

【原著論文】 ラットを用いた非アルコール性脂肪性肝炎における 肝臓のアミノ酸組成の変動

野 口 知 里

金城学院大学大学院人間生活学研究科

Amino Acid Analysis of Non-alcoholic Steatohepatitis in Rat Liver

Chisato Noguchi

Graduate School of Human Ecology, Kinjo Gakuin University

Non-alcoholic steatohepatitis (NASH) is correlated with metabolic syndrome, and the prevalence of NASH patients is increasing worldwide. Fast food is considered a risk for the pathogenesis of NASH, so dietary therapy is very important for its prevention.

In this study, amino acid composition of rat liver of NASH model was examined. WKY male rats (6 weeks old) were randomly divided into 8 groups. Control groups were fed control diets for 4 weeks, 8 weeks, 12 weeks and 16 weeks, respectively. HFC groups were fed high fat and high cholesterol diet for 4 weeks, 8 weeks, 12 weeks and 16 weeks, respectively. The liver weight of HFC group was high compared with control rat, and the surface color was whitish, indicating deposition of much lipid in the HFC liver.

The cell pathology of liver was examined by transmission electron microscopy. Many lipid droplets were observed in the cytoplasm of hepatocyte, which increased after 8 week-intake of HFC diet.

Amino acid analysis showed the increase of hydroxyproline in the liver of HFC group, while the other amino acids were decreased. Because hydroxyproline is a chief component of collagen molecules, the deposition of collagen fibrils in NASH liver has been confirmed by amino acid analysis.

Keywords: NASH (非アルコール性脂肪性肝炎), HFC (高脂肪・高コレステロール), amino acid analysis (アミノ酸分析)

1. はじめに

非アルコール性脂肪性肝疾患（nonalcoholic fatty liver disease：NAFLD）と呼ばれる疾患は、肝臓におけるメタボリックシンドロームの表現型といわれている。アルコール摂取がなくとも、過剰に蓄えられた内臓脂肪が肝臓の炎症や線維化に関わるとされており¹⁾、非アルコール性脂肪性肝疾患のうちの10%に相当するNASHは、飲酒歴がないにも関わらず脂肪性肝炎の病態（大滴性の脂肪沈着、炎症性細胞の浸潤、マロリー小体の出現、肝細胞周囲の線維化など）を示し²⁾、不可逆性の重篤な疾患である肝硬変や肝細胞がんに行進する疾患である。

最も罹患率の高いアメリカでは、人口の3~5%がNASHであり³⁾、その増加にはファストフード（fast food）の存在が大きいとされ⁴⁾、食生活が欧米化した我が国でも今後のNASH患者の増加が懸念される。

コレステロールと飽和脂肪酸の摂取量が多く⁵⁾、脂肪、n-6系脂肪酸は多いが、炭水化物と食物繊維の摂取量が少ない⁶⁾という結果がNASH患者を対象とした調査で得られており、これはファストフードとNASHの因果関係を裏付けるものだといえる。しかし、NASHという疾患の概念が提唱されて30年以上経つ今でも、その病態には未だ不明な点が多く残っている。

現在、グリシン⁷⁾、ベタイン⁸⁾、レプチン⁹⁾を用いたNASHの治療に関する研究が進められている。このようにアミノ酸などの投与による肝組織の回復効果の検討がなされている一方で、NASH発症時の肝臓中のアミノ酸量の変化に関する報告はほとんど認められない。アミノ酸の治療効果の検討に際し、疾患による肝臓のアミノ酸量変化を把握することは重要であると考えた。

そこで今回の実験では、ファストフードに類似した高脂肪・高コレステロール飼料摂取による肝臓の組織学的変化に加えて、肝臓中のアミノ酸分析を行うことで、NASH発症時の肝臓の病態変化を包括的に明らかにすることを目的とした。

