

平成26年度博士学位論文

高血圧および非アルコール性脂肪性肝炎に対する  
フィコシアニンの効果の検討

The effects of phycocyanin against hypertension and  
non-alcoholic steatohepatitis

D3212001

市村 真祐子

2015年3月

長崎県立大学大学院

人間健康科学研究科 栄養科学専攻

専攻分野 臨床栄養学  
指導教員 大曲 勝久 印

## 目 次

第1章 序論	-----1
第2章 フィコシアニンによる血圧上昇抑制作用の検討	
2-1. 緒言	-----7
2-2. 実験方法	-----8
2-3. 実験結果	-----18
2-4. 考察	-----21
2-5. 小括	-----24
第3章 NASH に対するフィコシアニンの効果の検討	
第1節 食事誘導性 NASH 線維化モデルの作成	
3-1-1. 緒言	-----25
3-1-2. 実験方法	-----26
3-1-3. 実験結果	-----36
3-1-4. 考察	-----43
第2節 食事誘導性 NASH 線維化モデルにおけるフィコシアニンの効果の検討	
3-2-1. 緒言	-----49
3-2-2. 実験方法	-----50
3-2-3. 実験結果	-----50
3-2-4. 考察	-----51
3-3. 小括	-----53
第4章 総括および結語	-----54
謝辞	-----57
参考文献	-----58

## 略語表記一覧

ABCG5, adenosine triphosphate-binding cassette transporter G5

ACh, acetylcholine chloride

AdipoR, adiponectin receptor (アディポネクチン受容体)

ALT, alanine aminotransferase (アラニンアミノトランスフェラーゼ)

AMPK, adenosine monophosphate-activated protein kinase

ANOVA, analysis of variance (分散分析)

AST, aspartate aminotransferase (アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ)

Ath diet, atherogenic diet (動脈硬化誘導食)

ATP, adenosine triphosphate (アデノシン 3 リン酸)

BAT, bile acid CoA :amino acid N-acyltransferase

BSA , bovine serum albumin (牛血清アルブミン)

BSEP, bile salt export pump

cDNA, complementary DNA

C/EBP $\alpha$ , CCAAT/enhancer binding protein  $\alpha$

cGMP, cyclic guanosine monophosphate

COL1A1, procollagen type I  $\alpha$  1

COL4A1, procollagen type IV  $\alpha$  1

CPT, carnitine palmitoyltransferase

CYP7A1, cytochrome P450 7A1

DG, diglyceride (ジグリセリド)

ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay

eNOS, endothelial nitric oxide synthase (内皮型一酸化窒素合成酵素)

FAS, fatty acid synthase (脂肪酸合成酵素)

FATP5, fatty acid transport protein 5

FC, free cholesterol (遊離型コレステロール)

FFA, free fatty acid (遊離脂肪酸)

FXR, farnesoid X receptor

G6PDH, glucose-6-phosphate dehydrogenase (グルコース 6 リン酸デヒドロゲナーゼ)

GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol (高密度リポタンパク質コレステロール)

HF, high fat diet (高脂肪食)

HFC1.25, high fat diet with 1.25% cholesterol (コレステロール 1.25% 添加高脂肪食)

HFC2.5, high fat diet with 2.5% cholesterol (コレステロール 2.5% 添加高脂肪食)

HMGCR, 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase

LDLR, low-density lipoprotein receptor (低密度リポタンパク質受容体)

L-NNA, nitro-L-arginine

LXR $\alpha$ , liver X receptor  $\alpha$

mRNA, messenger RNA

MRP2, multidrug resistance-associated protein 2

MTP, microsomal triglyceride transfer protein (ミクロソームトリグリセリド輸送タンパク質)

NADP, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate  
(酸化型ニコチナミドアデニンジヌクレオチドリン酸)

NADPH, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate  
(還元型ニコチナミドアデニンジヌクレオチドリン酸)

NAFLD, non-alcoholic fatty liver disease (非アルコール性脂肪肝疾患)

NAS, non-alcoholic fatty liver disease activity score

NASH, non-alcoholic steatohepatitis (非アルコール性脂肪性肝炎)

NO, nitric oxide (一酸化窒素)

Pap, papaverine hydrochloride

PAP, phosphatidate phosphohydrolase (ホスファチジン酸ホスホヒドロラーゼ)

PCR, polymerase chain reaction

PE, L-phenylephrine

SD, Sprague-Dawley

SE, standard error (標準誤差)

sGC, soluble guanylyl cyclase (可溶性グアニル酸シクラーゼ)

SHR/NDmcr-cp, spontaneously hypertensive/NIH-corpulent

SHRSP/ZF, stroke-prone spontaneously hypertensive/IzmDmcr-fa

SNP, sodium nitroprusside

SREBP, sterol regulatory element binding protein (ステロール調節配列結合タンパク質)

TBS, Tris-buffered saline

TC, total cholesterol (総コレステロール)

TG, triglyceride (トリグリセリド)

TGF- $\beta$ 1, transforming growth factor  $\beta$ 1

VLDL, very low-density lipoprotein (超低密度リポタンパク質)

本文 72 枚 (表紙・目次を含む)

図 16 枚 (Figure 1-1, Figure 2-1~2-9 および Figure 3-1~3-11)

表 20 枚 (Table 2-1~2-9 および Table 3-1~3-11)

## 第1章

### 序論

近年、高脂肪食などの食生活や運動不足といった生活習慣が原因となり、肥満をはじめ高血圧、糖尿病、脂質異常症などに代表される生活習慣病や、それらが併発したメタボリックシンドロームの罹患者数が急増している。また、肝臓におけるメタボリックシンドロームの表現型とされる非アルコール性脂肪肝疾患（non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD）や、そのうち重症型に分類される非アルコール性脂肪性肝炎（non-alcoholic steatohepatitis, NASH）も増加の一途をたどっている。これらの予防および治療には薬物療法のみならず、生活習慣の是正を促す栄養療法あるいは運動療法が重視されるが、継続的な生活習慣の改善は容易でない。このような現状に対し、機能性食品の利用は生活習慣病の予防および治療をサポートする有用なツールであると考えられる。特に、肥満を背景とした種々の生活習慣病の病態進展には、脂肪組織から分泌される生理活性物質であるアディポネクチンの低下が関与していると考えられており、アディポネクチンを特異的に増加させる作用を有する機能性成分は肥満に伴う関連疾患に対する有力な治療手段の一つとなる可能性がある。本章では本研究の背景として文献や諸資料に基づいて論考し、次章の実験研究の位置付けや背景・目的を明確にするとともに、論文で用いる主な用語を定義する。研究背景として、まず生活習慣病およびメタボリックシンドロームについて、特に高血圧と NASH に焦点を当てて概説する。また、生活習慣病の予防および治療には病態の原因解明とそれに立脚した対策を講じることの重要性を指摘し、高血圧、NASH ならびにメタボリックシンドロームの原因や発症機序に言及する。さらに、機能性食品の利用について生活習慣病の予防だけでなく治療に活用することを提言し、メタボリックシンドロームに付随した病態の抑制効果を期待される機能性素材としてフィコシアニンを挙げ、その効果を検証する必要性を説明する。併せて、生活習慣病に対する機能性成分の薬効評価を検証する際の適切な病態モデル動物を示す。

生活習慣病とは「食習慣、運動習慣、休養、喫煙、飲酒などの生活習慣が、その発症・進行に関与する疾患群」であり、肥満、高血圧、糖尿病、脂質異常症、肝臓病、虚血性心疾患および悪性新生物などが含まれる<sup>1)</sup>。近年、過食および高脂肪食などの食生活や運動不足など生活様式の変化に呼応して、わが国における生活習慣病患者数は増加の一途をたどり、生活習慣病である悪性新生物、心血管疾患および脳血管疾患による死亡数は死因の半数を占める<sup>2)</sup>。2012年の日本人間ドック学会の全国集計では、受診者約315万人の異常所見の中で最も多いものが肝機能障害(32.4%)であり、高コレステロール血症(31.5%)、肥満(29.3%)、耐糖能異常(22.8%)、高血圧(21.9%)と続いており、受診者の中で異常なしの割合はわずか7.2%にすぎない<sup>3)</sup>。また、高血圧、糖尿病および脂質異常症は罹患者数が多いことに加え、単独で心筋梗塞や脳梗塞などの動脈硬化性疾患の危険因子となるため注目されている。さらに、腹腔内に過剰に脂肪が蓄積する内臓脂肪型肥満とそれによって

生じるインスリン抵抗性を共通の基盤として、それらの疾患は互いに合併しやすく、動脈硬化性疾患の発症リスクは相乗的に高まることが明らかとなった<sup>4)</sup>。このような動脈硬化の危険因子が一個人に集積した状態は“メタボリックシンドローム”という疾患概念として提唱された。2005年にわが国独自のメタボリックシンドロームの診断基準が策定され<sup>5)</sup>、2008年からは特定健康診査・特定保健指導が実施されるようになり、動脈硬化の高リスク群を的確に抽出し、早期より生活習慣の改善を中心とした予防・治療の介入を行っていく試みが始まった。

生活習慣病のうち高血圧は心血管病（心疾患および脳血管疾患）の最大の危険因子といっても過言ではない。わが国のコホート研究において、全心血管病死亡の50%が至適血圧（収縮期血圧120 mmHg未満かつ拡張期血圧80 mmHg未満）を超える血圧高値に起因するものと評価されている<sup>6)</sup>。血圧を上昇させる環境因子として食塩の摂取過剰や喫煙、肥満、ストレスなどが挙げられ、それらが原因となって交感神経系の亢進、ナトリウム再吸収の増加、レニン-アンジオテンシン系の活性化および血管内皮機能障害などが生じ、高血圧を発症させる<sup>7)</sup>。血管内皮機能障害とは、血管の最も内層に位置する内皮細胞において産生・分泌される生理活性物質である血管弛緩因子ならびに血管収縮因子の不均衡が生じた状態であり、血管の“内皮依存性弛緩反応”の低下に特徴づけられる<sup>8)</sup>。代表的な内皮由来弛緩因子は内皮型一酸化窒素合成酵素（endothelial nitric oxide synthase, eNOS）によって産生される一酸化窒素（nitric oxide, NO）で、平滑筋細胞に取り込まれて可溶性グアニル酸シクラーゼ（soluble guanylyl cyclase, sGC）を活性化し、セカンドメッセンジャーである cyclic guanosine monophosphate（cGMP）を産生することで血管弛緩を促す<sup>9)</sup>。よって、eNOSタンパク質の発現低下あるいはNO産生能（eNOS活性）の低下が内皮依存性弛緩反応を減弱する一因となる<sup>10)</sup>。高血圧あるいはメタボリックシンドロームを呈する動物モデルにおいては、eNOSの発現および活性の低下が認められ、内皮依存性弛緩反応が減弱していることが明らかとなっている<sup>11,12)</sup>。高血圧と内皮機能障害の因果関係に関しては未だ議論の余地があるものの、血管内皮機能の低下は高血圧発症の独立した危険因子であるという報告から<sup>13)</sup>、内皮機能障害の改善は高血圧の予防および治療における標的になりうると考えられる。さらに、メタボリックシンドローム患者の増加から推察されるように肥満を伴う高血圧患者が増加しており<sup>14,15)</sup>、高血圧の予防および治療方法も肥満対策を包含したものへと改変する必要がある。

生活習慣に起因して発症する主要な肝臓病は肝臓に過剰のトリグリセリド（triglyceride, TG）が蓄積する脂肪肝であり、健診における肝機能障害の大部分を占める<sup>16)</sup>。そのうち肝障害を惹起する明らかな飲酒歴がないにもかかわらず、肝組織学的所見はアルコール性肝障害に類似した主に脂肪沈着を特徴とする肝障害をNAFLDと総称する<sup>17)</sup>。NAFLD患者は健常者に比較して肥満などの生活習慣病の合併頻度が高く、NAFLDはメタボリックシンドロームの肝臓における表現型とみなされており、今後ますます増加することが予想される<sup>17,18)</sup>。NAFLDは肝細胞の脂肪沈着のみによる可逆的で予後良好な慢性疾患（単純性脂肪肝）と捉えられていたが、NAFLDの10~20%は炎症や

線維化を伴う NASH に進展し、肝硬変や肝臓など致死的な疾患に至る可能性があることが明らかとなっている<sup>17,19)</sup>。しかし、単純性脂肪肝から NASH へ進展する機序は十分に解明されておらず、そのため特効薬を含む治療法は確立していないのが現状である。現在考えられている NASH の発症機序としては Day らが提唱した“two hit theory”が広く受け入れられている<sup>20)</sup>。すなわち、第一段階で肥満やインスリン抵抗性を背景とし、食事由来の脂肪あるいは脂肪組織由来の脂肪酸の肝臓への流入の増加により脂肪肝が形成され (first hit)、そこに第二段階で炎症性サイトカインや、酸化ストレス、エンドトキシンなどの肝細胞障害因子が加わり (second hit)、炎症や肝細胞の変性および壊死が生じ脂肪性肝炎が成立するという説である。一方、NASH を含む NAFLD では観察期間 3～14 年で 30～50%の症例で線維化進展が認められるとの報告があるが<sup>21)</sup>、肝線維化進展に寄与する因子についても未解明な点が多い。NASH において肝線維化進展例に発癌などを含む肝疾患関連死が多いという報告を踏まえると<sup>22,23)</sup>、線維化進展抑制を標的とした NASH の進展予防方法を開発することは喫緊の課題といえる。

以上より、著者は種々の生活習慣病患者の増加ならびにその克服はわが国における社会的問題であると捉え、生活習慣病の予防および治療法を追究する必要性を考えた。疾患の発症・進展を抑制するためには、その病態の原因解明とそれに立脚した予防・治療法を実施することが極めて重要である。すなわち、生活習慣病の予防・治療においては原因となる生活習慣の改善が不可欠である。したがって、メタボリックシンドロームあるいは肥満を背景とする生活習慣病には、栄養療法および運動療法によって成因の最上流に位置する肥満の是正を行うことが原因に基づいた治療法となる。しかし、長期間にわたる継続的な生活習慣の修正は決して容易ではない。特効薬のない NASH に対する治療を例に挙げると、現状では専ら肥満の是正を目標とした栄養療法および運動療法を組み合わせ、それに加えて合併症の改善のため、糖代謝改善薬や脂質代謝改善薬、抗酸化剤および抗肥満薬を用いた薬物療法が行われている<sup>24)</sup>。2010 年には NASH 患者に生活習慣の介入を行った初めての無作為化比較試験が報告され、1 年間に初期体重の 7～10%の減量の達成により肝臓における脂肪沈着だけでなく炎症像も改善することが明らかとなった<sup>25)</sup>。この NASH の改善には栄養士や健康指導士、ケースマネジャーなどによる 1～2 週間毎の面談を通じた厳格な食事・運動・行動療法が功を奏したと考えられる。その一方で、食事の変化による急激な体重減少は NAFLD 患者で肝不全をもたらすことや<sup>24)</sup>、動物を用いた実験では脂質摂取量の低下に伴う糖質摂取量の増加により、肝組織所見の増悪が生じるという報告も多い<sup>26)</sup>。以上を踏まえると、生活習慣病に対して生活習慣の介入のみの予防・治療法では指導者および患者双方の負担はかなり大きくなると考えられる。著者はこの問題の解決策として、栄養療法や運動療法による予防・治療をサポートする薬物療法あるいはそれに代わる機能性食品などの利用を提言する。

“機能性食品”とは食品中に含まれる生体防御や疾病の予防や回復、体調リズムの調節などの生体調節機能を有する成分を用いてつくられる健康増進食品を指し、世界に先駆けてわが国で定義さ



れた概念である<sup>27,28)</sup>。その中でも科学的証拠に基づいた有効性、安全性および適正な保健機能の提示がなされたものは“特定保健用食品”として認可されており、生活習慣病のリスクを低減化することを目指す食品として、広く認知されている<sup>29)</sup>。現行では食品の表示では病名や予防・治療効果などを表示することは許されていないが、著者は機能性食品の新たな一面として疾患の境界域病態の進展予防目的、あるいは治療を補完する目的での利用も推奨すべきであると考えている。なぜなら、機能性食品は複数の異なる機能性を併せ持つ成分、あるいは複数の機能性素材の組み合わせによる機能性の相加・相乗効果を備えることによって、多くの機能異常を合併した病態であるメタボリックシンドロームやNASHなどには、特にその作用を発揮することが期待できるためである。

メタボリックシンドロームを含む肥満を伴う生活習慣病の予防および治療を念頭に置いた機能性食品の開発にあたり、著者は治療標的として肥満に伴って低下することが知られるアディポネクチンおよびアディポネクチン受容体に着目した。アディポネクチンはインスリン感受性が良好な小型脂肪細胞で発現の亢進がみられる分泌タンパク質である<sup>30,31)</sup>。アディポネクチン一因子の低下あるいは欠損は、インスリン抵抗性や脂質代謝異常<sup>31)</sup>、高血圧<sup>32)</sup>などの生活習慣病病態を惹起することが報告されている。また、肝臓や骨格筋、血管壁などにみられるアディポネクチン受容体 (adiponectin receptor, AdipoR) も肥満に伴ってその発現が低下することが明らかとなっており、AdipoR 発現量がアディポネクチン感受性制御に重要な役割を果たしていることが示唆されている<sup>33,34)</sup>。一方、肥満によって低下するアディポネクチンを補充あるいは AdipoR の発現量をアディポネクチン存在下で増加させることは、インスリン抵抗性や脂質異常症<sup>30,31)</sup>、高血圧<sup>34,35)</sup>を改善することが動物実験において明らかにされている。このような報告から脂肪細胞の小型化やアディポネクチン/AdipoR 経路の活性を増加させることを目的とし、エネルギー制限による栄養療法のほかに、既に臨床エビデンスが存在する薬剤である糖尿病治療薬チアゾリジン誘導体ならびに降圧薬アンジオテンシン変換酵素阻害薬などに血中アディポネクチンを増加させる作用が見出されており、その効果が期待されている<sup>36)</sup>。また、肥満を伴う生活習慣病に対する効果的な治療手段となりうるアディポネクチンおよび受容体を増加させる機能性成分を探索し、早急な機能性評価とエビデンスの蓄積が望まれる。

著者は生活習慣病の予防・治療を期待する新規機能性成分としてフィコシアニン (phycocyanin) に注目している。フィコシアニンは藍藻類 *Arthrospira platensis* や *A. maxima* (通称スピルリナ、以下、*Spirulina platensis* および *Spirulina maxima* と表記) から抽出される青色色素で、食品用天然着色料として氷菓類などに用いられている<sup>37)</sup>。*Spirulina platensis* および *Spirulina maxima* はアフリカや中米などの高温水・強い太陽光線・強アルカリ条件下の湖で自生し、高含量のタンパク質に加えてビタミン、ミネラルおよびカロテノイドが豊富なことから千年以上も前から食用とされてきた<sup>38,39)</sup>。今日では *Spirulina platensis* および *Spirulina maxima* が有する抗酸化作用、抗炎症作用<sup>40)</sup>、自然免疫賦活作用<sup>38)</sup>、および血圧低下作用<sup>39)</sup>などが注目され、健康食品としても利用されている。

*Spirulina platensis* および *Spirulina maxima* に含まれる色素タンパク質の 1 つであるフィコシアニンは開環テトラピロール骨格をもつフィコシアノビルリンとアポタンパク質が結合した構造で、フィコシアノビルリン部分が生体内における活性酸素種の捕捉作用が確認されているビリルビンと構造が類似していることから抗酸化能があるとされる (Figure 1-1) <sup>41-43</sup>). また、フィコシアニンは抗炎症作用 <sup>44</sup>), 抗癌作用 <sup>45</sup>), コレステロール低下作用 <sup>46</sup>), 肝障害抑制作用 <sup>47-49</sup>), 血小板抗凝集作用 <sup>50</sup>), 抗動脈硬化作用 <sup>51</sup>) など多くの作用を有することが報告されている。メタボリックシンドロームあるいは生活習慣病は、食事因子やアディポサイトカインなどの多因子が関与し合って発症することから、多面的な機能性を有するフィコシアニンのような成分にこそ複雑な病態を改善する可能性を著者は考えている。生活習慣病の予防あるいは治療成分として機能性成分を食品に添加することを視野に入れた場合、既に食品用天然着色料として用いられている青色色素フィコシアニンは比較的汎用性の高い素材であると考えられる。しかし、メタボリックシンドロームやその構成病態の予防や治療を目的としたフィコシアニン投与実験についての報告は乏しく、その作用機序も未解明の部分が多い。よって、疾患予防あるいは治療を目的とした機能性成分としてフィコシアニンを用いるためには、作用機序の解明を含む機能性の証明が不可欠である。

生体における疾患に対する薬効の評価には病態モデル動物が用いられることが多い。病態モデル動物はヒトにおける疾患の病態を表現型として備えることが大前提であり、それに加えて研究に用いる際には目的に合わせてヒトの病因と動物モデルの発症機序の近似性を考慮する必要がある。種々の生活習慣病病態モデル動物が開発される中、NASH モデルにおいては臨床診断基準である肝組織学的特徴とヒトの NASH における全身病態を完全に呈する動物モデルは少なく <sup>52</sup>), このことが NASH の病態解明や治療法の開発の大きな障害ともなっている。特に実験動物として高頻度に用いられる齧歯類において、NASH の肝組織学的所見の 1 つである線維化病変は生じにくく、線維化を発症させるために動物の遺伝子操作、肝毒性物質の投与、経胃あるいは経腸ルートによる高カロリー負荷、あるいはメチオニンおよびコリンを欠乏させた食餌を投与する手法が用いられている <sup>52,53</sup>)。これらのモデルは短期間で肝線維化を発症するため薬効などを評価する研究で多用されているものの、生活習慣に起因して発症する NASH の病態を考慮すると、動物の遺伝子操作や肝毒性物質の投与、あるいはヒトが通常摂取する食事には当てはまらない投与方法および食餌成分などの手法を用いて、NASH やそれ以降のステージである肝硬変などを誘導することはヒトの NASH 病因を正しく反映しているとはいえない。以上より、NASH の治療薬の開発のため、ヒト NASH 病因・病態に近似した NASH 動物モデルを確立することは必要であると考えられる。著者は特に線維化進展の抑止の検討に適切な高度な線維化を伴う NASH モデルの必要性を指摘する。また、齧歯類において長期間を要する肝線維化への進展を、短期間で生じさせることも有用な病態モデルの基本的条件であると考えられる。

上記背景を踏まえ、本研究では機能性食品を用いて生活習慣病を予防および治療することを念頭

に置き、メタボリックシンドロームならびにそれに付随した病態のうち、特に高血圧および NASH に対し、多様な効果を発揮することが期待されるフィコシアニンの効果を病態モデル動物を用いて検証することを目的とした。第 2 章では、高血圧に対するフィコシアニンの効果の検討を目的とし、高血圧を自然発症するメタボリックシンドロームモデル動物を用いてフィコシアニンによる血圧低下作用ならびに作用機序を検討した。第 3 章では、NASH に対するフィコシアニンの効果を検討することを目的とした。第 1 節では、NASH に対する治療薬および機能性食品開発研究に用いることができる、ヒト NASH に病因が近似し、かつ線維化性病変を呈する食餌誘導性 NASH 齧歯類モデルの作成を試みた。第 2 節では、作成した新規 NASH 線維化モデルを用い、フィコシアニンによる NASH の発症抑制効果を検討し、第 4 章を総括とした。

## 第2章

### フィコシアニンによる血圧上昇抑制作用の検討

#### 2-1. 緒言

高血圧と血管内皮機能障害の関連から、内皮機能を良好に保ち血管の弛緩性を維持することは血圧上昇を抑制するための1つの方法論であると考えられる。また、メタボリックシンドロームなどの肥満を背景とした高血圧において、アディポネクチンの低下はその病態の形成に寄与することが推察されており<sup>32,54)</sup>、動物モデルにおいて、アディポネクチンの補充によって高血圧の改善がみられることも報告されている<sup>35)</sup>。その機序として、アディポネクチンの血管壁に対する直接的な作用が示唆されている。すなわち、内皮細胞のアディポネクチン受容体下流の adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) の活性化を介した eNOS の活性化、あるいは eNOS の転写活性化を介し、NO の産生増加による内皮依存性弛緩反応の改善作用が明らかとなっている<sup>35,55)</sup>。これより、アディポネクチンおよびその受容体 AdipoR を増加させることは内皮機能障害ならびに高血圧に対する治療標的となると考えられる。

フィコシアニンは食品用天然着色料として用いられている青色色素であり、*Spirulina platensis* および *Spirulina maxima* から抽出される。フィコシアニンは抗酸化作用をはじめとした多様な機能性を有し<sup>42,43)</sup>、メタボリックシンドロームおよびそれに付随した病態に対し多面的な効果を示すことで病態を改善する可能性が考えられる。Torres-Duran らの研究グループは、ヒトにおいて *Spirulina maxima* の経口摂取は降圧効果をもたらすことを報告している<sup>39)</sup>。また、同グループは *Spirulina maxima* を摂取したラットの摘出動脈における内皮依存性弛緩反応の改善を確認している<sup>56)</sup>。しかし、降圧作用に関与する *Spirulina maxima* の有効成分は不明である。著者はフィコシアニンの色素部分であるフィコシアノビルンが血管内皮細胞における酸化ストレス軽減を介して動脈硬化改善作用を示すという報告から<sup>51)</sup>、*Spirulina maxima* の一成分であるフィコシアニンが降圧効果の一端を担っていると仮説を立てた。

本章では、高血圧に対するフィコシアニンの摂取による効果の検討ならびに作用機序の解明を目的とし、病態モデル動物を用いたフィコシアニン投与実験を行った。本実験では高血圧を自然発症する遺伝的背景に過食による肥満形質が加わることでメタボリックシンドローム様病態を発症する2種類の動物モデル、spontaneously hypertensive/NIH-corpulent (SHR/NDmcr-cp) ラットおよび stroke-prone SHR/IzmDmcr-fa (SHRSP/ZF) ラットを用いた。SHR/NDmcr-cp ラットおよび SHRSP/ZF ラットはともにレプチン受容体遺伝子にナンセンス変異を持つことから過食を生じ、6週齢で既に非肥満同胞に比較して有意な高体重、高血圧を呈する<sup>57-60)</sup>。加齢とともに、高血糖、高インスリン

血症，高TG血症および高コレステロール血症といった様々な代謝異常をはじめ，肝臓では脂肪肝およびNASHの発症<sup>59,61-63</sup>，腎臓では糖尿病性病変を示し<sup>57</sup>，幅広いメタボリックシンドローム病態を観察できるモデル動物である．また，SHRSP/ZFラットに高脂肪・高コレステロール食（20%パーム油，5%コレステロールおよび2%コール酸を含む）を負荷すると，腸間膜動脈において初期動脈硬化病変である脂肪沈着を生じる<sup>64</sup>．一方，同じ食餌を負荷したSHR/NDmcr-cpラットはSHRSP/ZFラットと同様に肥満および血中コレステロール高値を呈するにもかかわらず，動脈における脂肪沈着はほとんど認められない．齧歯類は通常，動脈硬化病変の形成に対して抵抗性を有しているため，SHRSP/ZFラットは動脈硬化性疾患研究に使用可能な動物モデルであると考えられる<sup>64</sup>．本実験では，はじめにSHR/NDmcr-cpラットにフィコシアニンを長期摂取させ，高血圧をはじめメタボリックシンドロームの全身病態に対する効果を検討した．次に，SHRSP/ZFラットが高血圧を呈するとともに動脈脂肪沈着に対して高い感受性を有するという特性に着目し，特に動脈硬化などの血管病変に焦点を当ててフィコシアニンの作用を検証した．

## 2-2. 実験方法

### 1. 動物モデルおよび実験デザイン

9週齢雄性SHR/NDmcr-cpラット28匹および8週齢雄性SHRSP/ZFラット18匹（日本SLC，静岡）を購入し，初めの1週間は普通飼料（MF；オリエンタル酵母工業，東京）を摂取させ飼育環境に順化させた．MFはラットの中長期の飼育を念頭においた配合飼料である．SHR/NDmcr-cpラットは順化後の10週齢時から，普通飼料（MF）を摂取させたControl群，ならびに普通飼料にフィコシアニン0.25%，0.5%および1.0%を添加した食餌を摂取させたLow，MiddleおよびHigh群の4群各7匹ずつに分け，24週間飼育した．フィコシアニンはDICライフテック株式会社（東京）より供与頂き，飼料中へのフィコシアニンの混餌も同社で行った．各飼料の一般成分値およびエネルギー量をTable 2-1に示す．フィコシアニン添加飼料のエネルギー量はタンパク質であるフィコシアニンのエネルギーを1g当たり4kcalとして算出した．食餌は成長速度が同程度になるように調節しながら与え，水は自由摂取とした．飼育期間中，体重測定を2日に1回，摂食量測定を毎日行った．SHRSP/ZFラットは順化後の9週齢時から，パーム油25%，コレステロール5%およびコール酸ナトリウム2%を含む動脈硬化誘導食を摂取させたatherogenic diet（Ath）群，ならびにAth食にフィコシアニン0.5%および1.5%を添加した食餌を摂取させたAth+P0.5群およびAth+P1.5群の3群各6匹ずつに分け，9週間飼育した．Ath飼料はフナバシファーム（千葉）より購入し，フィコシアニンを混餌した．各飼料の一般成分値およびエネルギー量をTable 2-2に示す．食餌および水は自由摂取とし，飼育期間中，体重測定を1週間に2回，摂食量測定を2日に1回行った．

全てのラットは温度 22~24℃, 湿度 50~60%, 8 時~20 時は明期, 20 時~8 時は暗期サイクルに設定された室内で飼育した。なお, 本動物実験は「長崎県立大学動物実験指針」ならびに「実験動物の飼育および保管等に関する基準 (昭和 55 年 3 月総理府告示第 6 号)」に則して実施した (承認番号 22-07 および 24-12)。

## 2. 血圧測定

収縮期血圧はテイルカフ法により, BP MONITOR RATS & MICE Model MK-2000A (室町機械, 東京) を用いて測定した。SHR/NDmcr-cp ラットは 34 週齢時に, SHRSP/ZF ラットは 10, 13, 16 週齢時に測定を行った。ラット 1 個体につき連続した 8 回以上の測定を行い, その平均値を測定値とした。ただし, 排便時・排尿時の血圧は高値のため除いた。また, ラットが興奮状態にある時の血圧も安定しなかったため除外した。

## 3. 動物処理

SHR/NDmcr-cp ラットは 34 週齢時の屠殺前に 12 時間絶食させ, SHRSP/ZF ラットは 18 週齢時の屠殺前に 6 時間絶食させたのち, ペントバルビタール麻酔下で開腹処置を行い, シリンジを用いて腹部大静脈あるいは心臓から採血した。胸部大動脈を摘出し, 直ちに酸素ガス (99.5%) で通気かつ冷却した 10 mM HEPES 溶液 (pH 7.4) で洗浄し, 同 HEPES 溶液で満たしたスクリー管に入れ, 密栓して氷冷保存した。また, 睾丸周囲脂肪組織および心臓を摘出し 0.9% 食塩水で洗浄後, 重量を測定した。病理組織学的検討用に胸部大動脈は組織の一部を切除し, 10% 中性ホルマリン液で固定した。遺伝子発現解析用に睾丸周囲脂肪組織 300 mg および腹部大動脈 50 mg を液体窒素で凍結させた後, -80℃で保存した。血液は, 1,400×g (3,000 rpm; 卓上遠心機 H-103N, コクサン, 東京) で 15 分間遠心分離し, 上清 (血清) を凍結保存した。

## 4. 血清生化学的測定

血清を用いて, TG, 総コレステロール (total cholesterol, TC), 高密度リポタンパク質コレステロール (high-density lipoprotein cholesterol, HDL-C), グルコース, インスリン, レプチン, アディポネクチン, 総アンジオテンシノーゲンおよび窒素酸化物 (NO<sub>x</sub>; 亜硝酸イオン[NO<sub>2</sub>]および硝酸イオン[NO<sub>3</sub>])を測定した。各項目の吸光度の測定には分光光度計 UV mini 1240 (島津製作所, 京都) およびマルチスペクトロフォトメーター (DS ファーマバイオメディカル, 大阪) を使用した。各項目の測定原理および方法を以下に示す。

### (1) 血清 TG

TG 濃度の測定は, グリセロール-3-リン酸オキシダーゼ (GPO)・3,5-ジメトキシ-N-エチル-N- (2'-

ヒドロキシ-3'-スルホプロピル)-アニリンナトリウム (DAOS) 法を用いた測定キットであるトリグリセリド E-テストワコー (和光純薬工業, 大阪) を使用して行った。測定原理は以下のとおりである。検体中の TG はリポプロテインリパーゼの作用でグリセリンと脂肪酸に分解され、グリセリンはグリセロールキナーゼおよび GPO によって過酸化水素を生じる。過酸化水素はペルオキシダーゼ (POD) の作用により DAOS と 4-アミノアンチピリンとを定量的に酸化縮合させ青色の色素を生成させる。これを分光光度計にて吸光度 (主波長 600 nm) を測定し、検体中の TG 濃度を求めるものである。

本実験では、標準溶液または検体 10  $\mu$ L に発色試液 1.5 mL を加えて混ぜ、37°C で 5 分間静置反応させ、吸光度を測定した。標準溶液はトリオレイン濃度 100, 200, 300, 596.1 mg/dL に調製し、試薬盲検には発色試液のみを加えた。検量線を作成し、検体の TG 濃度を算出した。測定は 1 検体につき 2 回行い、その平均値を測定値とした。

## (2) 血清 TC

TC 濃度の測定は、コレステロールオキシダーゼ・DAOS 法を用いた測定キットであるコレステロール E-テストワコー (和光純薬工業) を使用して行った。測定原理は以下のとおりである。検体中のコレステロールエステル類はコレステロールエステラーゼおよびコレステロールオキシダーゼによって分解および酸化され過酸化水素を生じる。過酸化水素は POD の作用により DAOS と 4-アミノアンチピリンとを定量的に酸化縮合させ、青色の色素を生成させる。これを分光光度計にて吸光度 (主波長 600 nm) を測定し、検体中の TC 濃度を求めるものである。

本実験では、標準溶液または検体 10  $\mu$ L に発色試液 1.5 mL を加えて混ぜ、37°C で 5 分間静置反応させ、吸光度を測定した。標準溶液はコレステロール濃度 100, 200, 397.4, 592.2 mg/dL に調製し、試薬盲検には発色試液のみを加えた。検量線を作成し、検体の TC 濃度を算出した。測定は 1 検体につき 2 回行い、その平均値を測定値とした。

## (3) 血清 HDL-C

HDL-C 濃度の測定は、リントングステン酸・マグネシウム塩沈殿法を用いた測定キットである HDL-コレステロール E-テストワコー (和光純薬工業) を使用して行った。測定原理は以下のとおりである。検体にリントングステン酸とマグネシウム塩を含む沈殿試液を加えると、HDL 以外のリポタンパク質が選択的に沈殿する。この沈殿を除いた上清に発色試液を加えると、上清中のコレステロールエステル類は TC 濃度の測定と同様の原理で青色の色素を生成させる。これを分光光度計にて吸光度 (主波長 600 nm) を測定し、検体中の HDL-C 濃度を求めるものである。

本実験では、検体 200  $\mu$ L および沈殿試液 200  $\mu$ L を混合して 10 分間静置後、室温、870 $\times$ g (3000 rpm; 微量用冷却卓上遠心機 H-15FR, コクサン) で 10 分間遠心分離し、上清を採取した。標準溶

液または上清 50  $\mu\text{L}$  に発色試液 3 mL を加え、37°C で 5 分間静置反応させ、吸光度を測定した。標準溶液はコレステロール濃度 50, 100, 145.2, 196.8 mg/dL に調製し、試薬盲検には発色試液のみを加えた。検量線を作成し、検体の HDL-C 濃度を算出した。測定は 1 検体につき 2 回行い、その平均値を測定値とした。

#### (4) 血清グルコース

グルコースの測定は、ムタロターゼ・グルコースオキシダーゼ (GOD) 法を用いた測定キットであるグルコース CII-テストワコー (和光純薬工業) を使用して行った。測定原理は以下のとおりである。検体中のグルコースは発色試液中に含まれるムタロターゼの作用により  $\alpha$  型から  $\beta$  型へ変換され、 $\beta$ -D-グルコースは GOD の作用により過酸化水素を生じる。過酸化水素は POD の作用により発色試液中のフェノールと 4-アミノアンチピリンとを定量的に酸化縮合させ、赤色の色素を生成させる。これを分光光度計にて吸光度 (主波長 505 nm) を測定し、検体中のグルコース濃度を求めるものである。

本実験では、標準溶液または検体 10  $\mu\text{L}$  に発色試液 1.5 mL を加えて混ぜ、37°C で 5 分間静置反応させ吸光度を測定した。標準溶液はグルコース濃度 50, 100, 200, 300, 400, 500 mg/dL に調製し、試薬盲検には発色試液のみを加えた。検量線を作成し、検体のグルコース濃度を算出した。測定は 1 検体につき 2 回行い、その平均値を測定値とした。

#### (5) 血清インスリン

インスリン濃度の測定は、enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法を用いた測定キットであるラットインスリン測定キット (森永生科学研究所, 神奈川) を使用して行った。測定原理は以下のとおりである。一次反応として検体中のインスリンはマイクロプレート上の固相化抗インスリンモノクローナル抗体およびモルモット抗インスリン抗体と結合して複合体を形成する。二次反応として酵素標識抗モルモット IgG 抗体が複合体に結合する。オルトフェニレンジアミン (OPD) 基質を加えると、複合体に結合した酵素により呈色する。これをプレートリーダーにて吸光度 (主波長 450 nm) を測定し、検体中のインスリン濃度を求めるものである。

本実験では抗体固相化プレートを洗浄し、モルモット抗インスリン血清 95  $\mu\text{L}/\text{well}$ 、標準溶液または検体 5  $\mu\text{L}/\text{well}$  を加え、4°C で 16 時間静置反応させた。洗浄後、酵素標識抗モルモット IgG 抗体 100  $\mu\text{L}/\text{well}$  を加え、室温で 1 時間静置反応させた。再び洗浄後、酵素基質溶液 100  $\mu\text{L}/\text{well}$  を加え、遮光下室温で 30 分間静置反応させた後、反応停止液 100  $\mu\text{L}/\text{well}$  を加え、30 分以内に吸光度を測定した。標準溶液はインスリン濃度 156, 313, 625, 1,250, 2,500, 5,000, 10,000 pg/mL に調製し、試薬盲検には検体希釈液のみを加えた。標準溶液の吸光度および濃度を片対数方眼紙にプロットして検量線を作成し、検体のインスリン濃度を算出した。測定は 1 検体につき 2 回行い、その平



均値を測定値とした。

#### (6) 血清レプチン

レプチン濃度の測定は、enzyme immune assay (EIA) サンドイッチ法を用いた測定キットであるラットレプチン測定キット（森永生科学研究所）を使用して行った。測定原理は以下のとおりである。一次反応として検体中のレプチンはマイクロプレート上の固相化抗レプチン抗体およびホルモット抗レプチン抗体に結合して複合体を形成する。二次反応として酵素標識抗ホルモット IgG 抗体が複合体に結合する。酵素基質溶液（tetra methyl benzidine, TMB）を加えると、複合体に結合した酵素により呈色する。これをプレートリーダーにて吸光度（主波長 450 nm）を測定し、検体中のレプチン濃度を求めるものである。

本実験では抗体固相化プレートを洗浄し、検体希釈液 45  $\mu\text{L}/\text{well}$ 、ホルモット抗レプチン抗血清 50  $\mu\text{L}/\text{well}$  およびレプチン標準溶液または検体 5  $\mu\text{L}/\text{well}$  を加え、4°Cで 16 時間静置反応させた。洗浄後、酵素標識抗ホルモット IgG 抗体 100  $\mu\text{L}/\text{well}$  を加え、4°Cで 3 時間静置反応させた。再び洗浄し、酵素基質溶液 100  $\mu\text{L}/\text{well}$  を加え、遮光下常温で 30 分間静置反応させた後、反応停止液 100  $\mu\text{L}/\text{well}$  を加えて吸光度を測定した。標準溶液はレプチン濃度 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2, 6.4, 12.8 ng/mL に調製し、試薬盲検には検体希釈液のみを加えた。標準溶液の吸光度および濃度を片対数方眼紙にプロットして検量線を作成し、検体のレプチン濃度を算出した。測定は 1 検体につき 2 回行い、その平均値を測定値とした。

