

# 非アルコール性脂肪肝炎発症モデルラットの肝組織所見に 及ぼす食餌性コレステロールの影響

大曲 勝久<sup>1)</sup>・服部 美紀<sup>1)</sup>・後藤 紫方<sup>1)</sup>・坂元 藍<sup>1)</sup>・  
鳥居 春菜<sup>1)</sup>・市村真祐子<sup>2)</sup>・田辺 賢一<sup>1)</sup>

## Dietary Cholesterol Affecting Liver Histology in Rat Model for Nonalcoholic Steatohepatitis

Katsuhisa OMAGARI<sup>1)</sup>, Miki HATTORI<sup>1)</sup>, Shiho GOTO<sup>1)</sup>, Ai SAKAMOTO<sup>1)</sup>,  
Haruna TORII<sup>1)</sup>, Mayuko ICHIMURA<sup>2)</sup> and Kenichi TANABE<sup>1)</sup>

### 要 旨

2007年度から2014年度に長崎県立大学栄養健康学科臨床栄養学研究室で行ったラットを用いた飼育実験において、どの飼育条件が非アルコール性脂肪肝炎（NASH）の病理組織学的所見に関連しているかを検討した。対象ラット129匹において、SHR/NDmcr-cpラットはSDラットに比べて、また、コレステロールおよびコラーゲンを添加した餌および脂質の由来がパーム油あるいはsoybeans oilである餌を与えた場合に、NASHが進行していた。さらに、飼育開始週齢が若いほど、餌の組成のうちタンパク質や炭水化物の割合が低いほど、脂質の割合やF/C比が高いほど、NASHが進行していた。重回帰分析の結果、餌へのコレステロールの添加は肝組織学的進行度と関連しており、その程度も強かった。このことより、食餌性コレステロールの摂取は肝線維化を伴うNASHの発症・進展に関与していることが示唆された。今後は、食餌性コレステロールのNASHの発症・進展に及ぼす作用機序および、同時に添加したコラーゲンの関与を検討する必要がある。

キーワード：非アルコール性脂肪肝炎、ラット、肝組織像、食餌性コレステロール、飼育条件

## 1. 緒 言

非アルコール性脂肪性肝疾患（nonalcoholic fatty liver disease: NAFLD）は、飲酒歴がなく（エタノール換算で男性30g/日、女性20g/日未満）、ウイルス性肝炎などの原因が明らかなものを除外した脂肪沈着を伴う肝疾患の総称であり、病理組織学的に大滴性の肝脂肪変性を基本として、肝細胞障害（風船様腫大）や肝線維化がみられる非アルコール性脂肪肝炎（nonalcoholic steatohepatitis: NASH）と、病態の進行がみら

れない非アルコール性脂肪肝（nonalcoholic fatty liver: NAFL）に大別される。NAFLD患者の多くは、肥満や糖尿病、高インスリン血症、脂質異常症などを合併しており、食生活の欧米化や運動不足、肥満人口の増加に伴いわが国でもNAFLDやNASH患者が増加してきている。わが国におけるNAFLD患者の有病率は報告によりばらつきはあるものの（6～35%）、20～30%程度と推測されており、NAFLDの約10%はNASHに進展するとされている<sup>1,2)</sup>。NASHへの進展機序については、肝脂肪変性をfirst hitとして、酸化ストレス

所 属：

<sup>1)</sup> 長崎県立大学看護栄養学部栄養健康学科

<sup>2)</sup> 長崎県立大学大学院人間健康科学研究科栄養科学専攻

<sup>1)</sup> Department of Nutrition, Faculty of Nursing and Nutrition, University of Nagasaki

<sup>2)</sup> Division of Nutritional Sciences, Graduate School of Human Health Sciences, University of Nagasaki

やアディポサイトカイン、インスリン抵抗性、小胞体ストレス、腸内細菌叢、鉄などのsecond hitが加わって壊死炎症性変化をきたしNASHとなるというtwo hits theoryが提唱されてきた<sup>3)</sup>が、最近では複数の因子が並行してNASHの発症・進展に関与するというmultiple parallel hits hypothesisが注目されている<sup>4)</sup>。このように、肝硬変や肝癌に進展しうるNASHの病態にはまだ不明な点も多く、その病態の解明や治療法の確立が急がれている。