2. 実験方法

1) 試料

無菌的な環境で飼育された6週齢の雄性WKY（Wistar Kyoto）ラット（体重130~150g）、24匹を無作為に8群に分けた。飼料はコントロール食（Cont）をSP飼料（株フナバシファーム）とし、試験食の高脂肪・高コレステロール食（HFC；（株）フナバシファーム）は、SP飼料にコレステロールと粉末パーム油を添加したものとした。それぞれ4週、8週、12週、16週間飼育し、全ての群で水と飼料は自由摂取とした（計8群）。両群に与えた試料の栄養価を表1に示した。なお、本研究の動物実験は、「金城学院大学動物実験委員会」の承認を受け、「金城学院大学動物実験指針」を遵守して行われたものである。

表1 飼料100gあたりの栄養価

100gあたり	SP飼料	HFC飼料
エネルギー (kcal)	373	460
タンパク質 (g)	20.8	14.7
脂質 (g)	2.8	28.6
炭水化物 (g)	66.1	31.3
コレステロール (g)	Tr	5.0
脂質由来エネルギー比 (%E)	6.8	56.0

Tr：Trace（微量）

2) 電子顕微鏡観察

摘出した肝臓を1mm角に細切し、カルノフスキー固定液に2日間浸漬させエポキシ樹脂にて包埋した。ウルトラミクロトームを用いて厚さ80nmの超薄切片を作製、酢酸ウラニルとクエン酸鉛の二重染色により透過型電子顕微鏡を用いて観察した。

3) アミノ酸分析

凍結した摘出直後の肝臓（各群n=3）を用いてアミノ酸分析を行った。分析は株式会社ニッピバイオマトリックス研究所に委託した。

4) 統計処理

今回の実験で得られた値は全て平均値±標準偏差で示し、Shapiro-Wilkによる正規性の検討を行った。正規性が認められた飼育期間が同じコントロール群と高脂肪・高コレステロール群間（Cont4w vs HFC4w, Cont8w vs HFC8w, Cont12w vs HFC12w, Cont16w vs HFC16w）の比較には、対

応のないt検定を、正規性が認められなかった項目にはMann-Whitney U検定を行った。コントロール群間 (Cont4w vs Cont8w vs Cont12w vs Cont16w) または高脂肪・高コレステロール群間 (HFC4w vs HFC8w vs HFC12w vs HFC16w), も同様に正規性を検討し、正規性が認められた項目においては一元配置分散分析と、その後の検定としてTukey HSDを用い、正規性が認められなかった項目にはKruskal-Wallis検定を用いた。これらの統計にはSPSS ver. 11を使用し、有意水準5%未満 (両側) を統計的有意とした。

3. 結果

1) 肝臓の経時変化 (肉眼所見)

摘出直後の肝臓重量を計測した結果、いずれの飼育期間においてもコントロール群に比べてHFC群が有意に高かった (表2)。体重あたりの肝臓重量を示す肝臓重量比率は、コントロール群では飼育期間が長くなるほど低下していったのに対し、HFC群では高くなった。特にHFC16wにおいては肝臓重量比率が11%と、全体重のうちの1割以上を占める結果となった。

コントロール群の肝臓はいずれの飼育期間でも正常な赤茶色を呈し、重量の変化もあまり見られなかったが、HFCを摂取させた群では全体が白くな

表2 最終体重と肝臓重量

		最終体重 (g)	肝臓重量 (g)	肝臓重量比率 (%)
4w	Cont	303.6 ± 1.66	10.7 ± 0.30	3.5 ± 0.11
	HFC	272.9 ± 18.86	15.9 ± 1.00**	5.8 ± 0.05**
8w	Cont	349.8 ± 10.37 [†]	11.3 ± 0.26	3.2 ± 0.25 [†]
	HFC	310.0 ± 17.07*	28.6 ± 1.35 [¶] **	9.3 ± 0.97**
12w	Cont	415.5 ± 13.46 ^{†,‡}	12.8 ± 0.19 ^{†,‡}	3.1 ± 0.12
	HFC	347.7 ± 13.60 [¶] **	30.6 ± 1.06 [¶] **	8.8 ± 0.89**
16w	Cont	432.0 ± 13.75 ^{†,‡}	12.4 ± 0.80 [†]	2.9 ± 0.10 ^{†,‡}
	HFC	362.6 ± 0.97 ^{¶,§}	39.7 ± 2.28 ^{¶,§} **	11.0 ± 0.64 ^{¶,§} **

