N (2016) In vitro and in vivo experimental hepatotoxic models in liver research: applications to the assessment of potential hepatoprotective drugs. Physiol Res, 65, S417-s425.
 50. Yoshinari O, Shiojima Y, Igarashi K (2014) Hepatoprotective effect of germanium-containing Spirulina in rats with (D)-galactosamine- and lipopolysaccharide-induced hepatitis. Br J Nutr, 111, 135-140.
 51. Raish M, Ahmad A, Alkharfy KM, Ahamad SR, Mohsin K, Al-Jenoobi FI, Al-Mohizea AM, Ansari MA (2016) Hepatoprotective activity of Lepidium sativum seeds against D-galactosamine/lipopolysaccharide induced hepatotoxicity in animal model. BMC Complement Altern Med, 16, 501.
 52. Sayed RH, Khalil WK, Salem HA, Kenawy SA, El-Sayeh BM (2014) Sulforaphane increases the survival rate in rats with fulminant hepatic failure induced by D-

- galactosamine and lipopolysaccharide. Nutr Res, 34, 982-989.
53. Miyanaga K, Yoshioka T, Nakagawa H, Kitahara T, To H, Ichikawa N, Nakashima M, Nishida K, Nakamura J, Sasaki H (2008) Influence of murine hepatitis induced by D-(+)-galactosamine hydrochloride and lipopolysaccharide on gene expression of polyethylenimine/plasmid DNA polyplex. Biol Pharm Bull, 31, 1585-1589.
 54. Liu LM, Zhang JX, Luo J, Guo HX, Deng H, Chen JY, Sun SL (2008) A role of cell apoptosis in lipopolysaccharide (LPS)-induced nonlethal liver injury in D-galactosamine (D-GalN)-sensitized rats. Dig Dis Sci, 53, 1316-1324.
 55. Nakama T, Hirono S, Moriuchi A, Hasuike S, Nagata K, Hori T, Ido A, Hayashi K, Tsubouchi H (2001) Etoposide prevents apoptosis in mouse liver with D-galactosamine/lipopolysaccharide-induced fulminant hepatic failure resulting in reduction of lethality. Hepatology, 33, 1441-1450.
 56. Nowak M, Gaines GC, Rosenberg J, Minter R, Bahjat FR, Rectenwald J, MacKay SL, Edwards CK, 3rd, Moldawer LL (2000) LPS-induced liver injury in D-galactosamine-sensitized mice requires secreted TNF-alpha and the TNF-p55 receptor. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 278, R1202-1209.
 57. Remacle-Bonnet MM, Garrouste FL, Heller S, Andre F, Marvaldi JL, Pommier GJ (2000) Insulin-like growth factor-I protects colon cancer cells from death factor-induced apoptosis by potentiating tumor necrosis factor alpha-induced mitogen-activated protein kinase and nuclear factor kappaB signaling pathways. Cancer Res, 60, 2007-2017.
 58. Gonzalez-Teran B, Cortes JR, Manieri E, Matesanz N, Verdugo A, Rodriguez ME, Gonzalez-Rodriguez A, Valverde AM, Martin P, Davis RJ, Sabio G (2013) Eukaryotic elongation factor 2 controls TNF-alpha translation in LPS-induced hepatitis. J Clin Invest, 123, 164-178.
 59. Masaki T, Chiba S, Tatsukawa H, Yasuda T, Noguchi H, Seike M, Yoshimatsu H (2004) Adiponectin protects LPS-induced liver injury through modulation of TNF-alpha in KK-

- Ay obese mice. Hepatology, 40, 177-184.
60. Yamaguchi M, Takai S, Hosono A, Seki T (2014) Bovine milk-derived alpha-lactalbumin inhibits colon inflammation and carcinogenesis in azoxymethane and dextran sodium sulfate-treated mice. Biosci Biotechnol Biochem, 78, 672-679.
 61. Di Pierro F, Rossoni G (2013) An amino acids mixture improves the hepatotoxicity induced by acetaminophen in mice. J Amino Acids, 2013, 615754.
 62. Kitagawa T, Yokoyama Y, Kokuryo T, Nagino M (2013) Protective effects of branched-chain amino acids on hepatic ischemia-reperfusion-induced liver injury in rats: a direct attenuation of Kupffer cell activation. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 304, G346-355.
 63. Wang B, Ishihara M, Egashira Y, Ohta T, Sanada H (1999) Effects of various kinds of dietary amino acids on the hepatotoxic action of D-galactosamine in rats. Biosci Biotechnol Biochem, 63, 319-322.
 64. Miki H, Tokuhara K, Oishi M, Tanaka Y, Nakatake R, Ueyama Y, Kaibori M, Nishizawa M, Okumura T, Kon M (2017) Elental(R) amino acid component has protective effects on primary cultured hepatocytes and a rat model of acute liver injury. Nutr Res, 42, 71-84.
 65. Kimura T, Noguchi Y, Shikata N, Takahashi M (2009) Plasma amino acid analysis for diagnosis and amino acid-based metabolic networks. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 12, 49-53.
 66. Yoneda J, Andou A, Takehana K (2009) Regulatory roles of amino acids in immune response. Curr Rheumatol Rev, 5, 252-258.
 67. Dang CV, O'Donnell KA, Zeller KI, Nguyen T, Osthus RC, Li F (2006) The c-Myc target gene network. Semin Cancer Biol, 16, 253-264.
 68. Dang CV (1999) c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism. Mol Cell Biol, 19, 1-11.