NASHの発症・進展のメカニズム解明のために、遺伝子変異を伴うものやコリン・メチオニン欠乏食のような特別に調製した餌を与えたものなど、これまで多くの動物モデルが作成されている。しかし、肝硬変や肝癌の発症に大きく関与する高度な肝線維化を伴うNASHモデルは少ない<sup>5, 6)</sup>。われわれの研究室（長崎県立大学看護栄養学部栄養健康学科臨床栄養学研究室）でも2007年度よりNASHに対する病態解明のためにラットを用いて検討を続けているが、レプチン受容体遺伝子にナンセンス変異を持ち、高体重、高血圧、高血糖、高インスリン血症、脂質異常症および脂肪肝を自然発症するspontaneously-hypertensive/NIH corpulent (SHR/NDmcr-cp) ラットや通常のSprague-Dawley (SD) ラットに高脂肪食（脂肪エネルギー比45～60%）を比較的長期間（15～43週間）与えても、軽度な肝線維化が認められるに過ぎなかった<sup>7, 12)</sup>。しかし、これらのラットに高脂肪・高コレステロール食を与えると、比較的短期間（9～18週間）で高度な肝線維化を伴うNASHを発症した<sup>13, 14)</sup>。このことから、コレステロールの摂取はNASHにおける肝線維化の進展に関与している可能性が示唆されたが、ラットの種類や飼育開始週齢、飼育期間、餌の種類や組成が各実験系で異なるため、これだけでは結論づけることはできない。

そこで、本研究では、ラットの飼育条件がNASHの発症・進展に及ぼす影響を明らかにするため、これまでに臨床栄養学研究室で行ったNASHモデルを含むラットを用いた実験において、どの飼育条件がNASHの病理組織学的所見に関連しているかを検討した。

## 2. 対象と方法

### 1) 対象

長崎県立大学看護栄養学部栄養健康学科臨床栄養学研究室において2007年度から2014年度に行ったラットを用いた飼育実験のうち、普通食や高脂肪食、高脂肪・高コレステロール食を摂取させ、肝臓の組織学的検討を行ったラット129匹（全て雄性）を対象とした。なお、全ての実験は「実験動物の飼育および保管並びに苦痛の軽減に関する基準」（平成18年環境省告示第88号）に則り、「県立長崎シーボルト大学動物実験委員会」あるいは「長崎県立大学動物実験委員会」の承認を得て、「県立長崎シーボルト大学動物実験規程」あるいは「長崎県立大学動物実験規程」および「県立長崎シーボルト大学動物実験室利用細則」あるいは「長崎県立大学動物実験室利用細則」に即して行われた。

### 2) 方法

飼育したラットの種類、飼育開始時期（週齢）、飼育期間（週）、餌の製品、餌の組成（エネルギー比）（P：タンパク質の割合、F：脂質の割合、C：炭水化物の割合、F/C比、コレステロール添加の有無、コール酸添加の有無）、餌の脂質の由来、餌の総摂取量（g）、総摂取エネルギー量（kcal）、1日あたりの平均摂取エネルギー量（kcal/日）、飼育期間中の体重増加量（g）、1日あたりの平均体重増加量（g/日）、肝組織検討時期（週齢）のデータを集計し、これらが肝組織所見に及ぼす影響について検討を加えた。肝組織所見は、Kleinerらが提唱したNASH Clinical Research Network Scoring Systemに従ってスコア化した<sup>15)</sup>。これは、NASHに特徴的な組織所見であるsteatosis（脂肪沈着：0～3の4段階）、lobular inflammation（小葉内炎症：0～3の4段階）、hepatocytes ballooning（肝細胞の風船様腫大：0～2の3段階）を表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、これら3カテゴリーを合わせてNAFLD activity score (NAS)とした。また、fibrosis（線維化：0～4の5段階）の評価も行った。なお、組織標本の作成、染色および組織学的評価は富山

表1 NASH Clinical Research Network Scoring System<sup>15)</sup>

Item	Definition	Score/Code
Steatosis	Low- to medium-power evaluation of parenchymal involvement by steatosis	
	<5%	0
	5% -33%	1
	>33% -66%	2
Lobular inflammation	>66%	3
	Overall assessment of all inflammatory foci	
	No foci	0
	<2 foci per 200X field	1
Hepatocyte ballooning	2-4 foci per 200X field	2
	4> foci per 200X field	3
	None	0
	Few balloon cells	1
NAFLD activity score (NAS)	Many cells/prominent ballooning	2
	Unweighted sum of the scores for the above three items	
		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