データは平均値±標準偏差

*は同じ飼育期間のコントロール群との有意差を示す *P<0.05 **P<0.01

他の記号は全てP<0.05を示す

† : vs Cont4w ‡ : vs Cont8w ¶ : vs HFC4w // : vs HFC8w

§ : vs HFC12w

り、コントロール群に比べて著しく大きくなっていった (図1)。この白色変化 (脂肪化) と肥大化は、どのHFC摂取群でも見られたが、特にHFC16wで顕著にみられ、摂取期間に比例して重量の増加が認められた。

2) 高脂肪・高コレステロール長期摂取による肝臓の経時的組織変化

肝細胞の微細構造を電子顕微鏡により観察した (図2)。コントロール群においてはどの飼育期間においても肝細胞内の脂肪滴はわずかであったが、HFC群では多量の脂肪沈着が認められ、HFC4wの時点で肝細胞細胞質の半分以上は脂肪滴で埋め尽くされていた。肥大した細胞の割合は少ないものの、肝細胞と肝細胞の間に存在する毛細血管 (類洞) が、

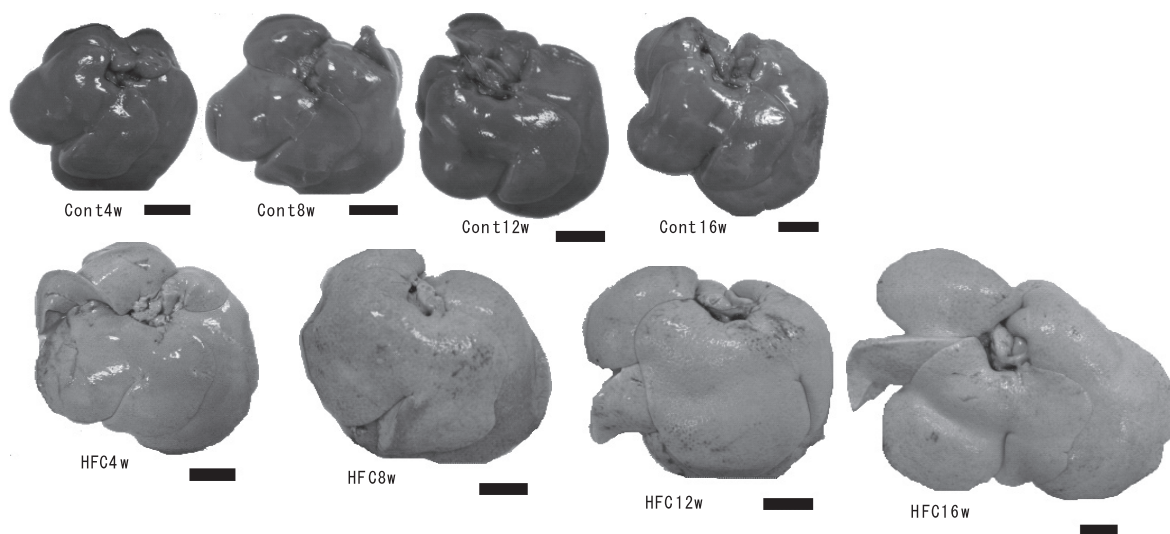


図1. 摘出直後の肝臓
スケールは1cmを示す

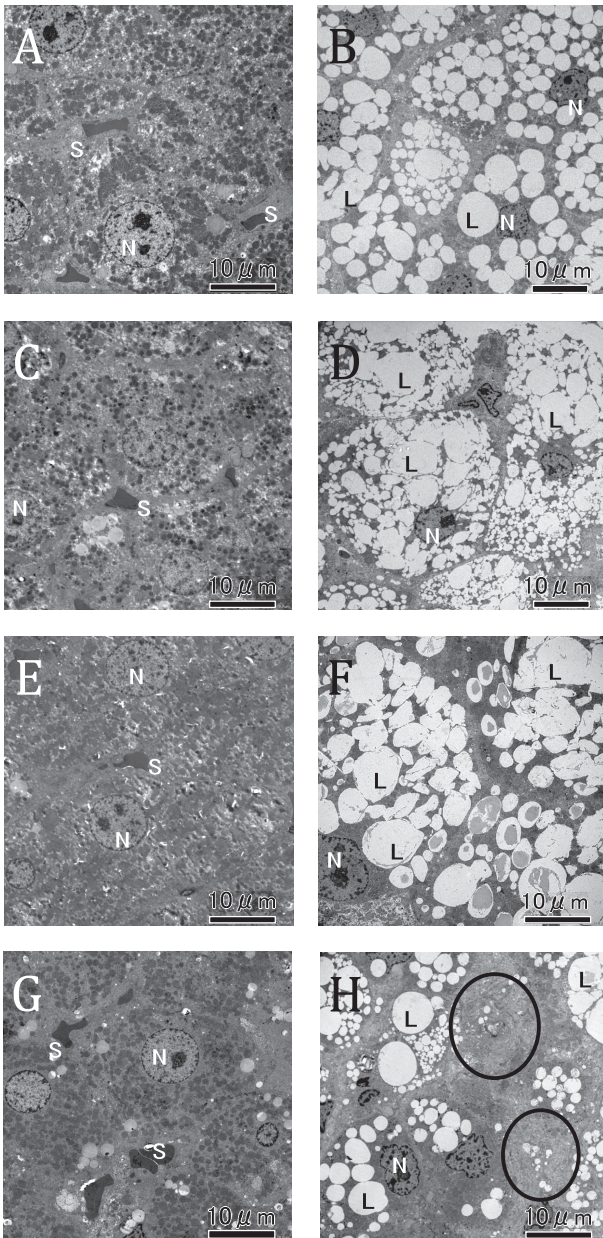


図2. HFC長期摂取による肝細胞の微細構造変化
 N：核，S：類洞，L：脂肪滴，丸：線維化部位
 A, Cont4w; B, HFC4w; C, Cont8w; D, HFC8w