69. Pello OM, De Pizzol M, Mirolo M, Soucek L, Zammataro L, Amabile A, Doni A, Nebuloni M, Swigart LB, Evan GI, et al (2012) Role of c-MYC in alternative activation of human macrophages and tumor-associated macrophage biology. Blood, 119, 411-421.
70. Francone OL, Royer L, Boucher G, Haghpassand M, Freeman A, Brees D, Aiello RJ (2005) Increased cholesterol deposition, expression of scavenger receptors, and response to chemotactic factors in Abca1-deficient macrophages. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 25, 1198-1205.
71. Koseki M, Hirano K, Masuda D, Ikegami C, Tanaka M, Ota A, Sandoval JC, Nakagawa-Toyama Y, Sato SB, Kobayashi T, et al (2007) Increased lipid rafts and accelerated lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha secretion in Abca1-deficient macrophages. J Lipid Res, 48, 299-306.
72. Yvan-Charvet L, Welch C, Pagler TA, Ranalletta M, Lamkanfi M, Han S, Ishibashi M, Li R, Wang N, Tall AR (2008) Increased inflammatory gene expression in ABC transporter-deficient macrophages: free cholesterol accumulation, increased signaling via toll-like receptors, and neutrophil infiltration of atherosclerotic lesions. Circulation, 118, 1837-1847.
73. Zhu X, Lee JY, Timmins JM, Brown JM, Boudyguina E, Mulya A, Gebre AK, Willingham MC, Hiltbold EM, Mishra N, et al (2008) Increased cellular free cholesterol in macrophage-specific Abca1 knock-out mice enhances pro-inflammatory response of macrophages. J Biol Chem, 283, 22930-22941.
74. Thompson PA, Gauthier KC, Varley AW, Kitchens RL (2010) ABCA1 promotes the efflux of bacterial LPS from macrophages and accelerates recovery from LPS-induced tolerance. J Lipid Res, 51, 2672-2685.
75. Veremeyko T, Yung AWY, Anthony DC, Strelakova T, Ponomarev ED (2018) Early Growth Response Gene-2 Is Essential for M1 and M2 Macrophage Activation and Plasticity by Modulation of the Transcription Factor CEBPbeta. Front Immunol, 9, 2515.

76. Johnson AR, Milner JJ, Makowski L (2012) The inflammation highway: metabolism accelerates inflammatory traffic in obesity. Immunol Rev, 249, 218-238.
77. Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, Taghadosi M, Esmaeili SA, Mardani F, Seifi B, Mohammadi A, Afshari JT, Sahebkar A (2018) Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. J Cell Physiol, 233, 6425-6440.
78. Takahashi S, Sakamaki M, Ferdousi F, Yoshida M, Demura M, Watanabe MM, Isoda H (2018) Ethanol Extract of *Aurantiochytrium mangrovei* 18W-13a Strain Possesses Anti-inflammatory Effects on Murine Macrophage RAW264 Cells. Front Physiol, 9, 1205.
79. Li S, Miao T, Sebastian M, Bhullar P, Ghaffari E, Liu M, Symonds AL, Wang P (2012) The transcription factors Egr2 and Egr3 are essential for the control of inflammation and antigen-induced proliferation of B and T cells. Immunity, 37, 685-696.
80. Cotter K, Stransky L, McGuire C, Forgac M (2015) Recent Insights into the Structure, Regulation, and Function of the V-ATPases. Trends Biochem Sci, 40, 611-622.
81. Murase M, Kawasaki T, Hakozaiki R, Sueyoshi T, Putri DDP, Kitai Y, Sato S, Ikawa M, Kawai T (2018) Intravesicular Acidification Regulates Lipopolysaccharide Inflammation and Tolerance through TLR4 Trafficking. J Immunol, 200, 2798-2808.
82. Xia Y, Liu N, Xie X, Bi G, Ba H, Li L, Zhang J, Deng X, Yao Y, Tang Z, et al (2019) The macrophage-specific V-ATPase subunit ATP6V0D2 restricts inflammasome activation and bacterial infection by facilitating autophagosome-lysosome fusion. Autophagy, 15, 960-975.
83. Hornung V, Barchet W, Schlee M, Hartmann G (2008) RNA recognition via TLR7 and TLR8. Handb Exp Pharmacol, 71-86.
84. Smits EL, Ponsaerts P, Berneman ZN, Van Tendeloo VF (2008) The use of TLR7 and TLR8 ligands for the enhancement of cancer immunotherapy. Oncologist, 13, 859-875.
85. Robertson RC, Guiheneuf F, Bahar B, Schmid M, Stengel DB, Fitzgerald GF, Ross RP, Stanton C (2015) The Anti-Inflammatory Effect of Algae-Derived Lipid Extracts on