#### (7) 血清アディポネクチン

アディポネクチン濃度の測定は、ELISA 法を用いた測定キットであるマウス/ラットアディポネクチン ELISA キット（大塚製薬，東京）を使用して行った。測定原理は以下のとおりである。一次反応として検体中のアディポネクチンはマイクロプレート上の固相化抗マウスアディポネクチンポリクローナル抗体に結合して複合体を形成する。二次反応としてビオチン標識抗マウスアディポネクチンモノクローナル抗体が複合体に結合し、さらに三次反応として酵素標識ストレプトアビジン液が複合体と結合する。TMB 溶液を加えると、複合体に結合した酵素により呈色する。これをプレートリーダーにて吸光度（主波長 450 nm）を測定し、検体中のアディポネクチン濃度を求めるものである。

本実験では抗体固相化プレートを洗浄し、標準溶液または検体希釈液で 1,111 倍に希釈した検体 100  $\mu\text{L}/\text{well}$  を加え、25°Cで 60 分間静置反応させた。洗浄後、ビオチン標識抗体液 100  $\mu\text{L}/\text{well}$  を加え、25°Cで 60 分間静置反応させた。再び洗浄後、酵素標識ストレプトアビジン液 100  $\mu\text{L}/\text{well}$  を加えて 25°Cで 60 分間静置反応させた。さらに洗浄し、基質溶液 100  $\mu\text{L}/\text{well}$  を加え、25°Cで 15 分間静置反応させた後、反応停止液 100  $\mu\text{L}/\text{well}$  を加えて吸光度を測定した。標準溶液は、アディポネ

クチン濃度 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0 ng/mL に調製し、試薬盲検には検体希釈液のみを加えた。標準溶液の吸光度および濃度を片対数方眼紙にプロットし、検体のアディポネクチン濃度を算出した。測定は1検体につき2回行い、その平均値を測定値とした。なお、測定値はマウスアディポネクチン当量として算出した。

#### (8) 血清総アンジオテンシノーゲン

総アンジオテンシノーゲン濃度の測定は、EIA サンドイッチ法を用いたキットである Rat Total Angiotensinogen Assay Kit (免疫生物研究所, 群馬) を使用して行った。測定原理は以下のとおりである。一次反応として検体中のアンジオテンシノーゲンはマイクロプレート上の固相化抗アンジオテンシノーゲン抗体に結合して複合体を形成する。二次反応として HRP 標識抗アンジオテンシノーゲン抗体が複合体に結合する。TMB 溶液を加えると複合体に結合した酵素により呈色する。これをプレートリーダーにて吸光度 (主波長 450 nm) を測定し、検体中のアンジオテンシノーゲン濃度を求めるものである。

本実験ではマイクロプレートに標準溶液または希釈用緩衝液で 3,000 倍希釈した検体 100  $\mu$ L/well を加え、37°C で 60 分間静置反応させた。洗浄後、HRP 標識抗体 100  $\mu$ L/well を加え、37°C で 30 分間静置反応させた。再び洗浄し、TMB 溶液 100  $\mu$ L/well を加え、遮光下常温で 30 分間静置反応させた後、反応停止液 100  $\mu$ L/well を加えて吸光度を測定した。標準溶液はアンジオテンシノーゲン濃度 0.08, 0.16, 0.31, 0.63, 1.25, 2.5, 5.0 ng/mL に調製し、試薬盲検には希釈用緩衝液のみを加えた。標準溶液の吸光度および濃度を片対数方眼紙にプロットして検量線を作成し、検体のアンジオテンシノーゲン濃度を算出した。測定は1検体につき2回行い、その平均値を測定値とした。

#### (9) 血清 NO<sub>x</sub> (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>・NO<sub>3</sub><sup>-</sup>)

NO<sub>x</sub> 濃度の測定は、Griess 法を用いた測定キットである NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub> Assay Kit-C II (Colorimetric) - Griess Reagent Kit - (同仁科学研究所, 熊本) を使用して行った。測定原理は以下のとおりである。検体中の NO<sub>3</sub><sup>-</sup> は還元酵素により NO<sub>2</sub><sup>-</sup> になる。NO<sub>2</sub><sup>-</sup> によってジアゾニウム塩化合物とナフチルエチレンジアミンはアゾカップリングし、ジアゾ化合物が生成する。これをプレートリーダーにて吸光度 (主波長 540 nm) を測定し、検体中の NO<sub>x</sub> 濃度を求めるものである。

本実験では、血清検体を遠心式フィルターユニット (Amicon Centrifugal Filter Unit with Ultracel-10 membrane ; Merck Japan, 東京) を用いて 4°C, 7,000 $\times$ g (8,500 rpm ; 微量用冷却卓上遠心機 H-15FR) で 20 分間遠心分離して除タンパク質処理を行い、濾過溶液を試料とした。96 ウェルプレートに標準溶液または試料 80  $\mu$ L/well, 補酵素溶液 10  $\mu$ L/well および酵素溶液 10  $\mu$ L/well を加えて混和し、室温で 2 時間静置反応させた。試薬 A 50  $\mu$ L/well を加えて混和して 5 分間静置反応させ、試薬 B 50  $\mu$ L/well を加えて混和して 10 分間静置反応後、吸光度を測定した。標準溶液は NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 濃度 25, 50,

100  $\mu\text{mol/L}$  になるように調製し、試薬盲検には緩衝溶液のみを加えた。検量線を作成し、検体の  $\text{NO}_x$  濃度を算出した。測定は1検体につき2回行い、その平均値を測定値とした。

## 5. 脂肪組織および大動脈における遺伝子発現解析

睾丸周囲脂肪組織および腹部大動脈組織から総 RNA を抽出し逆転写後, real-time polymerase chain reaction (PCR) 法により messenger RNA (mRNA) 発現量を測定した。睾丸周囲脂肪組織では、アディポネクチンおよび CCAAT/enhancer binding protein  $\alpha$  (C/EBP $\alpha$ )、腹部大動脈組織ではアディポネクチン受容体 AdipoR1, AMPK のサブユニットである Prkaa1, eNOS, および sGC のサブユニットである sGC $\alpha$ 1 の mRNA 発現を測定した。

### (1) 総 RNA の抽出

凍結保存していた睾丸周囲脂肪組織および大動脈組織に RNAiso Plus (タカラバイオ, 滋賀) を睾丸周囲脂肪組織重量 300 mg あたり 3 mL, Tripure Isolation Reagent (Roche, Mannheim, Germany) を大動脈組織重量 100 mg あたり 2 mL 加え, あらかじめ RNase AWAY (Molecular BioProducts, San Diego, CA, USA) で RNase 除去処理をしたホモジナイザー (EYELA MAZELA Z; 東京理化工機, 東京) を用いて氷冷下でホモジナイズした。チューブに分注したホモジネート 1 mL あたり, 氷冷したクロロホルム 0.2 mL を加えて 30 秒間混和し, 室温で 5 分間静置後, 4°C, 12,000 $\times$ g (11,000 rpm; 微量用冷却卓上遠心機 H-15FR) で 15 分間遠心分離した。上清約 0.4 mL を新しいチューブに採取し, 同量のイソプロパノールを加えて 10 秒間混和し, 室温に 5 分間静置した。4°C, 12,000 $\times$ g で 10 分間遠心分離した後, 上清を除去し, 残った沈殿物 (総 RNA) に 75%エタノールを 1 mL 加え, 4°C, 12,000 $\times$ g で 3 分間遠心分離した。上清除去後, 風乾させた。RNA 沈殿物 (総 RNA) を Tris-EDTA buffer で懸濁後, 50°C で 5 分加温しながら完全に溶解し, 総 RNA 溶液の吸光度を測定後 (NanoVue plus with printer; GE ヘルスケア・ジャパン, 東京), 脂肪組織あるいは大動脈から抽出した RNA 濃度がそれぞれ 0.5 あるいは 0.25  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  になるように Tris-EDTA buffer で希釈した。総 RNA 溶液は遺伝子解析実験まで -80°C で保存した。

### (2) 逆転写反応

逆転写反応には PrimeScript® RT Master Mix (Perfect Real Time) (タカラバイオ) を用いて反応液を調製した。逆転写反応液の組成を以下に示す。脂肪組織 RNA 試料: 5 $\times$ PrimeScript RT Master Mix : RNase Free dH<sub>2</sub>O : 総 RNA 溶液 = 2 : 7 : 1 (v/v)。大動脈組織 RNA 試料: 5 $\times$ PrimeScript RT Master Mix : RNase Free dH<sub>2</sub>O : 総 RNA 溶液 = 2 : 6 : 2 (v/v)。反応液を混和した後, 37°C で 15 分間の逆転写反応を行い, 85°C で 10 秒間, 逆転写酵素を熱失活させ, 直ちに氷上に置いた。逆転写反応産物である complementary DNA (cDNA) 溶液は real-time PCR を行うまで -20°C で保存した。

### (3) Real-time PCR

PCR は Applied Biosystems 7300 Real-time PCR system (ライフテクノロジーズジャパン, 東京) を使用し, SYBR Green real-time PCR 法を用いて行った. PCR 反応液の調製には, 脂肪組織から調製した cDNA 試料には SYBR® Premix Ex Taq™ II (タカラバイオ) および大動脈組織から調製した cDNA 試料には THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix (東洋紡, 大阪) を用いた. プライマーはプライマー設計ツール Primer-BLAST (National Center for Biotechnology Information, NCBI; Bethesda, MD, USA) を用いて設計し, グライナー・ジャパン (東京) に合成を依頼した. PCR 反応液の組成を以下に示す. SYBR® Premix Ex Taq™ II あるいは THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix 10 µL, 10 µM forward primer 0.8 µL, 10 µM reverse primer 0.8 µL, ROX reference dye 0.4 µL, 滅菌水 7 µL, cDNA 溶液 1 µL (総容量 20 µL). 合成プライマーの塩基配列を Table 2-3 に, PCR 条件を以下に示す. 初期変性 (1 サイクル): 95°C 下 60 秒, PCR (40 サイクル): 95°C 下 15 秒の変性反応および 60°C 下 45 秒の伸長反応, 融解曲線分析 (1 サイクル): 95°C 下 15 秒, 60°C 下 30 秒, 95°C 下 15 秒.

各目的遺伝子の発現量の相対比 (R) を 18S ribosomal RNA (rRNA) あるいは glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を内部標準遺伝子として, 比較 Ct 法で解析した. R 値の算出方法を以下に示す.

$$R = 2^{-\Delta\Delta Ct} \quad (Ct, \text{ threshold crossing})$$

$$\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{target}} - Ct_{\text{18S rRNA or GAPDH}})_{\text{treatment}} - (Ct_{\text{target}} - Ct_{\text{GAPDH}})_{\text{control group, avg.}}$$

## 6. 大動脈の病理組織学的検討

病理組織学的所見は群分けを伏せて行うブラインドにより, すべて病理医が評価した.

### (1) ヘマトキシリン・エオジン (hematoxylin and eosin, HE) 染色

組織が包埋されたパラフィンブロックをマイクロトームで 4 µm の厚さに薄切し, 脱パラフィン処理し水洗した後, マイヤーのヘマトキシリン液にて 5 分間染色した. 温湯で色出しし水洗後, エオジン液にて 2~3 分染色し, アルコールで分別した後, 脱水・透徹・封入した. これは, ヘマトキシリンの酸化により生じたヘマテインと媒染剤の金属部分とで錯体を形成させることにより正に帯電させ, 負に帯電した細胞核のリン酸基などと結合させる一方, 負に帯電しているエオジンの色素分子が正に帯電している組織成分と結合することを利用した染色方法である. したがって, 細胞核は青紫色に, その他の細胞質, 線維, 赤血球などはそれぞれの性質に応じ濃淡各種の赤色に染色される.

### (2) 胸部大動脈の動脈硬化病変の評価

動脈硬化病変の評価は HE 染色された胸部大動脈組織切片を用い, 内皮細胞と血管壁の平滑筋を

観察した。動脈硬化が存在すると内皮細胞下の内膜に変性脂質やマクロファージなどが蓄積する組織像（粥腫形成）がみられる。

### (3) 胸部大動脈の eNOS の免疫染色および評価

大動脈組織が包埋されたパラフィンブロックを 5  $\mu\text{m}$  の厚さで薄切し、脱パラフィン処理したあと、0.03%過酸化水素含有 Tris-buffered saline (TBS) に 5 分間浸漬し内因性ペルオキシダーゼをブロックした。マイクロ波を用いた熱処理による抗原賦活後に、5% 牛血清アルブミン (bovine serum albumin, BSA) 溶液に 5 分間浸漬し、非特異的反応をブロックした。抗体はウサギポリクローナル抗 NOS3 抗体 (Abnova Corporation, 台北, 台湾) を 1%BSA 含有 TBS で 80 倍希釈して用いた。二次抗体はウサギ抗体用 Envision-HRP (DAKO, Glostrup, Denmark) を用い、3,3'-diaminobenzidine (DAB ; Vector, Burlingame, CA, USA) で発色した。抗原抗体反応は、間歇的な超音波照射を取り入れた Kumada らの方法に従った<sup>65)</sup>。標本は DAB を基質として茶色に発色し、ヘマトキシリンで対比染色後に鏡検に供した。

染色性の評価は「まったく染まらない (0)」、「軽度に染まる (1)」、「中等度に染まる (2)」、「高度に染まる (3)」の 4 段階で分け、判断が難しいものや染まった細胞と染まらない細胞が隣り合っているものは、スコア 0 と 1 の間では 0.5、スコア 1 と 2 の間では 1.5 とした。

## 7. 摘出大動脈における血管張力測定

### (1) 試薬

本測定では、acetylcholine chloride (ACh ; Sigma-Aldrich Japan, 東京), sodium nitroprusside (SNP ; Sigma-Aldrich Japan), papaverine hydrochloride (Pap ; Sigma-Aldrich Japan), nitro-L-arginine (L-NNA ; Sigma-Aldrich Japan), KCl (和光純薬工業), L-phenylephrine (PE ; Sigma-Aldrich Japan) を用いた。KCl は 3 M のストック溶液として室温で保存し、KCl 以外の試薬はそれぞれ超純水で溶解後、高濃度調製試薬を  $-30^{\circ}\text{C}$  で凍結保存した。用いた薬物の性質を以下に説明する。ACh は副交感神経の伝達物質であり、血管平滑筋への直接作用としては弱い収縮を引き起こすが、動脈は副交感神経支配が少ないため収縮作用は弱い。血管内皮にある ACh のムスカリン受容体に作用して内皮由来弛緩因子である NO を遊離して血管を弛緩させる。SNP は構造中に NO 基を有する NO ドナーであり、直接平滑筋に作用して細胞内の cGMP の増加を介し血管を弛緩させる。Pap は平滑筋に作用して強い弛緩を引き起こす。L-NNA は NO 合成酵素阻害薬であり、本実験では内皮細胞における NO 合成を抑制するために標本に前処置した。

## (2) 動脈輪状標本の作成

酸素ガスで飽和した HEPES 溶液中に保存していた SHRSP/ZF ラットの胸部大動脈を 37°C に加温した Tyrode 液中に移し, 実体顕微鏡下で動脈から結合組織および脂肪組織を注意深く除去した後, 約 2 mm の長さの輪状標本を作製した. 1 個体から 1~3 本の血管標本を得た. 実験例数 (n) は, 血管標本 1 個から得られたデータを 1 例 (n = 1) と数え, PE 投与による収縮や ACh 投与による弛緩が観察されなかった場合は, 標本作成時に血管平滑筋や内皮細胞が障害されたとみなして実験データから除外した. Tyrode 液の組成は以下のとおりである. Tyrode 液 (mM) : NaCl 136.8, KCl 5.9, CaCl<sub>2</sub> 2.5, MgCl<sub>2</sub> 1.0, NaHCO<sub>3</sub> 11.9, glucose 5.5 (混合ガス (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) を通気したときの pH = 7.3~7.4).

## (3) 血管張力の測定方法

血管標本を混合ガス (95% O<sub>2</sub> および 5% CO<sub>2</sub>) を通気した Tyrode 液 (37°C) で満たした器官槽 (5mL 容; UC-5TD; いわしや岸本医科産業, 京都) 内に保持した. その後, 槽内に設置された 2 本のステンレス製フックに内皮を傷つけないように血管標本をセットし, 1 g の静止張力を負荷し, 20 分間隔で新鮮な Tyrode 液と交換しながら 1 時間平衡状態を保った. 平衡期間終了後, 60 mM KCl を投与して血管標本に最大収縮反応を引き起こした. KCl を繰り返して投与することによる血管標本の収縮反応に再現性が確認できた後, 各薬物の効果を検討した (後述). 張力変動は張力トランスデューサー (MLT010; ミネベア, 長野および 0.08N; オリエンテック, 東京) を用いて測定し, 歪圧力用アンプ (AP-621G; 日本光電, 東京および ML224 4 連ブリッジアンプ; AD Instruments Japan, 名古屋) を介し, 多ペン記録計 (LR4200E; 横河電機, 東京) に描記あるいは, コンピュータプログラム (Lab Chart v7.1; AD Instruments Japan) により記録した.

ACh による内皮依存性および SNP による内皮非依存性の血管弛緩作用を用量 - 反応曲線により評価した. ACh による弛緩反応の検討では, 標本を PE (10<sup>-5</sup> M) で前収縮させ, PE の収縮が安定したところで ACh を累積的に投与して (10<sup>-9</sup>~10<sup>-5</sup> M), 用量 - 弛緩反応を測定した. また, 内皮細胞依存性弛緩反応における NO 関与の証明のため, 標本を NOS 阻害薬である L-NNA (2×10<sup>-4</sup> M) で 20 分間前処置し, PE (10<sup>-5</sup> M) で前収縮させ, PE の収縮が安定したところで ACh を累積的に投与して (10<sup>-9</sup>~10<sup>-5</sup> M), 用量 - 弛緩反応を測定した. 内皮非依存性弛緩反応における NO 関与の証明のため, L-NNA および PE 処置後の前収縮標本において SNP (10<sup>-9</sup>~10<sup>-6</sup> M) を累積的に添加していき, 用量 - 弛緩反応を測定した. 実験の最後に Pap (10<sup>-4</sup> M) を投与し, 最大弛緩反応を測定した. 検体の弛緩率は Pap 投与による最大弛緩に対する百分率 (%) で表示した. また, 薬物効力の程度を示す指標として pD<sub>2</sub> 値を用い, 次式により求めた.

$$pD_2 = -\log ED_{50}$$

なお, ED<sub>50</sub> (effective dose 50%) とは薬物の 50% 有効量, すなわち最大反応の 50% を引き起こす

アゴニストの容量である。

## 8. 統計処理

各項目の分析結果は平均値 ± 標準誤差 (standard error, SE) で示した。群間の有意差の検定は統計解析ソフト SPSS Statistics 17 (IBM Corporation, Somers, NY, USA) を用いて一元配置分散分析 (analysis of variance, ANOVA) および Bonferroni 法 (多重比較) にて行い、クロス集計は Fisher の直接確率、相関解析は Pearson の相関係数の有意性検定にて行った。全ての検定で有意確率  $P < 0.05$  を統計学的に有意差があるとみなした。

## 2-3. 実験結果

フィコシアニンを摂取したメタボリックシンドローム自然発症モデル SHR/NDmcr-cp ラットおよび SHRSP/ZF ラットにおける身体所見、収縮期血圧、血清生化学的検査値ならびに大動脈における血管弛緩性、組織学的所見および遺伝子発現を示す。各群の実験例数 (n) に関して、実験期間中に SHR/NDmcr-cp ラットのうち High 群の 1 匹、SHRSP/ZF ラットのうち Ath 群の 3 匹、Ath+P0.5 群の 1 匹が原因不明で死亡したため、本実験ではそれぞれ Control 群 (n = 7)、Low 群 (n = 7)、Middle 群 (n = 7) および High 群 (n = 6) の 4 群ならびに Ath 群 (n = 3)、Ath+P0.5 群 (n = 5) および Ath+P1.5 群 (n = 6) の 3 群における解析および比較を行った。

### 1. SHR/NDmcr-cp ラットにおける身体所見および収縮期血圧

24 週間の摂餌期間 (10~34 週齢) 中の成長曲線を Figure 2-1 に示す。総エネルギー摂取量、終体重、肝臓重量/体重比および睾丸周囲脂肪重量/体重比において、4 群間に有意な差はみられなかった (Table 2-4)。34 週齢時における収縮期血圧は 4 群間に有意な差はみられなかったものの、フィコシアニン添加濃度依存的に低下する傾向を示した (Control, Low, Middle, High 群 :  $179 \pm 10$ ,  $170 \pm 8$ ,  $164 \pm 9$ ,  $152 \pm 8$  mmHg, ANOVA :  $P = 0.215$ , Figure 2-2)。

### 2. SHR/NDmcr-cp ラットにおける血清生化学的検査値

34 週齢時における SHR/NDmcr-cp ラットの血清生化学検査値を Table 2-5 に示す。血清 TG, HDL-C およびグルコース値は Middle 群が Control 群および Low 群に比べて有意に高値を示した。血清 TC, HDL-C/TC 比, インスリン, アディポネクチン, レプチンおよび NOx 値は 4 群間に有意な差はみられなかった。しかし、血清アディポネクチン値はフィコシアニン摂取群 (Low, Middle および High 群) が Control 群に比べて高値を示す傾向がみられた。

### 3. SHR/NDmcr-cp ラットの脂肪組織における遺伝子発現量

脂肪組織におけるアディポネクチン mRNA 発現はフィコシアニン摂取群が Control 群に比べて高値を示す傾向がみられたが、群間に有意な差はなかった (Figure 2-3). 脂肪細胞におけるアディポネクチン遺伝子の主要な転写調節因子である C/EBP $\alpha$  の mRNA 値はアディポネクチン mRNA 発現傾向に類似してフィコシアニン摂取群が Control 群に比べて高値を示す傾向がみられたが、群間に有意な差はなかった (Figure 2-3).

### 4. SHR/NDmcr-cp ラットの胸部大動脈における組織学的評価

動脈硬化が生じると組織学的所見として、内膜の増殖や肥厚、平滑筋細胞の増殖や肥厚および内膜への浸潤、マクロファージの増殖、アポトーシスならびにコラーゲンの蓄積などが観察されるが、本実験では SHR/NDmcr-cp ラットの胸部大動脈において動脈硬化病変は全個体で観察されなかった (データ未記載). 大動脈における eNOS 発現を免疫染色にて観察した組織像を Figure 2-4a に、染色程度をスコア化した評価結果のクロス集計表を Table 2-6 に示す. eNOS 免疫染色程度において群間で有意な差はみられなかったが、eNOS 免疫染色程度 (eNOS grade) は血清アディポネクチン値と有意な中等度の正相関を示した ( $P = 0.002$ ,  $r = 0.573$ , Figure 2-4b).

### 5. SHRSP/ZF ラットにおける身体所見および収縮期血圧の推移

9 週間の摂餌期間 (9~18 週齢) 中の成長曲線を Figure 2-5 に示す. 総エネルギー摂取量, 終体重, 肝臓重量/体重比, 睪丸周囲脂肪重量/体重比および心臓重量/体重比において、群間に有意な差はみられなかった (Table 2-7). 試験食を摂取開始後, 1 週目および 4 週目の収縮期血圧において群間に有意な差はみられなかった. 7 週目の収縮期血圧は群間で有意差はないものの, Ath 群に比較して Ath+P0.5 群および Ath+P1.5 群でフィコシアニン添加濃度依存的に低下する傾向がみられた (Ath, Ath+P0.5, Ath+P1.5 群 :  $166 \pm 3$ ,  $153 \pm 8$ ,  $147 \pm 5$  mmHg, ANOVA :  $P = 0.110$ , Figure 2-6).

### 6. SHRSP/ZF ラットにおける血清生化学的検査値

血清 TG, TC, HDL-C, グルコース, インスリンおよびレプチン値は 3 群間に有意な差はみられなかった (Table 2-8). また, 血清アディポネクチン値は SHR/NDmcr-cp ラットでも観察されたようにフィコシアニン添加群で濃度依存的に高値を示したが、群間に有意な差はみられなかった. 脂肪組織の増加に伴う血圧上昇に関与するアンジオテンシノーゲンを測定した結果, 3 群間に有意な差はみられなかった. 生体内で産生された NO 量を推定するため, 血液中に存在する NO $x$  濃度を測定したが, 3 群間に有意な差はみられなかった.



## 7. SHRSP/ZF ラットの胸部大動脈における血管弛緩反応

### (1) ACh 投与による胸部大動脈の内皮依存性弛緩反応

Ath, Ath+P0.5 および Ath+P1.5 群すべてにおいて, ACh 投与によって用量依存性の弛緩反応が認められた (Figure 2-7a). ACh による弛緩反応が内皮細胞からの NO 遊離に起因するかを確かめるために, NO 合成阻害薬である L-NNA を前処置してから同様の実験を行った結果, ACh による弛緩反応が消失したことから ACh 投与による弛緩反応は内皮細胞からの NO の遊離によることが示唆された (Table 2-9). フィコシアニン摂取が ACh による内皮依存性弛緩反応に影響を及ぼすかを検討するために, Ath 群と Ath+P0.5 群および Ath+P1.5 群の弛緩反応を比較した. 低濃度の ACh 投与 ( $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$  M) に対する弛緩反応は, Ath 群に比較して Ath+P0.5 群および Ath+P1.5 群でフィコシアニン添加濃度依存的に増大する傾向がみられたが, 群間に有意な差はなかった (Figure 2-7a). 最大弛緩反応は Ath 群と Ath+P1.5 群でほとんど変わらない値を示した (Table 2-9).

### (2) SNP 投与による胸部大動脈の内皮非依存性弛緩反応

SNP は構造中に NO 基を有する NO ドナーであり, 血管平滑筋に直接 NO が作用することで細胞内の cGMP を増加させて弛緩を引き起こす. 本実験では内皮非依存性の弛緩反応として平滑筋の NO に対する感受性の変化を知る目的で使用し, その作用を観察した.

3 群すべてにおいて, SNP 投与によって用量依存性の弛緩反応が認められた (Figure 2-7b). 各 SNP 投与濃度において群間で有意な差はみられなかったが, Ath 群に比較して Ath+P0.5 群および Ath+P1.5 群で弛緩反応が増大する傾向がみられた (Figure 2-7b, Table 2-9).  $pD_2$  値は Ath 群に比較してフィコシアニン添加群で有意ではないものの高値を示した ( $P = 0.088$ , Ath vs. Ath+P0.5;  $P = 0.079$ , Ath vs. Ath+P1.5, Table 2-9).

## 8. SHRSP/ZF ラットの胸部大動脈における組織学的評価

本実験では全個体で動脈硬化病変はみとめられなかった (Figure 2-8).

## 9. SHRSP/ZF ラットの大動脈における遺伝子発現量

フィコシアニンによる血管弛緩作用の機序としてアディポネクチンを介した血管内皮機能の改善を仮定し, 動脈における血管収縮・弛緩に関与する遺伝子発現を定量した. 内皮細胞に発現するアディポネクチン受容体である AdipoR1 mRNA, AdipoR1 の発現増加により活性化する AMPK のサブユニットである Prkaa1 mRNA, AMPK により活性化され, アディポネクチンが発現調節に関与する eNOS, および eNOS により産生された NO の受容体で, 平滑筋細胞に発現する sGC のサブユニットである sGC $\alpha$ 1 mRNA の発現は, Ath 群に比較して Ath+P0.5 群および Ath+P1.5 群で有意ではないもののフィコシアニン添加濃度依存的に増加する傾向を示した (Figure 2-9).

## 2-4. 考察

本実験ではメタボリックシンドロームおよび高血圧に対するフィコシアニンの効果の検討を目的とし、全身のメタボリックシンドローム病態ならびに動脈硬化などによる血管機能障害に着目した作用機序を検討するため、メタボリックシンドロームを自然発症する SHR/NDmcr-cp ラットおよび SHRSP/ZF ラットの2種類の病態モデル動物を用いた。

本実験において、34週齢時の SHR/NDmcr-cp ラットは過食により高体重、高血糖、高インスリン血症および高TG血症などで示される典型的なメタボリックシンドローム様病態を発症した。24週間にわたりフィコシアニン添加食を摂取した SHR/NDmcr-cp ラット (Low, Middle および High 群) においても同様にメタボリックシンドローム様病態を発症した。血中メタボリックパラメータに関するフィコシアニンの影響として、有意ではなかったもののフィコシアニン摂取群で血清アディポネクチン濃度の増加が観察された。さらに睾丸周囲脂肪組織におけるアディポネクチン mRNA の発現も有意ではなかったもののフィコシアニン摂取群で増加が認められた。アディポネクチン mRNA 発現の増加機序の検討のため、脂肪細胞におけるアディポネクチン遺伝子の主要な転写調節因子であり、脂肪細胞の分化の制御因子でもある C/EBP $\alpha$  の mRNA 発現量を測定した。その結果、転写調節因子 C/EBP $\alpha$  の mRNA 発現がアディポネクチン mRNA 発現傾向に類似していたことから、フィコシアニンによる血中アディポネクチン増加機序には C/EBP $\alpha$  発現に対しフィコシアニンの何らかの関与がある可能性が考えられた。

34週齢時における SHR/NDmcr-cp ラットの収縮期血圧は、有意ではなかったものの飼料に添加したフィコシアニン濃度依存的な低下傾向がみられた。フィコシアニンによる直接的な血圧低下作用の報告はこれまでないことから、アディポネクチンの増加を介した間接的な作用であると仮定し作用機序の検討を行った。Ouchi らは、高血圧症例における血管内皮機能と血中アディポネクチン濃度とは正の相関を示すこと、収縮期血圧と血中アディポネクチン濃度が逆相関することを示し、さらに、アディポネクチン欠損マウスは内皮依存性血管弛緩反応が低下していることを報告している<sup>1)</sup>。内皮依存性弛緩反応の低下には、①動脈硬化などに伴う内皮下組織の増殖による、遊離された NO の平滑筋への到達の障害、②内皮細胞における NO 産生・分泌の低下、③血管平滑筋における NO 感受性の低下などが関与する<sup>6)</sup>。まず、①に関して SHR/NDmcr-cp ラットの大動脈における動脈硬化病変の有無を検討したが、SHR/NDmcr-cp ラットは動脈硬化病変の形成に対して抵抗性を有し<sup>64)</sup>、本実験でも内膜や平滑筋の肥厚を含む明らかな血管病変は観察されなかった(データ未記載)。したがって、本実験において SHR/NDmcr-cp ラットの血圧上昇には動脈硬化でなく内皮機能障害による持続的な血管の収縮が関与していると考えた。Hattori らは、ヒト臍帯静脈内皮細胞においてアディポネクチンが転写レベルで eNOS 発現を増大させ、かつ eNOS を活性化し、NO 産生が誘導されることを示唆した<sup>67)</sup>。この報告を踏まえ、次に②に関して eNOS 発現量の検討ならびに血中 NOx

の定量を行った。大動脈の eNOS を免疫染色で評価した結果、群間で有意な差はみられなかった。しかし、血中アディポネクチン値と eNOS 発現強度の間には有意な正の相関がみられたことから、アディポネクチンによる eNOS 発現の誘導が示唆された。一方で、eNOS 発現強度と収縮期血圧値の間には相関関係がみられなかった（データ未記載）。これは、血圧調節が交感神経系などの様々な機構により制御されており、eNOS を介した血管弛緩作用と拮抗作用を示した可能性が考えられた。また、③の血管平滑筋における NO 感受性は本実験において評価しておらず、血管平滑筋機能を検討することでより正確に血圧値との関連性を見出せたかもしれない。また、血中 NOx 量はフィコシアニン摂取群における有意な増加はみられず、eNOS 発現強度とも有意な相関はみられなかった。血中 NOx の由来は eNOS だけでなく誘導性 NOS (inducible NOS, iNOS) が産生する NO もあること、また、内皮において産生された NO は自由拡散するため<sup>66)</sup>、血管内腔側および血管平滑筋側の分布割合は不明であることなどが血中 NOx 量と eNOS 発現強度の結果の不一致につながったと考えられる。

34 週齢時における SHR/NDmcr-cp ラットの血清 TG 値および血清グルコース値がフィコシアニン摂取に関係なく、Middle 群において有意に高値を示した理由については不明である。1つの可能性として、飼育時において Middle 群の摂餌量が常に多く、飼育終了時に体重差がみられないように食餌投与量を調節したことから、摂取量減に伴って脂質や糖質など栄養素の体内への蓄積から異化へと代謝の変化が起き、血中濃度が高値を示したという機序が考えられた。その仮説を裏付けるように Middle 群の中で血清 TG 値や血清グルコース値が最も高値を示した個体において、体重、睾丸周囲脂肪重量および肝臓 TG 量は低値を示したが詳細は解明できていない。

SHRSP/ZF ラットに高脂肪および高コレステロールを含む動脈硬化誘導 (atherogenic, Ath) 食を 9 週間摂取させると、肥満、高血圧、高インスリン血症および高コレステロール血症などに示されるメタボリックシンドローム様病態を発症した。Ath 食にフィコシアニンを添加した食餌を摂取した個体 (Ath+P0.5 および Ath+P1.5 群) でも同様にメタボリックシンドローム様病態を発症したが、フィコシアニン添加食摂取後 7 週目における収縮期血圧は、フィコシアニン添加濃度依存的に上昇が抑制される傾向を示した。また、フィコシアニンを摂取させた SHR/NDmcr-cp ラットにおいて血中アディポネクチンが増加したという結果と一致して、SHRSP/ZF ラットにおいてもフィコシアニン添加濃度依存的に血中アディポネクチンの増加が確認された。

フィコシアニンの継続的摂取による血圧上昇抑制作用の機序の解明を目的とし、血管内皮機能に及ぼす影響を検討するために、SHRSP/ZF ラットの摘出大動脈における ACh による内皮依存性弛緩反応の変化を観察した。メタボリックシンドロームにおいて内皮機能障害が生じることが報告されているように、SHRSP/ZF ラットにおいても非肥満同胞に比べて内皮依存性弛緩反応が減弱することが確認されている<sup>68)</sup>。本実験において ACh による内皮依存性弛緩反応は、NO 合成酵素阻害剤 L-NNA の前処置によりほぼ消失したことから、SHRSP/ZF ラットにおける ACh による弛緩反応は

内皮由来 NO に依存していると考えられた。Ath 食と同時にフィコシアニン摂取した群では、Ath 食のみを摂取した群に比べて低用量の ACh に弛緩反応を示し、フィコシアニンは内皮依存性弛緩反応を改善させる作用を有する可能性が考えられた。また、平滑筋弛緩に関与するセカンドメッセンジャーの cGMP に直接作用する NO ドナーである SNP による内皮非依存性弛緩反応においても、フィコシアニン摂取群では低用量の SNP に弛緩反応を示した。これより、フィコシアニン摂取は内皮機能だけでなく中膜平滑筋の NO 感受性を含む機能に対しても何らかの改善作用があることが示唆された。

フィコシアニン摂取による血管弛緩反応の改善作用の機序を検討するため、弛緩反応を観察した血管部位である胸部大動脈の動脈硬化病変を組織学的に評価した結果、SHRSP/ZF ラットにおいて 9 週間の Ath 食摂取によって動脈硬化の発症は認められなかった。次に血管弛緩反応に関与する遺伝子の発現を検討した。アディポネクチンによる eNOS 発現増加作用が報告されていることを踏まえて、アディポネクチン受容体である AdipoR1、アディポネクチンにより活性化され eNOS の活性化に関与する AMPK のサブユニット  $\alpha 1$  Prkaa 1 および eNOS の mRNA 発現を測定した。その結果、すべての mRNA 発現はフィコシアニン添加濃度依存的に増加する傾向を示したことから、フィコシアニン摂取は内皮のアディポネクチン受容体の増加作用を介し、eNOS 発現の低下を抑制することで内皮依存性弛緩反応の減弱を抑制していることが考えられた。フィコシアニンによる肝臓のアディポネクチン受容体発現の増加作用は本研究において確認しており（データ未記載）、血管内皮細胞においてもアディポネクチン受容体の発現を増加させることを示した。平滑筋細胞に発現する sGC mRNA 発現もフィコシアニン添加濃度依存的に増加する傾向を示したことから、内皮非依存性弛緩反応の減弱の抑制はフィコシアニンによって sGC 発現が保持されていることが関与する可能性が考えられた。AMPK は内皮細胞および平滑筋細胞の双方に発現が確認されており、AMPK の活性化は内皮依存性および内皮非依存性の弛緩反応を誘導する<sup>69)</sup>。本実験ではサンプルの腹部大動脈が微量であったこともあり、内皮細胞と平滑筋細胞を分離せずに mRNA 測定のサンプルとして用いたため、Prkaa 1 の発現増加がどちらの細胞で生じたのかは確認できなかった。本実験ではフィコシアニン摂取によって内皮依存性および内皮非依存性の弛緩反応ともに改善傾向がみられたことから、内皮細胞および平滑筋細胞どちらにおいても AMPK の発現増加がみられた可能性が考えられる。今後の研究では分離した血管の細胞における mRNA やタンパク質の測定を行う必要がある。

以上の結果より、本実験はフィコシアニンの機能性として次のことを明らかにした。すなわち、SHR/NDmcr-cp ラットおよび SHRSP/ZF ラットにおいて、フィコシアニンの長期摂取は収縮期血圧の上昇および血中アディポネクチン濃度の低下を抑制した。また、フィコシアニンによる降圧作用の機序としてメタボリックシンドロームの進展に伴う血管弛緩性の低下の抑制が関与している可能性が示された。その作用機序の一端をフィコシアニンによるアディポネクチン受容体の発現増加とアディポネクチンによる血管の eNOS 発現増加を介した内皮依存性弛緩反応の改善作用が担って

いることが示唆された。フィコシアニンがヒトにおいても十分な効果を発揮するかについて今後、更なる検討が望まれる。

## 2-5. 小括

メタボリックシンドロームモデル動物である SHR/NDmcr-cp ラットおよび SHRSP/ZF ラットにおける高血圧に対するフィコシアニンの効果を検討した。普通飼料にフィコシアニンを添加した食餌を 24 週間摂取した SHR/NDmcr-cp ラットにおいて、フィコシアニン添加濃度依存的に収縮期血圧の上昇が抑制された。また、アディポネクチンの血中レベルはフィコシアニン摂取濃度依存的に低下が抑制された。フィコシアニンは白色脂肪組織においてアディポネクチンを転写レベルで増加させ、転写調節因子 C/EBP $\alpha$  が関与している可能性が示唆された。また、血管における eNOS 発現強度と血清アディポネクチン値が正の相関関係を示したことから、フィコシアニンによる血圧低下作用にはアディポネクチンによる血管 eNOS を介した機序が考えられた。

フィコシアニンによる血圧上昇抑制作用機序の更なる解明のため、SHRSP/ZF ラットに動脈硬化誘導食およびフィコシアニンを同時摂取させて血管におけるフィコシアニンの効果を検討した。9 週間の食餌摂取後、胸部大動脈における動脈硬化病変は観察されなかったが、フィコシアニン摂取によって血管内皮依存性弛緩反応ならびに内皮非依存性弛緩反応の改善傾向がみられた。さらに、血管弛緩反応に関与する AdipoR1, AMPK サブユニットの Prkaa1, eNOS および sGC サブユニットの sGC1a mRNA 発現がフィコシアニン添加濃度依存的に増加する傾向がみられた。よって、フィコシアニンによる血管弛緩性の改善が高血圧発症の抑制に寄与したと考えられた。

## 第3章

### NASH に対するフィコシアニンの効果の検討

#### 第1節

#### 食事誘導性 NASH 線維化モデルの作成

##### 3-1-1. 緒言

NASH は単純性脂肪肝と異なり、炎症の持続によって肝細胞が変性および壊死を生じ、肝線維化の発症を経て最終的には肝硬変や肝臓癌に至る可能性がある予後不良な進行性疾患である<sup>17)</sup>。NASH は生活習慣病とみなされており、食事因子を含む種々の増悪関連因子の存在により多様な発症進展形式を示すことから、すべての患者に適応できる治療法や本疾患そのものに対する特効薬は未だ開発されていない。また、NASH における肝臓癌は肝線維化進展例に多いとされ、線維化進展の抑制を踏まえた治療は NASH 患者の予後改善のためにも重要である<sup>22)</sup>。これより、NASH における線維化発症に対して抑制作用を示す治療薬の開発のため、適切な病態モデル動物を用いて薬効評価を行う必要性が考えられた。上記の研究背景から著者が考える適切な病態モデル動物とは、遺伝子操作や肝毒性物質の投与などに依存することなく、ヒト NASH の病因、すなわち食事因子などの生活習慣関連因子によって自然経過で線維化へ移行する NASH 病態を呈するモデルを指す。