 E, Cont12w; F, HFC12w; G, Cont16w; H, HFC16w

コントロール群では顕著にみられるのに比べ、HFC4wでは確認されなかった(図2B)。HFC8wになると、さらに細胞質の脂肪滴が増加し、細胞質のほとんどが脂肪滴で埋め尽くされていた。細胞内に貯留した脂肪滴は、HFC4wの肝細胞に貯留したものに比べて細かいものが多く認められた(図2D)。HFC12wではほぼ全ての細胞内が脂肪滴で埋め尽くされ、肝細胞同士の隙間はごく僅かしかみられなかった(図2F)。細胞内に貯留した、隣り合う脂肪

滴同士が融合し、大きな脂肪滴を形成していた。HFC16wではHFC12wと同程度の脂肪が沈着した細胞だけでなく、線維に置換されていて脂肪沈着のみられない部位が出現していた(図2H)。

3) 肝臓のアミノ酸分析

1gあたりの肝臓中の総アミノ酸量は、いずれの飼育期間においてもHFC群が有意に低い結果となった(表3)。測定したアミノ酸20項目のうち、15～17の項目において両群間に有意差が認められた。その中でもメチオニンの減少は顕著で、HFC群では同期間飼育したコントロール群の値に比べて半分以下となっていた。多くのアミノ酸はHFC群において低値を示したが、ヒドロキシプロリンは逆にHFC群で高値を示し、16wにおいては2群の間に有意差が認められた。4w、8wの時点では高脂肪食群で低値であったヒドロキシリジンは、12w、16wにおいてHFC群が高くなる傾向を示した。