- Lipopolysaccharide (LPS)-Stimulated Human THP-1 Macrophages. Mar Drugs, 13, 5402-5424.
86. Friedman SL (2008) Mechanisms of hepatic fibrogenesis. Gastroenterol, 134, 1655-1669.
87. Wallace K, Burt AD, Wright MC (2008) Liver fibrosis. Biochem J, 411, 1-18.
88. Friedman SL (1993) Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. The cellular basis of hepatic fibrosis. Mechanisms and treatment strategies. N Engl J Med, 328, 1828-1835.
89. Friedman SL (1997) Molecular mechanisms of hepatic fibrosis and principles of therapy. J Gastroenterol, 32, 424-430.
90. Rockey DC, Housset CN, Friedman SL (1993) Activation-dependent contractility of rat hepatic lipocytes in culture and in vivo. J Clin Invest, 92, 1795-1804.
91. Rockey DC, Chung JJ (1998) Reduced nitric oxide production by endothelial cells in cirrhotic rat liver: endothelial dysfunction in portal hypertension. Gastroenterol, 114, 344-351.
92. Roy SS, Mukherjee S, Ballard BR, Das SK (2016) Protection Against Dimethylbenz[a] Anthracene-Induced Breast Cancer in Female Rats by alpha-Lactalbumin. Int J Cancer Oncol, 3, 1-6.
93. Yamaguchi M, Takai S (2014) Chronic administration of bovine milk-derived alpha-lactalbumin improves glucose tolerance via enhancement of adiponectin in Goto-Kakizaki rats with type 2 diabetes. Biol Pharm Bull, 37, 404-408.
94. Ushida Y, Shimokawa Y, Toida T, Matsui H, Takase M (2007) Bovine alpha-lactalbumin stimulates mucus metabolism in gastric mucosa. J Dairy Sci, 90, 541-546.
95. Nakano S, Nagasawa T, Ijio T, Inada Y, Tamura T, Maruyama K, Kuroda J, Yamazaki Y, Kusama H, Shibata N (2008) Bezafibrate prevents hepatic stellate cell activation and fibrogenesis in a murine steatohepatitis model, and suppresses fibrogenic response induced by transforming growth factor-beta1 in a cultured stellate cell line. Hepatol Res,