今まで報告されている食餌誘導性 NASH 線維化モデルは、食餌の強制投与による高カロリー摂取やメチオニン・コリン欠乏食の負荷などによるものがある<sup>52)</sup>。これらのモデルは短期間で NASH および肝線維化を発症するが、経胃あるいは経腸ルートによる高カロリー負荷や、メチオニンおよびコリンの欠乏した食餌はヒトの通常の食事にはあてはまらない。高脂肪食も同様に NASH モデルの作成に用いられる食餌であり、高脂肪食の摂取は肝臓において脂肪を蓄積させ、その後 NASH 様肝臓病変を発症することが報告されている<sup>52,70)</sup>。しかし、齧歯類に対する高脂肪食の負荷は、肝脂肪化や炎症を数週間で発症させるものの、肝線維化を発症するまでには 3~6 ヶ月程の期間を要し、しかもその線維化は軽微である<sup>71,72)</sup>。著者らは、高脂肪食(脂肪エネルギー比 45%)を Sprague-Dawley (SD) ラットに 38 週間摂取させると、顕著な肝脂肪化を発症する一方で、炎症は軽度で NASH とは診断されず、線維化も stage 1A 程度しかみられないことを報告している<sup>71)</sup>。高脂肪食を 50 週間にわたり C57Bl マウスに摂取させても脂肪性肝炎は生じるが線維化は軽度であるとの報告もある<sup>72)</sup>。一方、Spolding らはコレステロール添加高脂肪食(脂肪エネルギー比 20%、コレステロール 2%を含む)をスナネズミに 4 週間摂取させると脂肪性肝炎を発症することを示したが、高度な線維化には至らなかった<sup>73)</sup>。

近年、脂肪肝の発症および単純性脂肪肝から脂肪性肝炎への進展において食事性コレステロールが重要な因子であることが実証されつつある<sup>74-77)</sup>。いくつかの研究では、齧歯類にコレステロールを投与することにより、肝脂肪化や炎症の程度が増悪することや<sup>74,75)</sup>、四塩化炭素誘導性あるいは胆管結紮術による肝線維化を悪化させることなどが報告された<sup>77)</sup>。著者らも先行研究において NASH 自然発症モデルとして報告している SHR/NDmcr-cp ラットに対し<sup>62)</sup>、高脂肪、高コレステロール (5%) およびコール酸 (2%) を含む動脈硬化誘導食を摂取させると 10 週間で肝硬変を伴う NASH 肝組織像を呈することを見出した<sup>78)</sup>。これより、高脂肪食のみでなくコレステロールを同時に齧歯類に摂取させることで、短期間で高度な線維化に移行する NASH 齧歯類モデルを作成できると考えられた。

本研究では生活習慣病としての NASH を踏まえ、ヒトが通常摂取する食事成分を用いた飼料を摂取させて高度な線維化を伴う NASH 齧歯類モデルを作成することを目的とした。著者は齧歯類において長期間を要する肝線維化への進展を、短期間で生じさせることも有用な病態モデルの条件として重要であると考えている。本実験ではヒトが通常摂取する食事成分を用いた飼料として、コレステロールを添加した高脂肪食を用いることとした。また、コレステロール添加高脂肪食は著者らの先行研究における動脈硬化誘導食を参考にして調製し、その飼料を摂取させることで NASH モデルの作成を試みた。

### 3-1-2. 実験方法

#### 1. 動物モデルと実験デザイン

8 週齢雄性 SD ラット 42 匹 (日本 SLC) を購入し、初めの 1 週間は普通飼料 (MF) を摂取させ飼育環境に順化させた。順化後の 9 週齢から、普通飼料を摂取させた普通食 (Control) 群、高脂肪食を摂取させた高脂肪食 (high fat, HF) 群、コレステロール 1.25% を含む高脂肪食を摂取させた高脂肪・高コレステロール 1.25% 食 (high fat diet with 1.25% cholesterol, HFC1.25) 群、およびコレステロール 2.5% を含む高脂肪食を摂取させた高脂肪・高コレステロール 2.5% 食 (high fat diet with 2.5% cholesterol, HFC2.5) 群の 4 群各 10~11 匹ずつに分け、9 週間あるいは 18 週間飼育した。飼料はオリエンタル酵母工業に作成を依頼した。各飼料の一般成分値およびエネルギー量を Table 3-1 に示す。食餌および水は自由摂取とした。飼育室の条件等その他の事項は第 2 章に準じた (承認番号 24-39)。

#### 2. 動物処理

18 週齢および 27 週齢時の屠殺前に 6 時間絶食させたのち、ペントバルビタール麻酔下で開腹処置を行い、シリンジを用いて腹部大静脈あるいは心臓から採血した。直ちに肝臓、睪丸周囲脂肪、

脾臓を摘出し 0.9%食塩水で洗浄後、重量を測定した。病理組織学的検討用に肝臓組織の一部を切除し、10%中性ホルマリン液で固定した。肝臓の脂質代謝関連酵素活性測定用、遺伝子発現解析用および脂質定量用に肝臓組織 2.0 g, 50 mg および 0.5 g を液体窒素で凍結させた後、 $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。血液の処理は第 2 章に準じて行った。

### 3. 血清生化学的測定

血清を用いて、TG, TC, HDL-C, 遊離脂肪酸 (free fatty acid, FFA), グルコース, インスリン, アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (aspartate aminotransferase, AST), アラニンアミノトランスフェラーゼ (alanine aminotransferase, ALT), レプチンおよびアディポネクチンを測定した。各項目の原理および測定方法を以下に示す。なお、TG, TC, HDL-C, グルコース, インスリン, レプチンおよびアディポネクチンの測定原理, 方法および使用機器は第 2 章に準じた。

#### (1) 血清 FFA

FFA 濃度の測定は、アシル-CoA シンターゼ (ACS)・アシル-CoA オキシターゼ (ACOD) 法を用いた測定キットである NEFA C-テストワコー (和光純薬工業) を使用して行った。測定原理は以下のとおりである。検体中の FFA はコエンザイム A (CoA) とアデノシン-5'-三リン酸二ナトリウム (adenosine triphosphate, ATP) の存在下において、ACS の作用によりアシル-CoA, AMP およびピロリン酸を生成する。生成したアシル-CoA は、ACOD の作用により酸化され、同時に 2,3-トランス-エノイル-CoA および過酸化水素を生成する。過酸化水素は POD の作用により 3-メチル-N-エチル ( $\beta$ -ヒドロキシエチル)-アニリンと 4-アミノアンチピリンとを定量的に酸化縮合させ青紫色の色素を生成させる。これを分光光度計にて吸光度 (主波長 550 nm) を測定し、検体中の FFA 濃度を求めるものである。

本実験では、標準溶液または検体 25  $\mu\text{L}$  に発色試液 A 0.5 mL を加えて混合し、 $37^{\circ}\text{C}$ で 10 分間静置反応させ、さらに発色試液 B 1.0 mL を加えて混合し、 $37^{\circ}\text{C}$ で 10 分間静置反応後、吸光度を測定した。標準溶液はオレイン酸濃度 0.50, 1.00, 1.97 mEq/L になるように調製し、試薬盲検には発色試液 A 0.5 mL および発色試液 B 1.0 mL を加えた。検量線を作成し、検体の FFA 濃度 (mEq/L) を算出した。測定は 1 検体につき 2 回行い、その平均値を測定値とした。

#### (2) インスリン抵抗性指標

インスリン抵抗性指標は血清インスリン濃度および血清グルコース濃度を用い、次式により求めた。なお、本実験では国際単位の代わりに血清インスリン濃度 (ng/mL) を用いて算出し、インスリン抵抗性の相対的な強弱を比較することで検討を行った。

$$\text{インスリン抵抗性指標} = \text{血清インスリン値 (ng/mL)} \times \text{血清グルコース値 (mg/dL)} \div 405$$



### (3) 血清 AST および ALT

AST および ALT 濃度の測定は、ピルビン酸オキシダーゼ (POP)・N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルフォプロピル)-m-トルイジンナトリウム (TOOS) 法を用いた測定キットであるトランスアミナーゼ CII-テストワコー (和光純薬工業) を使用して行った。測定原理は以下のとおりである。検体に AST 用基質酵素液と発色試液を作用させると、検体中の AST により L-アスパラギン酸と  $\alpha$ -ケトグルタル酸からグルタミン酸とオキザロ酢酸が生成する。生成したオキザロ酢酸はオキザロ酢酸脱炭酸酵素の作用によりピルビン酸に変化する。また、検体に ALT 用基質酵素液と発色試液を作用させると、検体中の ALT により L-アラニンと  $\alpha$ -ケトグルタル酸からグルタミン酸とピルビン酸が生成する。生成したピルビン酸はチアミンピロリン酸およびフラビンアデニンジヌクレオチドの存在下において、POP の作用により酸化され、過酸化水素を生成する。生成した過酸化水素は POD の作用により TOOS と 4-アミノアンチピリンとを定量的に酸化縮合させ、青紫色の色素を生成させる。これを分光光度計にて吸光度 (主波長 555 nm) を測定し、検体中の AST および ALT 濃度を求めるものである。

本実験では AST あるいは ALT 用基質酵素液と発色試液を等量混合した AST あるいは ALT 用基質発色液 1 mL を 37°C で 5 分間加温し、標準溶液または検体 10  $\mu$ L を加えて 37°C で正確に 20 分間静置反応させた。反応停止液 1 mL を加えて混合後、1 時間以内に吸光度を測定した。標準溶液は AST および ALT 活性値 100, 198.7 Karmen 単位に調製し、試薬盲検には AST および ALT 用基質発色液のみを加えた。検量線を作成し、検体の AST および ALT 濃度を算出した。測定は 1 検体につき 2 回行い、その平均値を測定値とした。なお、本操作による測定値は Karmen 単位 (活性値) で測定されるため、次式により国際単位 (IU/L) へ変換した。

$$\text{AST あるいは ALT 値 (IU/L)} = \text{AST あるいは ALT 活性値 (Karmen 単位)} \times 0.482$$

## 4. 肝臓脂質含量の測定

肝臓組織の脂質を抽出し、TG, TC および FFA を測定した。各項目の吸光度の測定には分光光度計 UV mini 1240 を使用した。肝臓脂質の抽出および測定方法を以下に示す。

### (1) 肝臓組織の脂質の抽出

肝臓の総脂質は Folch らの方法に準じて肝臓組織から抽出した<sup>79)</sup>。操作方法は以下のとおりである。肝臓 0.5 g にメタノール 15 mL を加え、ホモジナイザー (EYELA MAZELA Z) を用いて組織片が完全に潰れるまでホモジナイズし、クロロホルム 30 mL で洗いこみながら 50 mL メスフラスコへ移し入れた。メタノール・クロロホルム混合液 (1:2, v/v) を容量が約 49 mL になるまで加えた後、40°C で 30 分間振盪し、脂質を加温抽出した。抽出液を室温まで冷却してからメタノール・クロロホルム混合液を加えて 50 mL に fill up した。定性濾紙 (No.2; アドバンテック東洋, 東京)

を用いて溶液を濾過した後、蒸留水 約 9 mL を加えて静かに転倒混和し、4°Cで一晩静置した。分離した上層（蒸留水およびメタノール相）を除去し、脂質を含む下層（クロロホルム相）を丸底フラスコに洗いながら移し入れ、50°Cの湯浴上で、ロータリーエバポレータで減圧しながらクロロホルムを吸引除去した。液体がなくなったらメタノール適量でフラスコ内壁を洗って再びエバポレータで揮発させ、これを 2~4 回繰り返した。脂質中に不純物がなくなり透明になったらヘキサンを用いてフラスコ内壁に付着した脂質をメスフラスコに回収し、25 mL に fill up した。これを肝臓総脂質濃縮液とし、各測定に用いるまで-20°Cで保存した。

## (2) 肝臓中の TG, TC および FFA 含量の測定

肝臓総脂質濃縮液を用いて TG, TC および FFA 濃度を測定した。肝臓 TG, TC および FFA 濃度の測定は、それぞれ血清 TG, TC および FFA 濃度の測定と同様の測定キットを用いて行った。

冷凍保存していた肝臓総脂質濃縮液を室温に戻した後、検体 0.5 mL (サンプル①) を試験管に取り、ヘキサンで適当な濃度に希釈した (後述)。希釈検体からさらに 0.5 mL (サンプル②) を試験管に分取し、40°Cに加温しながら窒素乾固後、イソプロパノール 100  $\mu$ L を加えてよく混合し、これを検体として各測定に用いた。各標準溶液は採取量に対してそれぞれ総液量が 100  $\mu$ L になるようにイソプロパノールを適量ずつ加え、試薬盲検にはイソプロパノール 100  $\mu$ L のみを加えた。検量線を作成し、検体の脂質濃度を算出した。測定は 1 検体につき 2 回行い、その平均値を測定値とした。なお、肝臓の各脂質量は次式により算出した。

$$\begin{aligned} & \text{肝臓脂質量 (mg/g tissue あるいは mmol/g tissue)} \\ & = \{ \text{検体濃度 (mg/mL) あるいは (mmol/L)} \} \\ & \quad \times \{ \text{希釈に用いたヘキサン量 (mL) / サンプル②の量 (0.5mL)} \} \\ & \quad \times \{ \text{肝臓総脂質濃縮液量 (25 mL) / サンプル①の量 (0.5 mL)} \} \div \{ \text{肝重量 (0.5 g)} \} \times 10^3 \end{aligned}$$

TG 濃度の測定では全検体を 10 倍希釈した。TC 濃度の測定では 18 週齢ラット検体を 20 倍希釈、27 週齢ラット検体では Control および HF 群検体を 10 倍希釈、HFC1.25 および HFC2.5 群検体を 40 倍希釈した。FFA 濃度の測定では 18 週齢ラット検体を 20 倍希釈、27 週齢ラット検体を 10 倍希釈した。

## (3) 薄層クロマトグラフィー法を用いたジグリセリド (diglyceride, DG) の定量

肝臓総脂質濃縮液 200  $\mu$ L を試験管に分取し、40°Cに加温しながら窒素乾固後、クロロホルム 30  $\mu$ L 程度に溶解したものを試料として用いた。シリカゲルプレート (TLC シリカゲル 60 F<sub>254</sub>; Merck Japan) に試料をスポットし、あらかじめ展開溶媒を 1 cm の深さ程入れて飽和させた展開槽中にプレートを静かに入れて、脂質を分離した。展開溶媒の組成を以下に示す。ヘキサン : ジエチルエーテル : 酢酸 = 80 : 20 : 1 (v/v)。試料と同時に既知濃度の標準品も展開した。標準品は cis-9-monoolein

(C18:1), cis-9-1,2-diolein (C18:1), cis-9-1,3-diolein (C18:1), および cis-9-triolein (C18:1)が 25% (wt/wt) ずつ含まれた混合物 (Mono, Di, Triglyceride Mix ; Sigma-Aldrich Japan) を用いた。展開終了後, シリカゲルプレートを乾燥させ, ヨウ素で呈色した。呈色後のプレート画像をスキャナで取り込み, AdobePhotoshop CS ver. 8.0.1 (Adobe, San Jose, CA, USA) を用いて画像処理を行い, 画像解析ソフト Image J ver 1.43 によって Integrated density を求めた。各群の検体のうち (n=5-6), 3 検体ずつを抽出して 1 枚のシリカゲルプレート内で展開し, Control 群の Integrated density 値 (平均値) に対する HF, HFC1.25 および HFC2.5 群の比を算出した。さらに, 独立した 3 枚のプレートの算出値を平均し各群の代表値とした。

## 5. 肝臓の病理組織学的検討

### (1) HE 染色

第 2 章に準じて行った。

### (2) アザン染色

肝臓組織が包埋されたパラフィンブロックをマイクロトームで 4  $\mu\text{m}$  の厚さに薄切し, 脱パラフィン処理し水洗した後, 10%重クロム酸カリウム水溶液と 10%トリクロール酢酸水溶液を等量混合した媒染剤に 10~20 分浸した。再び水洗した後, アゾカルミン G 液に室温で 30 分以上浸した。蒸留水で水洗し, アニリン・アルコールで数秒間分別し, 酢酸・アルコールで分別を停止し, 水洗後, 鏡検して染色状態を確認した。その後, 5%リンタングステン酸水溶液に 1 時間~1 晩浸した。水洗後, アニリン青・オレンジ G 混合液に 30~60 分間浸し, 100%アルコールで分別脱水し, 3 槽以上のキシロールで透徹, 封入した。これは, 分子の大きさの異なる酸性色素がそれぞれの組織の持つ構造上の差異に対する親和性を利用した染色法である。

### (3) 肝病変の評価

肝病変の評価は第 2 章の組織学的評価に準じて病理医が行った。診断基準は Kleiner らが提唱した「NASH Clinical Research Network Scoring System」に従った<sup>80)</sup>。この診断基準は steatosis (脂肪沈着), lobular inflammation (小葉内炎症), hepatocyte ballooning (肝細胞の風船様腫大) を Table 3-2 および Figure 3-1 に示す分類に従ってスコア化し, NASH の程度を評価する方法である。さらに, 脂肪沈着, 小葉内炎症, 肝細胞の風船様腫大の 3 カテゴリーを合わせて NAFLD activity score (NAS) とし, 合計点数 8 点中, 0~2 点を NASH ではない, 3~4 点を判定保留, 5 点以上を NASH と判断した。また, fibrosis (線維化) の評価も行った。

#### (4) 肝組織の免疫組織化学染色および評価

肝臓における星細胞および Kupffer 細胞を検出するため、デスミンおよび CD68 免疫染色を行った。肝組織が包埋されたパラフィンブロックをマイクロトームで薄切し、脱パラフィン処理し水洗した。15 分間のマイクロ波照射により抗原賦活後、徐々に冷却し、内因性ペルオキシダーゼを過酸化水素含有 TBS でブロックした。非特異的反応を BSA 5% 含有 TBS によりブロック後、一次抗体であるマウスモノクローナル抗デスミン (clone D33 ; DAKO) あるいは抗ラット CD68 モノクローナル抗体 (ED1 ; Serotec, Raleigh, NC, USA) を一晚反応させた。切片を TBS-Tween で洗浄し、二次抗体としてマウス抗体用 Envision-PO (DAKO) を用いて室温で 60 分間反応させた。TBS にて洗浄後、DAB (Vector) を用いて発色させ、ヘマトキシリンで対比染色後に鏡検に供した。

染色性の評価において、デスミン発現強度は 400 倍観察下における肝実質におけるデスミン陽性細胞数に応じて、「陽性細胞なし (grade 0)」、「陽性細胞 1~2 個 (grade 1)」、「陽性細胞 3~10 個 (grade 2)」および「陽性細胞 10 個以上 (grade 3)」の 4 段階に分類した。Kupffer 細胞における CD68 発現強度は染色性に応じて、「正常状態でみられる染色性 (grade 0)」、「軽度に染まる (grade 1)」、「中等度に染まる (grade 2)」および「高度に染まる (grade 3)」の 4 段階に分類した。

#### 6. 肝臓における脂質代謝関連酵素活性の測定

肝組織をスクロース密度勾配遠心法により分離し、ミトコンドリア画分を用いて carnitine palmitoyltransferase (CPT), サイトゾル画分を用いて malic enzyme, glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH), ミクロソーム画分を用いて phosphatidate phosphohydrolase (PAP) の活性を測定した。なお、malic enzyme, G6PDH, CPT の測定には分光光度計 UV-2500PC (島津製作所) を、PAP および各画分のタンパク質量の測定には分光光度計 UV mini 1240 を用いた。

##### (1) 細胞画分の調製

凍結保存していたラットの肝臓 2.0 g にホモジネート緩衝液 (HG buffer) として 0.25 M スクロースおよび 1 mM EDTA を含むトリス塩酸緩衝液 (pH 7.4) 12 mL を加え、ホモジナイザー (EYELA MAZELA Z) を用いて氷冷下でホモジナイズし、4°C, 700×g で 10 分間遠心分離 (3,000 rpm ; 卓上遠心機 H-103N) し、残渣や核を沈殿させた。上清を高速遠心チューブに移し、4°C, 10,000×g で 10 分間遠心分離 (11,000 rpm, インバータ・コンパクト高速冷却遠心機 6900, ローター形式番号 RA-400, 久保田製作所, 群馬) した。さらに上清を超遠心チューブ (12PA シールチューブ ; 日立工機, 東京) に移し、残りの沈殿物に HG buffer 2.5 mL を加え、懸濁したものをミトコンドリア画分とした。上清を移した超遠心チューブは HG buffer で内腔を満たし、チューブシーラー (STF-1 ; 日立工機) で密封した。4°C, 125,000×g で 60 分間遠心分離 (40,000 rpm ; 日立分離用超遠心機 CP100β, ローター形式番号 P55AT, 日立工機) し、上清をサイトゾル画分、残りの沈殿物に HG buffer 2 mL

を加え、懸濁したものをマイクロソーム画分とした。各画分は測定に用いるまで $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。

## (2) Malic enzyme 活性

Malic enzyme 活性の測定は Kelley らの方法に準じて行った<sup>81)</sup>。測定原理は以下のとおりである。Malic enzyme は細胞質において L-リンゴ酸を nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP<sup>+</sup>) 存在下で脱炭酸し、ピルビン酸を生成する反応を触媒する酵素である。この脱炭酸反応において生成した NADPH の吸光度 (主波長 340 nm) の変化を経時的に測定し、NADPH の生成速度を算出することにより検体中の malic enzyme 活性を求めるものである。

本実験では最終濃度 1.2 mM L-リンゴ酸、4 mM 塩化マンガン、1.2 mM NADP を含む 64 mM トリエタノールアミン緩衝液 (pH 7.4) にサイトゾル検体 40  $\mu\text{L}$  を添加し (総容量 1 mL)、 $27^{\circ}\text{C}$  で 2 分間吸光度を追跡した。活性値は次式により算出した。

Malic enzyme 活性 (nmol/min/mg protein)

$$= \left[ \left\{ \text{反応時間中の吸光度の変化} \div (6.22 \times 10^3) \times \text{反応液総量} (1.0 \text{ mL} \times 10^{-3}) \right\} \div \{ 1 (\text{min}) \} \right. \\ \left. \div \{ \text{タンパク質量} (\text{mg/mL}) \times \text{検体量} (40 \mu\text{L} \times 10^{-3}) \} \right] \times 10^9$$

反応時間中の吸光度の変化は、測定開始後 40 秒から 100 秒の 1 分間の吸光度の差である。 $6.22 \times 10^3$  は NADPH のモル吸光係数 ( $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) である。

## (3) G6PDH 活性

G6PDH 活性の測定は Kelley らの方法に準じて行った<sup>81)</sup>。測定原理は以下のとおりである。G6PDH は細胞質においてペントースリン酸回路のグルコース 6-リン酸から 6-ホスホグルコノラク톤を生成すると同時に、NADP<sup>+</sup>を NADPH に還元する。さらに、ホスホグルコン酸デヒドロゲナーゼの作用により 6-ホスホグルコノラク톤がリブリース 5-リン酸になる脱炭酸反応でも NADPH が生成される。この NADPH の吸光度 (主波長 340 nm) の変化を経時的に測定し、NADPH の生成速度を算出することにより検体中の G6PDH 活性を求めるものである。

本実験では最終濃度 3.3 mM グルコース 6-リン酸、1.6 mM NADP、0.5 unit 6-ホスホグルコン酸デヒドロゲナーゼおよび 30 mM 塩化マグネシウムを含む 0.16 M トリス塩酸緩衝液 (pH 7.6) にサイトゾル検体 50  $\mu\text{L}$  を添加し (総容量 1 mL)、 $30^{\circ}\text{C}$  で 3 分間吸光度を追跡した。活性値は次式により算出した。

G6PDH 活性 (nmol/min/mg protein)

$$= \left[ \left\{ \text{反応時間中の吸光度変化} \div (6.22 \times 10^3) \times \text{反応液総量} (1.0 \text{ mL} \times 10^{-3}) \right\} \right. \\ \left. \div \{ 1 (\text{min}) \} \div \{ \text{タンパク質量} (\text{mg/mL}) \times \text{検体量} (50 \mu\text{L} \times 10^{-3}) \} \right] \times 10^9 \div 2$$

反応時間中の吸光度の変化は、測定開始後 100 秒から 160 秒の 1 分間の吸光度の差である。 $6.22 \times 10^3$  は NADPH のモル吸光係数 ( $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) である。2 で除するのはグルコース 6-リン酸分子か

ら NADPH 2 分子が転換されるためである。

#### (4) PAP 活性

PAP 活性の測定は Walton らの方法に準じて行った<sup>82)</sup>。測定原理は以下のとおりである。PAP は主に小胞体に存在し、ホスファチジン酸を加水分解して TG の前駆体である DG と無機リン酸を生成する酵素である。この無機リン酸は酸性下ではモリブデン酸アンモニウムと結合してリンモリブデン酸となり、アスコルビン酸によりリンモリブデン酸中のモリブデンが還元されて青色を呈する。これを分光光度計により吸光度（主波長 820 nm）を測定し、検体中の PAP 活性を求めるものである。

本実験では反応試薬として 8.125 mM 塩化マグネシウムおよび 23.125 mM EDTA を含む 0.125 M トリス塩酸緩衝液（pH 7.0）、1.0 mM ホスファチジン酸および 1.0 mM ホスファチジルコリンを含む 0.9% 塩化ナトリウム溶液（PCPA 溶液）ならびに 0.13% ラウリル硫酸ナトリウム、1.25% アスコルビン酸、0.32% モリブデン酸アンモニウムおよび 0.375 M 硫酸を含む混合液をあらかじめ調製した。標準溶液はリン濃度 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5  $\mu\text{g/mL}$  となるように調製した。測定は本検、PCPA 盲検、検体盲検、標準曲線用試験の 4 種を行い、PCPA 盲検は検体ごとに測定した。本検にはトリス塩酸緩衝液 80  $\mu\text{L}$ 、PCPA 溶液 80  $\mu\text{L}$ 、HG buffer（上述 3-1-2-6-(1)）で 5 倍希釈したマイクロソーム検体 40  $\mu\text{L}$ 、PCPA 盲検にはトリス塩酸緩衝液 80  $\mu\text{L}$ 、0.9% 塩化ナトリウム溶液 80  $\mu\text{L}$ 、HG buffer で 5 倍希釈したマイクロソーム検体 40  $\mu\text{L}$ 、検体盲検にはトリス塩酸緩衝液 80  $\mu\text{L}$ 、PCPA 溶液 80  $\mu\text{L}$ 、HG buffer 40  $\mu\text{L}$ 、標準曲線用試験にはトリス塩酸緩衝液 80  $\mu\text{L}$ 、調製した標準溶液 80  $\mu\text{L}$ 、HG buffer 40  $\mu\text{L}$  をそれぞれ分注し、37°C で 15 分間振盪反応させた。その後、混合液 800  $\mu\text{L}$  を加えて混合し、45°C で 20 分間静置反応後、吸光度を測定した。検量線を作成し、本検、PCPA 盲検、検体盲検のそれぞれのリン濃度を算出した。活性値を算出した式を下記に示す。なお 30.97 はリンの分子量である。

PAP 活性 ( nmol/min/mg protein )

$$= [ \{ \{ ( \text{本検のリン量} ) \times \text{希釈倍数}(5) - ( \text{PCPA 盲検のリン量} ) - ( \text{検体盲検のリン量} ) \} \div 30.97 \} \div \{ 15 (\text{min}) \} \div \{ \text{タンパク質量} (\text{mg/mL}) \times \text{検体量} (40 \mu\text{L} \times 10^{-3}) \} ] \times 10^9$$

#### (5) CPT 活性

CPT 活性の測定は Markwell らの方法に準じて行った<sup>83)</sup>。測定原理は以下のとおりである。CPT はミトコンドリア外膜に存在しており、長鎖アシル CoA をカルニチンと結合させアシルカルニチンへ転換する反応を触媒する酵素である。長鎖アシル CoA（パルミトイル CoA）から遊離する CoA は 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) と反応して黄色色素 2-nitro-5-thio benzoic acid (TNB) を生成させる。この吸光度（主波長 412 nm）の変化を分光光度計にて経時的に測定し、CoA の生

成速度を算出することにより検体中の CPT 活性を求めるものである。

本実験では最終濃度 37.5  $\mu\text{M}$  パルミトイル CoA, 0.25 mM DTNB, 1.25 mM EDTA および 0.1% Triton X-100 を含む 58 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) にミトコンドリア検体 20  $\mu\text{L}$  を添加し, 27°C で 4 分間吸光度を追跡した (ブランク). その後, L-カルニチン (最終濃度 1.25 mM) を添加し (総容量 1 mL), さらに 4 分間吸光度を追跡した. 活性値は次式により算出した.

CPT 活性 (nmol/min/mg protein)

$$= \{ [ ( \text{反応時間中の吸光度変化} - \text{ブランクの吸光度変化} ) \div ( 13.6 \times 10^3 ) \times$$

$$\text{反応液総量 ( 1.0 mL } \times 10^{-3} ) \} \div \{ 1 \text{ (min)} \} \div \{ \text{タンパク質量 (mg/mL)} \times \text{検体量 ( 20 } \mu\text{L} \times 10^{-3} ) \} \times 10^9$$

反応時間中の吸光度の変化は, L-カルニチン添加後 100 秒から 160 秒の 1 分間の吸光度の差であり, ブランクの吸光度変化は L-カルニチン添加前の測定開始後 100 秒から 160 秒の 1 分間の吸光度の差である.  $13.6 \times 10^3$  は TNB のモル吸光係数 ( $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) である.

#### (6) 各画分のタンパク質濃度の定量

タンパク質濃度の測定は, Lowry らの方法に準じて行った<sup>84)</sup>. 測定原理は以下のとおりである. タンパク質をアルカリ性下にて銅イオン ( $\text{Cu}^{2+}$ ) で処理すると,  $\text{Cu}^{2+}$  とタンパク質のペプチド結合がキレート結合して赤紫色の錯イオンを形成する. さらに還元性アミノ酸残基がフェノール試薬と定量的に反応して青色に発色する. これを分光光度計にて吸光度 (主波長 750 nm) を測定し, 検体中のタンパク質量を求めるものである.

本実験では標準溶液または 100 倍希釈した検体 400  $\mu\text{L}$  に反応試薬 (後述) 2 mL を混合し, 室温で 10 分間静置反応させた. 1N フェノール試薬 200  $\mu\text{L}$  を加えて室温で 30 分間静置反応後, 吸光度を測定した. 標準溶液は BSA を用い, アルブミン濃度 0.04, 0.08, 0.12, 0.16, 0.20 mg/mL に調製し, 試薬盲検には蒸留水のみを加えた. 検量線を作成し, 検体のタンパク質濃度を算出した. 測定は 1 検体につき 2 回測定し, 各平均値を測定値とした. 反応試薬の組成は以下に示すとおりである. 0.1N 水酸化ナトリウムおよび 2% 炭酸ナトリウム水溶液 : 0.5% 硫酸銅水溶液 : 1% 酒石酸カリウムナトリウム水溶液 = 100 : 1 : 1 (v/v).

#### 7. 肝臓における遺伝子発現解析

Real-time PCR 法により, 肝臓における脂質・胆汁酸代謝および線維化発症に関連する遺伝子発現を解析した. 解析した遺伝子は以下のとおりである. Low-density lipoprotein receptor (LDLR), 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase (HMGCR), ATP-binding cassette transporter G5 (ABCG5), cytochrome P450 7A1 (CYP7A1), bile acid CoA : amino acid N-acyltransferase (BAT), bile salt export pump (BSEP), multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2), fatty acid synthase (FAS), fatty acid transport protein 5 (FATP5), microsomal triglyceride transfer protein (MTP), liver X receptor  $\alpha$

(LXR- $\alpha$ ), farnesoid X receptor (FXR), sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c), SREBP-2, procollagen type I  $\alpha$  1 (COL1A1), procollagen type IV  $\alpha$  1 (COL4A1), transforming growth factor  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1).

#### (1) 総 RNA の抽出

肝組織に Tripure Isolation Reagent を組織重量 50 mg あたり 1.5 mL を加え、第 2 章に準じた方法で総 RNA を抽出した。RNA 沈殿物に Tris-EDTA buffer を加えて懸濁後、総 RNA 濃度が 0.5  $\mu$ g/ $\mu$ L になるように Tris-EDTA buffer で希釈し、 $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。

#### (2) 逆転写反応および real-time PCR

逆転写および real-time PCR は第 2 章に準じて行った。逆転写反応液の組成を以下に示す。  
5 $\times$ PrimeScript RT Master Mix : RNase Free dH<sub>2</sub>O : 総 RNA 溶液 = 2 : 7 : 1 (v/v)。PCR 反応液の調製には、THUNDERBIRD<sup>®</sup> SYBR<sup>®</sup> qPCR Mix を用いた。合成プライマー (グライナー・ジャパン) の塩基配列を Table 3-3 に示す。

### 8. 肝臓のミトコンドリアおよびマイクロソーム画分におけるコレステロール量の測定

肝臓のミトコンドリアおよびマイクロソーム画分をスクロース密度勾配遠心法により分画し、各画分における TC および遊離型コレステロール (free cholesterol, FC) 濃度を測定した。

#### (1) ミトコンドリアおよびマイクロソーム画分の精製

3-1-2-6 と同様の方法で肝臓組織 2.0 g を用いて各画分を調製した。HG buffer で懸濁したミトコンドリアおよびマイクロソーム画分を再度、 $4^{\circ}\text{C}$ 、10,000 $\times$ g で 5 分間遠心分離した。上清を除去し同様の作業を 2 回繰り返した後、HG buffer で懸濁したものを検体として用いた。

#### (2) ミトコンドリアおよびマイクロソーム画分に含まれる TC および FC 濃度の測定

TC 濃度は血清 TC 濃度の測定方法に準じた。FC 濃度の測定は、コレステロールオキシダーゼ・DAOS 法を用いた測定キットである遊離コレステロール E-テストワコー (和光純薬工業) を使用して行った。測定原理は以下のとおりである。検体中の FC はコレステロールオキシダーゼによって酸化され過酸化水素を生じる。過酸化水素は POD の作用により DAOS と 4-アミノアンチピリンとを定量的に酸化縮合させ、青色の色素を生成させる。これを分光光度計にて吸光度 (主波長 600 nm) を測定し、検体中の FC 濃度を求めるものである。

本実験では、標準溶液またはミトコンドリアおよびマイクロソーム検体 10  $\mu$ L に発色試液 600  $\mu$ L を加えて混ぜ、 $37^{\circ}\text{C}$  で 5 分間静置反応させ、吸光度を測定した。標準溶液はコレステロール濃度 25,



50, 100, 196.8 mg/dL に調製し，試薬盲検には発色試液のみを加えた．検量線を作成し，検体の FC 濃度を算出した．測定は 1 検体につき 2 回行い，その平均値を測定値とした．

### (3) ミトコンドリアおよびマイクロソーム画分におけるタンパク質量の測定

ミトコンドリア画分のタンパク質量を 3-1-2-6 に準じて測定した．TC および FC 濃度はミトコンドリアおよびマイクロソーム画分のタンパク質量 1 mg あたりの濃度 ( $\mu\text{g}/\text{mg protein}$ ) で示した．

## 9. 統計処理

統計処理は統計解析ソフト SPSS Statistics 21 (IBM Corporation) を用いて行った．その他の事項は第 2 章に準じた．

### 3-1-3. 実験結果

9 週齢 SD ラットに Control, HF, HFC1.25 および HFC2.5 食を 9 週間あるいは 18 週間摂取させた後の身体所見，肝組織学的所見，血清・肝臓生化学検査値ならびに肝臓における脂質代謝関連酵素活性や遺伝子発現を示す．なお，各群の実験例数 (n) に関して，Control, HF, HFC1.25 および HFC2.5 食を 9 週間摂取した 18 週齢 SD ラットにおいて，HFC2.5 群の 1 匹のみ，食餌摂取開始後 7 週目から摂食量の低下に伴って著しい体重減少がみられ，また採取した血清中に脂質含有量が多く正確な血清生化学的測定が困難であった．よって，身体所見および血清生化学検査値の各項目において Control 群 (n = 5)，HF 群 (n = 5)，HFC1.25 群 (n = 5) および HFC2.5 群 (n = 4) の 4 群で，それ以外の項目では各群 n = 5 における解析および比較を行った．また，Control, HF, HFC1.25 および HFC2.5 食を 18 週間摂取した 27 週齢 SD ラットにおいて，HFC2.5 群の 1 匹のみ，食餌摂取開始後 16 週目から摂食量が低下し体重減少がみられたため，身体所見の各項目において Control 群 (n = 5)，HF 群 (n = 5)，HFC1.25 群 (n = 6) および HFC2.5 群 (n = 5) の 4 群で解析および比較を行った．また，HFC2.5 群の 2 匹から採取した血清中に脂質含有量が多く正確な測定が困難であったため，血清生化学検査値の各項目において Control 群 (n = 5)，HF 群 (n = 5)，HFC1.25 群 (n = 6) および HFC2.5 群 (n = 4) の 4 群で解析および比較を行った．

#### 1. Control, HF, HFC1.25 および HFC2.5 食を摂取した SD ラットにおける身体所見

9 週間および 18 週間の摂餌期間 (9 週齢～18 および 27 週齢) 中の成長曲線を Figure 3-2 に示す．

### (1) 18 週齢 SD ラットにおける身体所見

総エネルギー摂取量は 4 群間に有意な差はみられなかったが、終体重は HF 群が Control 群に比べて有意に低値を示した (Table 3-4)。体重増加量は HF および HFC2.5 群がそれぞれ Control 群に比べて有意に少なかった。肝臓重量/体重比は Control 群と HF 群は同程度の値を示したが、HFC1.25 および HFC2.5 群が Control および HF 群に比べ約 2 倍もの有意に高い値を示した。一方で、睾丸周囲脂肪重量/体重比は HF、HFC1.25 および HFC2.5 群がそれぞれ Control 群に比べて有意に低値を示した。

### (2) 27 週齢 SD ラットにおける身体所見

総エネルギー摂取量は 4 群間に有意な差はみられなかったが、終体重は HF、HFC1.25 および HFC2.5 群がそれぞれ Control 群に比べて有意に低値を示した (Table 3-4)。体重増加量は HF、HFC1.25 および HFC2.5 群が Control 群に比べて有意に少なかった。肝臓重量/体重比は Control 群と HF 群は同程度の値を示したが、HFC1.25 および HFC2.5 群が Control および HF 群に比べ約 3 倍もの有意な高値を示した。一方で、睾丸周囲脂肪重量/体重比は HF、HFC1.25 および HFC2.5 群がそれぞれ Control 群に比べて有意に低値を示し、また、HFC1.25 群は HF 群に比べて有意に低値を示した。脾臓/体重比は HFC1.25 および HFC2.5 群が Control および HF 群に比べて有意に高値を示した。

## 2. Control, HF, HFC1.25 および HFC2.5 食を摂取した SD ラットにおける血清生化学検査値

### (1) 18 週齢 SD ラットにおける血清生化学検査値

血清 TG 値は HFC1.25 群が Control 群に比べて有意に低値を示した。血清 TC 値は HFC1.25 および HFC2.5 群が Control 群および HF 群に比較して有意に高値を示した。また、HFC2.5 群の血清 TC 値は HFC1.25 群より有意に高値を示した。血清 AST 値は HFC2.5 群が Control、HF および HFC1.25 群に比べて有意に高値を示した。血清 ALT 値は HFC2.5 群が Control、HF 群に比べて有意に高値を示した。血清レプチン値は HFC1.25 および HFC2.5 群が Control 群に比べて有意に低値を示した。血清 HDL-C、FFA およびアディポネクチン値は 4 群間に有意な差はみられなかった。また、血清グルコース、インスリン値およびインスリン抵抗性指標において 4 群間に有意な差はみられなかった (Table 3-5)。

### (2) 27 週齢 SD ラットにおける血清生化学検査値

血清 TG 値は Control 群に比べて他 3 群で低い傾向を示したが、各群間で有意な差はみられなかった (ANOVA :  $P = 0.030$ )。血清 TC 値は 18 週齢時と同様に HFC1.25 および HFC2.5 群が Control 群および HF 群に比較して有意に高値を示した。血清インスリン値は Control 群に比べて他 3 群で低値を示し、Control 群と HFC1.25 および HFC2.5 群間で有意な差がみられた。この結果として、イ

ンスリン抵抗性指標は Control 群に比べて他 3 群で有意に低値を示し、Control 群に比べて他 3 群ではインスリン抵抗性が改善していることが示唆された。血清 AST および ALT 値は HFC1.25 および HFC2.5 群が Control および HF 群に比べて有意に高値を示した。血清レプチン値は HF, HFC1.25 および HFC2.5 群が Control 群に比べて有意に低値を示した。血清 HDL-C, FFA, グルコースおよびアディポネクチン値においては 4 群間に有意な差はみられなかった (Table 3-5)。