大学大学院医学薬学研究部病理診断学講座 常山幸一准教授に依頼し、組織学的評価にあたっては、飼育条件を伏せた上で判定していただいた。

### 3) 統計処理

各項目の集計結果は平均値±標準誤差SE（最小値～最大値）で示した。統計学的検討は統計解析ソフト SPSS statistical package、version 22（SPSS Inc、Chicago、IL、USA）を使用し、平均値の差の検定には一元配置分散分析および多重比較検定（Bonferroni法）を、相関関係の検定にはSpearmanの順位相関係数を用いた。さらに、有意差がみられた項目については重回帰分析を行い、NAS、脂肪沈着、小葉内炎症、肝細胞の風船様腫大および肝線維化の各項目に関与する因子（飼育条件）の検討をした。

すべての検定において危険率5%未満（ $p < 0.05$ ）をもって統計学的に有意差があるとみなした。

## 3. 結果

### 1) 対象ラットの特徴

対象ラット129匹の種類、飼育開始週齢、飼育期間、餌の種類および餌の組成を表2に示す。ラットの種類は、129匹中107匹（82.9%）はSD

ラットであり、他の22匹（17.1%）はSHR/NDmcr-cpラットであった。飼育開始時期（週齢）の平均値は $6.6 \pm 0.2$ （3～13）週であり、飼育期間の平均値は $19.6 \pm 1.0$ （9～43）週であった。摂取した餌の種類ごとのラットの個体数は、普通食が53匹（41.1%）（Research diets D12450Bが21匹、AIN93Gが10匹、オリエンタル酵母工業MF飼料が22匹）、高脂肪食が40匹（31.0%）（Research diets D12451が23匹、Research diets D12492が7匹、オリエンタル酵母工業MF飼料に脂肪とコール酸を添加した餌が10匹）、高脂肪・高コレステロール食が36匹（27.9%）（オリエンタル酵母工業MF飼料に脂肪とコレステロール1.25%とコール酸を添加した餌が11匹、オリエンタル酵母工業MF飼料に脂肪とコレステロール2.5%とコール酸を添加した餌が20匹、オリエンタル酵母工業MF飼料に脂肪とコレステロール5%とコール酸を添加した餌が5匹）であった。F/C比の平均値は $1.1 \pm 0.1$ （0.1～3.0）であった。餌の脂質の由来は、soybeans oilが10匹（7.8%）、lard soybeans oilが51匹（39.5%）、パーム油が46匹（35.7%）であった。

飼育期間中の餌の総摂取量の平均値は $2928.5 \pm 176.8$ （726.1～7243.4）gであり、摂取エネルギー量の平均値は $12729.5 \pm 723.7$ （3572.1～30946.6）

表2 対象ラットの背景

実験年度	ラットの種類	ラット匹数 (匹)	飼育開始週齢 (週)	飼育期間 (週)	餌の製品	餌の組成 (%)				
						P*	F*	C*	コレステロール	コール酸
2007	Splague-Dawley	5	3	43	Research diets D12450B	20	10	70	0	0
2007	Splague-Dawley	7	3	43	Research diets D12451	20	45	35	0	0
2007	SHR/NDmcr-cp	5	13	15	AIN93G	20	16	64	0	0
2008	SHR/NDmcr-cp	5	9	25	AIN93G	20	16	64	0	0
2009	Splague-Dawley	5	3	22	Research diets D12450B	20	10	70	0	0
2009	Splague-Dawley	5	3	38	Research diets D12450B	20	10	70	0	0
2009	Splague-Dawley	5	3	22	Research diets D12451	20	45	35	0	0
2009	Splague-Dawley	5	3	38	Research diets D12451	20	45	35	0	0
2011	SHR/NDmcr-cp	7	9	25	オリエンタル酵母工業 MF	26	13	61	0	0
2012	Splague-Dawley	6	5	17	Research diets D12450B	20	10	70	0	0
2012	Splague-Dawley	6	5	17	Research diets D12451	20	45	35	0	0
2012	Splague-Dawley	7	5	17	Research diets D12492	20	60	20	0	0
2013	Splague-Dawley	5	9	9	オリエンタル酵母工業 MF	26	13	61	0	0
2013	Splague-Dawley	5	9	9	オリエンタル酵母工業 MF + 脂肪	12	59	29	0	2
2013	Splague-Dawley	5	9	9	オリエンタル酵母工業 MF + 脂肪 + コレステロール	12	58	30	1.25	2
2013	Splague-Dawley	5	9	9	オリエンタル酵母工業 MF + 脂肪 + コレステロール	12	57	31	2.5	2
2013	Splague-Dawley	5	9	18	オリエンタル酵母工業 MF	26	13	61	0	0
2013	Splague-Dawley	5	9	18	オリエンタル酵母工業 MF + 脂肪	12	59	29	0	2
2013	Splague-Dawley	6	9	18	オリエンタル酵母工業 MF + 脂肪 + コレステロール	12	58	30	1.25	2
2013	Splague-Dawley	6	9	18	オリエンタル酵母工業 MF + 脂肪 + コレステロール	12	57	31	2.5	2
2013	SHR/NDmcr-cp	5	9	9	オリエンタル酵母工業 MF + 脂肪 + コレステロール	14.7	28.6	42.9	5	2
2014	Splague-Dawley	5	9	9	オリエンタル酵母工業 MF	26	13	61	0	0
2014	Splague-Dawley	9	9	9	オリエンタル酵母工業 MF + 脂肪 + コレステロール	12	57	31	2.5	2