- 38, 1026-1039.
96. Haggerty HG, Holsapple MP (1990) Role of metabolism in dimethylnitrosamine-induced immunosuppression: a review. Toxicology, 63, 1-23.
 97. George J, Rao KR, Stern R, Chandrakasan G (2001) Dimethylnitrosamine-induced liver injury in rats: the early deposition of collagen. Toxicology, 156, 129-138.
 98. Tung YT, Tang TY, Chen HL, Yang SH, Chong KY, Cheng WT, Chen CM (2014) Lactoferrin protects against chemical-induced rat liver fibrosis by inhibiting stellate cell activation. J Dairy Sci, 97, 3281-3291.
 99. Shin MO, Moon JO (2010) Effect of dietary supplementation of grape skin and seeds on liver fibrosis induced by dimethylnitrosamine in rats. Nutr Res Pract, 4, 369-374.
 100. Shin JW, Son JY, Oh SM, Han SH, Wang JH, Cho JH, Cho CK, Yoo HS, Lee YW, Lee MM, et al (2006) An herbal formula, CGX, exerts hepatotherapeutic effects on dimethylnitrosamine-induced chronic liver injury model in rats. World J Gastroenterol, 12, 6142-6148.
 101. Inami M, Fukushima A, Ueno T, Yamada T, Tsunemi A, Matsumoto Y, Fukuda N, Soma M, Moriyama M (2015) Reduction of Dimethylnitrosamine-Induced Liver Fibrosis by the Novel Gene Regulator PI Polyamide Targeting Transforming Growth Factor beta1 Gene. Biol Pharm Bull, 38, 1836-1842.
 102. Nagase S, Isobe H, Ayukawa K, Sakai H, Nawata H (1995) Inhibition of nitric oxide production increases dimethylnitrosamine-induced liver injury in rats. J Hepatol, 23, 601-604.
 103. Lukivskaya O, Lis R, Zwierz K, Buko V (2004) Effect of the nitric oxide donor and the nitric oxide synthase inhibitor on the liver of rats with chronic hepatitis induced by dimethylnitrosamine. Pol J Pharmacol, 56, 599-604.
 104. Amirtharaj GJ, Thangaraj TR, Kini A, Raghupathy V, Goel A, Eapen CE, Venkatraman A, Pulimood AB, Balasubramanian KA, Ramachandran A (2014) Acute liver injury induced

- by low dose dimethylnitrosamine alters mediators of hepatic vascular flow. Toxicol Reps, 1, 707-717.
105. McKim SE, Gabele E, Isayama F, Lambert JC, Tucker LM, Wheeler MD, Connor HD, Mason RP, Doll MA, Hein DW, Arteel GE (2003) Inducible nitric oxide synthase is required in alcohol-induced liver injury: studies with knockout mice. Gastroenterol, 125, 1834-1844.
 106. Matthews JR, Botting CH, Panico M, Morris HR, Hay RT (1996) Inhibition of NF-kappaB DNA binding by nitric oxide. Nucleic Acids Res, 24, 2236-2242.
 107. Peng HB, Libby P, Liao JK (1995) Induction and stabilization of I kappa B alpha by nitric oxide mediates inhibition of NF-kappa B. J Biol Chem, 270, 14214-14219.
 108. Wills PJ, Suresh V, Arun M, Asha VV (2006) Antiangiogenic effect of *Lygodium flexuosum* against N-nitrosodiethylamine-induced hepatotoxicity in rats. Chem Biol Interact, 164, 25-38.
 109. Hernandez-Ledesma B, Davalos A, Bartolome B, Amigo L (2005) Preparation of antioxidant enzymatic hydrolysates from alpha-lactalbumin and beta-lactoglobulin. Identification of active peptides by HPLC-MS/MS. J Agric Food Chem, 53, 588-593.
 110. Gao JH, Wen SL, Tong H, Wang CH, Yang WJ, Tang SH, Yan ZP, Tai Y, Ye C, Liu R, et al (2016) Inhibition of cyclooxygenase-2 alleviates liver cirrhosis via improvement of the dysfunctional gut-liver axis in rats. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 310, G962-972.
 111. Luo L, Zhou Z, Xue J, Wang Y, Zhang J, Cai X, Liu Y, Yang F (2018) Bletilla striata polysaccharide has a protective effect on intestinal epithelial barrier disruption in TAA-induced cirrhotic rats. Exp Ther Med, 16, 1715-1722.
 112. Zhao TY, Su LP, Ma CY, Zhai XH, Duan ZJ, Zhu Y, Zhao G, Li CY, Wang LX, Yang D (2015) IGF-1 decreases portal vein endotoxin via regulating intestinal tight junctions and plays a role in attenuating portal hypertension of cirrhotic rats. BMC gastroenterol, 15, 77.