### 3. Control, HF, HFC1.25 および HFC2.5 食を摂取した SD ラットにおける肝臓脂質含量

#### (1) 18 週齢 SD ラットにおける肝臓脂質含量

肝臓 TG 濃度は Control 群に比べて他 3 群で高値を示し、Control 群と HFC1.25 および HFC2.5 群間で有意な差がみられた (Figure 3-3)。また、HFC1.25 群の肝臓 TG 濃度は HF 群に比べて有意に高値を示した。肝臓 TC 濃度は Control および HF 群間で有意な差はみられず、HFC1.25 群および HFC2.5 群は Control および HF 群に比べて有意に高値を示した。肝臓 FFA 濃度は有意な差はみられないものの HF 群が Control 群に比べて高値を示した。また、HFC1.25 群および HFC2.5 群の肝臓 FFA 濃度は HF 群に比べてそれぞれ約 1.8 倍、約 2 倍もの有意に高い値を示した。

#### (2) 27 週齢 SD ラットにおける肝臓脂質含量

肝臓 TG 濃度は Control 群に比べて他 3 群で有意に高値を示した (Figure 3-3)。また、HFC1.25 および HFC2.5 群の肝臓 TG 濃度は HF 群に比べて有意に高値を示した。肝臓 TC および FFA 濃度は Control および HF 群間で有意な差はみられず、HFC1.25 群および HFC2.5 群は Control および HF 群に比べて有意に高値を示した。

#### (3) 27 週齢 SD ラットにおける肝臓 DG 量

TLC 分析による DG 発現を Figure 3-4a に示す。Control 群に対する肝臓 DG 量は HF, HFC1.25 および HFC2.5 群で高値を示し、HFC1.25 群では Control 群の約 2 倍量であった (Figure 3-4b)。

### 4. Control, HF, HFC1.25 および HFC2.5 食を摂取した SD ラットにおける肝組織学的所見

#### (1) 18 週齢 SD ラットにおける肝組織学的所見

HE 染色およびアザン染色による肝組織像の各群の代表例を Figure 3-5 に、各個体の肝臓における脂肪沈着、小葉内炎症、肝細胞の風船様腫大、および線維化の評価を Table 3-6 に示す。Control 群において肝脂肪沈着、炎症および線維化を呈した個体はみられなかった。肝臓の脂肪沈着所見に関して、HF 群の 5 匹中 3 匹に中心静脈領域 (zone 3) に軽～中等度の脂肪沈着がみられたのに対し、HFC1.25 および HFC2.5 両群のすべての個体で高度 (grade 3) な小～大滴性の脂肪沈着がみられた。肝小葉内炎症所見に関して、HF 群の 5 匹中 2 匹に軽度 (grade 1) な炎症がみられたのに対し、HFC1.25

および HFC2.5 両群のすべての個体で中等度 (grade 2) の炎症がみられた。肝細胞の風船様腫大所見に関して、HF 群の 5 匹中 2 匹に少数の風船様肝細胞がみられたのに対し、HFC2.5 群の全個体で多数の風船様肝細胞がみられた。これらの脂肪沈着、小葉内炎症および肝細胞の風船様腫大の 3 項目を合計した NAS により、HFC1.25 および HFC2.5 群のすべての個体で「NASH」と判断された一方で、HF 群では「NASH」と判断された個体はみられなかった。脂肪沈着、小葉内炎症、肝細胞の風船様腫大および NAS の grade および score は、Control および HF 群に比べて、HFC1.25 および HFC2.5 群で有意に高値を示した (すべての項目において  $P < 0.001$ )。肝線維化所見に関して、Control および HF 群の全個体において線維化所見はみられなかったのに対し、HFC1.25 および HFC2.5 群では全個体において軽～高度な線維化がみられた ( $P < 0.001$ )。さらに、HFC2.5 群の 5 匹中 2 匹 (40%) において stage 4 の線維化、すなわち肝硬変がみられた。

## (2) 18 週齢 SD ラットにおける肝臓の免疫組織化学的評価

線維化肝ではコラーゲンを主体とする細胞外基質の過剰蓄積がみられ、その主要な産生源は活性化した肝星細胞であると考えられている。星細胞は活性化されると筋線維芽細胞様の細胞へ形質転換し、細胞骨格タンパク質であるデスミンが増加する。肝星細胞の活性化状態を評価するため、抗デスミン抗体を用いた免疫染色を行った。デスミンを発現した活性化星細胞は HFC1.25 および HFC2.5 群で顕著に多くみられた (Figure 3-5)。対照的に Control および HF 群ではデスミン陽性星細胞はほとんどみられなかった ( $P = 0.001$ , Table 3-6)。

肝臓の炎症や線維化の発症に寄与するサイトカインの多くは血液中のマクロファージや肝臓のマクロファージである Kupffer 細胞で産生される。肝細胞の障害が生じるとマクロファージの遊走および炎症局所への集積、ならびに Kupffer 細胞の活性化に伴って局所炎症は増幅される。肝臓の炎症状態を評価するため、マクロファージに特異的に反応する抗 CD68 抗体を用いた免疫染色を行った。CD68 陽性マクロファージの集積は HFC1.25 および HFC2.5 群で高頻度にみられたが、Control および HF 群ではみられなかった ( $P = 0.001$ , Figure 3-5, Table 3-6)。

## (3) 27 週齢 SD ラットにおける肝組織学的所見

HE 染色およびアザン染色による肝組織像の各群の代表例を Figure 3-5 に、各個体の組織学的評価を Table 3-7 に示す。Control 群において肝脂肪沈着、炎症および線維化を呈した個体はみられなかった。肝臓の脂肪沈着所見に関して、HF 群ではごく軽度の脂肪沈着がみられ、一方で HFC1.25 および HFC2.5 群のすべての個体で高度 (grade 3) な小脂肪滴優位な脂肪沈着がみられた。肝小葉内炎症および肝細胞の風船様腫大所見に関して、HF 群ではほとんどみられなかったのに対し、HFC1.25 および HFC2.5 群では全個体で高度な炎症と肝細胞の風船様腫大がみられた。NAS により、HFC1.25 および HFC2.5 群では全個体で「NASH」と判断されたが、HF 群では全個体で「NASH」で

ない」と判断された。脂肪沈着，小葉内炎症，肝細胞風船様腫大および NAS の grade あるいは score は，Control および HF 群に比べて HFC1.25 および HFC2.5 群で有意に高値を示した（すべての項目において  $P < 0.001$ ）。肝線維化所見に関して，HF 群では 5 匹中 2 匹でごく軽度な線維化がみられ，HFC1.25 および HFC2.5 群では全個体において高度な線維化（grade 3~4）がみられた（ $P < 0.001$ ）。また，肝硬変への進展は HFC1.25 群で 6 匹中 2 匹（33%），HFC2.5 群で 6 匹中 5 匹（83%）でみられた。

HFC1.25 群の 2 個体において肉眼的に肝腫瘍様所見がみられたため，組織学的に検討した結果，肝細胞癌マーカーである glutamine synthetase 陰性であった。おそらく循環障害による細胞の変性や壊死による組織像であると考えられる（データ未記載）。

## 5. Control, HF, HFC1.25 および HFC2.5 食を摂取した SD ラットにおける肝臓の脂質代謝関連酵素活性

### (1) 18 週齢 SD ラットにおける脂質代謝関連酵素活性

Malic enzyme は脂肪酸合成に必要な NADPH を生成する反応を触媒する。Malic enzyme 活性は HF 群が Control 群に比べて有意に低値を示した（Figure 3-6）。また，Malic enzyme 活性は HF, HFC1.25 および HFC2.5 群においてコレステロール添加濃度依存的に高値を示す傾向がみられたが，群間で有意な差はみられなかった。G6PDH はペントースリン酸回路において脂肪酸合成に必要な NADPH を生成する反応を触媒する。G6PDH 活性は Malic enzyme 活性と同様に，HF 群が Control 群に比べて低値を示したが群間に有意な差はみられなかった。また，G6PDH 活性は HF, HFC1.25 および HFC2.5 群においてコレステロール添加濃度依存的に高値を示し，HF および HFC2.5 群間で有意な差が認められた。PAP は TG 合成経路の律速酵素である。PAP 活性は Control 群および HF 群において同程度の値を示し，HFC1.25 および HFC2.5 群が Control 群に比べて有意に高値を示した。CPT は脂肪酸  $\beta$  酸化経路の律速酵素である。CPT 活性は有意ではないものの HF 群が Control 群に比べて高値を示し，HF, HFC1.25 および HFC2.5 群においてコレステロール添加濃度依存的に低値を示す傾向がみられたが，各群間で有意な差はみられなかった（ANOVA :  $P = 0.027$ ）。

### (2) 27 週齢 SD ラットにおける脂質代謝関連酵素活性

27 週齢 SD ラットにおける各脂質代謝関連酵素活性は，18 週齢 SD ラットと類似した傾向を示した。Malic enzyme 活性は HF 群が Control 群に比べて有意でないものの低値を示し，HFC1.25 および HFC2.5 群においてコレステロール添加濃度依存的に高値を示した（HF および HFC2.5 群間で有意差あり，Figure 3-6）。G6PDH 活性は HFC1.25 および HFC2.5 群が Control および HF 群に比べて有意に高値を示した。PAP 活性は Control 群および HF 群において同程度の値を示し，Control および HF 群に比べて HFC1.25 および HFC2.5 群がコレステロール添加濃度依存的に高値を示したが，群

間に有意な差はみられなかった (ANOVA :  $P = 0.032$ , Control vs. HFC2.5 :  $P = 0.076$ , HF vs. HFC2.5 :  $P = 0.058$ ). CPT 活性は HF 群が Control 群に比べて高値傾向を示し, HF 群に比べて HFC1.25 および HFC2.5 群で有意に低値を示した.

## 6. Control, HF, HFC1.25 および HFC2.5 食を摂取した SD ラットの肝臓のミトコンドリアおよびミクロソーム画分におけるコレステロール含量

### (1) 18 週齢 SD ラットの肝臓ミトコンドリア画分におけるコレステロール量

ミトコンドリアにおける TC 量は, HFC1.25 および HFC2.5 群が Control および HF 群に比べて有意に高値を示した (Figure 3-7a). また, HF, HFC1.25 および HFC2.5 群の 3 群において, ミトコンドリアの TC 量と CPT 活性値の間に有意な負の相関がみられた ( $P = 0.034$ ,  $r = -0.550$ , Figure 3-7b).

### (2) 27 週齢 SD ラットの肝臓ミトコンドリア画分におけるコレステロール量

ミトコンドリアにおける TC および FC 量は HFC1.25 および HFC2.5 群が Control および HF 群に比べて有意に高値を示した (Figure 3-8a). また, HF, HFC1.25 および HFC2.5 群の 3 群において, ミトコンドリアの TC 量と CPT 活性値の間に有意な負の相関がみられた ( $P < 0.001$ ,  $r = -0.767$ , Figure 3-8b).

### (3) 27 週齢 SD ラットの肝臓ミクロソーム画分におけるコレステロール量

ミクロソーム画分の大部分は小胞体である. ミクロソームにおける TC 量は HFC1.25 および HFC2.5 群が Control および HF 群に比べて有意に高値を示した (Figure 3-8c). FC 量も TC 量と同様に HFC1.25 および HFC2.5 群が Control および HF 群に比べて高値を示したが各群間に有意な差はみられなかった (ANOVA :  $P = 0.049$ ).

## 7. Control, HF, HFC1.25 および HFC2.5 食を摂取した SD ラットの肝臓における遺伝子発現

肝臓における NASH および線維化発症に対する HF あるいは HFC 食摂取の分子的作用機序を検討するため, 肝臓の脂質・胆汁酸代謝ならびに線維化の発症に関与する代表的な分子マーカーを定量した. 遺伝子発現の結果は Control 群の mRNA 発現量を 1 とした相対比で示し, 主に HF 群と HFC 群 (HFC1.25 および HFC2.5 群) を比較して記述する.

### (1) 18 週齢 SD ラットにおける遺伝子発現

肝臓のコレステロール取り込みに関与する LDLR ならびにコレステロール生合成の律速酵素である HMGCR の mRNA 発現量は HF 群に比較して HFC 群で低値を示した (Figure 3-9). 細胞内コレステロール量の増加によって負の制御を受ける SREBP-2 は LDLR および HMGCR の転写調節因

子であり、SREBP-2 に応答して類似した mRNA 発現傾向を示したと考えられる。肝臓コレステロールを胆汁中へ排出する輸送担体である ABCG5 の mRNA 発現量は HFC 群で濃度依存的な低下傾向がみられた。コレステロールの胆汁酸への異化および胆管への胆汁酸輸送は、肝臓におけるもう一つのコレステロール排出系といえる。胆汁酸合成の律速酵素である CYP7A1 の mRNA 発現量は HF 群に比べて HFC1.25 群で高値を示したが、その一方で胆汁酸のグリシンおよびタウリン抱合に関与する BAT ならびに肝細胞の毛細胆管側膜上に発現する胆汁酸排泄輸送体 BSEP および MRP2 の mRNA 発現量は HFC 群で低値を示した。これらの結果から、HF 食へのコレステロール添加は胆汁酸合成を促進するが、その一方で胆汁酸抱合や排出を阻害し、その結果として肝臓内胆汁鬱滞が生じている可能性が示唆された。肝臓における脂肪酸生合成の律速酵素である FAS の mRNA 発現量は Control 群に比べて HF、HFC1.25 および HFC2.5 群で有意に低値を示した。肝臓における脂肪酸取り込みに関与する長鎖脂肪酸の輸送担体である FATP5 の mRNA 発現量は HF 群に比べて HFC 群で低値を示した。肝臓における脂質排出経路の一つである超低密度リポタンパク質 (very low-density lipoprotein, VLDL) の合成に関与する MTP の mRNA 発現量は HFC 群でコレステロール濃度依存的に低値を示した。肝臓の脂質および胆汁酸の恒常性維持に関与する主な転写調節因子には LXR- $\alpha$ 、FXR、SREBP-1c および SREBP-2 が挙げられる。コレステロールの排出や異化に関わる遺伝子 (ABCG5、CYP7A1 など) の発現を制御する LXR- $\alpha$  およびその下流に存在し、脂肪酸合成に関与する遺伝子 (FAS など) の発現を制御する SREBP-1c の mRNA 発現は群間で有意な差はみられなかった。胆汁酸排出に関わる遺伝子 (BSEP、MRP2、BAT など) の発現の調節および CYP7A1 の負の制御因子である FXR の mRNA 発現は HF 群に比べて HFC2.5 群で有意に低値を示した。FXR の下流に存在し、LDLR や HMGCR の調節因子である SREBP-2 は FXR と類似した mRNA 発現傾向を示した。肝臓の線維化に関連するコラーゲンタンパク質コード遺伝子である COL1A1 および COL4A1 の mRNA 発現量は HF 群に比べて HFC 群で有意に高値を示した。さらに、線維化の誘因因子である TGF- $\beta$ 1 もコラーゲン遺伝子と類似した mRNA 発現傾向を示した。

## (2) 27 週齢 SD ラットにおける遺伝子発現

LDLR mRNA 発現量は HF 群に比べて HFC 両群で有意に低値を示した (Figure 3-10)。HMGCR は HF、HFC1.25 および HFC2.5 群において Control 群に比べて低値を示した。BSEP mRNA 発現量は HF 群に比べて、HFC 両群で有意に低値を示した。FAS mRNA 発現量は 18 週齢時と同様に Control 群に比べて他 3 群で有意に低値を示した。FATP mRNA 発現量は 18 週齢時と異なり、Control 群と HF 群は同程度であるが、HF 群に比べて HFC1.25 群で有意に低値を示した。MTP mRNA 発現量は HF 群に比べて HFC 両群で有意に低値を示した。18 週齢時と同様に FXR および SREBP-2 mRNA 発現量は HF 群に比べて HFC1.25 および HFC2.5 群でコレステロール添加濃度依存的な低下傾向を示したが、LXR- $\alpha$  および SREBP-1c mRNA 発現量は 4 群間で有意な差はみられなかった。COL1A1、

COL4A1 および TGF- $\beta$ 1 mRNA 発現量は HF 群に比べて HFC 両群で有意に高値を示した。

#### 3-1-4. 考察

著者らによる新規 NASH ラットモデルは、9 週間という比較的短期間に、遺伝子操作や肝毒性物質の投与などを実施することなく、ヒトが普段摂取している食事成分を用いた食餌によって NASH 様肝病変を呈した。すなわち、SD ラットにおける HFC 食の摂取は、NASH の肝組織学的特徴である脂肪沈着、小葉内炎症および肝細胞の風船様腫大を発症させた。また、HFC2.5 食の投与は顕著な肝線維化を惹起し、5 匹中 2 匹 (40%) の個体は肝硬変に進展していた。さらに、HFC 食の 18 週間の摂取によって、肝組織学的病変はより進展し、HFC1.25 および HFC2.5 食を摂取した全個体で stage 3~4 の高度な線維化/肝硬変がみられた。これより、著者らの NASH モデルは、従来の線維化関連遺伝子の改変や肝毒性物質などによる肝硬変モデルとは異なる<sup>53)</sup>、新規食餌誘導性肝硬変モデルとなりうることが示唆された。NASH 関連線維化/肝硬変は食事因子の影響を少なからず受けていると考えられる。米国における疫学研究では肝硬変の発症においてコレステロール摂取量が独立した危険因子であることが報告されている<sup>85)</sup>。これより、コレステロール負荷によって作成された本 NASH モデルはヒトにおける生活習慣病としての肝硬変の病態に近似したモデル動物であると考えられる。

最近の研究では、NASH 患者あるいはコレステロール負荷により NASH を発症した動物モデルの肝臓において、特異的にコレステロールが増加していることが示されている<sup>76,86)</sup>。本実験においても、HFC 食の摂取により NASH を発症した肝臓においてコレステロールの著明な蓄積がみられたことより、コレステロールは直接的に NASH における脂肪沈着あるいは肝障害の程度に関連していると考えられた。本実験における HFC 食摂取による肝臓のコレステロール蓄積には、ABCG5 の発現低下を介したコレステロール排出系の低下が関与していると考えられた。一方、肝臓におけるコレステロール取り込みに関与する LDLR や、コレステロール生合成系の HMGCR の発現は低下していた。NAFLD/NASH 患者は肝臓におけるコレステロール代謝が障害されており、健常者に比較してコレステロール合成が亢進状態であることが報告されているが<sup>87,88)</sup>、本実験では生体にとっては過剰な量のコレステロールを摂取させており、これによって細胞内コレステロールレベルによって制御される転写因子 SREBP-2 の低下を介して負のフィードバックが生じ、コレステロール合成系が抑制されたと考えられた。

食事性コレステロールによる肝脂肪化の発症機序の 1 つとして、コレステロールの酸化物であるオキシステロールをリガンドとしてもつ LXR $\alpha$  の活性化がある<sup>87)</sup>。LXR $\alpha$  の下流遺伝子には脂肪酸 *de novo* 合成に関与する遺伝子群 (FAS など) の転写調節因子である SREBP-1c があり、コレステロ



ールは脂肪酸合成を促進することで脂肪肝を発症させる。動物モデルにおいて、普通食にコレステロールを添加すると肝臓に TG が蓄積するのは<sup>89)</sup>、この機序を介しているものと考えられる。しかし、本実験において HF, HFC1.25 および HFC2.5 群における LXR $\alpha$ , SREBP-1c あるいは FAS の発現に差異は認められなかったことから、HFC 食は脂肪酸合成を誘導していないと考えられた。血中 TG 値や MTP 発現の低下も脂肪酸合成のダウンレギュレーションの結果を支持するものと考えられる。よって、脂肪酸合成低下と同時に生じた肝臓の TG 蓄積は、HFC 食に含まれる脂肪そのものが肝臓における TG 蓄積に直接的に寄与していることが示唆されたが、詳細な機序に関しては不明である。

本実験では、HFC 食摂取による NASH モデルは肝星細胞の活性化を伴って、“fibrosing steatohepatitis (線維化進展性脂肪性肝炎)”を発症した。対照的にコレステロールを含まない HF 食では、9 週間摂取して線維化を発症した個体はみられず、18 週間の摂取期間を経て stage 1 の軽微な線維化が 5 匹中 2 匹に発症したのみであり、NASH といえる肝組織学的病変でさえ発症していなかった。また、肝組織学的な炎症および線維化の重症度はコレステロール摂取量依存的に悪化をみせた。これより、食事性コレステロールは NASH の進展を促進し、加えて線維化病変の引き金となることが推察された。著者らの実験結果と一致して、Savard らは C57BL/6J マウスにおいて食事性高脂肪と食事性高コレステロールの同時摂取により fibrosing steatohepatitis を生じ、その一方で各食事成分のみの摂取では NASH を発症しなかったことを報告している<sup>89)</sup>。したがって、本実験における高度な線維化を伴う NASH 発症には、食事性コレステロールのみでなく、食事性コレステロールと食事性脂肪の相互作用が寄与していることが考えられた。

なぜコレステロールは肝障害あるいは肝線維化進展を加速させたのか。1 つの可能性として、健常時に比べて大量のコレステロールが肝臓に貯留し種々の細胞機能を障害していることが予想された。コレステロール負荷は肝臓において、肝実質細胞<sup>74)</sup>、Kupffer 細胞<sup>90,91)</sup>および肝星細胞<sup>77)</sup>など様々な細胞、ならびにミトコンドリア<sup>92)</sup>およびリソソーム<sup>93)</sup>など細胞内小器官におけるコレステロール含有量を増加させることが示されている。本実験においても、HFC 食は HF 食に比較してミトコンドリアおよびミクロソーム画分におけるコレステロール蓄積を誘導した。また、HF, HFC1.25 および HFC2.5 群においてミトコンドリアのコレステロール含有量と CPT 活性値間には負の相関がみられたことから、因果関係は不明なもののミトコンドリアにおける過剰なコレステロール負荷と、NASH 病態において認められるミトコンドリア機能障害には関連性があり、その結果として CPT 活性が阻害されたものと考えられた。遊離型のコレステロールは細胞膜成分の 1 つであり、細胞膜の生理学的状態を調節している<sup>94)</sup>。ミトコンドリアにおいてコレステロールが豊富な状態では“membrane order (膜秩序)”の変化によりミトコンドリアの機能が障害されることが癌細胞において観察されているが、その機序は不明な点も多い<sup>95)</sup>。Mari らは肝臓のミトコンドリアにおける遊離型コレステロール負荷状態は、サイトカインによる傷害に対するミトコンドリアの感受性を高めると報告している<sup>92)</sup>。

肝線維化の発症に関して、食事性コレステロールの関与を報告している研究はいくつかあるが、その機序について言及された研究は少ない。Teratani らは線維化発症の中心的役割を担う肝星細胞に着目し、コレステロールの摂取が肝星細胞に遊離型コレステロールを蓄積させることを見出した<sup>77)</sup>。星細胞は肝臓の炎症により活性化した Kupffer 細胞や単球由来のマクロファージにより放出される TGF- $\beta$  の作用により活性化し、筋線維芽細胞様細胞に形質転換することでコラーゲンなどを産生する<sup>96)</sup>。Teratani らの研究グループは星細胞における遊離型コレステロールの蓄積は、TGF- $\beta$  の受容体である Toll-like receptor 4 (TLR4) の発現を増加させ、TGF- $\beta$  に対する星細胞の感受性を高めることで線維化を増悪させることを示した<sup>97)</sup>。すなわち、この結果はコレステロール負荷が星細胞を活性化するイニシエーターではなく、線維化進展を促すプロモーターである可能性を示唆している。著者らの実験では、肝臓における細胞ごとのコレステロール分布を確認することができなかったため、今後、各細胞の機能も含めて検討が必要である。

食餌中のコール酸は胆汁酸の1つで、食餌に含まれる高濃度コレステロールをはじめとした脂溶性物質の小腸における吸収を促進するために添加したが、胆汁酸自体には細胞障害性があることが報告されている<sup>98)</sup>。また、高脂肪、コレステロールおよびコール酸の3つの成分が含まれる“動脈硬化誘導食”の各成分による肝臓への影響を検討した結果、コール酸は線維化関連遺伝子であるコラーゲンファミリーの発現を特異的に増強させることが示されている<sup>99)</sup>。したがって、コール酸の添加は肝線維化の発症における食事性コレステロールの直接的な関与の判断を困難にすると考えられる。本実験において同量のコール酸を添加した HF 食（コール酸 2%およびコレステロール 0%含有）とコレステロールも添加した HFC 食により誘導された肝線維化の程度の差は歴然であり、HF 群では9週間の摂取で肝線維化を発症した個体はなく、18週間の摂取で5匹中2匹が stage 1 の線維化を発症したに過ぎなかった。一方、Matsuzawa らは C57BL/6J マウスに脂肪 15%、コレステロール 1.25%およびコール酸 0.5%を含む動脈硬化誘導食を摂取させると 24 週間で高度な線維化を伴う NASH を発症することを報告した<sup>100)</sup>。さらに、脂肪含有率を高めた（脂肪 60%）動脈硬化誘導食によって、6 週間で肝臓に線維化がみられ、24 週間で stage 4 の線維化が発症した個体もみられた。それとは対照的に、コール酸を含まない高脂肪（15%）・高コレステロール（1%）食を摂取させた C57BL/6J マウスも同様に軽度（stage 1A）な線維化を発症したが、30 週間の摂取期間が必要であったという報告もある<sup>89)</sup>。以上を踏まえると、本 NASH モデルにおける食餌中コール酸は線維化発症あるいは進展に対し促進的に作用していることが推察された。

本 NASH モデルにおける胆汁酸に起因する肝障害の誘導に関して、食餌由来の外因性胆汁酸だけでなく、食餌性コレステロールの異化亢進による内因性胆汁酸も寄与した可能性がある。生体内の胆汁酸濃度は核内受容体 FXR が胆汁酸代謝に関与する遺伝子群の発現を制御することで恒常性が維持されている<sup>101)</sup>。具体的には、胆汁酸は FXR のリガンド活性を有しており、FXR の活性化は胆汁酸合成 (CYP7A1) の抑制、抱合 (BAT) あるいは輸送 (BSEP) の促進に関与する。本実験にお

いて、HF 食摂取によって CYP7A1 発現は低下し、一方で HFC 食を摂取すると CYP7A1 発現は亢進した。また、転写因子である FXR の発現は HF 食摂取では Control 食と差異はなく、HFC 食摂取によって発現が低下した。本実験では FXR の発現を mRNA レベルでしか評価していないが、下流遺伝子の発現から推察すると、FXR の下流遺伝子 (BAT, BSEP, SREBP-2) が FXR と同様に HFC 食の摂取によって低下することから、FXR タンパク質発現も低下していたと推察される。HFC 食の摂取によって FXR 発現が低下した機序は不明であるが、FXR 低下によって外因性および内因性リガンドである胆汁酸が豊富にあるにもかかわらず、コレステロールからの胆汁酸合成が抑制されなかったことから、肝臓における胆汁酸濃度が高まった可能性が考えられる。それに加えて FXR 発現低下に伴い BAT および BSEP の発現も低下しており、抱合化されない胆汁酸は胆汁中に排出されないこと<sup>101)</sup>に加えて輸送担体も減少していることから、HFC 群では胆汁酸鬱滞が生じている可能性が示唆された。胆管結紮術により続発性胆汁性肝硬変が生じることや<sup>53)</sup>、FXR-null マウスにおいてコール酸投与により BSEP 発現が低下するために肝内胆汁酸濃度の増加を抑制できず、重篤な肝障害が惹起されることを踏まえると<sup>101)</sup>、本 NASH モデルの肝障害もしくは肝線維化は胆汁酸による直接的な肝細胞障害も影響した可能性は大いに考えられた。ただし、本モデルにおいて肉眼的および組織学的に明らかな胆管の拡大や鬱滞所見はみられていない。著者の仮説と一致するように、Jia らも SHRSP5/Dmcr ラットにコール酸を含む高脂肪・高コレステロール飼料を摂取させることで作成した NASH 線維化モデルにおいて、肝臓における胆汁酸合成酵素の増加と胆汁酸抱合および排出タンパク質の低下がみられ、毒性の強い疎水性胆汁酸が肝臓に蓄積して肝障害を生じたことを示唆している<sup>102)</sup>。今後、肝臓内胆汁酸画分濃度や胆汁酸抱合に関与するタウリンなどの定量、胆汁酸排出関連タンパク質の発現などの定量による更なる検討が必要である。

FXR は胆汁酸代謝に加えて、脂質および糖質代謝制御にも関与している<sup>103)</sup>。動物モデルにおいてコール酸あるいは FXR 作動薬の経口投与による FXR の活性化は、脂質異常症やインスリン抵抗性、脂肪肝を改善することが確認されており<sup>104,105)</sup>、さらに、肝臓における炎症や線維化等の減弱効果も明らかにされたことから FXR は NASH の薬物治療の標的分子として注目されている<sup>106)</sup>。実際に、NASH に対するファーストインクラス (画期的新薬) の薬剤として開発中の胆汁酸誘導体 obeticholic acid は FXR 作動薬で、2014 年現在、臨床第 II 相試験では NASH 患者の肝組織像の改善効果がみられたと報告された (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01265498)<sup>107)</sup>。著者らの HFC 食誘導性 NASH モデルにおいてみられた FXR の発現低下と NASH/線維化発症の因果関係は解明できていない。しかし、本実験と類似した組成の飼料 (コレステロール 1.25%、コール酸 0.5%を含む) を摂取した SD ラットにおいて FXR 発現が低下すること<sup>108)</sup>、ならびに FXR 欠損マウスにおいて NASH が惹起されることが報告されている<sup>109)</sup>。以上を踏まえると、HFC 食の摂取が FXR 発現に何らかの影響を及ぼし、FXR を介する胆汁酸の負のフィードバック調節の破綻のほか、FXR が低下することにより生じる脂質・糖代謝障害および炎症反応の増強などが NASH の発症・進展の一端を

担っていた可能性が考えられる。HFC 食による FXR 発現への作用の詳細な検討が NASH の発症・進展機序の解明の糸口となるかも知れない。

NASH における TG 蓄積が肝障害を惹起するか否かについて“lipotoxicity (脂肪毒性)”の観点から議論がなされている<sup>110)</sup>。Lipotoxicity とは正式に定義された用語ではないが、脂肪酸やその代謝物によって細胞障害や細胞死が惹起されることを指す。単純性脂肪肝の 70~80%は NASH に進展せず予後良好であるという疫学研究が示すように、肝臓に TG が蓄積すること自体は悪いことではないという見解は存在する<sup>111)</sup>。また、ヒトおよび動物モデルにおける研究の多くで、肝細胞の脂肪滴蓄積は肝障害の原因ではなく、むしろ結果を示すという報告もなされている<sup>110)</sup>。これより、TG 以外の脂質が NASH の炎症などの病態を形成すると推測できる。実際、生体の脂質を網羅的に分析する lipidomic study では、NASH を発症した肝臓において、“nontriglyceride fatty acid metabolites (非 TG 脂肪酸代謝物)”が増加していることが明らかとなっている<sup>86)</sup>。本実験では、NASH の肝臓に蓄積する TG 以外の脂質として FFA ならびに DG を定量し、双方とも NASH を生じた肝臓において増加が確認された。FFA は多くの代謝経路の中間代謝産物であるため、FFA あるいはその産物のどちらかが細胞障害を生じさせるのか見極めるのは難しいが、FFA が直接的にリソソーム膜を不安定化させること、あるいは FFA のうち飽和脂肪酸が TLR4 のリガンドとなることを介して、アポトーシスカスケードを活性化することが報告されている<sup>112,113)</sup>。DG は TG の前駆体でプロテインキナーゼ C の活性化を介してインスリン抵抗性を惹起し、脂肪肝発症の一端を担う<sup>114)</sup>。また、DG を基質として TG を合成する酵素である diacylglycerol acyltransferase (DGAT) の阻害により脂肪肝は抑制される一方で、肝障害は悪化することが報告されている<sup>111)</sup>。さらに、四塩化炭素誘導性肝障害において、酸化ストレス亢進状態で生成した DG 過酸化物がプロテインキナーゼ C および nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) の活性化を介して炎症を惹起するとの報告もある<sup>115)</sup>。これより、DG は NASH における脂肪蓄積や炎症の発生の段階における病態誘導因子の 1 つである可能性が考えられる。一方、ヒトにおける NAFLD の進展度と DG の関連を検討した研究では、軽度線維化を生じている NASH 患者と健常者の肝臓(脂肪沈着 <5-10%)を比較すると NASH 患者で DG が高値を示す一方、肝硬変患者における DG は健常者レベルに戻ることも報告されており<sup>116)</sup>、肝硬変への進展を DG が促進したともいえない。肝硬変が長期間持続すると肝臓における栄養素の取り込み能が低下し、組織学的に脂肪沈着もみられなくなるという現象が生じるが (burned-out NASH)<sup>117)</sup>、この研究においても肝硬変患者の脂肪沈着程度は 5%未満であり、DG 量の減少は脂肪沈着の程度に関連するという見方もできる。著者らの研究では HFC 群で肝硬変を生じているものの、肝臓における TG 量は減少していないため、DG 量も高値を示したことが考えられる。今後、より長期間の飼育を行い肝硬変の経過に伴う脂質量の変化、ならびに脂質の酸化変性の程度も確認していくとともに、他の脂質種においても同様に経時的観察を行い、病態形成との因果関係を突き止める必要がある。また、本実験では TLC を用いた DG の分離および定量を行っており、DG と類似した極性をもつ脂質の誤った分離・

検出，ならびにヨウ素が脂肪酸の二重結合と反応する性質を用いた呈色方法によって，DG の脂肪酸組成（二重結合数）に影響を受ける定量を行っている可能性は否めず、正しい DG 量を反映していないことも考えられる。よって，今後 DG をはじめとした様々な脂質種の変化量を測定する場合は，より精度の高い定量法を選択することも考慮すべきである。

TG は比較的不活性な脂質であり，細胞障害の原因とはならないとの見解も示されている一方で，極度の TG 蓄積は肝臓の毛細血管である類洞を圧迫し，肝臓の血流を障害して肝細胞の壊死を惹起するという報告もあることから完全に無害であるともいえない<sup>118)</sup>。本実験において短期間で NASH あるいは肝硬変まで発症した原因の 1 つには，急激に過剰な脂肪滴が蓄積したことに伴う物理的な肝細胞障害による可能性も考えられた。加えて，本実験における HFC 食を摂取させたラットの肝臓では，HF 食を摂取した個体に比べて約 10 倍のコレステロールが蓄積しており，その一部は脂肪滴中のコレステロールエステルであると推察され，これが急激な脂肪滴の蓄積を助長させた可能性もある。

NASH は肝臓の発症に至ることもあるが，NASH の発症から肝臓の進展までみられる動物モデルは非常に限られている。本モデルにおいて，27 週齢ラットの肝臓で小さな結節がみられたが，肝細胞癌マーカーである glutamine synthetase 陰性であったことから前癌病変とはいえなかった（データ未記載）。しかし，C57BL/6J マウスに高コレステロール食（コレステロール 1.5%およびコール酸 0.1%を含む）を 55 週間摂取させたところ，肝線維化の発症とともに focal nodular hyperplasia（限局性結節性過形成）が形成されたことが報告されている<sup>119)</sup>。また，FXR 欠損マウスは肝腫瘍を自然発症することも報告されていることから<sup>103)</sup>，HFC 食による本 NASH モデルにおける肝臓への進展は期待できると考えられ，今後，より長期にわたる観察が望まれる。

NASH および NAFLD 発症の病因として肥満およびインスリン抵抗性が挙げられるが，著者らの NASH モデルは内臓脂肪量の増加を伴う肥満やインスリン抵抗性を呈さなかった。その原因の 1 つに外因性コール酸あるいは内因性胆汁酸による作用である，褐色脂肪組織や骨格筋，ならびに小腸 L 細胞に存在する胆汁酸受容体である G protein-coupled bile acid receptor 1 (TGR5) を介した脂肪酸酸化の亢進，および glucagon-like peptide 1 (GLP-1) の分泌亢進に伴うインスリン感受性の向上が関与した可能性が考えられる<sup>104)</sup>。一方，非肥満の NAFLD/NASH 患者が存在することは注目されており，特にアジア地域において NAFLD 患者の約 3 分の 1 は非肥満であることがいくつかの報告で示されている<sup>120,121)</sup>。さらに，Yasutake らの報告によると，非肥満および軽度のインスリン抵抗性を呈する NASH 患者は，肥満 NASH 患者に比べてコレステロール摂取量が有意に多い<sup>122)</sup>。著者らの NASH モデルは，過剰な食事性コレステロールとその結果として生じる肝臓のコレステロール蓄積は，特に非肥満個体においてインスリン抵抗性とは独立して NASH 発症に寄与する因子であることを示唆した。

## 第2節

### 食事誘導性 NASH 線維化モデルにおけるフィコシアニンの効果の検討

#### 3-2-1. 緒言

NASH は予後不良な進行性疾患であるにもかかわらず、本疾患そのものに対する特効薬を含む治療法は開発されていない。よって、NASH の特効薬の開発には食品由来の機能性素材などからも幅広く病態改善作用を有する成分を探索し、その薬効を評価する必要がある。著者は NASH の病態改善効果が期待される機能性成分としてフィコシアニンおよびフィコシアニンが含まれる藍藻類 *Spirulina platensis* に注目している。フィコシアニンは NASH などの肝障害に対し抑制作用を示す報告があり<sup>47-49)</sup>、さらに、抗酸化作用<sup>42,43)</sup>、抗炎症作用<sup>44)</sup>、抗癌作用<sup>45)</sup>、コレステロール低下作用<sup>46)</sup>などの機能性を有することから、NASH の病態増悪因子を抑制する可能性があると考えられる。肝障害抑制作用に関して、Fujimoto らはグルタミン酸ナトリウムの投与による過食から誘導される NASH マウスモデルにおいて、12 週間の *Spirulina platensis* の摂取が NASH の発症を抑制することを報告している<sup>47)</sup>。また、コリン欠乏高脂肪食および低酸素血症ストレスの同時負荷による NASH ラットモデルにおいて、*Spirulina platensis* およびフィコシアニンは双方ともに NASH 肝組織学的病変を改善することが報告されている<sup>49)</sup>。また、肝毒性物質である四塩化炭素誘導性の急性肝障害に対しフィコシアニンの事前投与は肝保護作用を示すことも明らかとなった<sup>48)</sup>。しかし、これら先行研究の NASH モデル動物はヒトにおける生活習慣病としての NASH 病態を模倣しているとは言い難く、よって、ヒト NASH にフィコシアニンが効果を示すかに関しては、ヒト NASH の発症・進展機序により近似した動物モデルで検証する必要性が考えられる。

著者は NASH において線維化への進展が予後規定因子である可能性に着目し<sup>21,23)</sup>、前節において線維化進展の抑止の検討への利用が可能であると考えられる、高度な線維化を伴う脂肪性肝炎を発症する食餌誘導性 NASH モデルを作成した。本節では、著者らの新規 NASH モデルを用いてフィコシアニンの NASH 発症抑制効果を検討することを目的とした。本実験は同時に新規 NASH モデルが、NASH の予防や治療を踏まえた機能性食品開発研究において有用であるかを確認することも目的とした。本実験ではフィコシアニンによる NASH の発症および進展抑制の作用点として、コレステロール低下作用を介した肝障害あるいは肝線維化進展の抑制を期待し、前節のコレステロール 2.5% 添加高脂肪食を摂取させた高度な肝線維化を発症する SD ラットにおけるフィコシアニン摂取の効果を検証することとした。また、本実験のフィコシアニンの食餌添加量は、先行研究において *Spirulina platensis* が NASH 組織学的病変を改善した投与量を参考にして<sup>47)</sup>、*Spirulina platensis* 中に含まれるフィコシアニン量として算出した値を用いた。

### 3-2-2. 実験方法

#### 1. 動物モデルと実験デザイン

8週齢雄性SDラット21匹（日本SLC）を購入し、初めの1週間は普通飼料（MF）を摂取させ、順化させた。順化後の9週齢時から、普通飼料（MF）を摂取させた普通食（Control）群、コレステロール2.5%を含む高脂肪食（HFC食）を摂取させたNASH群、フィコシアニン0.5%および1.5%を添加したHFC食を摂取させたP-0.5およびP-1.5群の4群各5~6匹ずつに分け、9週間飼育した。コレステロール2.5%を含む高脂肪食は第3章第1節のHFC2.5飼料と同じ配合のものを用い、フィコシアニンを混餌した。各飼料の一般成分値およびエネルギー量をTable 3-8に示す。フィコシアニン添加飼料のエネルギー量の算出方法は第2章に準じた。また、飼育室の条件等その他の事項は第3章第1節に準じた（承認番号25-29）。

#### 2. 動物処理，血清生化学的測定，肝臓脂質含量の測定および肝臓の病理組織学的検討

18週齢時の屠殺前に8時間絶食させた。肝臓脂質含量の測定では、TG濃度の測定では全検体を10倍希釈し、TC濃度の測定ではControl群検体を10倍希釈、その他の群の検体を20倍希釈した。その他の事項は第3章第1節に準じて行った。