\*P: タンパク質, F: 脂質, C: 炭水化物

kcal、1日の平均摂取エネルギー量の平均値は90.0±1.3 (56.7～133.5) kcalであった。飼育期間中のラットの体重増加量の平均値は331.2±18.2 (-92.5～815.6) g、1日の平均体重増加量の平均値は2.4±0.1 (-1.3～4.4) gであった。なお、飼育期間中に体重減少をきたしたラットは、コレステロール5%とコール酸を添加した高脂肪・高コレステロール食を与えたSHR/NDmcr-cpラット2匹であり、慢性的な下痢と摂食不良によるものであった。

屠殺後に肝臓を摘出し肝組織を検討した週齢の平均値は26.8±0.8 (18～46) 週であった。KleinerらのNASH Clinical Research Network Scoring System<sup>15)</sup>に基づく判定では、steatosis(脂肪沈着)スコアの平均値は1.5±0.1(スコア0が34匹、スコア1が35匹、スコア2が19匹、スコア3が41匹)、lobular inflammation(小葉内炎症)スコアの平均値は1.1±0.1(スコア0が53匹、スコア1が37匹、スコア2が18匹、スコア3が21匹)、hepatocytes ballooning(肝細胞の風船様腫大)スコアの平均値は0.8±0.1(スコア0が53匹、スコア1が49匹、スコア2が27匹)であり、この3カテゴリーを合計したNASスコアの平均値は3.3±0.3(0～8)であった。NASスコアが5点以上でNASHと判定されたのは63匹(48.8%)、3～4点で判定保留となったのは21匹(16.3%)、2

点以下でNASHではないと判定されたのは45匹(34.9%)であった。fibrosis(線維化)スコアの平均値は0.8±0.1(スコア0が88匹、スコア1Aが10匹、スコア2が10匹、スコア3が9匹、スコア4が12匹)であった。

## 2) 肝組織学的スコアと各飼育条件との関連

肝組織学的スコアと各飼育条件との関連についての検討結果を表3に示す。なお、連続変数であらわされる項目については相関係数も合わせて表記した。

SHR/NDmcr-cpラットはSDラットに比べてsteatosis(脂肪沈着)、hepatocytes ballooning(肝細胞の風船様腫大)やNASスコアが有意に高値であった。また、飼育開始週齢が若いほど、餌の組成のうちタンパク質や炭水化物の割合が低いほど、脂質の割合やF/C比が高いほど、飼育期間中および1日の平均摂取エネルギー量が少ないほど、NASをはじめとする組織学的各スコアが有意に高かった。AIN93G飼料とオリエンタル酵母工業MF飼料は他の製品よりも組織学的各スコアが有意に高かった。コレステロールおよびコール酸を添加した餌を与えた場合は、添加していない餌を与えた場合に比べて全ての組織学的スコアで有意に高値であった。脂質の由来がパーム油である餌では全ての組織学的スコアが、soybeans oil