113. Lorenzo-Zuniga V, Rodriguez-Ortigosa CM, Bartoli R, Martinez-Chantar ML, Martinez-Peralta L, Pardo A, Ojanguren I, Quiroga J, Planas R, Prieto J (2006) Insulin-like growth factor I improves intestinal barrier function in cirrhotic rats. Gut, 55, 1306-1312.
114. Hering NA, Andres S, Fromm A, van Tol EA, Amasheh M, Mankertz J, Fromm M, Schulzke JD (2011) Transforming growth factor-beta, a whey protein component, strengthens the intestinal barrier by upregulating claudin-4 in HT-29/B6 cells. J Nutr, 141, 783-789.
115. Kotler BM, Kerstetter JE, Insogna KL (2013) Claudins, dietary milk proteins, and intestinal barrier regulation. Nutr Rev, 71, 60-65.
116. Xiao K, Jiao L, Cao S, Song Z, Hu C, Han X (2016) Whey protein concentrate enhances intestinal integrity and influences transforming growth factor-beta1 and mitogen-activated protein kinase signalling pathways in piglets after lipopolysaccharide challenge. Br J Nutr, 115, 984-993.
117. Abdulaziz Bardi D, Halabi MF, Hassandarvish P, Rouhollahi E, Paydar M, Moghadamtousi SZ, Al-Wajeeh NS, Ablat A, Abdullah NA, Abdulla MA (2014) Andrographis paniculata leaf extract prevents thioacetamide-induced liver cirrhosis in rats. PloS one, 9, e109424.
118. Abramovitch S, Dahan-Bachar L, Sharvit E, Weisman Y, Ben Tov A, Brazowski E, Reif S (2011) Vitamin D inhibits proliferation and profibrotic marker expression in hepatic stellate cells and decreases thioacetamide-induced liver fibrosis in rats. Gut, 60, 1728-1737.
119. Khan JA, Khan FA, Dilawar M, Ijaz A, Khan NA, Mehmood T (2007) Serum hyaluronic acid as a marker of hepatic fibrosis. J Coll Physicians Surg Pak, 17, 323-326.
120. Harputluoglu MM, Demirel U, Gul M, Temel I, Gursoy S, Selcuk EB, Aladag M, Bilgic Y, Gunduz E, Seckin Y (2012) Effects of rifaximin on bacterial translocation in thioacetamide-induced liver injury in rats. Inflammation, 35, 1512-1517.

121. Harputluoglu MM, Demirel U, Karadag N, Temel I, Bayraktar M, Firat S, Karahan D, Aladag M, Alan H, Ates F, et al (2006) The effects of Gingko biloba, vitamin E and melatonin on bacterial translocation in thioacetamide-induced fulminant hepatic failure in rats. Acta Gastroenterol Belg, 69, 268-275.
122. Fukui H (2015) Gut-liver axis in liver cirrhosis: How to manage leaky gut and endotoxemia. World J Hepatol, 7, 425-442.
123. Czeslick E, Struppert A, Simm A, Sablotzki A (2006) E5564 (Eritoran) inhibits lipopolysaccharide-induced cytokine production in human blood monocytes. Inflamm Res, 55, 511-515.
124. Kawata T, Bristol JR, Rossignol DP, Rose JR, Kobayashi S, Yokohama H, Ishibashi A, Christ WJ, Katayama K, Yamatsu I, Kishi Y (1999) E5531, a synthetic non-toxic lipid A derivative blocks the immunobiological activities of lipopolysaccharide. Br J Pharmacol, 127, 853-862.
125. Al-Sadi R, Khatib K, Guo S, Ye D, Youssef M, Ma T (2011) Occludin regulates macromolecule flux across the intestinal epithelial tight junction barrier. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 300, G1054-1064.
126. Parker A, Vaux L, Patterson AM, Modasia A, Muraro D, Fletcher AG, Byrne HM, Maini PK, Watson AJM, Pin C (2019) Elevated apoptosis impairs epithelial cell turnover and shortens villi in TNF-driven intestinal inflammation. Cell Death Dis, 10, 108.
127. Ortega MA, Torres MI, Fernandez MI, Rios A, Sanchez-Pozo A, Gil A (1997) Hepatotoxic agent thioacetamide induces biochemical and histological alterations in rat small intestine. Dig Dis Sci, 42, 1715-1723.
128. Scrutton H, Carbonnier A, Cowen PJ, Harmer CJ (2007) Effects of alpha-lactalbumin on emotional processing in healthy women. J Psychopharmacol, 21, 519-524.
129. Watanabe J, Fukumoto K, Fukushi E, Sonoyama K, Kawabata J (2004) Isolation of tryptophan as an inhibitor of ovalbumin permeation and analysis of its suppressive effect

on oral sensitization. Biosci Biotechnol Biochem, 68, 59-65.

130. Song Z, Tong G, Xiao K, Jiao le F, Ke Y, Hu C (2016) L-cysteine protects intestinal integrity, attenuates intestinal inflammation and oxidant stress, and modulates NF-kappaB and Nrf2 pathways in weaned piglets after LPS challenge. Innate immun, 22, 152-161.
131. Tunon MJ, Alvarez M, Culebras JM, Gonzalez-Gallego J (2009) An overview of animal models for investigating the pathogenesis and therapeutic strategies in acute hepatic failure. World J Gastroenterol, 15, 3086-3098.