#### 3. 統計解析

第3章第1節に準じて行った。

### 3-2-3. 実験結果

HFC食負荷によるNASH発症に対するフィコシアニン摂取の効果を以下に示す。各群の実験例数（n）はNASH群の個体1匹が原因不明で死亡したため、Control群（n=5）、NASH群（n=4）、P-0.5群（n=5）およびP-1.5群（n=6）の4群で解析および比較を行った。

#### 1. Control, NASH およびフィコシアニン摂取群における総エネルギー摂取量および身体所見

9週間の飼育期間における総エネルギー摂取量は4群間で有意な差はみられなかったが、終体重および体重増加量はNASH, P-0.5 および P-1.5 群がControl群に比べて有意に低値を示した（Table 3-9）。肝臓重量／体重比および脾臓重量／体重比はNASH, P-0.5 および P-1.5 群がControl群に比べて有意に高値を示した。一方で、睾丸周囲脂肪重量／体重比はNASH, P-0.5 および P-1.5 群がControl群に比べて有意に低値を示した。すべての項目において、NASH群とフィコシアニン摂取群

(P-0.5 および P-1.5 群) 間で有意な差はみられなかった。

## 2. Control, NASH およびフィコシアニン摂取群における血清・肝臓生化学検査値

血清 TC 値は NASH, P-0.5 および P-1.5 群が Control 群に比べて有意に高値を示した (Table 3-10)。血清グルコース値は P-1.5 群が Control 群に比べて有意に低値を示した。血清 AST および ALT 値は NASH 群が Control 群に比べて有意に高値を示し、フィコシアニン摂取群は NASH 群に比較してフィコシアニン添加濃度依存的に低下する傾向を示したが有意な差はみられなかった。血清レプチン値は NASH, P-0.5 および P-1.5 群が Control 群に比べて有意に低値を示した。血清 TG, インスリンおよびアディポネクチン値においては 4 群間に有意な差はみられなかった。肝臓 TG および TC 濃度は NASH, P-0.5 および P-1.5 群が Control 群に比べて有意に高値を示した。すべての項目において、NASH 群とフィコシアニン摂取群 (P-0.5 および P-1.5 群) 間で有意な差はみられなかった。

## 3. Control, NASH およびフィコシアニン摂取群における肝組織学的所見

HE 染色およびアザン染色による肝組織像の各群の代表例を Figure 3-11 に、肝組織学的評価を Table 3-11 に示す。Control 群において肝脂肪沈着、炎症および線維化を呈した個体はみられなかった。NASH 群において、高度な脂肪沈着および小葉内炎症、軽度な肝細胞の風船様腫大がみられ、NAS によりすべての個体で「NASH」と判断された。また、NASH 群の肝臓では NASH 様病変に伴って stage 2~4 の線維化も発症していた。フィコシアニン摂取群においても NASH 群の肝臓と類似した NASH 様肝病変および stage 3~4 の線維化を発症していた。

### 3-2-4. 考察

HFC 食の摂取により高度な線維化を伴う NASH を発症するラットモデルに対し、フィコシアニンを 9 週間摂取させた結果、血清 AST および ALT 値がフィコシアニン添加濃度依存的に低下する傾向がみられたが、それ以外の血清・肝臓生化学的検査値ならびに肝組織学的所見においてフィコシアニンによる明らかな改善効果は認められなかった。期待されたコレステロール低下作用を介した NASH 発症抑制作用がみられなかった原因として、フィコシアニンによる血中コレステロール低下作用機序と本 NASH モデルにおけるコール酸負荷が拮抗した可能性が考えられる。すなわち、Nagaoka らの報告によると、*Spirulina platensis* は *in vitro* において胆汁酸結合能を有し、コレステロールのミセル形成を阻害して腸管内でのコレステロール吸収を抑制すること、また、*in vivo* においてコレステロールおよび胆汁酸の糞中への排出を促進することが示されている<sup>55)</sup>。さらに、フィコシアニンも *in vivo* においてコレステロールおよび胆汁酸の糞中への排出を促進することが明らか



となり、*Spirulina platensis* による血中コレステロール低下作用はフィコシアニンがその役割の一端を担っていると示唆された。これより、フィコシアニンも *Spirulina platensis* と同様に、腸管におけるコレステロールの吸収阻害作用があると想定された。その一方で、著者らの NASH モデルはコレステロール吸収のためにコール酸を投与しており、本実験ではフィコシアニンが有すると考えられる胆汁酸結合能が十分に発現されず、コレステロールのミセル溶解性ならびに吸収を抑制させる作用が減弱した可能性が考えられた。また、Nagaoka らが用いたフィコシアニンの飼料添加濃度は 3.75% 程度で著者らの 1.5% より高く、本実験で用いたフィコシアニン量は腸管内においてコレステロール吸収を阻害するには不十分であった可能性も考えられる。また、フィコシアニンによるコレステロール低下作用を介さない NASH 発症抑制作用がみられなかった理由に関しても、まずフィコシアニンの投与量が適当であったかを考える必要がある。Pak らによって報告された肝組織学的改善がみられたフィコシアニンの投与量は 0.4~1.2 g/kg 体重/日であり<sup>58)</sup>、それは著者らの実験におけるフィコシアニン平均摂取量の約 0.6 g/kg 体重/日と同程度の値であった。しかし、フィコシアニンの摂取形態は異なり、Pak らは既定の体重あたりフィコシアニン量を強制経口投与方法で与え、一方、本実験では混餌投与方法を用いたフィコシアニン自由摂取であった。自由摂取であるため、毎日の食餌摂取量の変動によってフィコシアニン摂取量は 0.3~0.8 g/kg 体重/日と幅があり、このことが生体内のフィコシアニンの作用発現に必要な局所の濃度に変動をもたらし、期待された作用を発現しなかった可能性が考えられた。また、フィコシアニンの投与期間も妥当であったかは確かめられておらず、長期間投与では効果を発現した可能性もあるため、今後検討する必要がある。

NASH の発症抑制におけるフィコシアニン投与に期待された効果として、第 2 章において示したアディポネクチンを介した作用にも注目していたが、本実験では NASH モデルにおけるフィコシアニン摂取によるアディポネクチン増加作用は認められなかった。その理由の 1 つとして、著者らの NASH モデルが肥満を呈さず、アディポネクチンを産生する脂肪細胞自体が少なかったことが原因となった可能性が考えられる。アディポネクチンは脂肪肝、炎症および線維化を伴う NASH、ならびに肝発癌といった NASH 病態の各段階に対して抑制的に作用することが報告されている<sup>123)</sup>。特に炎症および線維化に関与する Kupffer 細胞および肝星細胞に対してアディポネクチンは直接的に作用し、細胞の不活性化や炎症性サイトカインの分泌抑制に働くことが明らかとなっている。これより、フィコシアニンのアディポネクチン増加作用を介した NASH における線維化発症抑制効果の可能性は期待できることから、今後は肥満を伴う NASH 病態モデル動物におけるフィコシアニン投与実験を行い、その効果を検証する必要がある。

本実験を踏まえ、新たに作成した食餌誘導性 NASH 線維化モデル(第 1 節)の有用性を評価する。まず、本実験においても、肝線維化発症に対し抵抗性を有する齧歯類において、HFC 食の投与は短期間で NASH 様肝病変および高度な線維化/肝硬変を発症し、NASH 病態モデルとして再現性が確認された。一方、食事因子を反映した NASH 線維化モデルとして作成したが、機能性食品開発を前

提とした場合、短期間で肝硬変を発症するような病態の重篤さから天然薬効成分などの緩徐な効果を解析するには不向きであることも考えられ、今後、より適切な NASH モデルを探索することが望まれる。

機能性食品は安全、安価に長期間継続的な摂取が可能なものが多く、NASH の予後改善を目的として治療や進展予防のサポートあるいは医薬品の代替品として適性が高いと考えられる。引き続き機能性素材の探索を行うと同時に、優れた動物モデルを用いてヒトへの有効性をシミュレートすることが今後ますます重要になってくると考えられる。

### 3-3. 小括

第1節では食餌誘導性 NASH 線維化モデルの作成を試みた。SD ラットに HFC 食（コレステロール 1.25%あるいは 2.5%を含む）を 9 週間摂取させた結果、高度な脂肪沈着および炎症像を有する NASH 様肝病変に加えて線維化を発症し、同じ飼料を 18 週間摂取させるとその線維化はさらに進展し、肝硬変を発症するに至った。NASH を発症した肝臓では、著明なコレステロールおよび TG をはじめとした脂肪酸代謝物の蓄積がみられたほか、ミトコンドリアにおけるコレステロールの蓄積も観察された。肝臓における脂質代謝関連遺伝子発現および酵素活性を検討した結果、HFC 食によって、脂肪酸  $\beta$  酸化能の低下や TG 及びコレステロール排出能の低下を生じていることが示唆された。さらに、肝臓における胆汁酸代謝関連遺伝子の発現の検討により、胆汁酸合成の亢進および胆汁酸抱合・排出の低下が示唆され、それには核内受容体 FXR による胆汁酸恒常性の維持の破綻が関与している可能性が考えられた。以上より、本検討は食事性コレステロールが肝線維化の進展を促進する因子であることを明らかにし、HFC 食の摂取は脂質および胆汁酸代謝に影響を与え、NASH および肝線維化の発症に寄与することを示した。

第2節では HFC 食によって誘導した NASH 線維化モデルを用いて、フィコシアニンによる NASH、特に肝線維化発症に対する効果を検討した。HFC（コレステロール 2.5%含む）食とフィコシアニンを 9 週間同時摂取させた結果、血清 AST および ALT 値はフィコシアニン添加濃度依存的に低下する傾向を示したが、肝組織学的な改善には至らなかった。

## 第4章 総括

近年、高脂肪食などの食生活や運動不足といった生活様式の変化に呼応して、生活習慣病の罹患患者数は増加の一途をたどっており、その予防・治療は疾患対応的な薬物療法ばかりでなく、生活習慣の改善を重視するという、今まで中心的な治療法になりえなかった栄養療法および運動療法を第一とする方法により対処しようとする動きに転換されてきた。しかし、肥満の是正などを目標とした長期間にわたる継続的な生活習慣の改善は決して容易ではない。この問題の解決策として、著者は健康増進作用を有する機能性食品に着目し、生活習慣病の一次予防のみならず、疾患の境界域病態の進展予防あるいは栄養療法などの治療を補完する目的でも積極的に活用すべきであると考えた。また、メタボリックシンドロームを含む肥満を伴う生活習慣病の予防および治療を念頭に置いた機能性食品の開発にあたり、青色色素フィコシアニンの有用性に注目している。フィコシアニンは抗酸化作用をはじめ、肝障害抑制作用、抗動脈硬化作用など多様な機能性を有するため、機能異常が重積した生活習慣病に対して抑制的に働くことが期待できる。さらに、フィコシアニンは既に食品用天然着色料として用いられているため、機能性成分としてその汎用性は高いと考えられる。よって、本研究では新規機能性成分フィコシアニンによる生活習慣病に対する効果を明らかにするため、特に高血圧およびNASHに焦点をあてて病態モデル動物におけるフィコシアニンの作用を検討することを目的とした。併せて、NASHモデル動物はヒトの病態や発症機序を完全に模倣するのは少ないため、生活習慣に起因して発症するNASHを念頭におき食餌誘導性の病態モデル動物の作成を試みた。

はじめに、高血圧に対するフィコシアニンの効果を検討するため、過食による肥満をベースとしたメタボリックシンドローム自然発症モデルであるSHR/NDmcr-cpおよびSHRSP/ZFラットに対するフィコシアニン投与実験を行った。身体所見および血中パラメータともに典型的なメタボリックシンドローム様病態を発症したSHR/NDmcr-cpラットにおいて、24週間のフィコシアニンの摂取は濃度依存的に収縮期血圧の上昇を抑制した。また、肥満に伴って低下することが知られている炎症性サイトカインであるアディポネクチンの血中レベルは、フィコシアニン摂取濃度依存的に低下が抑制されていた。フィコシアニンは白色脂肪組織においてアディポネクチンを転写レベルで増加させ、転写調節因子C/EBP $\alpha$ が関与している可能性が示唆された。フィコシアニンによる血圧上昇抑制機序に関して、アディポネクチンと関連があるeNOSの発現が増加すると仮説をたて、大動脈におけるeNOSの発現が血清アディポネクチン値と正の相関関係にあることを示した。フィコシアニンの血圧上昇抑制作用の詳細な機序を解明するため、動脈における脂肪沈着易発性のSHRSP/ZFラットを用い、動脈硬化誘導食と同時にフィコシアニンを投与し、血管におけるフィコシアニンの

作用を検討した。SHRSP/ZF ラットに動脈硬化誘導食を9週間摂取させると身体所見および血中パラメータともに典型的なメタボリックシンドローム様病態を発症し、また、同時にフィコシアニン摂取させることによって、SHR/NDmcr-cp ラットでみられたように収縮期血圧の上昇抑制が確認された。摘出動脈リングにおける血管弛緩反応の検討により、フィコシアニンは内皮依存性および内皮非依存性弛緩反応を改善させる傾向を示した。さらに、大動脈における血管弛緩反応に関与する遺伝子 (AdipoR, eNOS, AMPK, sGC) はフィコシアニンによって発現の低下が改善されていることを示した。以上より、フィコシアニンは肥満を伴う高血圧に対し、血中アディポネクチンレベルを維持し、かつ血管におけるアディポネクチン受容体およびその下流因子の eNOS の発現を亢進させることを介する血管弛緩性の改善により、血圧上昇を抑制する効果を示すことが明らかとなった。

次に、NASH に対するフィコシアニンの効果を検討するため、食餌によって高度な肝線維化を伴う脂肪性肝炎を短期間で発症する NASH 齧歯類モデルの作成を試みた。本実験では9週齢 SD ラットにコレステロール (1.25%あるいは 2.5%) を添加した高脂肪食 (HFC) を9週間摂取させた結果、NASH 様肝病変に加えて線維化を発症し、同じ飼料を18週間摂取させるとその線維化はさらに進展し、肝硬変を発症するに至った。これとは対照的に、コレステロールを添加していない高脂肪食を摂取した個体においては、NASH 様肝病変および肝線維化の発症はみられなかった。NASH を発症した肝臓では、著明なコレステロールおよび TG をはじめとした脂肪酸代謝物の蓄積がみられたほか、ミトコンドリアにおけるコレステロールの蓄積も観察された。肝臓における脂質代謝関連遺伝子発現および酵素活性を検討した結果、HFC 食によって、脂肪酸 $\beta$ 酸化能の低下や TG 及びコレステロール排出能の低下を生じていることが示唆された。さらに、肝臓における胆汁酸代謝関連遺伝子の発現の検討により、胆汁酸合成の亢進および胆汁酸抱合・排出の低下が示唆され、それには核内受容体 FXR による胆汁酸恒常性の維持の破綻が関与している可能性が考えられた。以上より、HFC 食の摂取は脂質および胆汁酸代謝に影響を与え、NASH および肝線維化の発症に寄与することを示した。また、本実験は従来の肝線維化モデルの作成手法である遺伝子操作や肝毒性物質の投与などに依ることなく、ヒトが通常摂取する食事成分による新規 NASH 肝硬変モデルの開発に貢献し、本モデルは生活習慣病を背景とした NASH から進展する肝線維化や肝硬変の治療法の開発に役立つと考えられる。さらに、病態進展に影響する食事因子のエビデンスに乏しい NASH において、食事性コレステロールが肝線維化の進展を促進する因子であることを明らかにしたという点においても本 NASH モデルの作成の意義があったと考えられる。

次いで、新規 NASH 線維化モデルを用いて、フィコシアニンによる NASH、特に肝線維化発症に対する効果を検討した。HFC (コレステロール 2.5%含む) 食とフィコシアニンを9週間同時摂取させた結果、血清 AST および ALT 値はフィコシアニン添加濃度依存的に低下する傾向を示したが、肝組織学的な改善には至らなかった。フィコシアニンの投与量や期間などの再検討が必要である。

以上をまとめると、フィコシアニン<sup>1</sup>は肥満を伴う高血圧においてアディポネクチンの増加を介して血管内皮機能障害を改善することで血圧上昇を抑制し、一方、NASH<sup>2</sup>に対しては抑制的な作用を示さなかった。肥満を伴う生活習慣病において、インスリン感受性の改善および抗炎症作用などを有するアディポネクチンおよびその受容体の双方を増加させるフィコシアニンは、メタボリックシンドロームやその構成病態の発症および進展の抑制に効果を期待できる魅力的な機能性素材であると考えられた。フィコシアニンは食品用の天然着色料として既に用いられており汎用性が高く、健康食品として安全に摂取することが可能である。今後の患者数の増加が危惧されるメタボリックシンドロームの発症抑制および治療に活用できるよう、フィコシアニンがヒトに対して十分な効果を発揮するかについて更なる検討が必要である。

## 結語

生活習慣病の多くは多因子疾患であり、代謝恒常性の維持に関連する生体内機能分子に機能異常が生じ、それらが重複して代謝恒常性の維持が困難な状態に陥った結果、発症する。したがって、機能分子の活性を食生活等の改善によりコントロールすることは、生活習慣の改善と同じく生活習慣病の根本的な解決に寄与すると考えられる。機能性食品は、生活習慣病の一次予防として代謝恒常性維持機能の増進効果だけでなく、代謝機能障害の改善、すなわち病態の治療効果にも期待できるため、今後、積極的に賢く活用することが望まれる。本研究は生活習慣病の発症の抑制に対する機能性素材の効果を示す根拠の一端を担い、エビデンスに基づく健康増進および疾病予防・治療を介し、活力のある社会の維持に貢献できるものと考えられる。

## 謝辞

本研究を遂行し学位論文をまとめるにあたり、終始懇切丁寧なご指導、ご支援を賜りました、長崎県立大学大学院 人間健康科学研究科 栄養科学専攻 大曲勝久教授に謹んで感謝の意を表します。

組織の染色・評価をして下さった富山大学大学院医学薬学研究部 病理診断学講座 常山幸一准教授（現 徳島大学教授）、血管張力測定実験でご指導を賜った南九州大学 健康栄養学部 管理栄養学科 伊藤薫教授、ならびにフィコシアニンを供与して下さった DIC ライフテック株式会社 石原光輝氏、鈴木正久氏に深く感謝いたします。

実験の実施や日常の議論を通じて多くの知識や示唆を賜りました田中一成教授、永田保夫教授、駿河和仁准教授、田丸静香助教、山口範晃助教に心より厚く御礼申し上げます。

実験をはじめ研究全般にわたる多大なご支援、ご指導を賜りました加藤滋子助教（現 東京大学特任研究員）、ならびに本論文作成にあたり丁寧かつ熱心なご指導を賜りました田辺賢一助教に心より感謝申し上げます。

肝臓脂質量測定や脂質代謝酵素活性測定につきましては、栄養化学研究室ならびに細胞生化学研究室の同期、後輩の皆様に多くのご協力を頂きました。心より厚く御礼申し上げます。

臨床栄養学研究室の同期、後輩の皆様には、ともに研究に励み、また、日常の議論を通じて精神的にも支えられました。本当にありがとうございました。

最後に、これまで自分の思う道を進むことに対し、温かく見守りそして辛抱強く支援して下さいました両親に対して深い感謝の意を表して謝辞と致します。

## 参考文献

- 1) 細谷憲政, 中村丁次, 足立香代子. サプリメント, 「健康・栄養食品」と栄養管理. 東京; チーム医療, 2001.
- 2) 厚生労働省. 平成 24 年人口動態統計月報年計 (概数) の概況.
- 3) 人間ドック健診統計調査委員会. 2012 年人間ドック全国集計成績報告. 人間ドック 2013; 28:678-90.
- 4) Matsuzawa Y, Funahashi T, Nakamura T. The concept of metabolic syndrome: contribution of visceral fat accumulation and its molecular mechanism. *J Atheroscler Thromb* 2011;18:629-39.
- 5) メタボリックシンドローム診断基準検討委員会. メタボリックシンドロームの定義と診断基準. 日本内科学会 2005;94:794-809.
- 6) Fujiyoshi A, Ohkubo T, Miura K, Murakami Y, Nagasawa SY, Okamura T, Ueshima H; Observational Cohorts in Japan (EPOCH JAPAN) Research Group. Blood pressure categories and long term risk of cardiovascular disease according to age group in Japanese men and women. *Hypertens Res* 2012; 35:947-53.
- 7) Vikrant S, Tiwari SC. Essential hypertension – Pathogenesis and pathophysiology. *J Indian Acad Clin Med* 2001;2:141-61.
- 8) Ritchie SA, Ewart MA, Perry CG, Connell JMC, Salt IP. The role of insulin and the adipocytokines in regulation of vascular endothelial function. *Clin Sci* 2004;107:519-32.
- 9) Versari D, Daghini E, Viridis A, Ghiadoni L, Taddei S. Endothelium-dependent contractions and endothelial dysfunction in human hypertension. *Br J Pharmacol* 2009;157:527-36.
- 10) Chou TC, Yen MH, Li CY, Ding YA. Alterations of nitric oxide synthase expression with aging and hypertension in rats. *Hypertension* 1998;31:643-8.
- 11) Rodriguez-Mateos A, Ishisaka A, Mawatari K, Vidal-Diez A, Spencer JP, Terao J. Blueberry intervention improves vascular reactivity and lowers blood pressure in high-fat-, high-cholesterol-fed rats. *Br J Nutr* 2013;109:1746-54.
- 12) Li R, Wang WQ, Zhang H, Yang X, Fan Q, Christopher TA, Lopez BL, Tao L, Goldstein BJ, Gao F, Ma XL. Adiponectin improves endothelial function in hyperlipidemic rats by reducing oxidative/nitrative stress and differential regulation of eNOS/iNOS activity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007;293:E1703-8.
- 13) Rossi R, Chiurlia E, Nuzzo A, Cioni E, Origliani G, Modena MG. Flow-mediated vasodilation and the risk of developing hypertension in healthy postmenopausal women. *J Am Coll Cardiol* 2004;44:1636-40.

- 14) 三浦克之（研究代表者）. 厚生労働省科学研究費補助金循環器疾患・糖尿病等生活習慣病対策総合研究事業「2010年国民健康栄養調査対象者の追跡開始(NIPPON DATA2010)とNIPPON DATA80/90の追跡継続に関する研究」平成24年度総括・分担研究報告書. 2013.
- 15) 日本高血圧学会. 高血圧治療ガイドライン. 東京; ライフサイエンス出版, 2014.
- 16) 船津和夫, 山下毅, 本間優, 栗原浩次, 斗米馨, 横山雅子, 細谷浩司, 近藤修二, 中村治雄. 非肥満者と肥満者における脂肪肝とインスリン抵抗性の検討. 人間ドック 2011;26:37-43.
- 17) Schuppan D, Schattenberg JM. Non-alcoholic steatohepatitis: Pathogenesis and novel therapeutic approaches. *J Gastroenterol Hepatol* 2013;28:68-76.
- 18) Okanoue T, Umemura A, Yasui K, Itoh Y. Nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis in Japan. *J Gastroenterol Hepatol* 2011;26 (Suppl 1):153-62.
- 19) Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Oh BJ. Nonalcoholic steatohepatitis : Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc* 1980;55:434-8.
- 20) Day CP, James OFW. Steatohepatitis: A tale of two hits? *Gastroenterology* 1998;114:842-5.
- 21) 川合弘一, 五十嵐正人, 須田剛士, 野本実, 岡田正彦, 青柳豊. 臨床経過: 肝硬変. 臨床栄養 2010;116:699-705.
- 22) 吉治仁志, 野口隆一, 福井博. NASHに対する抗線維化療法. 肝胆膵 2010;60:1033-40.
- 23) Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T, Boparai N, Liu YC, McCullough AJ. Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology* 1999;116:1413-9.
- 24) 加藤眞三. NAFLDの栄養療法. 臨床消化器内科 2008;23:745-50.
- 25) Promrat K, Kleiner DE, Niemeier HM, Jackvony E, Kearns M, Wands JR, Fava JL, Wing RR. Randomized controlled trial testing the effects of weight loss on nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2010;51:121-9.
- 26) Omagari K, Kato S, Tsuneyama K, Inohara C, Kuroda Y, Tsukuda H, Fukazawa E, Shiraishi K, Mune M. Effects of a long-term high-fat diet switching from a high-fat to low-fat, standard diet on hepatic fat accumulation in Sprague-Dawley rats. *Dig Dis Sci* 2008;53:3206-12.
- 27) Arai S, Osawa T, Ohigashi H, Yoshikawa M, Kaminogawa S, Watanabe M, Ogawa T, Okubo K, Watanabe S, Nishino H, Shinohara K, Esashi T, Hirahara T. A mainstay of functional food science in Japan--history, present status, and future outlook. *Biosci Biotechnol Biochem* 2001;65:1-13.
- 28) Swinbanks D, O'Brien J. Japan explores the boundary between food and medicine. *Nature* 1993;364:180.
- 29) 清水誠. これからの特定保健用食品. 化学と生物 2010;48:749-56.
- 30) Kadowaki T, Yamauchi T, Kubota N, Hara K, Ueki K, Tobe K. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *J Clin Invest* 2006;116:1784-92.



- 31) 山内敏正, 門脇孝. アディポネクチン受容体とエネルギー代謝調節. *実験医学* 2009;27:1069-77.
- 32) Ouchi N, Ohishi M, Kihara S, Funahashi T, Nakamura T, Nagaretani H, Kumada M, Ohashi K, Okamoto Y, Nishizawa H, Kishida K, Maeda N, Nagasawa A, Kobayashi H, Hiraoka H, Komai N, Kaibe M, Rakugi H, Ogihara T, Matsuzawa Y. Association of hypoadiponectinemia with impaired vasoreactivity. *Hypertension* 2003;42:231-4.
- 33) Tsuchida A, Yamauchi T, Ito Y, Hada Y, Maki T, Takekawa S, Kamon J, Kobayashi M, Suzuki R, Hara K, Kubota N, Terauchi Y, Froguel P, Nakae J, Kasuga M, Accili D, Tobe K, Ueki K, Nagai R, Kadowaki T. Insulin/Foxo1 pathway regulates expression levels of adiponectin receptors and adiponectin sensitivity. *J Biol Chem* 2004;279:30817-22.
- 34) Li R, Xu M, Wang X, Wang Y, Lau WB, Yuan Y, Yi W, Wei X, Lopez BL, Christopher TA, Wang XM, Ma XL. Reduced vascular responsiveness to adiponectin in hyperlipidemic rats - mechanisms and significance. *J Mol Cell Cardiol* 2010;49:508-15.
- 35) Ohashi K, Kihara S, Ouchi N, Kumada M, Fujita K, Hiuge A, Hibuse T, Ryo M, Nishizawa H, Maeda N, Maeda K, Shibata R, Walsh K, Funahashi T, Shimomura I. Adiponectin replenishment ameliorates obesity-related hypertension. *Hypertension* 2006;47:1108-16.
- 36) 木原進士. 内臓脂肪機能を改善する薬物療法. *Adiposcience* 2007;4:299-304.
- 37) Eriksen NT. Production of phycocyanin - a pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine. *Appl Microbiol Biotechnol* 2008;80:1-14.
- 38) Hayashi O, Katoh T, Okuwaki Y. Enhancement of antibody production in mice by dietary *Spirulina platensis*. *J Nutr Sci Vitaminol* 1994;40:431-41.
- 39) Torres-Duran PV, Ferreira-Hermosillo A, Juarez-Oropeza MA. Antihyperlipemic and antihypertensive effects of *Spirulina maxima* in an open sample of Mexican population: a preliminary report. *Lipids Health Dis* 2007;6:33.
- 40) Kim HM, Lee EH, Cho HH, Moon YH. Inhibitory effect of mast cell-mediated immediate-type allergic reactions in rats by spirulina. *Biochem Pharmacol* 1998;55:1071-6.
- 41) Khan M, Varadharaj S, Ganesan LP, Shobha JC, Naidu MU, Parinandi NL, Tridandapani S, Kutala VK, Kuppusamy P. C-phycocyanin protects against ischemia-reperfusion injury of heart through involvement of p38 MAPK and ERK signaling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;290:H2136-45.
- 42) Romay C, González R, Ledón N, Ramirez D, Rimbau V. C-phycocyanin: a biliprotein with antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective effects. *Curr Protein Pept Sci* 2003;4:207-16.
- 43) Romay C, Armesto J, Ramirez D, González R, Ledón N, García I. Antioxidant and anti-inflammatory properties of C-phycocyanin from blue-green algae. *Inflamm Res* 1998;47:36-41.

- 44) Ramirez D, Ledon N, Gonzalez R. Role of histamine in the inhibitory effects of phycocyanin in experimental models of allergic inflammatory response. *Mediators Inflamm* 2002;11:81-5.
- 45) Wang H, Liu Y, Gao X, Carter CL, Liu ZR. The recombinant beta subunit of C-phycocyanin inhibits cell proliferation and induces apoptosis. *Cancer Lett* 2007;247:150-8.
- 46) Nagaoka S, Shimizu K, Kaneko H, Shibayama F, Morikawa K, Kanamaru Y, Otsuka A, Hirahashi T, Kato T. A novel protein C-phycocyanin plays a crucial role in the hypocholesterolemic action of *Spirulina platensis* concentrate in rats. *J Nutr* 2005;135:2425-30.
- 47) Fujimoto M, Tsuneyama K, Fujimoto T, Selmi C, Gershwin ME, Shimada Y. Spirulina improves non-alcoholic steatohepatitis, visceral fat macrophage aggregation, and serum leptin in a mouse model of metabolic syndrome. *Dig Liver Dis* 2012;44:767-74.
- 48) Ou Y, Zheng S, Lin L, Jiang Q, Yang X. Protective effect of C-phycocyanin against carbon tetrachloride-induced hepatocyte damage in vitro and in vivo. *Chem Biol Interact* 2010;185:94-100.
- 49) Pak W, Takayama F, Mine M, Nakamoto K, Kodo Y, Mankura M, Egashira T, Kawasaki H, Mori A. Anti-oxidative and anti-inflammatory effects of spirulina on rat model of non-alcoholic steatohepatitis. *J Clin Biochem Nutr* 2012;51:227-34.
- 50) Chiu HF, Yang SP, Kuo YL, Lai YS, Chou TC. Mechanisms involved in the antiplatelet effect of C-phycocyanin. *Br J Nutr* 2006;95:435-40.
- 51) Strasky Z, Zemankova L, Nemeckova I, Rathouska J, Wong RJ, Muchova L, Subhanova I, Vanikova J, Vanova K, Vitek L, Nachtigal P. *Spirulina platensis* and phycocyanobilin activate atheroprotective heme oxygenase-1: a possible implication for atherogenesis. *Food Funct.* 2013;4:1586-94.
- 52) Larter CZ, Yeh MM. Animal models of NASH: Getting both pathology and metabolic context right. *J Gastroenterol Hepatol* 2008;23:1635-48.
- 53) Liu Y, Meyer C, Xu C, Weng H, Hellerbrand C, ten Dijke P, Dooley S. Animal models of chronic liver diseases. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2013;304:G449-68.
- 54) Cao Y, Tao L, Yuan Y, Jiao X, Lau WB, Wang Y, Christopher T, Lopez B, Chan L, Goldstein B, Ma XL. Endothelial dysfunction in adiponectin deficiency and its mechanisms involved. *J Mol Cell Cardiol* 2009;46:413-9.
- 55) Deng G, Long Y, Yu YR, Li MR. Adiponectin directly improves endothelial dysfunction in obese rats through the AMPK-eNOS pathway. *Int J Obese* 2010;34:165-71.
- 56) Paredes-Carbajal MC, Torres-Durán PV, Díaz-Zagoya JC, Mascher D, Juárez-Oropeza MA. Effects of dietary *Spirulina maxima* on endothelium dependent vasomotor responses of rat aortic rings. *Life Sci* 1997;61:PL 211-9.

- 57) Nangaku M, Izuhara Y, Usuda N, Inagi R, Shibata T, Sugiyama S, Kurokawa K, van Ypersele de Strihou C, Miyata T. In a type 2 diabetic nephropathy rat model, the improvement of obesity by a low calorie diet reduce oxidative/carbonyl stress and prevent diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2005;20:2661-9.
- 58) Yamaguchi Y, Yoshikawa N, Kagota S, Nakamura K, Haginaka J, Kunitomo M. Elevated circulating levels of markers of oxidative-nitrative stress and inflammation in a genetic rat model of metabolic syndrome. *Nitric Oxide* 2006;15:380-6.
- 59) Ueno T, Takagi H, Fukuda N, Takahashi A, Yao EH, Mitsumata M, Hiraoka-Yamamoto J, Ikeda K, Matsumoto K, Yamori Y. Cardiovascular remodeling and metabolic abnormalities in SHRSP.Z-*Lepr<sup>fa</sup>*/IzmDmcr rats as a new model of metabolic syndrome. *Hypertens Res* 2008;31:1021-31.
- 60) Kagota S, Fukushima K, Umetani K, Tada Y, Nejime N, Nakamura K, Mori H, Sugimura K, Kunitomo M, Shinozuka K. Coronary vascular dysfunction promoted by oxidative-nitrative stress in SHRSP.Z-*Lepr(fa)* /IzmDmcr rats with metabolic syndrome. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2010;37:1035-43.
- 61) Omagari K, Kato S, Tsuneyama K, Hatta H, Sato M, Hamasaki M, Sadakane Y, Tashiro T, Fukuhata M, Miyata Y, Tamaru S, Tanaka K, Mune M. Olive leaf extract prevents spontaneous occurrence of non-alcoholic steatohepatitis in SHR/NDmcr-cp rats. *Pathology* 2010;42:66-72.
- 62) Kato S, Omagari K, Tsuneyama K, Fukazawa E, Tsukuda H, Inohara C, Kuroda Y, Shiraiishi K, Mune M. A possible rat model for nonalcoholic steatohepatitis: histological findings in SHR/NDmcr-cp rats. *Hepatol Res* 2008;38:743-4.
- 63) Yoshitomi H, Guo X, Liu T, Gao M. Guava leaf extracts alleviate fatty liver via expression of adiponectin receptors in SHRSP.Z-*Leprfa*/Izm rats. *Nutr Metab* 2012;20:9:13.
- 64) Kunimasa K, Miura C, Mori H, Tsuchikura S, Ikeda K, Gao M, Yamori Y, Mori M. High susceptibility of obese hypertensive SHRSP.Z-*Lepr<sup>fa</sup>* /IzmDmcr rats to lipid deposition in the mesenteric artery. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2010;37:1102-4.
- 65) Kumada T, Tsuneyama K, Hatta H, Ishizawa S, Takano Y. Improved 1-h rapid immunostaining method using intermittent microwave irradiation: practicability based on 5 years application in Toyama Medical and Pharmaceutical University Hospital. *Mod Pathol* 2004;17:1141-9.
- 66) 岡村富夫, 戸田昇. 高血圧と NO. 戸田昇編, NO と病態・治療 —機能障害メカニズムの解明と新しい医療への期待 (最新医学からのアプローチ 14) 東京; メジカルビュー社, 1995;2-11.
- 67) Hattori Y, Suzuki M, Hattori S, Kasai K. Globular adiponectin upregulates nitric oxide production in vascular endothelial cells. *Diabetologia* 2003;46:1543-9.