表3 肝組織学的スコアと各飼育条件との関連

項目	steatosis (脂肪沈着)	lobular inflammation (小葉内炎症)	hepatocytes ballooning (肝細胞の風船様腫大)	NASスコア	fibrosis (線維化)
飼育したラットの種類	0.002	0.218	0.006	0.010	0.877
飼育開始時期 (週齢)	<0.001 (0.351)	<0.001 (0.340)	<0.001 (0.304)	<0.001 (0.325)	<0.001 (0.324)
飼育期間 (週)	0.052 (-0.172)	0.003 (-0.263)	0.310 (-0.090)	0.181 (-0.119)	<0.001 (-0.309)
餌の製品	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
餌の組成 (エネルギー比)					
P: タンパク質の割合	<0.001 (-0.599)	<0.001 (-0.610)	<0.001 (-0.492)	<0.001 (-0.652)	<0.001 (-0.693)
F: 脂質の割合	<0.001 (0.348)	<0.001 (0.444)	<0.001 (0.363)	<0.001 (0.464)	<0.001 (0.413)
C: 炭水化物の割合	0.001 (-0.279)	<0.001 (-0.411)	<0.001 (-0.312)	<0.001 (-0.425)	<0.001 (-0.397)
F/C 比	<0.001 (0.360)	<0.001 (0.454)	<0.001 (0.374)	<0.001 (0.370)	<0.001 (0.412)
コレステロール添加の有無	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
コール酸添加の有無	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
餌の脂質の由来	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
餌の総摂取量 (g)	0.015 (-0.230)	<0.001 (-0.383)	0.064 (-0.176)	0.035 (-0.199)	<0.001 (-0.441)
総摂取エネルギー量 (kcal)	0.370 (-0.086)	0.016 (-0.228)	0.851 (-0.018)	<0.001 (-0.334)	0.754 (-0.030)
1日あたりの平均摂取エネルギー量 (kcal/日)	0.371 (0.085)	0.442 (-0.073)	0.173 (0.130)	0.449 (0.072)	0.064 (-0.176)
飼育期間中の体重増加量 (g)	<0.001 (-0.326)	<0.001 (-0.431)	0.003 (-0.257)	<0.001 (-0.392)	<0.001 (-0.584)
1日あたりの平均体重増加量 (g/日)	<0.001 (-0.363)	<0.001 (-0.370)	0.001 (-0.290)	<0.001 (-0.437)	<0.001 (-0.617)
肝組織検討時期 (週齢)	0.355 (-0.082)	0.017 (-0.210)	0.620 (-0.044)	0.042 (-0.179)	0.002 (-0.276)

数字は有意確率 ( $p$ ) で、カッコ内は相関係数 ( $r$ ) を表す。

である餌はfibrosis (線維化) を除く各組織学的スコアで他の由来の餌よりも有意に高かった。餌の総摂取量が少ないほどhepatocytes ballooning (肝細胞の風船様腫大) を除く各組織学的スコアが有意に高かった。総摂取エネルギー量が少ないほどlobular inflammation (小葉内炎症) やNASスコアが高かった。飼育期間が短いほど、また、肝組織検討時期が若いほど、lobular inflammation (小葉内炎症) やfibrosis (線維化) スコアが高かった。1日の平均摂取エネルギー量は全ての組織学的スコアで有意な相関はみられなかった。

### 3) 各組織学的スコアに關与する飼育条件の検討

上記の検討より有意差が認められた項目について重回帰分析を行い、各組織学的スコアに關与する因子 (飼育条件) を検討した。方法は強制投入

法で行い共線性の診断の結果、共線性の可能性があるものを除外して、再び解析を行った。

その結果、餌へのコレステロールの添加は、steatosis (脂肪沈着)、lobular inflammation (小葉内炎症)、hepatocytes ballooning (肝細胞の風船様腫大)、NASスコア、およびfibrosis (線維化) の全てのスコアの高値に關与していた。また、SHR/NDmcr-cpラットはsteatosis (脂肪沈着) およびNASスコアの高値に關与しており、脂質の由来がsoybeans oilの餌はhepatocytes ballooning (肝細胞の風船様腫大) スコアの高値に關与していた。steatosis (脂肪沈着)、NASスコア、hepatocytes ballooning (肝細胞の風船様腫大) の各項目においては、標準偏回帰係数 ( $\beta$ ) の結果より、餌へのコレステロールの添加が最も強く關与していた (表4)。