- 68) Kagota S, Tada Y, Nejime N, Nakamura K, Kunitomo M, Shinozuka K. Telmisartan provides protection against development of impaired vasodilation independently of metabolic effects in SHRSP.Z-*Lepr<sup>fa</sup>*/IzmDmcr rats with metabolic syndrome. *Can J Physiol Pharmacol* 2011;89:355-64.
- 69) Goirand F, Solar M, Athes Y, Viollet B, Mateo P, Fortin D, Leclerc J, Hoerter J, Ventura-Clapier R, Garnier A. Activation of AMP kinase  $\alpha$ 1 subunit induces aortic vasorelaxation in mice. *J Physiol* 2007;581:1163-71.
- 70) Lieber CS, Leo MA, Mak KM, Xu Y, Cao Q, Ren C, Ponomarenko A, DeCarli LM. Model of nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Clin Nutr* 2004;79:502-9.
- 71) Omagari K, Kato S, Tsuneyama K, Hatta H, Ichimura M, Urata C, Sumiyama Y, Nishizaki A, Hashimoto S, Harada M, Tamaru S, Tanaka K. The effect of olive leaf extract on hepatic fat accumulation in Sprague-Dawley rats fed a high-fat diet. *Acta Medica Nagasakiensia* 2010;55:29-39.
- 72) Ito M, Suzuki J, Tsujioka S, Sasaki M, Gomori A, Shirakura T, Hirose H, Ito M, Ishihara A, Iwaasa H, Kanatani A. Longitudinal analysis of murine steatohepatitis model induced by chronic exposure to high-fat diet. *Hepatol Res* 2007;37:50-7.
- 73) Spolding B, Connor T, Wittmer C, Abreu LL, Kaspi A, Ziemann M, Kaur G, Cooper A, Morrison S, Lee S, Sinclair A, Gibert Y, Trevaskis JL, Roth JD, El-Osta A, Standish R, Walder K. Rapid development of non-alcoholic steatohepatitis in *Psammomys obesus* (Israeli sand rat). *PloS One* 2014;9:e92656.
- 74) Wouters K, van Gorp PJ, Bieghs V, Gijbels MJ, Duimel H, Lütjohann D, Kerksiek A, van Kruchten R, Maeda N, Staels B, van Bilsen M, Shiri-Sverdlov R, Hofker MH. Dietary cholesterol, rather than liver steatosis, leads to hepatic inflammation in hyperlipidemic mouse models of nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2008;48:474-86.
- 75) Subramanian S, Goodspeed L, Wang S, Kim J, Zeng L, Ioannou GN, Haigh WG, Yeh MM, Kowdley KV, O'Brien KD, Pennathur S, Chait A. Dietary cholesterol exacerbates hepatic steatosis and inflammation in obese LDL receptor-deficient mice. *J Lipid Res* 2011;52:1626-35.
- 76) Van Rooyen DM, Larter CZ, Haigh WG, Yeh MM, Ioannou G, Kuver R, Lee SP, Teoh NC, Farrell GC. Hepatic free cholesterol accumulates in obese, diabetic mice and causes nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 2011;141:1393-403.
- 77) Teratani T, Tomita K, Suzuki T, Oshikawa T, Yokoyama H, Shimamura K, Tominaga S, Hiroi S, Irie R, Okada Y, Kurihara C, Ebinuma H, Saito H, Hokari R, Sugiyama K, Kanai T, Miura S, Hibi T. A high-cholesterol diet exacerbates liver fibrosis in mice via accumulation of free cholesterol in hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 2012;142:152-64.
- 78) Ichimura M, Hatanaka M, Tsuneyama K, Kato S, Omagari K. An SHR/NDmcr-cp rat model of

- non-alcoholic steatohepatitis with advanced fibrosis induced by a high-fat, high-cholesterol diet. *J Obes Wt Loss Ther* (in press).
- 79) Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 1957;226:497-509.
- 80) Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, Ferrell LD, Liu YC, Torbenson MS, Unalp-Arida A, Yeh M, McCullough AJ, Sanyal AJ; Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network. Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network: Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005;41:1313-21.
- 81) Kelley DS, Kletzien R. Ethanol modulation of the hormonal and nutritional regulation of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in primary cultures of rat hepatocytes. *Biochem J* 1984; 217:543-9.
- 82) Walton PA, Possmayer F. Mg<sup>2+</sup>-dependent phosphatidate phosphohydrolase of rat lung: development of an assay employing a defined chemical substrate which reflects the phosphohydrolase activity measured using membrane-bound substrate. *Anal Biochem* 1985;151:479-86.
- 83) Markwell M, McGroarty EJ, Bieber LL, Tolbert NE. The subcellular distribution of carnitine acyltransferases in mammalian liver and kidney. *J Biol Chem* 1973;248:3426-32.
- 84) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-75.
- 85) Ioannou GN, Morrow OB, Connole ML, Lee SP. Association between dietary nutrient composition and the incidence of cirrhosis or liver cancer in the United States population. *Hepatology* 2009;50:175-84.
- 86) Puri P, Baillie RA, Wiest MM, Mirshahi F, Choudhury J, Cheung O, Sargeant C, Contos MJ, Sanyal AJ. A lipidomic analysis of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2007;46:1081-90.
- 87) Nakamuta M, Fujino T, Yada R, Yada M, Yasutake K, Yoshimoto T, Harada N, Higuchi N, Kato M, Kohjima M, Taketomi A, Maehara Y, Nakashima M, Kotoh K, Enjoji M. Impact of cholesterol metabolism and the LXRA $\alpha$ -SREBP-1c pathway on nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Med* 2009;23:603-8.
- 88) Min HK, Kapoor A, Fuchs M, Mirshahi F, Zhou H, Maher J, Kellum J, Warnick R, Contos MJ, Sanyal AJ. Increased hepatic synthesis and dysregulation of cholesterol metabolism is associated with the severity of nonalcoholic fatty liver disease. *Cell Metab* 2012;15:665-74.
- 89) Savard C, Tartaglione EV, Kuver R, Haigh WG, Farrell GC, Subramanian S, Chait A, Yeh MM, Quinn LS, Ioannou GN. Synergistic interaction of dietary cholesterol and dietary fat in inducing experimental

- steatohepatitis. *Hepatology* 2013;57:81-92.
- 90) Hoekstra M, Out R, Kruijt JK, Van Eck M, Van Berkel TJ. Diet induced regulation of genes involved in cholesterol metabolism in rat liver parenchymal and Kupffer cells. *J Hepatol* 2005;42:400-7.
  - 91) Ioannou GN, Haigh WG, Thorning D, Savard C. Hepatic cholesterol crystals and crown-like structures distinguish NASH from simple steatosis. *J Lipid Res* 2013;54:1326-34.
  - 92) Marí M, Caballero F, Colell A, Morales A, Caballeria J, Fernandez A, Enrich C, Fernandez-Checa JC, García-Ruiz C. Mitochondrial free cholesterol loading sensitizes to TNF- and Fas-mediated steatohepatitis. *Cell Metab* 2006;4:185-98.
  - 93) Bieghs V, Verheyen F, van Gorp PJ, Hendrikx T, Wouters K, Lütjohann D, Gijbels MJ, Febbraio M, Binder CJ, Hofker MH, Shiri-Sverdlov R. Internalization of modified lipids by CD36 and SR-A leads to hepatic inflammation and lysosomal cholesterol storage in Kupffer cells. *PLoS One* 2012;7:e34378.
  - 94) García-Ruiz C, Marí M, Colell A, Morales A, Caballero F, Montero J, Terrones O, Basanez G, Fernandez-Checa JC. Mitochondrial cholesterol in health and disease. *Histol Histopathol* 2009;24:117-32.
  - 95) Montero J, Morales A, Llacuna L, Lluís JM, Terrones O, Basanez G, Antonsson B, Prieto J, García-Ruiz C, Colell A, Fernandez-Checa JC. Mitochondrial cholesterol contributes to chemotherapy resistance in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2008;68:5246-56.
  - 96) 小川智弘, 河田則文. 肝線維化と細胞間ネットワーク. *肝胆膵* 2008;57:205-9.
  - 97) Tomita K, Teratani T, Suzuki T, Shimizu M, Sato H, Narimatsu K, Okada Y, Kurihara C, Irie R, Yokoyama H, Shimamura K, Usui S, Ebinuma H, Saito H, Watanabe C, Komoto S, Kawaguchi A, Nagao S, Sugiyama K, Hokari R, Kanai T, Miura S, Hibi T. Free cholesterol accumulation in hepatic stellate cells: mechanism of liver fibrosis aggravation in nonalcoholic steatohepatitis in mice. *Hepatology* 2014;59:154-69.
  - 98) Watanabe S, Tsuneyama K. Eicosapentaenoic acid attenuates hepatic accumulation of cholesterol esters but aggravates liver injury and inflammation in mice fed a cholate-supplemented high-fat diet. *J Toxicol Sci* 2013;38:379-90.
  - 99) Vergnes L, Phan J, Strauss M, Tafuri S, Reue K. Cholesterol and cholate components of an atherogenic diet induce distinct stages of hepatic inflammatory gene expression. *J Biol Chem* 2003;278:42774-84.
  - 100) Matsuzawa N, Takamura T, Kurita S, Misu H, Ota T, Ando H, Yokoyama M, Honda M, Zen Y, Nakanuma Y, Miyamoto K, Kaneko S. Lipid-induced oxidative stress causes steatohepatitis in mice fed an atherogenic diet. *Hepatology* 2007;46:1392-403.
  - 101) Miyata M, Tozawa A, Otsuka H, Nakamura T, Nagata K, Gonzalez FJ, Yamazoe Y. Role of farnesoid X receptor in the enhancement of canalicular bile acid output and excretion of unconjugated bile acids:

- a mechanism for protection against cholic acid-induced liver toxicity. *J Pharmacol Exp Ther* 2005;312:759-66.
- 102) Jia X, Naito H, Yetti H, Tamada H, Kitamori K, Hayashi Y, Wang D, Yanagiba Y, Wang J, Ikeda K, Yamori Y, Nakajima T. Dysregulated bile acid synthesis, metabolism and excretion in a high fat-cholesterol diet-induced fibrotic steatohepatitis in rats. *Dig Dis Sci* 2013;58:2212-22.
- 103) Yang F, Huang X, Yi T, Yen Y, Moore DD, Huang W. Spontaneous development of liver tumors in the absence of the bile acid receptor farnesoid X receptor. *Cancer Res* 2007;67:863-7.
- 104) Watanabe M, Houten SM, Matakai C, Christoffolete MA, Kim BW, Sato H, Messaddeq N, Harney JW, Ezaki O, Kodama T, Schoonjans K, Bianco AC, Auwerx J. Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation. *Nature* 2006;439:484-9.
- 105) Ma Y, Huang Y, Yan L, Gao M, Liu D. Synthetic FXR agonist GW4064 prevents diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance. *Pharm Res* 2013;30:1447-57.
- 106) Cariou B. The farnesoid X receptor (FXR) as a new target in non-alcoholic steatohepatitis. *Diabetes Metab* 2008;34:685-91.
- 107) Neuschwander-Tetri BA, Loomba R, Sanyal AJ, Lavine JE, Van Natta ML, Abdelmalek MF, Chalasani N, Dasarathy S, Diehl AM, Hameed B, Kowdley KV, McCullough A, Terrault N, Clark JM, Tonascia J, Brunt EM, Kleiner DE, Doo E; NASH Clinical Research Network. Farnesoid X nuclear receptor ligand obeticholic acid for non-cirrhotic, non-alcoholic steatohepatitis (FLINT): a multicentre, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet* Early Online Publication, 7 November 2014; doi:10.1016/S0140-6736(14)61933-4.
- 108) Côté I, Ngo Sock ET, Lévy É, Lavoie JM. An atherogenic diet decreases liver FXR gene expression and causes severe hepatic steatosis and hepatic cholesterol accumulation: effect of endurance training. *Eur J Nutr* 2013;52:1523-32.
- 109) Kong B, Luyendyk JP, Tawfik O, Guo GL. Farnesoid X receptor deficiency induces nonalcoholic steatohepatitis in low-density lipoprotein receptor-knockout mice fed a high-fat diet. *J Pharmacol Exp Ther* 2009;328:116-22.
- 110) Neuschwander-Tetri BA. Hepatic lipotoxicity and the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis: the central role of nontriglyceride fatty acid metabolites. *Hepatology* 2010;52:774-88.
- 111) Yamaguchi K, Yang L, McCall S, Huang J, Yu XX, Pandey SK, Bhanot S, Monia BP, Li YX, Diehl AM. Inhibiting triglyceride synthesis improves hepatic steatosis but exacerbates liver damage and fibrosis in obese mice with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2007;45:1366-74.
- 112) Fessler MB, Rudel LL, Brown JM. Toll-like receptor signaling links dietary fatty acids to the metabolic syndrome. *Curr Opin Lipidol* 2009;20:379-85.

- 113) Feldstein AE, Werneburg NW, Canbay A, Guicciardi ME, Bronk SE, Rydzewski R, Burgart LJ, Gores GJ. Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by stimulating TNF-alpha expression via a lysosomal pathway. *Hepatology* 2004;40:185-94.
- 114) Kotronen A, Seppänen-Laakso T, Westerbacka J, Kiviluoto T, Arola J, Ruskeepää AL, Orešič M, Yki-Järvinen H. Hepatic stearoyl-CoA desaturase (SCD)-1 activity and diacylglycerol but not ceramide concentrations are increased in the nonalcoholic human fatty liver. *Diabetes* 2009;58:203-8.
- 115) Toriumi K, Horikoshi Y, Yoshiyuki Osamura R, Yamamoto Y, Nakamura N, Takekoshi S. Carbon tetrachloride-induced hepatic injury through formation of oxidized diacylglycerol and activation of the PKC/NF-κB pathway. *Lab Invest* 2013;93:218-29.
- 116) Gorden DL, Ivanova PT, Myers DS, McIntyre JO, VanSaun MN, Wright JK, Matrisian LM, Brown HA. Increased diacylglycerols characterize hepatic lipid changes in progression of human nonalcoholic fatty liver disease; comparison to a murine model. *PLoS ONE* 2011;6:e22775.
- 117) Caldwell SH, Oelsner DH, Iezzoni JC, Hespeneheide EE, Battle EH, Driscoll CJ. Cryptogenic cirrhosis: clinical characterization and risk factors for underlying disease. *Hepatology* 1999;29:664-9.
- 118) Wanless IR, Shiota K. The pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis and other fatty liver disease: a four-step model including the role of lipid release and hepatic venular obstruction in the progression to cirrhosis. *Semin Liver Dis* 2004; 24:99-106.
- 119) Sumiyoshi M, Sakanaka M, Kimura Y. Chronic intake of a high-cholesterol diet resulted in hepatic steatosis, focal nodular hyperplasia and fibrosis in non-obese mice. *Br J Nutr* 2010;103:378-85.
- 120) De Hewavisenthi SJ, Dassanayaka AS, De Silva HJ. Clinical, biochemical and histological characteristics of a Sri Lankan population of non-alcoholic steatohepatitis (NASH) patients. *Ceylon Med J* 2005;50:113-6.
- 121) Choudhary NS, Duseja A, Kaira N, Das A, Dhiman RK, Chawla YK. Correlation of adipose tissue with liver histology in Asian Indian patients with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Ann Hepatol* 2012;11:478-86.
- 122) Yasutake K, Nakamuta M, Shima Y, Ohyama A, Masuda K, Haruta N, Fujino T, Aoyagi Y, Fukuizumi K, Yoshimoto T, Takemoto R, Miyahara T, Harada N, Hayata F, Nakashima M, Enjoji M. Nutritional investigation of non-obese patients with non-alcoholic fatty liver disease: The significance of dietary cholesterol. *Scand J Gastroenterol* 2009;44:471-7.
- 123) Buechler C, Wanninger J, Neumeier M. Adiponectin, a key adipokine in obesity related liver diseases. *World J Gastroenterol* 2011;17:2801-11.



**Table 2-1 Major nutrients composition of diets with or without phycocyanin**

Ingredient (g/100 g)	Control*	Low	Middle	High
Crude protein	23.6	23.5	23.5	23.4
Crude lipid	5.3	5.3	5.3	5.2
Crude ash	6.1	6.1	6.1	6.0
Crude fiber	2.9	2.9	2.9	2.9
Nitrogen free extract	54.4	54.3	54.1	53.9
Water	7.7	7.7	7.7	7.6
Phycocyanin	0.0	0.25	0.5	1.0
Energy (kcal/100 g)	360.0	360.1	360.2	360.4

\*The Control group fed the MF, which is a normal diet provided by Oriental Yeast. Energy of phycocyanin was expected to be 4 kcal/g.

**Table 2-2 Major nutrients composition of the Ath diets with or without phycocyanin**

Ingredient (g/100 g)	Ath*	Ath+P0.5	Ath+P1.5
Crude protein	14.7	14.6	14.5
Crude lipid	28.6	28.5	28.2
Crude ash	4.8	4.8	4.7
Crude fiber	2.0	2.0	2.0
Nitrogen free extract	42.9	42.7	42.3
Water	7.0	7.0	6.9
Phycocyanin	0.0	0.5	1.5
Energy (kcal/100 g)	487.8	487.4	486.5

\*The Ath diet, which was provided by Funabashi farm, contained 25% palm oil, 5% cholesterol, and 2% sodium cholate. Energy of phycocyanin was expected to be 4 kcal/g. Ath, atherogenic diet; Ath+P0.5, the Ath diet with 0.5% phycocyanin; Ath+P1.5, the Ath diet with 1.5% phycocyanin

**Table 2-3 Primer sequences for real-time PCR**

	Forward (5'→3')	Reverse (5'→3')
18S rRNA	GTAACCCGTTGAACCCATT	CCATCCAATCGGTAGTAGCG
Adiponectin	AATCCTGCCCAGTCATGAAG	CATCTCCTGGGTCACCCTTA
C/EBP $\alpha$	GCTCGCCATGCCGGGAGAACT	TGGAGGTGGCTGCTCATCGGG
GAPDH	GGCACAGTCAAGGCTGAGAATG	ATGGTGGTGAAGACGCCAGTA
AdipoR1	ACAAGCATGCCCCGTGCCTC	CCAACGCCCTCCCAGACCTTA
eNOS	AGCGGCTGGTACATGAGTTC	GCAGACAGCCACATCCTCAA
Prkaa1	GGCCTCACCTGAGAGAGTA	ATGCCACTTTGCCTTCCGTA
sGCa1	ACACAATATGCATCTCCGATGG	GCTCTCTATACTCGCTTTGACCAA

These primers were originally designed using primer designing tool, Primer-BLAST, and were synthesized by Greiner Japan.

**Table 2-4 Cumulative energy intake, body weight and relative organ weight in SHR/NDmcr-cp rats at 34 weeks of age**

	Control	Low	Middle	High
Cumulative energy intake (kcal)	18835 $\pm$ 117	19117 $\pm$ 144	18902 $\pm$ 123	18885 $\pm$ 226
Final BW (g)	762 $\pm$ 10	772 $\pm$ 15	791 $\pm$ 16	769 $\pm$ 7
Liver weight/BW (%)	3.18 $\pm$ 0.14	3.14 $\pm$ 0.10	3.27 $\pm$ 0.15	3.12 $\pm$ 0.13
Epididymal fat pad weight/BW (%)	1.11 $\pm$ 0.06	1.24 $\pm$ 0.06	1.27 $\pm$ 0.06	1.09 $\pm$ 0.06

Values are expressed as means  $\pm$  SE. n=6-7/group. There was no significant difference among groups. BW, body weight

**Table 2-5 Serum biochemical parameters in SHR/NDmcr-cp rats at 34 weeks of age**

	Control	Low	Middle	High
Triglyceride (mg/dL)	409 ± 21	409 ± 18	644 ± 51 <sup>b,d</sup>	506 ± 58
Total cholesterol (mg/dL)	97.0 ± 10.8	84.5 ± 7.6	114.4 ± 12.2	96.9 ± 10.6
HDL cholesterol (mg/dL)	51.3 ± 3.5	48.5 ± 3.7	68.4 ± 5.7 <sup>a,c</sup>	53.2 ± 3.1
HDL/total cholesterol	56.2 ± 6.7	57.6 ± 3.9	60.1 ± 3.1	55.8 ± 3.6
Glucose (mg/dL)	146 ± 8	156 ± 14	240 ± 32 <sup>a,c</sup>	183 ± 13
Insulin (ng/mL)	35.4 ± 4.5	28.7 ± 6.2	22.3 ± 2.9	24.9 ± 5.5
Adiponectin (µg/mL)	2.05 ± 0.33	3.73 ± 0.51	2.82 ± 0.14	3.99 ± 0.65
Leptin (ng/mL)	127 ± 10	129 ± 9	149 ± 13	129 ± 4
NOx (µmol/L)	15.4 ± 2.3	14.8 ± 1.4	15.6 ± 1.5	20.7 ± 3.1

Values are expressed as means ± SE. n=6-7/group. <sup>a</sup>*P* < 0.05 and <sup>b</sup>*P* < 0.01 vs. Control group; <sup>c</sup>*P* < 0.05 and <sup>d</sup>*P* < 0.01 vs. Low group. HDL, high-density lipoprotein

**Table 2-6 eNOS grades in the aorta of SHR/NDmcr-cp rats at 34 weeks of age**

Grade	Control	Low	Middle	High
0	1	0	0	0
0.5	4	1	5	1
1	1	0	2	1
1.5	0	2	0	0
2	1	1	0	2
3	0	3	0	2

The intensity of staining of eNOS in the aorta was classified as follows: grade 0, negative staining; grade 1, mild-staining; grade 2, moderate-staining; and grade 3, severe-staining. eNOS, endothelial nitric oxide synthase

**Table 2-7 Cumulative energy intake, body weight and relative organ weights in SHRSP/ZF rats fed the Ath, Ath+P0.5 or Ath+P1.5 diet for 9 weeks**

	<b>Ath (n=3)</b>	<b>Ath+P0.5 (n=5)</b>	<b>Ath+P1.5 (n=6)</b>
Cumulative energy intake (kcal)	5431 ± 69	5744 ± 147	5757 ± 39
Final BW (g)	419 ± 25	424 ± 16	421 ± 7
Liver weight/BW (%)	11.7 ± 0.8	13.2 ± 0.9	12.8 ± 1.0
Epididymal fat pad weight/BW (%)	1.90 ± 0.16	1.92 ± 0.09	1.89 ± 0.05
Heart weight/BW (%)	0.33 ± 0.01	0.35 ± 0.02	0.34 ± 0.01

Values are expressed as means ± SE. There was no significant difference among groups. Ath, atherogenic diet; Ath+P0.5, the Ath diet with 0.5% phycocyanin; Ath+P1.5, the Ath diet with 1.5% phycocyanin; BW, body weight

**Table 2-8 Serum biochemical parameters in SHRSP/ZF rats fed the Ath, Ath+P0.5 or Ath+P1.5 diet for 9 weeks**

	<b>Ath (n=3)</b>	<b>Ath+P0.5 (n=5)</b>	<b>Ath+P1.5 (n=6)</b>
Triglyceride (mg/dL)	132 ± 29	189 ± 52	155 ± 24
Total cholesterol (mg/dL)	611 ± 83	733 ± 171	820 ± 127
HDL cholesterol (mg/dL)	8.0 ± 1.1	28.3 ± 8.5	16.7 ± 5.6
Glucose (mg/dL)	86.2 ± 2.8	102.3 ± 13.3	95.8 ± 11.0
Insulin (ng/mL)	19.8 ± 10.7	15.9 ± 3.9	12.1 ± 0.7
Leptin (ng/mL)	106.6 ± 15.4	80.5 ± 15.3	80.2 ± 6.1
Adiponectin (µg/mL)	2.18 ± 0.40	4.67 ± 0.90	5.55 ± 0.91
Total angiotensinogen (µg/mL)	2.27 ± 0.26	2.65 ± 0.82	2.12 ± 0.25
NOx (µmol/L)	53.6 ± 13.8	53.6 ± 15.1	56.3 ± 13.1

Values are expressed as means ± SE. There was no significant difference among groups. Ath, atherogenic diet; Ath+P0.5, the Ath diet with 0.5% phycocyanin; Ath+P1.5, the Ath diet with 1.5% phycocyanin; HDL, high-density lipoprotein

**Table 2-9 Relaxation response to ACh and SNP in the thoracic aortas from SHRSP/ZF rats fed the Ath, Ath+P0.5 or Ath+P1.5 diet for 9 weeks**

Group	Drugs	n	pD <sub>2</sub>	Maximum relaxation (%)
Ath	ACh	2	-	24.0 ± 18.9
	ACh + L-NNA	0	-	-
	SNP	3	6.88 ± 0.20	57.2 ± 15.9
Ath+P0.5	ACh	5	-	11.5 ± 3.9
	ACh + L-NNA	2	-	2.67 ± 0.20
	SNP	9	7.53 ± 0.09	67.5 ± 9.1
Ath+P1.5	ACh	7	-	25.5 ± 9.5
	ACh + L-NNA	1	-	1.85
	SNP	10	7.39 ± 0.11	61.7 ± 11.3

Values are expressed as means ± SE. Data on aortas were from 3-6 animals. There was no significant difference among groups. pD<sub>2</sub> value was high in the phycocyanin-fed groups (Ath+P0.5 and Ath+P1.5 groups) as compared to the Ath group but these differences were not statistically significant, at  $P = 0.062$  by ANOVA. ACh, acetylcholine chloride; Ath, atherogenic diet; Ath+P0.5, the Ath diet with 0.5% phycocyanin; Ath+P1.5, the Ath diet with 1.5% phycocyanin; L-NNA, nitro-L-arginine; SNP, sodium nitroprusside

**Table 3-1 Major nutrients composition of the control, HF and HFC diets**

Ingredient (g/100g)	Control*	HF	HFC1.25	HFC2.5
Crude protein	23.1	15.7	15.7	15.7
Crude lipid	5.1	3.5	3.5	3.5
Crude ash	5.8	3.9	3.9	3.9
Crude fiber	2.8	1.9	1.9	1.9
Nitrogen free extract	55.3	37.6	37.6	37.6
Water	7.9	5.4	5.4	5.4
Palm oil	0.0	30.0	28.8	27.5
Cholesterol	0.0	0.0	1.25	2.5
Sodium cholate	0.0	2.0	2.0	2.0
Energy (kcal/100 g)	359.5	514.5	503.2	492.0
Energy ratio derived from fat (%)	12.8	58.5	57.6	56.7

\*The Control group fed the MF, which is a normal diet provided by Oriental Yeast. HF, high fat diet without cholesterol; HFC1.25, the HF diet with 1.25% cholesterol; HFC2.5, the HF diet with 2.5% cholesterol

**Table 3-2 NASH Clinical Research Network Scoring System <sup>80)</sup>**

	Item	Definition	Score/Code
NAFLD activity score (NAS)	Steatosis	Low-to medium-power evaluation of parenchymal involvement by steatosis	
		<5%	0
		5%-33%	1
		>33%-66%	2
		>66%	3
	Lobular inflammation	Overall assessment of all inflammatory foci	
		No foci	0
		<2 foci per 200x field	1
		2-4 foci per 200x field	2
		>4 foci per 200x field	3
Hepatocyte ballooning	None	0	
	Few balloon cells	1	
	Many cells/prominent ballooning	2	
		Full Score; 8	
Fibrosis	None	0	
	Perisinusoidal or periportal	1	
	Mild, zone 3, perisinusoidal	1A	
	Moderate, zone 3, perisinusoidal	1B	
	Portal/periportal	1C	
	Perisinusoidal and portal/periportal	2	
	Bridging fibrosis	3	
Cirrhosis	4		

**Table 3-3 Primer sequences for real-time PCR**

	Forward (5'→3')	Reverse (5'→3')
GAPDH	GGCACAGTCAAGGCTGAGAATG	ATGGTGGTGAAGACGCCAGTA
LDLR	AGGAGTGCAAGACCAACGAG	TATCTTCACACTGGTGGCCG
HMGR	GAAACCCTCATGGAGACGCA	AGCAAGCTCCCATCACCAAG
ABCG5	CGGGAGACGCTGAGATACAC	ACTGCCTCTACCTTCTTGTCG
CYP7A1	TGCCGGTACTAGACAGCATC	CGTCCTCAAGATGGAGAGTG
BAT	GCTGTGCGAACTACGGTTTTGG	GTGACCCGGATATGCACAGG
BSEP	TGAAGGCATGGTGA CTCTGG	GTGGTGGAGAACAGAACGG
MRP2	GCACATGGCTCCTGGTTTTG	ATACGCCGCATAAGACCGAG
MTP	CAAGCTCAAGGCAGTGGTTG	AGCAGGTACATCGTGGTGTC
FAS	CAACATTGACGCCAGTTCCG	TTCGAGCCAGTGTCTTCCAC
FATP5	CTTCTACTTCCGAGACCGCC	ACCTTACCCTCACACCCTGG
LXR $\alpha$	TTACTGAGCTGGCCATCGTG	TCTCCAGAAGCATCACCTCG
FXR	TGGGAATGTTGGCTGAATGTTG	TGCATAGCTTGGTCGTGGAG
SREBP-1c	CATGGACGAGCTACCCTTCG	GAAGCATGTCTTCGATGTCGG
SREBP-2	CCGGGAAGAAGAGAGCTGTG	CAGACGACATCGGGACCAAG
COL1A1	GCGTAGCCTACATGGACCAA	AAGTTCCGGTGTGACTCGTG
COL4A1	TCTTGAAGGATTGCCGGGTC	AAATATCTCGCCGGGCTCTC
TGF- $\beta$ 1	CTTTGTACAACAGCACCCGC	TAGATTGCGTTGTTGCGGTC

These primers were originally designed using primer designing tool, Primer-BLAST, and were synthesized by Greiner Japan.



**Table 3-4 Cumulative energy intake, body weight, and relative organ weight in SD rats fed the control, HF, HFC1.25 or HFC2.5 diet for 9 or 18 weeks**

Group	Control	HF	HFC1.25	HFC2.5
Cumulative energy intake (kcal)				
18 weeks of age	5838 ± 133	5840 ± 303	6301 ± 109	5840 ± 328
27 weeks of age	10788 ± 239	10349 ± 266	11163 ± 382	10161 ± 419
Final BW (g)				
18 weeks of age	487 ± 17	386 ± 15 <sup>a</sup>	433 ± 8	421 ± 27
27 weeks of age	571 ± 19	467 ± 15 <sup>a</sup>	485 ± 16 <sup>a</sup>	443 ± 24 <sup>b</sup>
BW gain (g)				
18 weeks of age	181 ± 12	78 ± 16 <sup>b</sup>	125 ± 9	107 ± 24 <sup>a</sup>
27 weeks of age	260 ± 16	153 ± 12 <sup>b</sup>	174 ± 15 <sup>a</sup>	141 ± 30 <sup>b</sup>
Liver weight/BW (%)				
18 weeks of age	3.17 ± 0.08	3.31 ± 0.18	7.54 ± 0.36 <sup>b,d</sup>	8.41 ± 0.69 <sup>b,d</sup>
27 weeks of age	3.08 ± 0.07	3.22 ± 0.11	9.62 ± 0.41 <sup>b,d</sup>	10.43 ± 0.48 <sup>b,d</sup>
Epididymal fat pad weight/BW (%)				
18 weeks of age	1.79 ± 0.01	1.12 ± 0.15 <sup>b</sup>	0.89 ± 0.07 <sup>b</sup>	0.85 ± 0.07 <sup>b</sup>
27 weeks of age	2.19 ± 0.19	1.25 ± 0.06 <sup>b</sup>	0.78 ± 0.1 <sup>b</sup>	0.55 ± 0.14 <sup>b,d</sup>
Spleen weight/BW (%)				
18 weeks of age	-	-	-	-
27 weeks of age	0.16 ± 0.00	0.15 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.40 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.47 ± 0.06

Values are expressed as means ± SE. n=5-6/group. <sup>a</sup>*P* < 0.05 and <sup>b</sup>*P* < 0.01 vs. age-matched, Control groups; <sup>c</sup>*P* < 0.05 and <sup>d</sup>*P* < 0.01 vs. age-matched, HF groups; <sup>e</sup>*P* < 0.05 and <sup>f</sup>*P* < 0.01 vs. age-matched, HFC 1.25 groups. BW, body weight; HF, high fat diet without cholesterol; HFC1.25, the HF diet with 1.25% cholesterol; HFC2.5, the HF diet with 2.5% cholesterol; -, not measured

**Table 3-5 Serum biochemical parameters in SD rats fed the control, HF, HFC1.25 or HFC2.5 diet for 9 or 18 weeks**

Group	Control	HF	HFC1.25	HFC2.5
Triglyceride (mg/dL)				
18 weeks of age	111.2 ± 24.3	79.8 ± 15.9	29.8 ± 1.9 <sup>a</sup>	43.0 ± 16.6
27 weeks of age	102.5 ± 14.3	58.3 ± 7.7	59.7 ± 6.0	68.1 ± 15.0
Total cholesterol (mg/dL)				
18 weeks of age	52.9 ± 5.3	76.8 ± 6.2	171.4 ± 13.2 <sup>b,d</sup>	287.3 ± 33.1 <sup>b,d,e</sup>
27 weeks of age	75.0 ± 5.6	80.6 ± 4.4	295.1 ± 20.0 <sup>b,d</sup>	301.2 ± 55.8 <sup>b,d</sup>
HDL cholesterol (mg/dL)				
18 weeks of age	21.7 ± 0.6	37.3 ± 4.8	35.4 ± 7.4	43.9 ± 10.7
27 weeks of age	49.4 ± 4.0	49.4 ± 4.2	62.8 ± 2.7	50.6 ± 3.8
Free fatty acid (mEq/L)				
18 weeks of age	0.37 ± 0.02	0.31 ± 0.04	0.26 ± 0.02	0.40 ± 0.08
27 weeks of age	0.32 ± 0.06	0.25 ± 0.03	0.52 ± 0.14	0.44 ± 0.13
Glucose (mg/dL)				
18 weeks of age	180 ± 16	171 ± 8	189 ± 11	175 ± 8
27 weeks of age	210 ± 31	184 ± 17	156 ± 4	156 ± 16
Insulin (ng/mL)				
18 weeks of age	6.26 ± 1.22	5.44 ± 1.47	6.67 ± 0.97	3.58 ± 0.38
27 weeks of age	6.08 ± 0.74	3.72 ± 0.52	3.47 ± 0.30 <sup>a</sup>	2.55 ± 0.80 <sup>b</sup>
Insulin resistance index				
18 weeks of age	2.70 ± 0.60	2.43 ± 0.75	3.18 ± 0.59	1.56 ± 0.23
27 weeks of age	3.89 ± 0.71	1.75 ± 0.26 <sup>a</sup>	1.59 ± 0.26 <sup>b</sup>	1.12 ± 0.45 <sup>b</sup>
AST (IU/L)				
18 weeks of age	28.6 ± 1.7	22.4 ± 2.1	54.4 ± 9.3	117.8 ± 31.4 <sup>b,d,e</sup>
27 weeks of age	15.8 ± 2.1	21.7 ± 8.4	86.6 ± 16.1 <sup>a,c</sup>	106.2 ± 27.2 <sup>b,c</sup>
ALT (IU/L)				
18 weeks of age	4.29 ± 0.91	4.45 ± 0.78	23.25 ± 6.38	53.70 ± 16.70 <sup>b,d</sup>
27 weeks of age	8.38 ± 0.94	11.76 ± 4.53	46.03 ± 7.69 <sup>a,c</sup>	50.81 ± 13.86 <sup>a,c</sup>
Leptin (ng/mL)				
18 weeks of age	6.56 ± 1.00	3.92 ± 0.64	2.72 ± 0.19 <sup>b</sup>	2.45 ± 0.48 <sup>b</sup>
27 weeks of age	11.82 ± 0.58	4.68 ± 0.36 <sup>b</sup>	4.68 ± 0.54 <sup>b</sup>	3.33 ± 0.66 <sup>b</sup>
Adiponectin (µg/mL)				
18 weeks of age	2.42 ± 0.46	1.96 ± 0.20	1.81 ± 0.08	1.21 ± 0.16
27 weeks of age	1.69 ± 0.54	1.78 ± 0.44	1.09 ± 0.12	1.02 ± 0.18

Values are expressed as means ± SE. n=5-6/group. <sup>a</sup>*P* < 0.05 and <sup>b</sup>*P* < 0.01 vs. age-matched, Control groups; <sup>c</sup>*P* < 0.05 and <sup>d</sup>*P* < 0.01 vs. age-matched, HF groups; <sup>e</sup>*P* < 0.05 vs. age-matched, HFC1.25 groups; ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; HDL, high-density lipoprotein; HF, high fat diet without cholesterol; HFC1.25, the HF diet with 1.25% cholesterol; HFC2.5, the HF diet with 2.5% cholesterol

**Table 3-6 Histopathological assessment of hepatic steatosis, lobular inflammation, hepatocyte ballooning, NAS, fibrosis and grades of desmin, and CD68 staining in SD rats fed the control, HF, HFC1.25 or HFC2.5 diet for 9 weeks**

**At 18 weeks of age**

Group	Rat no.	Steatosis	Lobular inflammation	Hepatocyte ballooning	NAS*	Fibrosis	Desmin	CD68
Control	1	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0
HF	1	1	1	1	3	0	0	1
	2	0	0	0	0	0	1	0
	3	2	1	1	4	0	0	1
	4	0	0	0	0	0	0	0
	5	1	0	0	1	0	1	0
HFC1.25	1	3	2	1	6	1A	2	2
	2	3	2	2	7	2	3	3
	3	3	2	2	7	2	1	3
	4	3	2	0	5	1A	1	1
	5	3	2	1	6	1A	1	2
HFC2.5	1	3	2	2	7	2	2	3
	2	3	2	2	7	1A	1	3
	3	3	2	2	7	1A	2	3
	4	3	2	2	7	4	3	3
	5	3	2	2	7	4	3	3

\*Non-alcoholic fatty liver disease activity score (NAS) is defined as unweighted sum of scores for steatosis, lobular inflammation and hepatocyte ballooning. Final scores range from 0 to 8. NAS scores  $\geq 5$  and  $\leq 2$  are considered diagnostic and not diagnostic, respectively, for steatohepatitis according to the NASH Clinical Research Network Scoring System<sup>80</sup>). The intensity of staining of desmin in the parenchyma was classified as follows: grade 0, absent staining; grade 1, a few stained cells; grade 2, 3-10 stained cells; and grade 3, > 10 stained cells. The intensity of staining of CD68 in Kupffer cells was classified as grade 0, 1, 2 and 3 indicating normal staining intensity and slightly, moderately and markedly increased staining intensity, respectively.

**Table 3-7 Histopathological assessment of hepatic steatosis, lobular inflammation, hepatocyte ballooning, NAS and fibrosis in SD rats fed the control, HF, HFC1.25 or HFC2.5 diet for 18 weeks**

**At 27 weeks of age**

Group	Rat no.	Steatosis	Lobular inflammation	Hepatocyte ballooning	NAS*	Fibrosis
Control	1	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0
HF	1	0-1	0	0	0-1	0
	2	1	0	0	1	0-1
	3	1	0	0	1	0
	4	1	1	0	2	1
	5	0-1	0	0	0-1	0
HFC1.25	1	3	3	2	8	3-4
	2	3	3	2	8	3
	3	3	3	2	8	4
	4	3	3	2	8	4
	5	3	3	2	8	3-4
	6	3	3	2	8	3-4
HFC2.5	1	3	3	2	8	4
	2	3	3	2	8	4
	3	3	3	2	8	3-4
	4	3	3	2	8	4
	5	3	3	2	8	4
	6	3	3	2	8	4

\*Non-alcoholic fatty liver disease activity score (NAS) is defined as unweighted sum of scores for steatosis, lobular inflammation and hepatocyte ballooning. Final scores range from 0 to 8. NAS scores  $\geq 5$  and  $\leq 2$  are considered diagnostic and not diagnostic, respectively, for steatohepatitis according to the NASH Clinical Research Network Scoring System<sup>80</sup>.

**Table 3-8 Major nutrients composition of the control and HFC diets with or without phycocyanin**

Ingredient (g/100g)	Control*	NASH	P-0.5	P-1.5
Crude protein	23.1	15.7	15.6	15.5
Crude lipid	5.1	3.5	3.5	3.4
Crude ash	5.8	3.9	3.9	3.9
Crude fiber	2.8	1.9	1.9	1.9
Nitrogen free extract	55.3	37.6	37.4	37.0
Water	7.9	5.4	5.3	5.3
Palm oil	0.0	27.5	27.4	27.1
Cholesterol	0.0	2.5	2.5	2.5
Sodium cholate	0.0	2.0	2.0	2.0
Phycocyanin	0.0	0.0	0.5	1.5
Energy (kcal/100 g)	359.5	492.0	491.5	490.6
Energy ratio derived from fat (%)	12.8	56.7	57.6	56.7

\*The Control group fed the MF, which is a normal diet provided by Oriental Yeast. The NASH group fed the high fat diet with 2.5% cholesterol (HFC diet). The P-0.5 and P-1.5 groups fed the HFC diet with 0.5% and 1.5% phycocyanin, respectively. Energy of phycocyanin was expected to be 4 kcal/g.

**Table 3-9 Cumulative energy intake, body weight and relative organ weight in the Control, NASH, P-0.5 and P-1.5 groups**

	<b>Control (n=5)</b>	<b>NASH (n=4)</b>	<b>P-0.5 (n=5)</b>	<b>P-1.5 (n=6)</b>
Cumulative energy intake (kcal)	4819 ± 39	4830 ± 54	4972 ± 123	4963 ± 114
Final BW (g)	492 ± 8	425 ± 8 <sup>b</sup>	435 ± 9 <sup>b</sup>	437 ± 8 <sup>b</sup>
BW gain (g)	185 ± 9	116 ± 12 <sup>b</sup>	127 ± 6 <sup>b</sup>	126 ± 4 <sup>b</sup>
Liver weight/BW (%)	3.13 ± 0.10	10.0 ± 0.6 <sup>b</sup>	10.7 ± 0.8 <sup>b</sup>	10.2 ± 0.1 <sup>b</sup>
Epididymal fat pad weight/BW (%)	1.58 ± 0.15	0.86 ± 0.09 <sup>b</sup>	0.86 ± 0.08 <sup>b</sup>	0.85 ± 0.06 <sup>b</sup>
Spleen weight/BW (%)	0.15 ± 0.00	0.26 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.31 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.34 ± 0.02 <sup>b</sup>

Values are expressed as means ± SE. <sup>a</sup>*P* < 0.05 and <sup>b</sup>*P* < 0.01 vs. Control group. The NASH group fed the high fat diet with 2.5% cholesterol (HFC diet). BW, body weight; P-0.5; the HFC diet with 0.5% phycocyanin; P-1.5, the HFC diet with 1.5% phycocyanin

**Table 3-10 Serum and hepatic biochemical parameters in the Control, NASH, P-0.5 and P-1.5 groups**

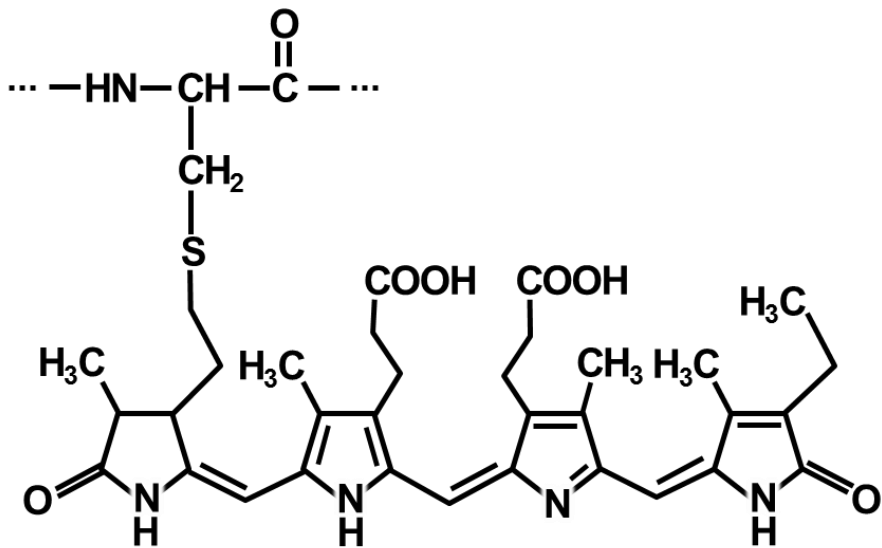
	<b>Control (n=5)</b>	<b>NASH (n=4)</b>	<b>P-0.5 (n=5)</b>	<b>P-1.5 (n=6)</b>
<b><i>Serum parameters</i></b>				
Triglyceride (mg/dL)	67.3 ± 13.2	59.7 ± 4.4	43.3 ± 6.4	50.1 ± 5.7
Total cholesterol (mg/dL)	57.8 ± 3.5	226.7 ± 12.1 <sup>b</sup>	229.5 ± 16.1 <sup>b</sup>	207.8 ± 21.6 <sup>b</sup>
Glucose (mg/dL)	199 ± 17	152 ± 2	174 ± 13	142 ± 6 <sup>a</sup>
Insulin (ng/mL)	5.26 ± 1.14	2.75 ± 0.56	2.80 ± 0.57	2.55 ± 0.24
AST (IU/L)	31.7 ± 5.6	127.4 ± 37.9 <sup>a</sup>	83.9 ± 24.2	48.6 ± 14.0
ALT (IU/L)	3.7 ± 0.9	52.1 ± 12.4 <sup>b</sup>	46.9 ± 11.6 <sup>b</sup>	25.1 ± 3.6
Leptin (ng/mL)	6.09 ± 1.22	2.05 ± 0.38 <sup>b</sup>	2.44 ± 0.24 <sup>b</sup>	2.17 ± 0.21 <sup>b</sup>
Adiponectin (µg/mL)	1.56 ± 0.25	1.39 ± 0.25	1.27 ± 0.26	0.85 ± 0.11
<b><i>Hepatic lipid contents</i></b>				
Triglyceride (mg/g tissue)	15.1 ± 2.7	65.5 ± 5.3 <sup>b</sup>	58.6 ± 4.1 <sup>b</sup>	70.9 ± 11.9 <sup>b</sup>
Total cholesterol (mg/g tissue)	1.84 ± 0.36	123.8 ± 6.9 <sup>b</sup>	117.9 ± 3.9 <sup>b</sup>	121.4 ± 5.2 <sup>b</sup>

Values are expressed as means ± SE. <sup>a</sup>*P* < 0.05 and <sup>b</sup>*P* < 0.01 vs. Control group. The NASH group fed the high fat diet with 2.5% cholesterol (HFC diet). AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; P-0.5; the HFC diet with 0.5% phycocyanin; P-1.5, the HFC diet with 1.5% phycocyanin

**Table 3-11 Histopathological assessment of hepatic steatosis, lobular inflammation, hepatocyte ballooning, NAS and fibrosis in the Control, NASH, P-0.5 and P-1.5 groups**

Group	Rat no.	Steatosis	Lobular inflammation	Hepatocyte ballooning	NAS*	Fibrosis
Control	1	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0
NASH	1	3	2	1	6	3
	2	3	3	1	7	4
	3	3	3	1	7	2
	4	3	3	1	7	3
P-0.5	1	3	2	1	6	3
	2	3	3	1	7	2
	3	3	3	1	7	4
	4	2	2	1	5	4
	5	2	2	1	5	4
P-1.5	1	2	2	1	5	4
	2	2	3	2	7	4
	3	2	3	1	6	4
	4	3	3	1	7	3
	5	2	2	1	5	3
	6	3	3	1	7	4

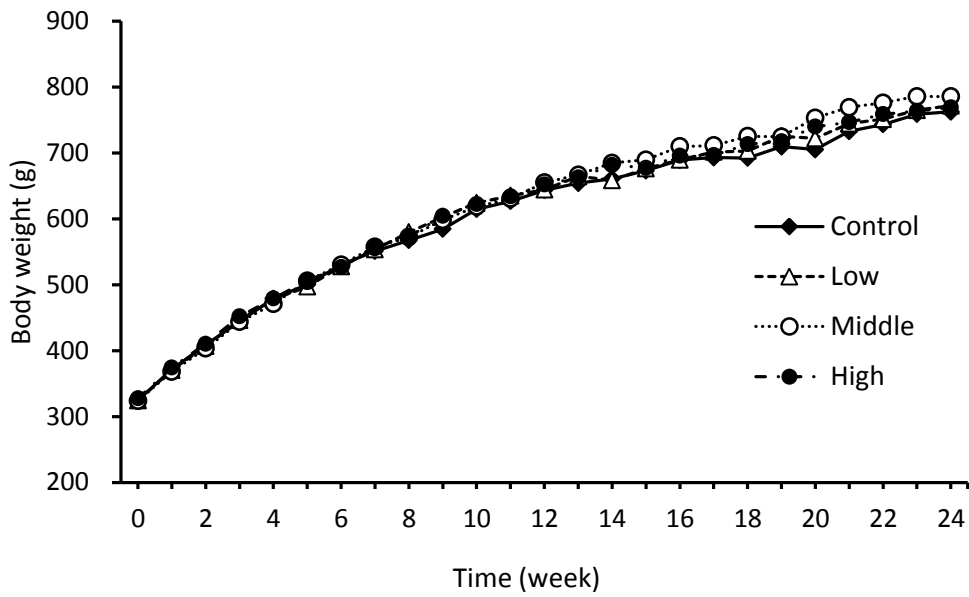
\*Non-alcoholic fatty liver disease activity score (NAS) is defined as unweighted sum of scores for steatosis, lobular inflammation and hepatocyte ballooning. Final scores range from 0 to 8. NAS scores  $\geq 5$  and  $\leq 2$  are considered diagnostic and not diagnostic, respectively, for steatohepatitis according to the NASH Clinical Research Network Scoring System<sup>80</sup>.



**Figure 1-1 Chemical structure of phycocyanobilin in phycocyanin**

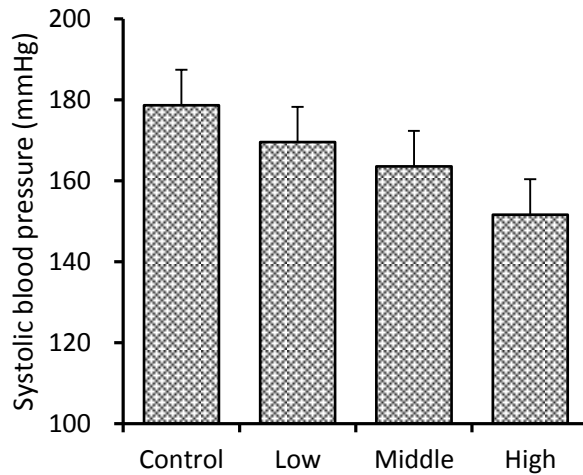
Phycocyanin contains phycocyanobilin, an open-chain tetrapyrrole chromophore that is covalently attached to apoprotein by thioether bonds to cysteine residues.





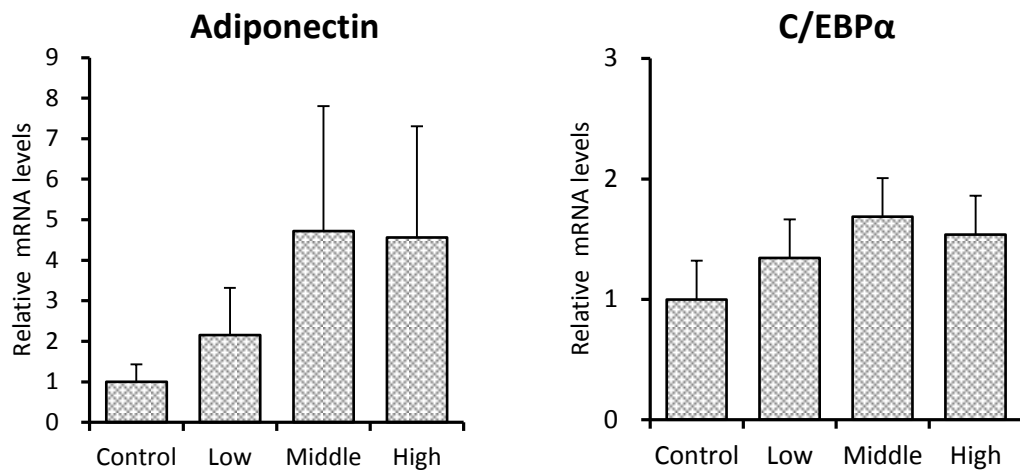
**Figure 2-1 Growth curves of SHR/NDmcr-cp rats in the Control, Low, Middle and High group**

SHR/NDmcr-cp rats were fed the normal diet with or without phycocyanin (2,500, 5,000 or 10,000 mg/kg diet) for 24 weeks.



**Figure 2-2 Systolic blood pressure in SHR/NDmcr-cp rats at 34 weeks of age**

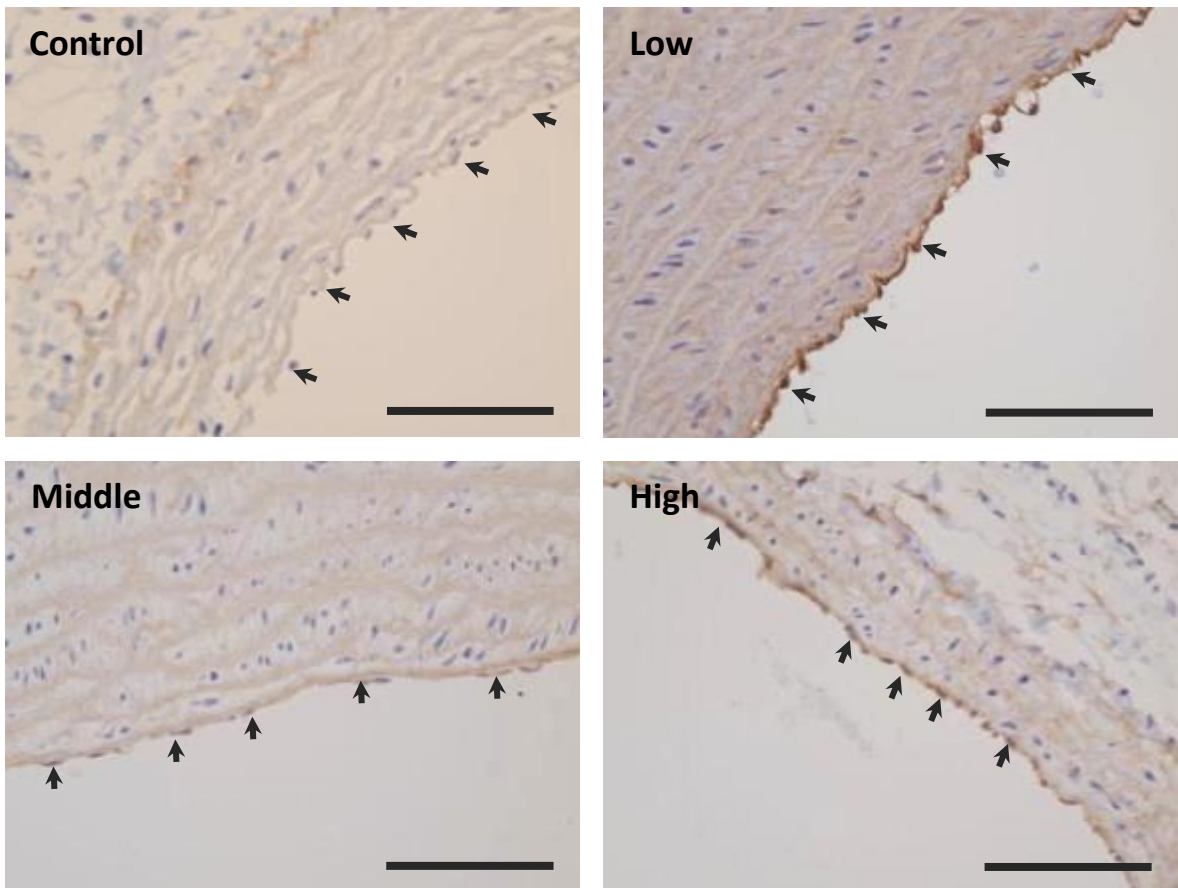
Values are expressed as means  $\pm$  SE. n=6-7/group. Phycocyanin-fed groups (Low, Middle, and High groups) exhibited a dose-dependent decrease in systolic blood pressure but these differences were not statistically significant, at  $P = 0.215$  by ANOVA.



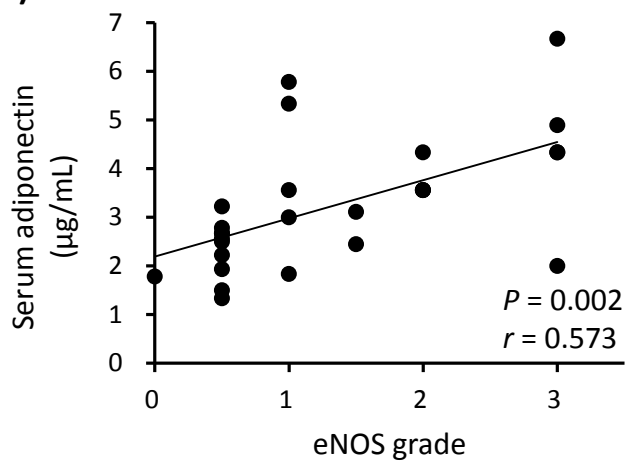
**Figure 2-3 Relative adipose mRNA levels of adiponectin and C/EBPα measured by real-time PCR in the Control, Low, Middle and High groups at 34 weeks of age**

The mRNA levels, measured relative to 18S rRNA levels used as an internal control, were determined using the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method and expressed as a fold of levels in the control group. Values are expressed as means  $\pm$  SE.  $n=6-7$ /group. The mRNA levels of adiponectin and C/EBPα were high in the phycocyanin-fed groups compared to the Control group, but the differences were not statistically significant, at  $P = 0.138$  and  $P = 0.330$ , respectively, by ANOVA. C/EBPα, CCAAT/enhancer binding protein α

(a)



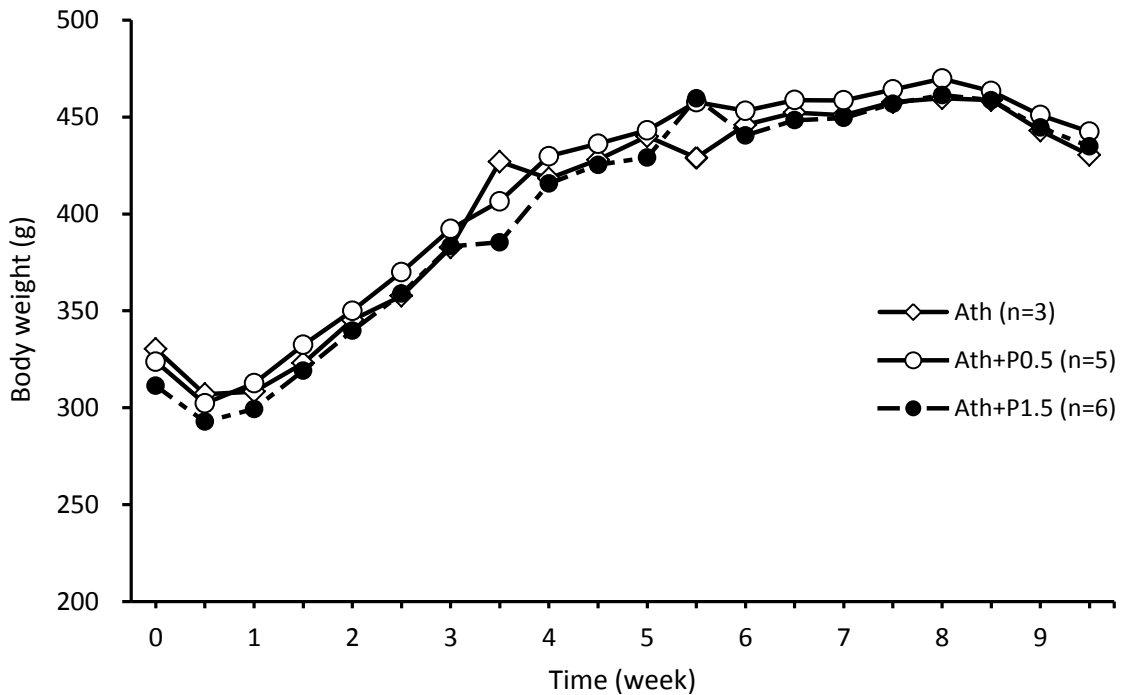
(b)



**Figure 2-4 Representative immunohistochemistry for eNOS in the aorta of SHR/NDmcr-cp rat, and correlation between eNOS expression levels and serum adiponectin levels**

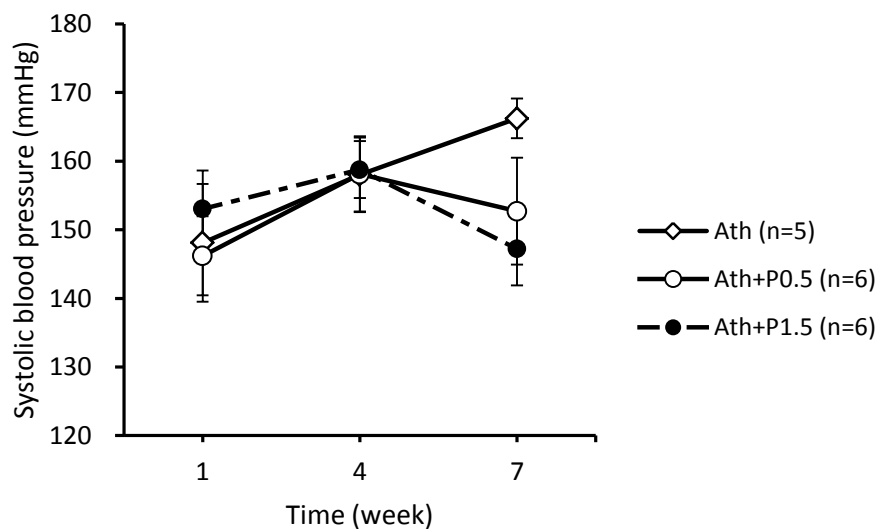
(a) Representative immunohistochemistry for eNOS in the aorta of the SHR/NDmcr-cp rats at 34 weeks of age. Arrows indicate vascular endothelium (original magnification, 400 × ; scale bars = 100 µm).

(b) Correlation between eNOS expression levels and serum adiponectin levels. eNOS expression levels were positively correlated with serum adiponectin levels by Pearson's correlation coefficient. eNOS, endothelial nitric oxide synthase



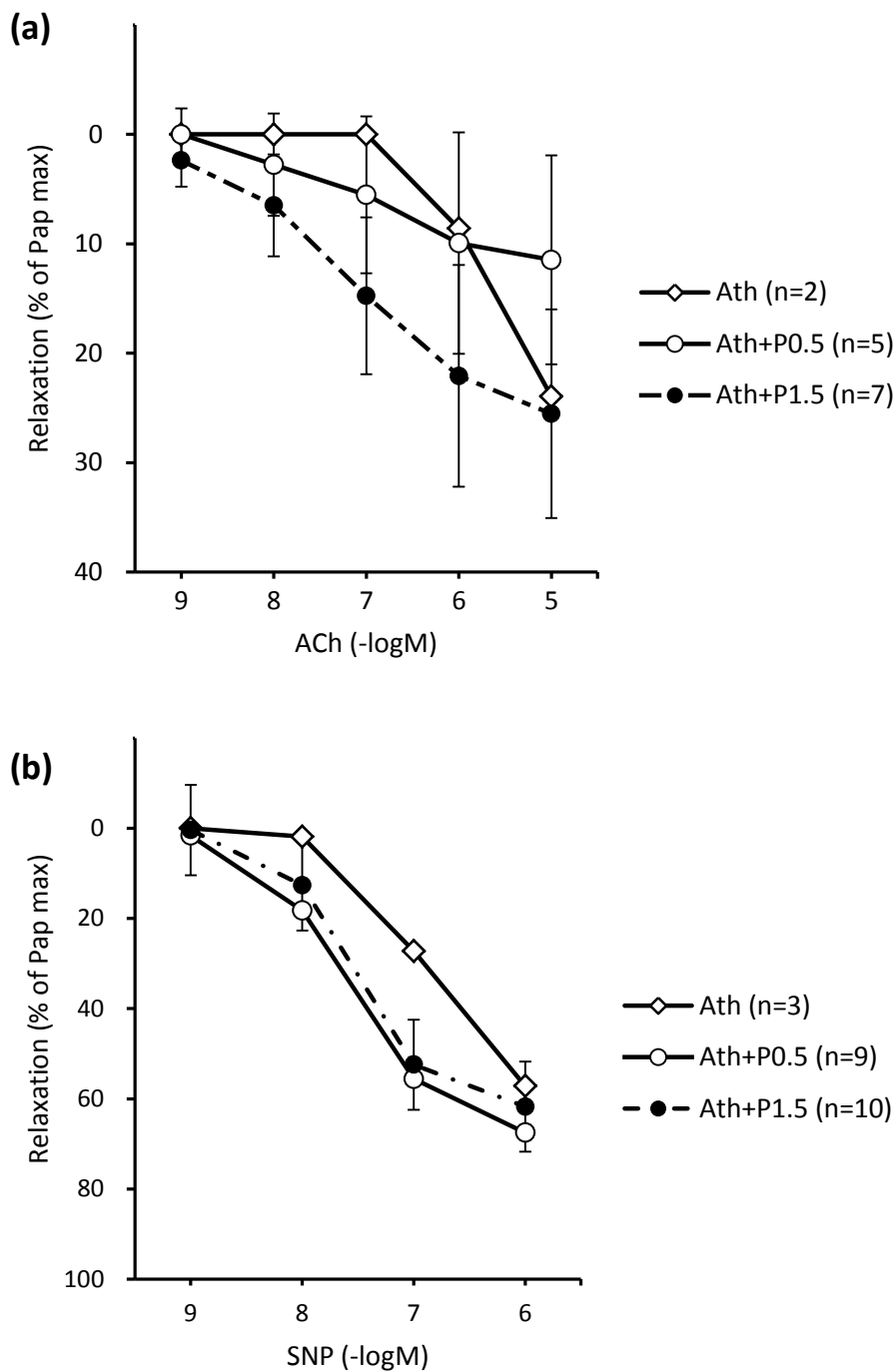
**Figure 2-5 Growth curves of SHRSF/ZF rats fed the Ath, Ath+P0.5 or Ath+P1.5 diet for 9 weeks**

SHRSF/ZF rats were fed the atherogenic (Ath) diet with or without phycocyanin (5,000 or 15,000 mg/kg diet) for 9 weeks.

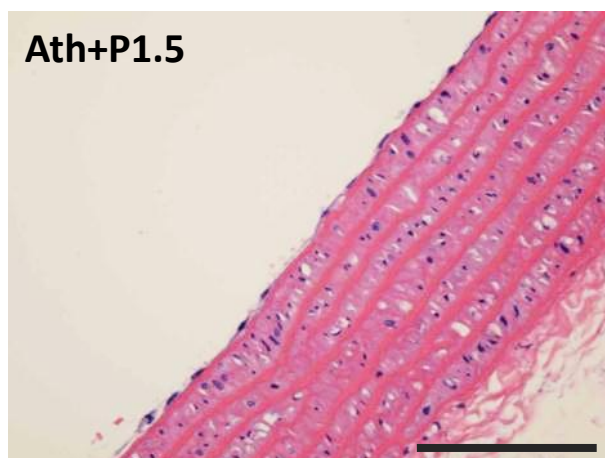
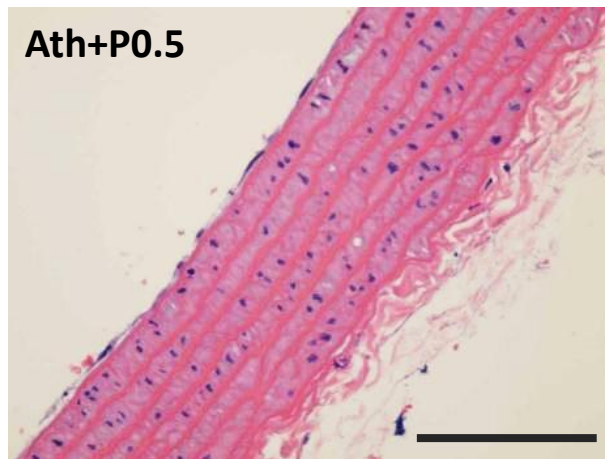
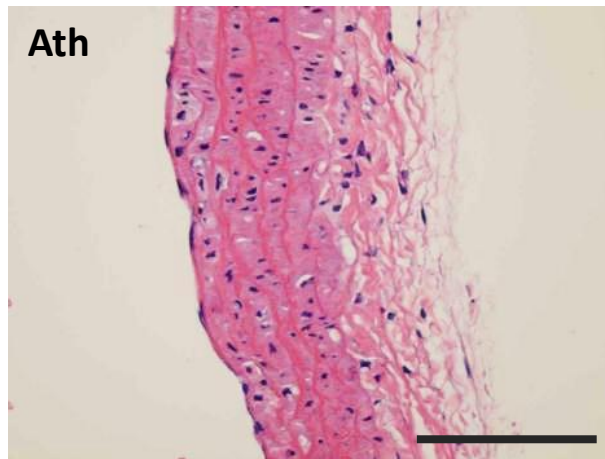


**Figure 2-6 Systolic blood pressure in SHRSF/ZF rat fed the Ath, Ath+P0.5 or Ath+P1.5 diet**

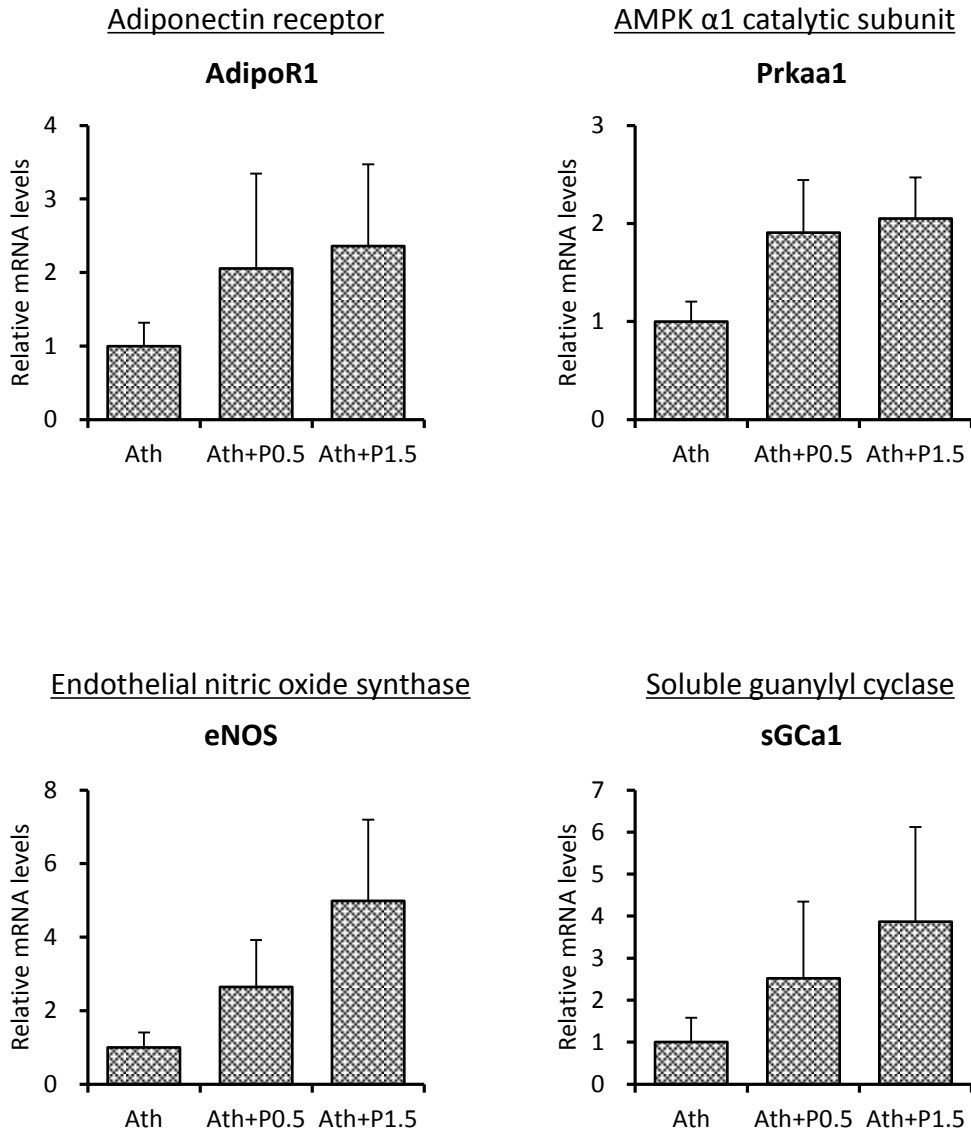
Each point represents means  $\pm$  SE. There was no significant difference among groups. Ath, atherogenic diet; Ath+P0.5, the Ath diet with 0.5% phycocyanin; Ath+P1.5, the Ath diet with 1.5% phycocyanin



**Figure 2-7 Concentration-response curves for ACh- (a) and SNP- (b) induced relaxation of thoracic aortas from SHRSP/ZF rats fed the Ath, Ath+P0.5 or Ath+P1.5 diet for 9 weeks** Each point represents means  $\pm$  SE of 2-10 preparations (3-6 animals). Relaxation induced by papaverine (Pap) was taken as 100%. There was no significant difference among groups. ACh, acetylcholine chloride; Ath, atherogenic diet; Ath+P0.5, the Ath diet with 0.5% phycocyanin; Ath+P1.5, the Ath diet with 1.5% phycocyanin; SNP, sodium nitroprusside

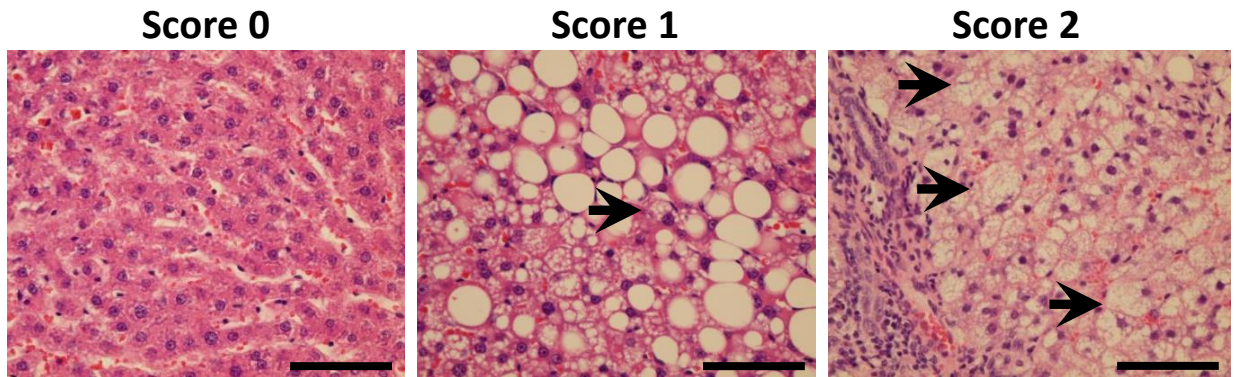


**Figure 2-8 Representative histopathological findings of thoracic aorta from SHRSP/ZF rats fed the Ath, Ath+P0.5 or Ath+P1.5 diet for 9 weeks** Atherosclerotic lesion was not observed in all groups (HE stain; original magnification, 200 × ; scale bars = 200 μm). Ath, atherogenic diet; Ath+P0.5, the Ath diet with 0.5% phycocyanin; Ath+P1.5, the Ath diet with 1.5% phycocyanin



**Figure 2-9 Quantitative real-time PCR for representative genes involved in vasodilating response in the aorta of SHRSP/ZF rats**

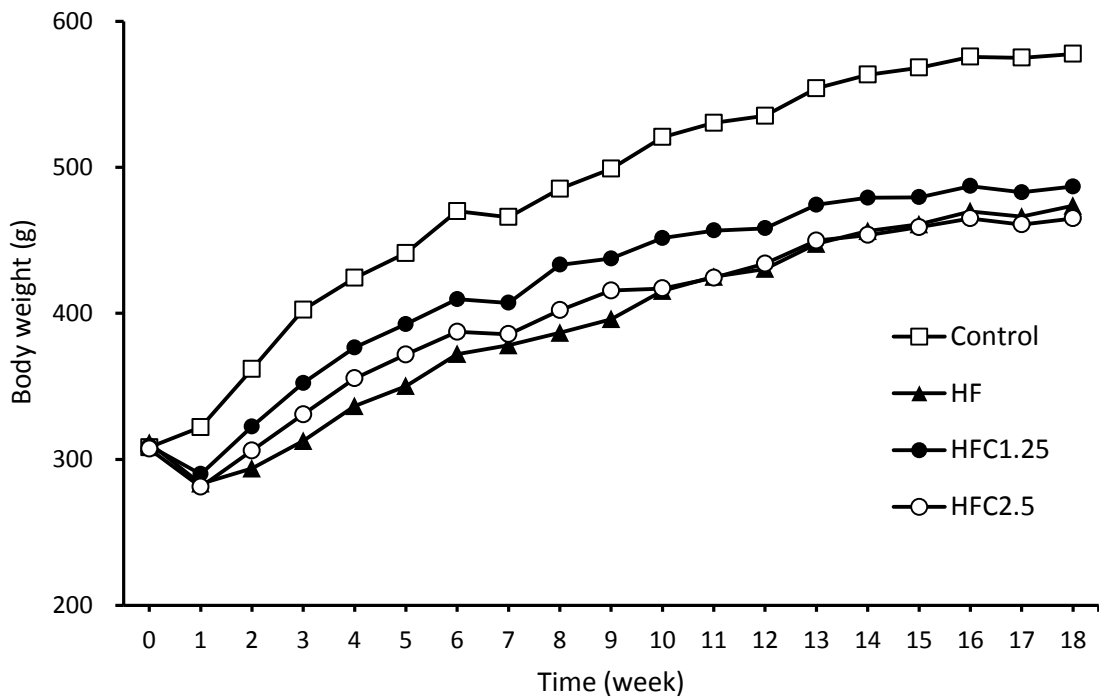
The mRNA levels, measured relative to GAPDH mRNA levels used as an internal control, were determined using the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method and expressed as a fold of levels in the Ath group. Values are expressed as means  $\pm$  SE. n=3-6/group. There was no significant difference among groups. AMPK, adenosine monophosphate-activated protein kinase; Ath, atherogenic diet; Ath+P0.5, the Ath diet with 0.5% phycocyanin; Ath+P1.5, the Ath diet with 1.5% phycocyanin; eNOS, endothelial nitric oxide synthase



**Figure 3-1 Representative liver histology shows criteria for ballooning hepatocytes according to NASH Clinical Research Network Scoring System**

Scores of 0, 1 and 2 indicate no ballooning, a few and many ballooning cells/prominent ballooning, respectively<sup>80</sup>. Arrows indicate ballooning hepatocytes (HE stain; original magnification, 400 × ; scale bars = 100 μm).

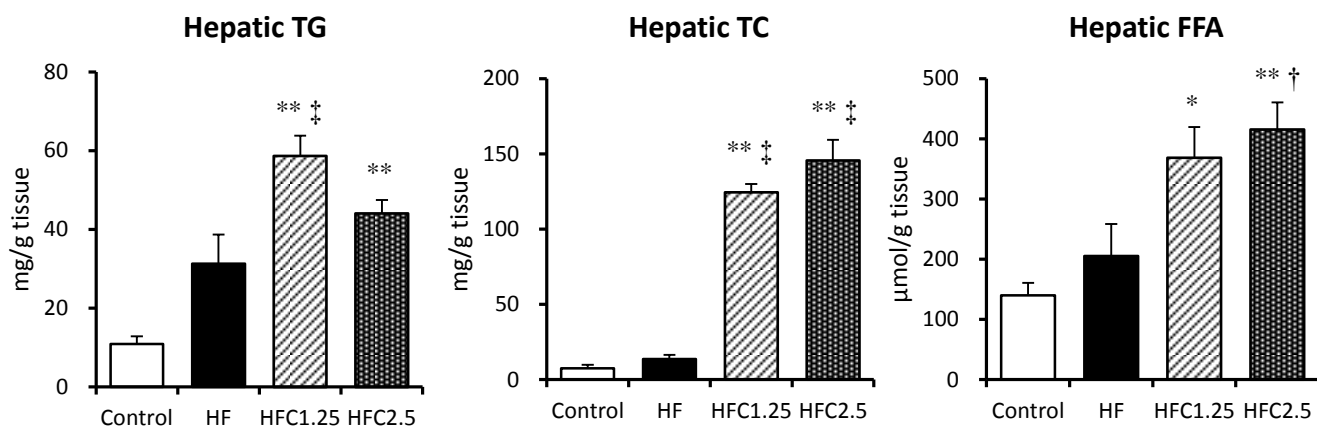




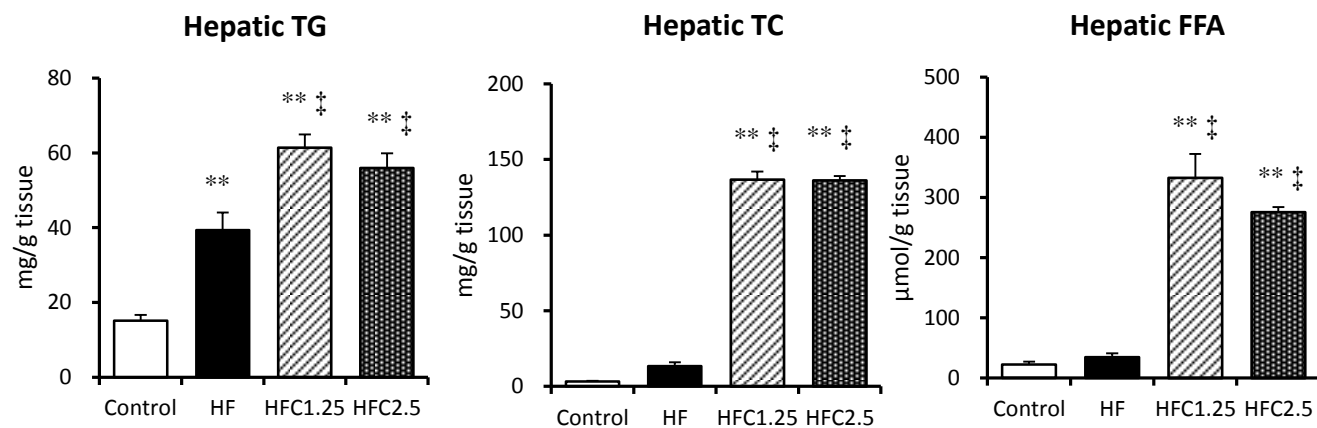
**Figure 3-2 Growth curves of SD rats fed the control, HF, HFC1.25 or HFC2.5 diet for 18 weeks**

SD rats were fed the control, HF, HFC1.25 or HFC2.5 diet from 9 to 18 or 27 weeks of age. HF, high fat diet without cholesterol; HFC1.25, the HF diet with 1.25% cholesterol; HFC2.5, the HF diet with 2.5% cholesterol

**At 18 weeks of age**



**At 27 weeks of age**



**Figure 3-3 Hepatic TG,TC and FFA levels in SD rats at 18 and 27 weeks of age**

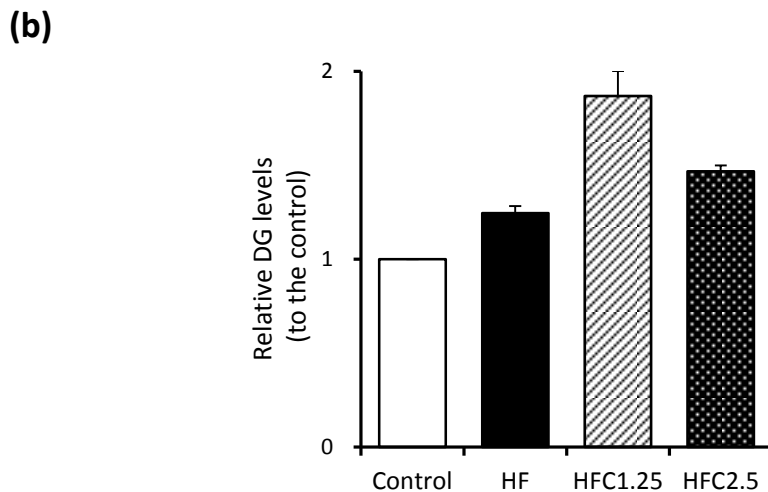
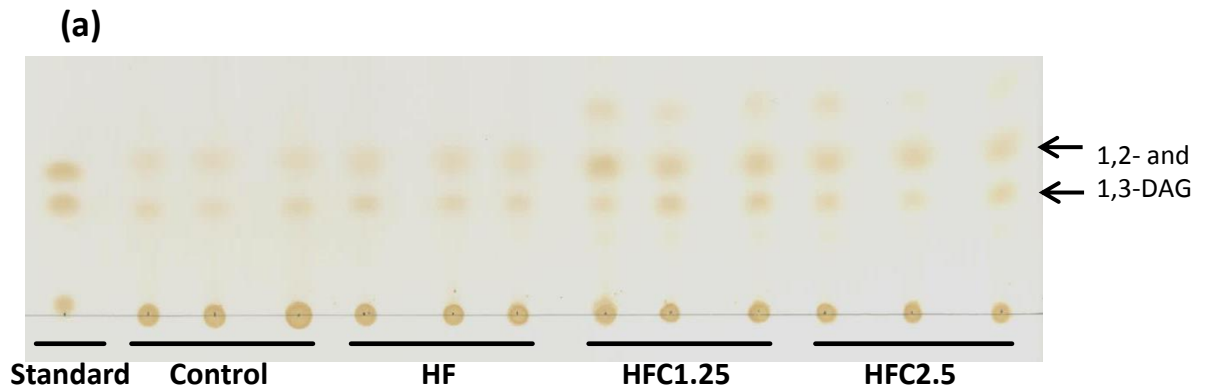
SD rats were fed the control, HF, HFC1.25 or HFC2.5 diet from 9 to 18 or 27 weeks of age.