表4 重回帰分析による各組織学的スコアに關与する飼育条件

項目	steatosis (脂肪沈着)	lobular inflammation (小葉内炎症)	hepatocytes ballooning (肝細胞の風船様腫大)	NASスコア	fibrosis (線維化)
餌の組成: コレステロール添加の有無	$p < 0.001$ $\beta = 0.960$	$p < 0.001$ $\beta = 0.986$	$p < 0.001$ $\beta = 0.813$	$p < 0.001$ $\beta = 0.996$	$p < 0.001$ $\beta = 0.937$
飼育したラットの種類	$p < 0.001$ $\beta = 0.406$			$p = 0.007$ $\beta = 0.213$	
餌の脂質の由来			$p = 0.014$ $\beta = 0.384$		

有意差のある項目のみを示す。各項目の上段  $p$  は有意確率、下段  $\beta$  は標準偏回帰係数を表す。

#### 4. 考 察

NASHの発症・進展のメカニズムを検討するためには適切な動物モデルの確立が重要であるが、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か月程の期間を要し、しかもその線維化は軽度に留まる<sup>5,6)</sup>。しかし、最近になって従来の高脂肪食にコレステロールを加えた餌を与えることによってより明らかなNASHの組織像を示す動物モデルが報告されるようになってきた<sup>16)</sup>。われわれの研究室でも、ラットに高脂肪・高コレステロール食を与えると、9～18週間という比較的短期間で高度な肝線維化を伴うNASHを発症することを見出した<sup>13,14)</sup>。しかし、これがコレステロールを加えたことによる効果なのか、ラットの種類や飼育開始時期、餌の製品、餌の組成(エネルギー比)、餌の脂質の由来、餌の総摂取量、摂取エネルギー量、体重増加量、肝組織検診時期などの影響を伴った結果なのかを検討する必要があると考えた。そのためには飼育条件毎に実験系を組みその影響を1つ1つ確かめていく必要があるが、われわれがこれまで行ってきた動物実験のうち、介入目的の食物あるいは栄養素を混餌していないコントロール群および高脂肪あるいは高脂肪・高コレステロール食を与えたラットの実験結果をretrospectiveに検証することも、飼育条件によるNASH発症の程度の検討に値するのではないかと考え、本研究を行った。当然のことながら、各飼育条件を均等に配置していないため、統計学的に十分な意義があるかどうかは不明と言わざるを得ない。

その結果、肝組織学的スコアと各飼育条件とのあいだに様々な関連がみられたが、重回帰分析の結果、餌へのコレステロールの添加は全ての肝組織学的スコアと関連しており、ラットの種類や餌の脂質の由来と比較してその程度も強かった。ヒトにおいても、NAFLD患者の栄養素摂取量の調査結果より、食事性コレステロールの過剰摂取が肝細胞内における脂肪酸合成に影響を与えている可能性が指摘されている<sup>17,18)</sup>。また、マウスでの検討においても、食餌性コレステロールは肝星細胞での遊離コレステロール蓄積を介して肝線維化

を促進することが報告されている<sup>19)</sup>。今回の結果はこれらの報告に符合していた。われわれのこれまでの検討では、高脂肪・高コレステロール食の投与により線維化を伴うNASHを発症したラット肝臓ではコレステロールおよびトリグリセリドなどの脂肪酸代謝物が顕著に蓄積しており、ミトコンドリアにおけるコレステロールの蓄積もみられた。肝臓での脂肪酸 $\beta$ 酸化能の低下やトリグリセリドおよびコレステロール排出能の低下、胆汁酸合成の亢進および胆汁酸抱合・排出の低下、肝臓の線維化に関連するコラーゲンタンパク質をコードする遺伝子の発現量の増加を確認している<sup>14)</sup>。

今回実験に用いたラットは、ウマやシカなどと同様に胆嚢を持たないため、肝臓で生成された肝胆汁(コール酸とケノデオキシコール酸)は直接十二指腸に分泌される。胆汁酸は脂質だけでなくコレステロールの吸収にも必要であり、コール酸が増加すればコレステロールの吸収が促進されることが分かっている<sup>20)</sup>。今回、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食餌中にコール酸を添加したが<sup>21)</sup>、コール酸自体に細胞障害性があることが報告されており<sup>22)</sup>、さらに、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報告されている<sup>23)</sup>。今回の重回帰分析の結果ではコール酸の肝組織学的スコアへの明らかな関連はみられなかったが、コール酸の添加はNASH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ため、今後コール酸の添加量の違いによる肝組織学的スコアへの影響を検討する予定である。

ヒトにおいては、コレステロールは体内で合成できる脂質であり、12～13mg/kg体重/日ほど産生されている。また、食事により摂取されたコレステロールはその40～60%が吸収されるが、個人差が大きく、遺伝的背景や代謝状態に影響される。食事により摂取されるコレステロール(食事性コレステロール)は体内で作られるコレステロールの1/3～1/7を占めるに過ぎず、コレステロールを多く摂取すると肝臓でのコレステロール合成は減少し、逆に少なく摂取するとコレステロール合成は増加し、末梢への補給が一定に保た

れるようにフィードバック機構が働く。したがって、食事性コレステロール摂取量が直接血中総コレステロール値に反映されるわけではない。このため、厚生労働省は2015年4月改訂の「日本人の食事摂取基準（2015年版）」で、これまで成人は男750mg、女600mgを上限としていた食事からのコレステロールの目標量を撤廃し、日本動脈硬化学会もこれを追認した<sup>24, 25)</sup>。このように、食事性コレステロールの摂取量がヒトの健康に及ぼす影響については限定的であるとする考え方が主流を占めつつあるが、NASHへの影響についてはまだ十分に検討されていない。ラットでの結果がそのままヒトのNASH発症・進展に当てはまるかどうかを、今後十分に検討していく必要がある。

## 謝 辞

本研究に際し、肝臓の組織学的評価を行っていただき、終始懇切丁寧なアドバイスをいただきました常山幸一先生（前・富山大学大学院医学薬学研究所病理診断学講座准教授、現・徳島大学大学院医歯薬学研究部疾患病理学分野教授）に心より感謝申し上げます。

## 引用文献

- 1) 林 紀夫, 考藤達哉: 非アルコール性脂肪性肝疾患, 小川 聡総編集, 内科学書 (改訂第8版), Vol 4, 299-300, 中山書店, 東京, 2013.
- 2) 橋本悦子: NAFLD/NASHの診断と治療～診療ガイドラインを中心に～, 平成27年度日本肝臓学会前期教育講演会テキスト, 7-15, 2015.
- 3) Day CP and James OF: Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology*, 114 (4), 842-845, 1998.
- 4) Tilg H and Moschen AR: Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis, *Hepatology*, 52 (5), 1836-1846, 2010.
- 5) Ito M, Suzuki J, Tsujioka S, Sasaki M, Gomori A, Shirakura T, Hirose H, Ito M, Ishihara A, Iwaasa H and Kanatani A: Longitudinal analysis of murine steatohepatitis model induced by chronic exposure to high-fat diet, *Hepato Res*, 37 (1), 50-57, 2007.
- 6) Larter CZ and Yeh MM: Animal models of NASH: Getting both pathology and metabolic context right, *J Gastroenterol Hepatol*, 23 (11), 1635-