Values are expressed as means  $\pm$  SE. n = 5-6/group. \* $P$  < 0.05 and \*\* $P$  < 0.01 vs. Control group;

† $P$  < 0.05 and ‡ $P$  < 0.01 vs. HF group. FFA, free fatty acid, HF, high fat diet without cholesterol;

HFC1.25, the HF diet with 1.25% cholesterol; HFC2.5, the HF diet with 2.5% cholesterol; TC, total

cholesterol; TG, triglyceride



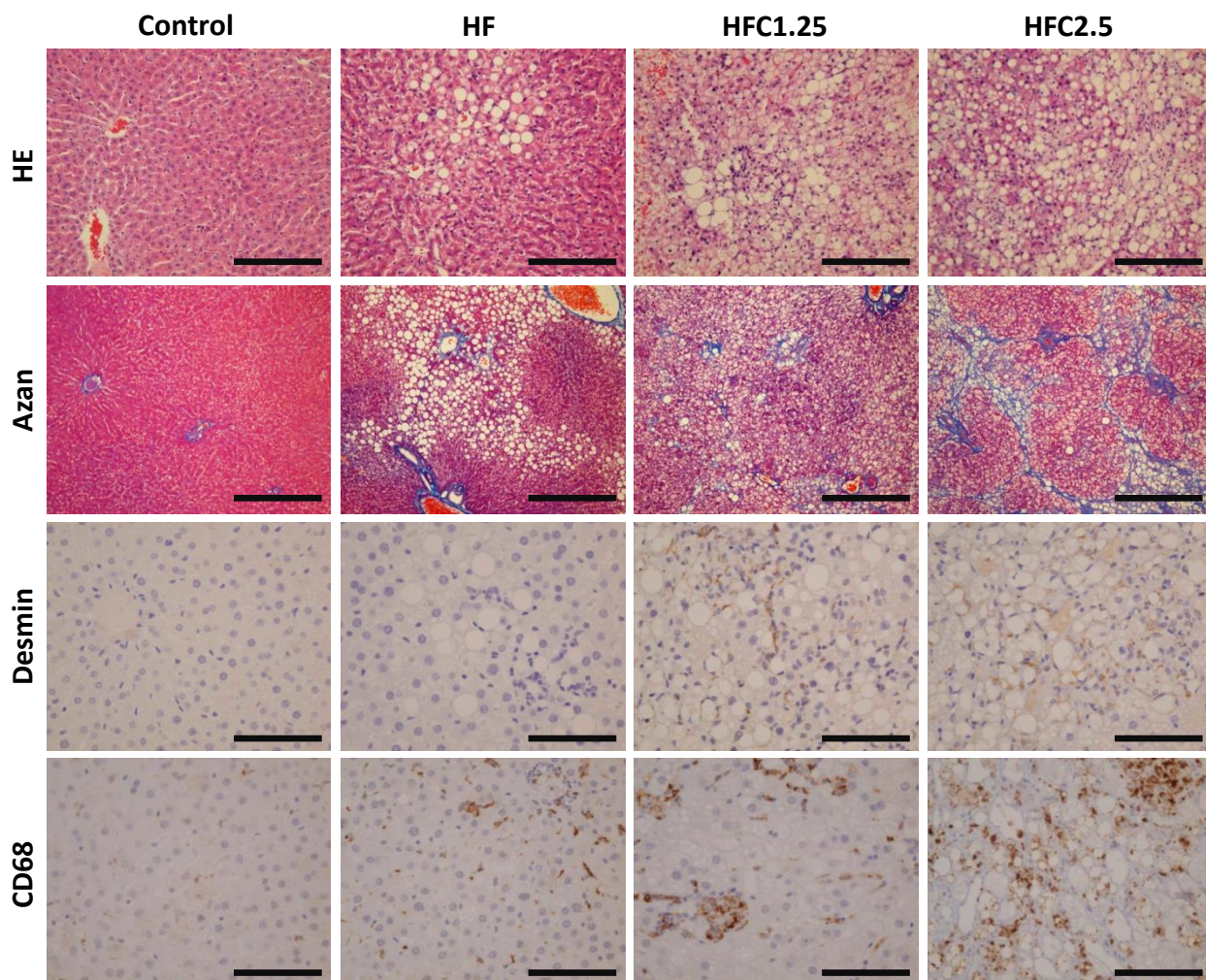
**Figure 3-4 TLC analysis of the hepatic DG in SD rats at 27 weeks of age**

(a) Representative TLC of total lipid extract from the liver of SD rats fed the control, HF, HFC1.25 or HFC2.5 diet for 18 weeks. The spots are different three samples in each group. Standard contains 25% (wt/wt) each monoolein, 1,2-diolein, 1,3-diolein, and triolein.

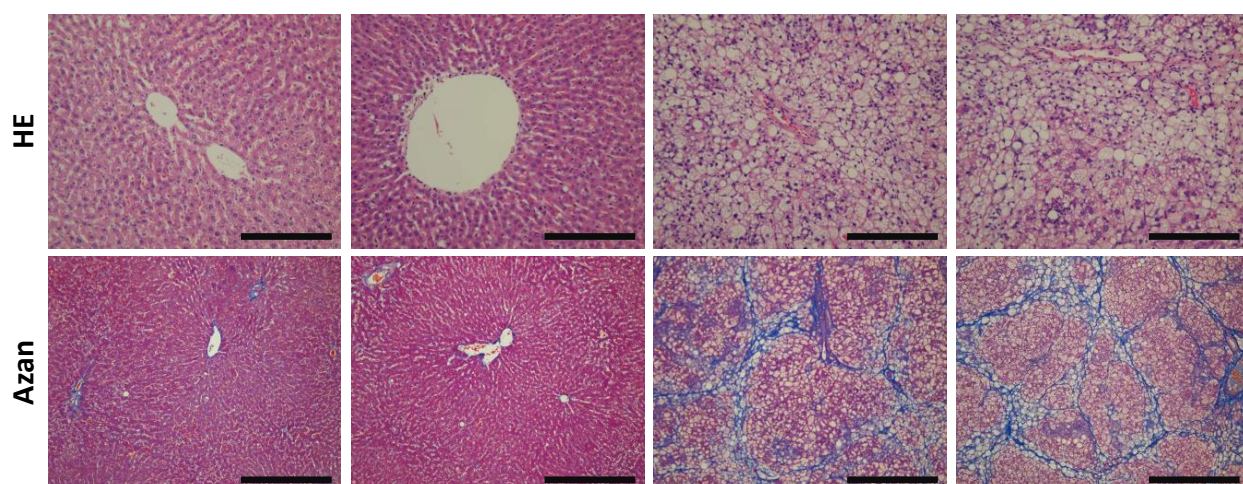
(b) Quantification of TLC with ImageJ. Results represent the means  $\pm$  SE from at least three independent TLC plates with  $n = 3$  in each group.

DG, diglyceride; HF, high fat diet without cholesterol; HFC1.25, the HF diet with 1.25% cholesterol; HFC2.5, the HF diet with 2.5% cholesterol; TLC, thin layer chromatography

**At 18 weeks of age**

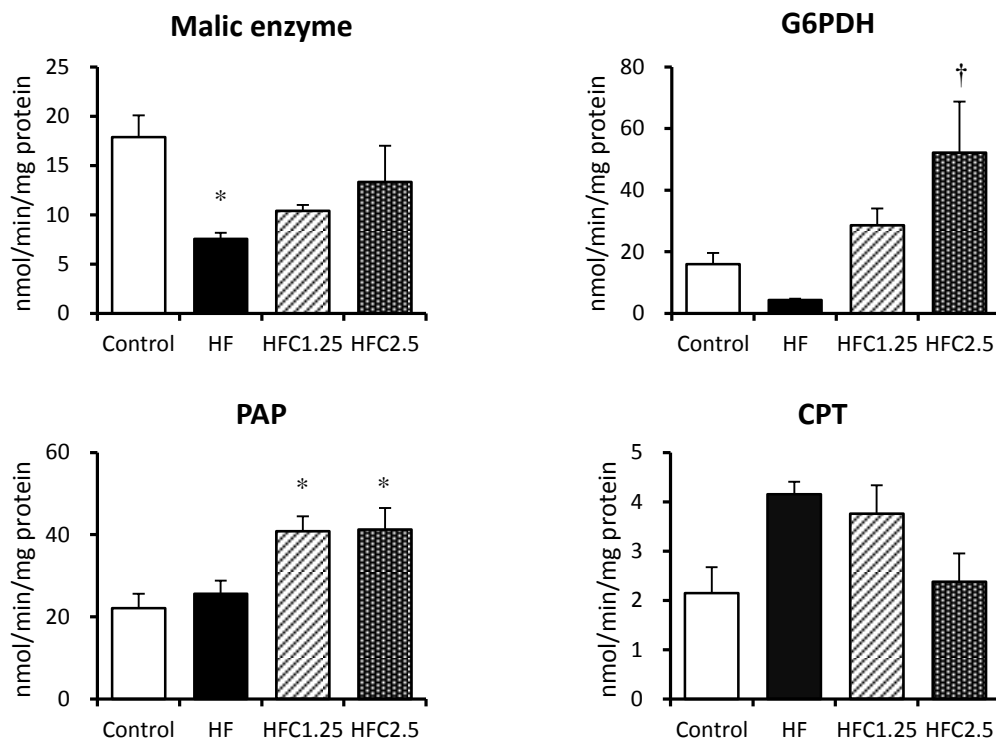


**At 27 weeks of age**

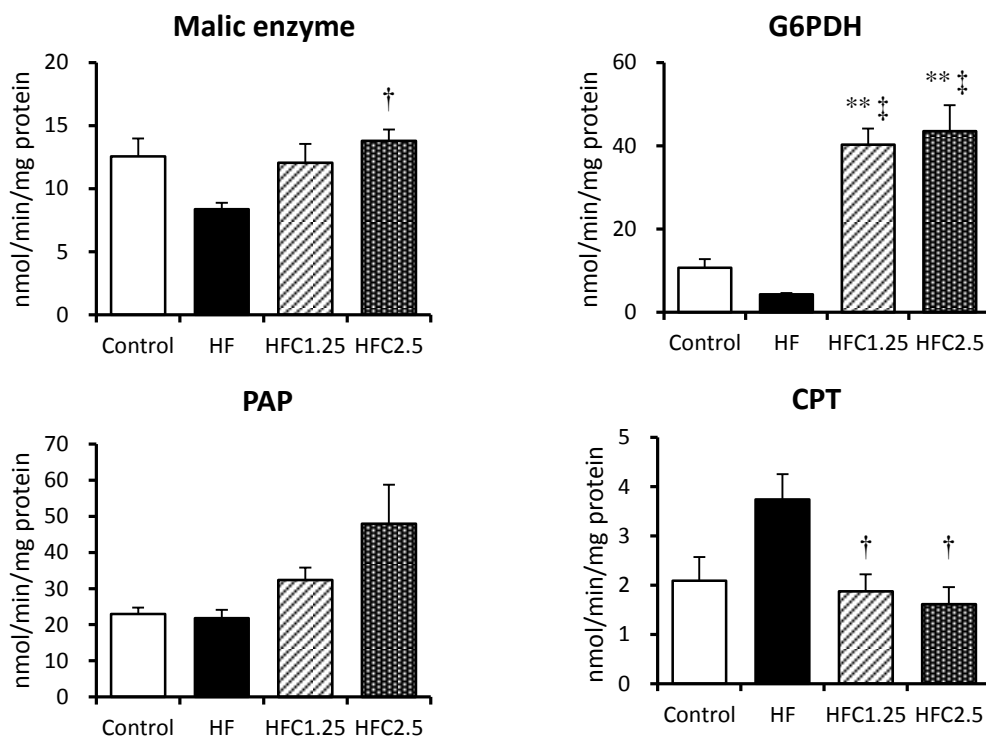


**Figure 3-5 Representative liver histopathology in SD rats at 18 and 27 weeks of age**  
SD rats were fed the control, HF, HFC1.25 or HFC2.5 diet from 9 to 18 or 27 weeks of age. HE-stained section; original magnification, 200 × ; scale bars = 200 μm. Azan-stained section; original magnification, 100 × ; scale bars = 400 μm. Immunohistochemical detection of desmin and CD68; original magnification, 400 × ; scale bars = 100 μm. HF, high fat diet without cholesterol; HFC1.25, the HF diet with 1.25% cholesterol; HFC2.5, the HF diet with 2.5% cholesterol

**At 18 weeks of age**



**At 27 weeks of age**

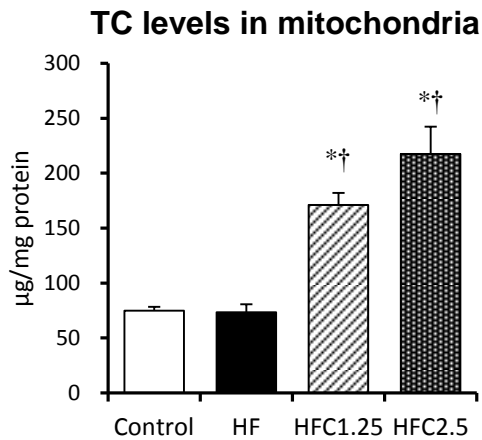


**Figure 3-6 Enzyme activities involved in hepatic lipid metabolism in SD rats at 18 and 27 weeks of age**

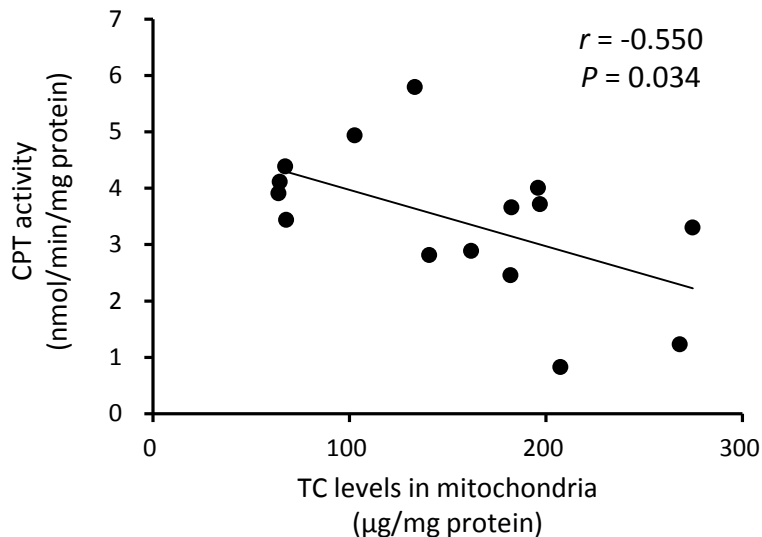
SD rats were fed the control, HF, HFC1.25 or HFC2.5 diet from 9 to 18 or 27 weeks of age. Values are expressed as means  $\pm$  SE.  $n = 5-6/\text{group}$ . \* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$  vs. Control group; † $P < 0.05$  and ‡ $P < 0.01$  vs. HF group. CPT, carnitine palmitoyltransferase; G6PDH, glucose-6-phosphate dehydrogenase; HF, high fat diet without cholesterol; HFC1.25, the HF diet with 1.25% cholesterol; HFC2.5, the HF diet with 2.5% cholesterol; PAP, phosphatidate phosphohydrolase

**At 18 weeks of age**

**(a)**



**(b)**

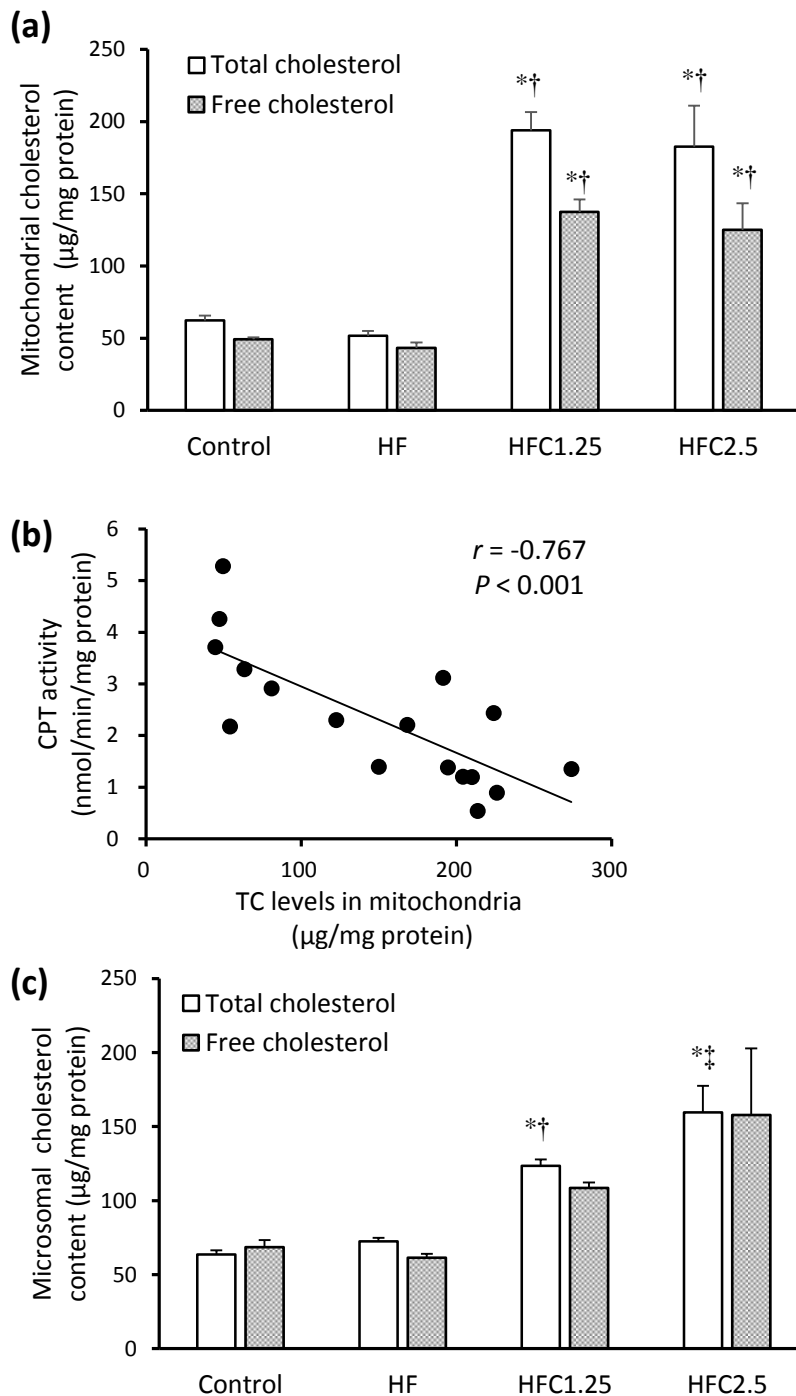


**Figure 3-7 Cholesterol content in hepatic mitochondrial fraction, and correlation between mitochondrial cholesterol levels and CPT activity in mitochondria in SD rats at 18 weeks of age**

(a) Total cholesterol (TC) content in hepatic mitochondria in SD rats fed the control, HF, HFC1.25 or HFC2.5 diet for 9 weeks. Values are expressed as means  $\pm$  SE.  $n = 5/\text{group}$ .  $*P < 0.01$  vs. Control group;  $\dagger P < 0.01$  vs. HF group.

(b) Correlation between mitochondrial cholesterol levels and CPT activity in the HF, HFC1.25 and HFC2.5 groups. CPT activity was negatively correlated with TC levels in mitochondria by Pearson's correlation coefficient. CPT, carnitine palmitoyltransferase; HF, high fat diet without cholesterol; HFC1.25, the HF diet with 1.25% cholesterol; HFC2.5, the HF diet with 2.5% cholesterol

**At 27 weeks of age**



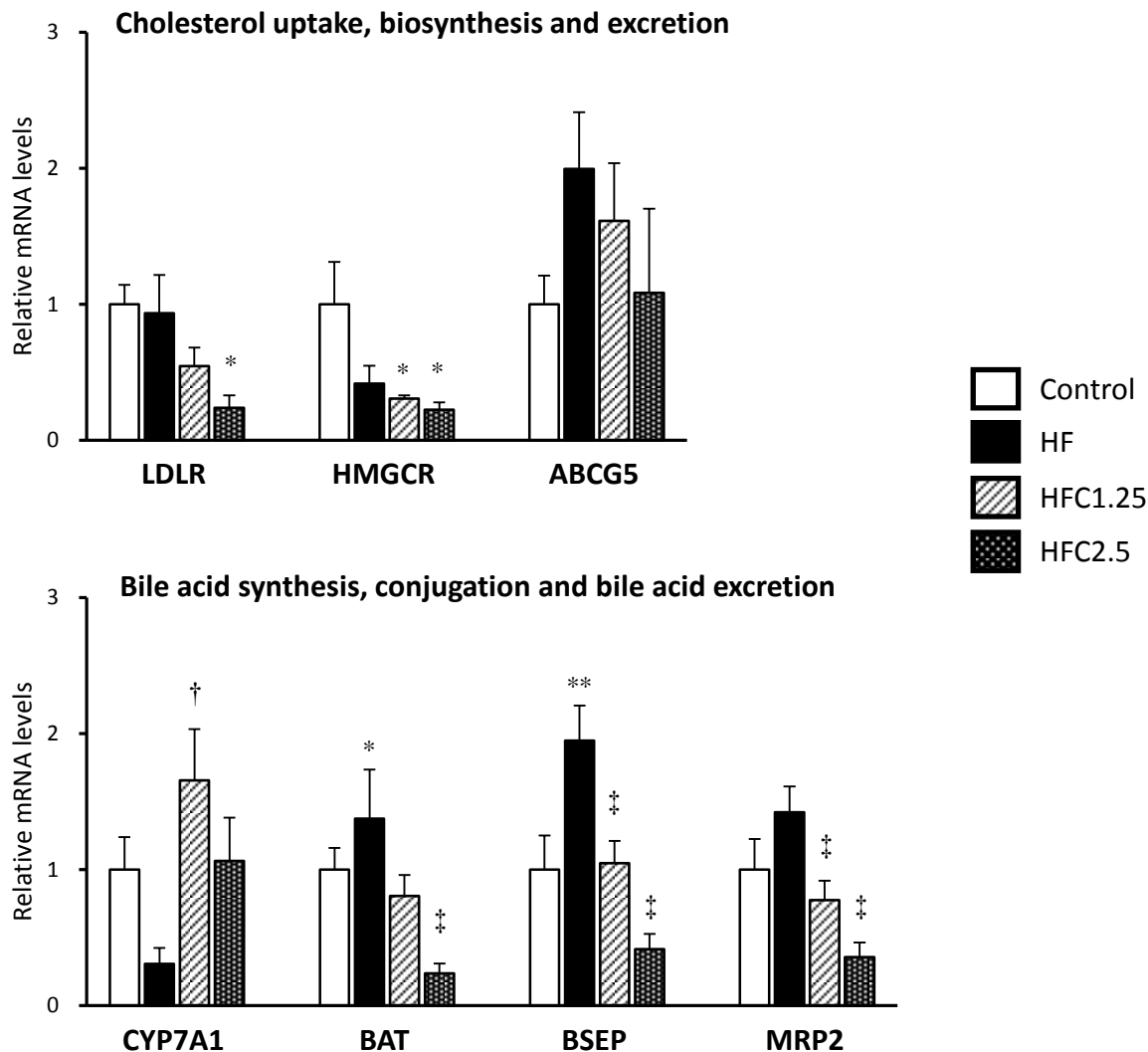
**Figure 3-8 Cholesterol content in hepatic mitochondrial and microsomal fractions in SD rats at 27 weeks of age**

(a) Total cholesterol (TC) and free cholesterol (FC) content in hepatic mitochondria in SD rats fed the control, HF, HFC1.25 or HFC2.5 diet for 18 weeks. Values are expressed as means  $\pm$  SE.  $n = 5-6/\text{group}$ . \* $P < 0.01$  vs. control; † $P < 0.01$  vs. HF.

(b) Correlation between mitochondrial cholesterol levels and CPT activity in the HF, HFC1.25 and HFC2.5 groups. CPT activity was negatively correlated with TC levels in mitochondria by Pearson's correlation coefficient.

(c) TC and FC content in hepatic microsome in SD rats fed the control, HF, HFC1.25 or HFC2.5 diet for 18 weeks. Values are expressed as means  $\pm$  SE.  $n = 5-6/\text{group}$ . \* $P < 0.01$  vs. Control group; † $P < 0.05$ , ‡ $P < 0.01$  vs. HF group. CPT, carnitine palmitoyltransferase; HF, high fat diet without cholesterol; HFC1.25, the HF diet with 1.25% cholesterol; HFC2.5, the HF diet with 2.5% cholesterol

### At 18 weeks of age



**Figure 3-9 Quantitative real-time PCR for representative genes involved in lipid and bile acid metabolism, and fibrogenesis in the liver of SD rats at 18 weeks of age**

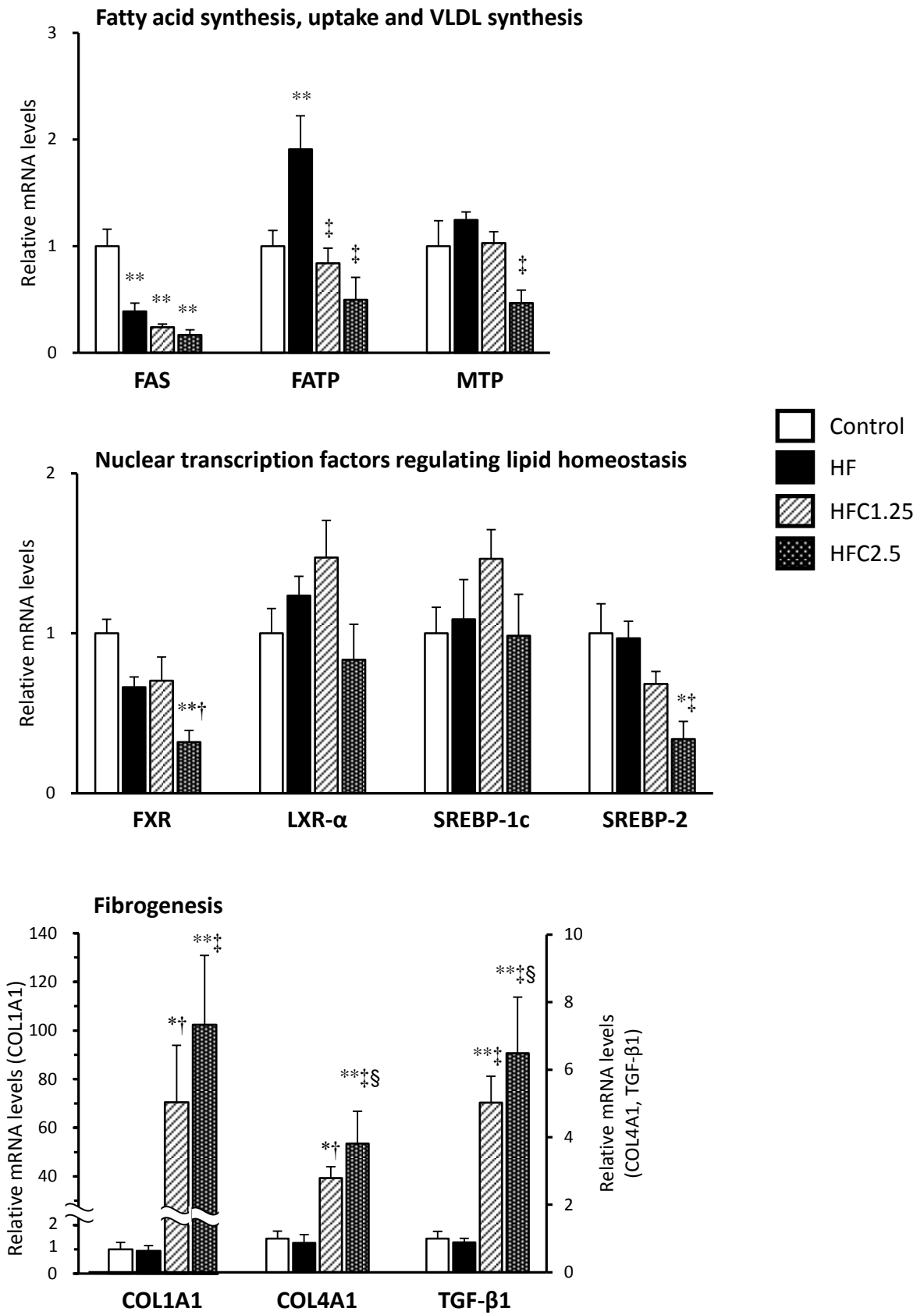
SD rats were fed the control, HF, HFC1.25 or HFC2.5 diet from 9 to 18 weeks of age.

Levels of mRNA were determined relative to those of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) as internal control using  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method and are expressed as fold control levels. Values are expressed as means  $\pm$  SE; n = 5/group. \*P < 0.05 and \*\*P < 0.01 vs. Control group; †P < 0.05 and ‡P < 0.01 vs. HF group; §P < 0.05 vs. HFC1.25 group. Only P values < 0.05 are shown.

ABCG5, adenosine triphosphate-binding cassette transporter G5; BAT, bile acid CoA: amino acid N-acyltransferase; BSEP, bile salt export pump; COL1A1, procollagen type I  $\alpha$  1; COL4A1, procollagen type IV  $\alpha$  1; CYP7A1, cytochrome P450 7A1; FAS, fatty acid synthase; FATP5, fatty acid transport protein 5; FXR, farnesoid X receptor; HF, high fat diet without cholesterol; HFC1.25, the HF diet with 1.25% cholesterol; HFC2.5, the HF diet with 2.5% cholesterol; HMGCR, 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase; LDLR, low-density lipoprotein receptor; LXR- $\alpha$ , liver X receptor  $\alpha$ ; MRP2, multidrug resistance-associated protein 2; MTP, microsomal triglyceride transfer protein; SREBP, sterol regulatory element-binding protein; TGF- $\beta$ 1, transforming growth factor  $\beta$ 1; VLDL, very low-density lipoprotein

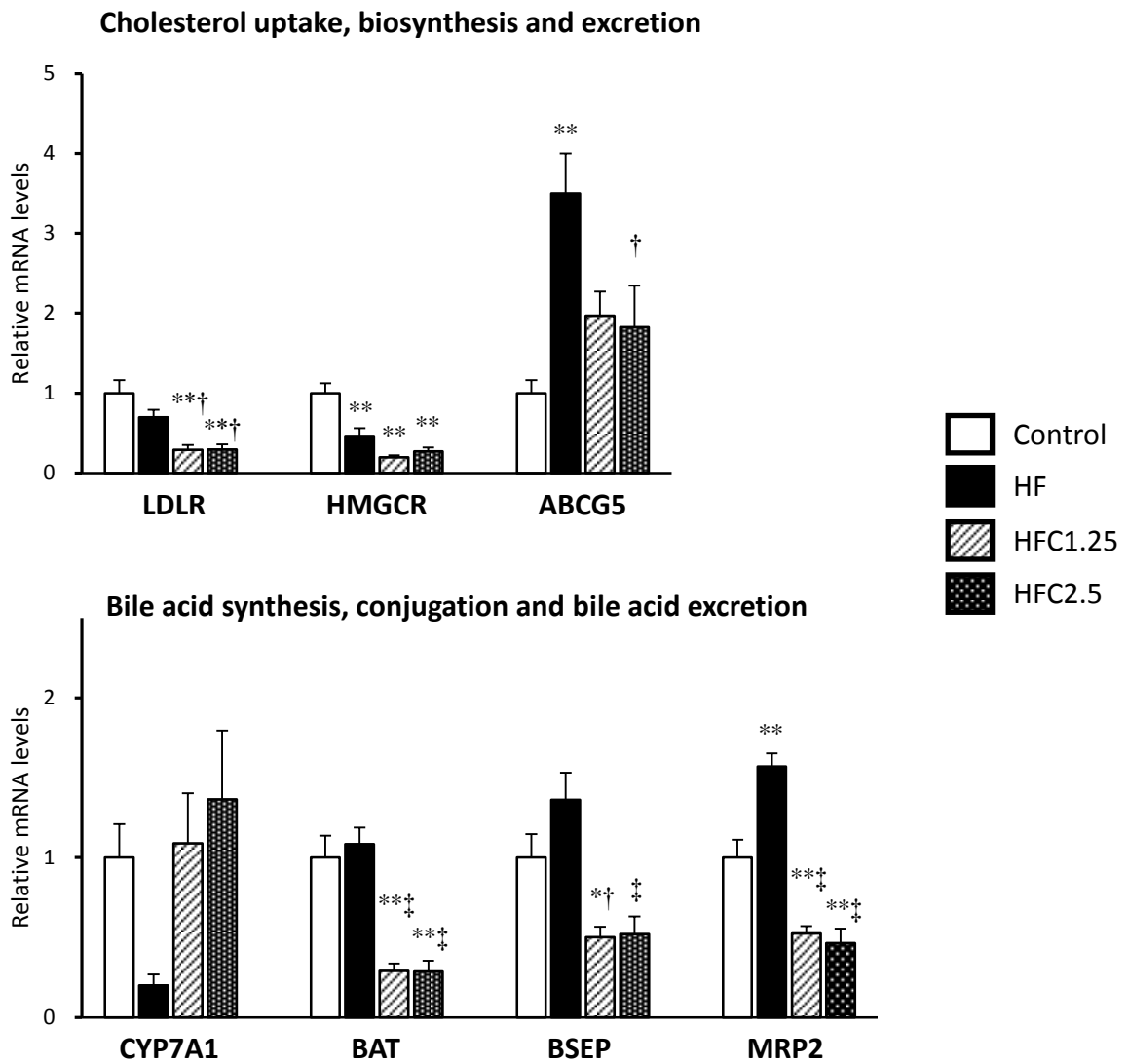


**At 18 weeks of age**



**Figure 3-9 (continued)**

## At 27 weeks of age

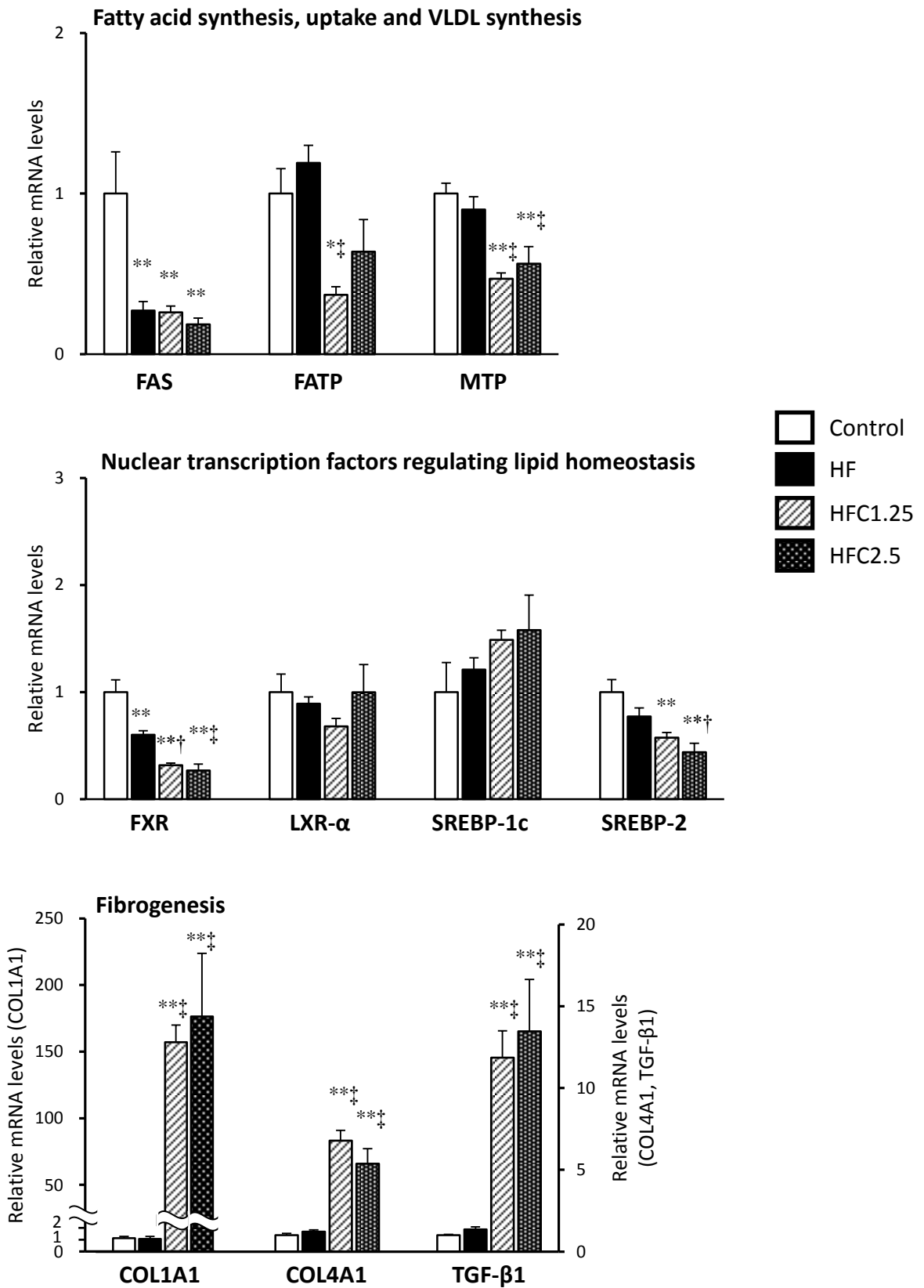


**Figure 3-10 Quantitative real-time PCR for representative genes involved in lipid and bile acid metabolism, and fibrogenesis in the liver of SD rats at 27 weeks of age**

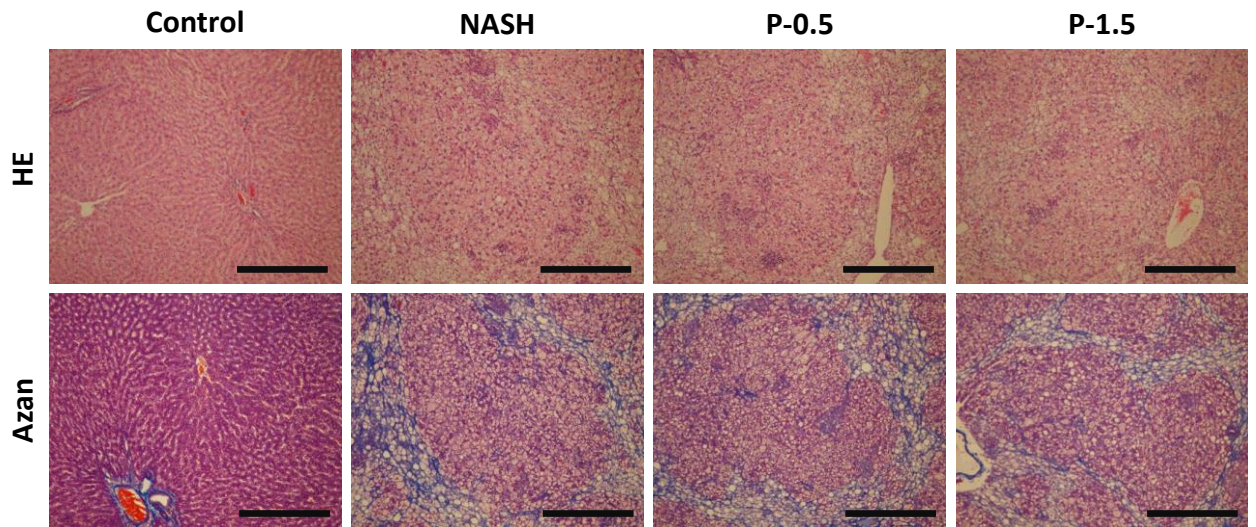
SD rats were fed the control, HF, HFC1.25 or HFC2.5 diet from 9 to 27 weeks of age.

Levels of mRNA were determined relative to those of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) as internal control using  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method and are expressed as fold control levels. Values are expressed as means  $\pm$  SE; n = 5-6/group. \* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$  vs. Control group; † $P < 0.05$  and ‡ $P < 0.01$  vs. HF group. ABCG5, adenosine triphosphate-binding cassette transporter G5; BAT, bile acid CoA: amino acid N-acyltransferase; BSEP, bile salt export pump; COL1A1, procollagen type I  $\alpha$  1; COL4A1, procollagen type IV  $\alpha$  1; CYP7A1, cytochrome P450 7A1; FAS, fatty acid synthase; FATP5, fatty acid transport protein 5; FXR, farnesoid X receptor; HF, high fat diet without cholesterol; HFC1.25, the HF diet with 1.25% cholesterol; HFC2.5, the HF diet with 2.5% cholesterol; HMGCR, 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase; LDLR, low-density lipoprotein receptor; LXR- $\alpha$ , liver X receptor  $\alpha$ ; MRP2, multidrug resistance-associated protein 2; MTP, microsomal triglyceride transfer protein; SREBP, sterol regulatory element-binding protein; TGF- $\beta$ 1, transforming growth factor  $\beta$ 1; VLDL, very low-density lipoprotein

**At 27 weeks of age**



**Figure 3-10 (continued)**



**Figure 3-11 Representative liver histopathology in the Control, NASH, P-0.5 and P-1.5 groups**  
 The Control, NASH, P-0.5 and P-1.5 groups fed the normal, high fat diet with 2.5% cholesterol (HFC diet) and the HFC diet with 0.5% or 1.5% phycocyanin for 9 weeks, respectively. HE- and Azan-stained sections; original magnification, 100 × ; scale bars = 400 μm.