- 1648, 2008.
- 7) Omagari K, Kato S, Tsuneyama K, Inohara C, Kuroda Y, Tsukuda H, Fukazawa E, Shiraishi K and Mune M: Effects of a long-term high-fat diet and switching from a high-fat to low-fat, standard diet on hepatic fat accumulation in Sprague-Dawley rats, *Dig Dis Sci*, 53 (12), 3206-3212, 2008.
- 8) Kato S, Omagari K, Tsuneyama K, Fukazawa E, Tsukuda H, Inohara C, Kuroda Y, Shiraishi K and Mune M: A possible rat model for nonalcoholic steatohepatitis: histological findings in SHR/Dmcr-cp rats, *Hepato Res*, 38 (7), 743-744, 2008.
- 9) Omagari K, Kato S, Tsuneyama K, Hatta H, Sato M, Hamasaki M, Sadakane Y, Tashiro T, Fukuhata M, Miyata Y, Tamaru S, Tanaka K and Mune M: Olive leaf extract prevents spontaneous occurrence of non-alcoholic steatohepatitis in SHR/NDmcr-cp rats, *Pathology*, 42 (1), 66-72, 2010.
- 10) Omagari K, Kato S, Tsuneyama K, Hatta H, Ichimura M, Urata C, Sumiyama Y, Nishizaki A, Hashimoto S, Harada M, Tamaru S and Tanaka K: The effect of olive leaf extract on hepatic fat accumulation in Sprague-Dawley rats fed a high-fat diet, *Acta Medica Nagasaki*, 55 (1), 29-39, 2010.
- 11) Ichimura M, Kato S, Tsuneyama K, Matsutake S, Kamogawa M, Hirao E, Miyata A, Mori S, Yamaguchi N, Suruga K and Omagari K: Phycocyanin prevents hypertension and low serum adiponectin level in a rat model of metabolic syndrome, *Nutr Res*, 33 (5), 397-405, 2013.
- 12) Omagari K, Yoshikawa C, Inoue S, Tanaka Y, Murayama T, Ichimura M, Miyata A, Mori S, Kamogawa M, Hirao E, Kato S, Suruga K and Tsuneyama K: Abdominal subcutaneous adipose tissue accumulation is positively correlated with hepatic steatosis in Sprague-Dawley rats, *Acta Med Nagasaki*, 59 (2), 47-56, 2014.
- 13) Ichimura M, Hatanaka M, Tsuneyama K, Kato S and 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 Weight Loss Ther*, 5 (1), 244, 2015.
- 14) Ichimura M, Kawase M, Masuzumi M, Sakaki M, Nagata Y, Tanaka K, Suruga K, Tamaru S, Kato S, Tsuneyama K and Omagari K: High-fat and high-cholesterol diet rapidly induces nonalcoholic steatohepatitis with advanced fibrosis in Sprague-Dawley rats, *Hepato Res*, 45 (4), 458-469, 2015.
- 15) Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, Ferrell LD, Liu Y-C, Torbenson MS, Unalp-Arida A, Yeh M, McCullough

- AJ and Sanyal AJ: Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease, *Hepatology*, 41 (6), 1313-1321, 2005.
- 16) Savard C, Tartaglione EV, Kuver R, Haigh WG, Farrell GC, Subramanian S, Chait A, Yeh MM, Quinn LS and Ioannou GN: Synergistic interaction of dietary cholesterol and dietary fat in inducing experimental steatohepatitis, *Hepatology*, 57 (1), 81-92, 2013.
- 17) 安武健一郎, 嶋 由紀, 一ノ瀬雅子, 大山明子, 増田香織, 春田典子, 早田福子, 中牟田誠: 肥満の有無による非アルコール性脂肪性肝疾患の病態と栄養素摂取量の解析 - 特に食事性コレステロール摂取量の重要性について -, *日本病態栄養学会誌*, 12 (3), 211-216, 2009.
- 18) Enjoji M, Yasutake K, Kohjima M and Nakamuta M: Nutrition and nonalcoholic fatty liver disease: The significance of cholesterol, *Int J Hepatol*, 2012, Article ID 925807, 2012.
- 19) 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 and Hibi T: A high-cholesterol diet exacerbates liver fibrosis in mice via accumulation of free cholesterol in hepatic stellate cells, *Gastroenterology*, 142 (1), 152-164, 2012.
- 20) 内田清久: 胆汁酸代謝と腸内細菌, *ビフィズス*, 5 (2), 157-172, 1992.
- 21) Jeong W-I, Jeong D-H, Do S-H, Kim Y-K, Park H-Y, Kwon O-D, Kim T-H and Jeong K-S: Mild hepatic fibrosis in cholesterol and sodium cholate diet-fed rats, *J Vet Med Sci*, 67 (3), 235-242, 2005.
- 22) Watanabe S and 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*, 38 (3), 379-390, 2013.
- 23) Vergnes L, Phan J, Strauss M, Tafuri S and Reue K: Cholesterol and cholate components of an atherogenic diet induce distinct stages of hepatic inflammatory gene expression, *J Biol Chem*, 278 (44), 42774-42784, 2003.
- 24) 厚生労働省: 日本人の食事摂取基準 (2015年版) の概要, <http://www.mhlw.go.jp/file/04-Houdouhappyou-10904750-Kenkoukyoku-Gantaisakukenkouzoushinka/0000041955.pdf> (2015年7月7日閲覧)
- 25) 日本動脈硬化学会: コレステロール摂取量に関する声明, [http://www.jathero.org/outline/cholesterol\\_150501.html](http://www.jathero.org/outline/cholesterol_150501.html) (2015年7月7日閲覧)