オルニチンはいずれの飼育期間においても両群の間に差は認められなかった。プロリン、グリシンは4w、8w、12wでHFC群が顕著に減少した。

飼育期間による比較では、コントロール群では8wが他の3群に比べて高値を示し、14項目において経時的な有意差が認められたが、ヒドロキシプロリン、アスパラギン酸、システイン、ヒドロキシリジン、オルニチンでは有意差は認められなかった。一方、HFC群ではシステイン、ヒドロキシリジンが4wに比べて8w、12w、16wで有意に高値を示し、HFCの摂取期間が長いほど上昇する結果となった。ヒドロキシプロリンも4wに比べて8w以降、12w、16wで高値を示し、HFC8wは他の群に比べて有意に高い結果となった。

4. 考察

高脂肪・高コレステロールの長期摂取により、脂肪肝の形成は早期に生じ、NASHの診断基準の1つである肝細胞の肥大化は、ラットでは摂取8週目以降現れることが示された。肝臓の脂肪化が進む一方で、肝臓中のアミノ酸含量(総量)は減少していくことが明らかとなった。肉眼所見と電子顕微鏡観察

表3 高脂肪・高コレステロール飼料による肝臓中アミノ酸量の変動

(μg/g)	4w		8w		12w		16w	
	Cont	HFC	Cont	HFC	Cont	HFC	Cont	HFC
Hyp	0.092 ± 0.02	0.072 ± 0.02	0.223 ± 0.04	0.251 ± 0.05	0.096 ± 0.02	0.151 ± 0.00	0.052 ± 0.03	0.146 ± 0.04*
Asp	3.950 ± 0.38	2.682 ± 0.24**	4.560 ± 0.40	2.532 ± 0.11**	3.467 ± 0.25‡	2.396 ± 0.06*	3.469 ± 0.48‡	2.388 ± 0.10*
Thr	2.105 ± 0.22	1.402 ± 0.12**	2.435 ± 0.23	1.335 ± 0.05**	1.830 ± 0.13‡	1.261 ± 0.03**	1.826 ± 0.27‡	1.248 ± 0.06*
Ser	2.019 ± 0.22	1.375 ± 0.12*	2.305 ± 0.21	1.306 ± 0.05**	1.717 ± 0.13‡	1.235 ± 0.04**	1.682 ± 0.25‡	1.229 ± 0.04*
Glu	5.740 ± 0.63	3.959 ± 0.32*	6.310 ± 0.48	3.659 ± 0.13**	5.009 ± 0.32‡	3.514 ± 0.09**	4.839 ± 0.50‡	3.669 ± 0.14*
Pro	1.889 ± 0.19	1.233 ± 0.11**	2.319 ± 0.19	1.252 ± 0.05**	1.708 ± 0.13‡	1.192 ± 0.02**	1.769 ± 0.28‡	1.267 ± 0.05
Gly	2.213 ± 0.22	1.469 ± 0.13**	2.621 ± 0.23	1.384 ± 0.06**	2.035 ± 0.16	1.412 ± 0.04**	2.007 ± 0.29‡	1.519 ± 0.05
Ala	2.535 ± 0.24	1.650 ± 0.14**	3.050 ± 0.28	1.550 ± 0.09**	2.243 ± 0.16‡	1.457 ± 0.03	2.230 ± 0.32‡	1.463 ± 0.07*
Cys	0.347 ± 0.03	0.270 ± 0.03*	0.431 ± 0.07	0.358 ± 0.02 [¶]	0.431 ± 0.03	0.358 ± 0.01 [¶]	0.473 ± 0.09	0.362 ± 0.04 [¶]
Val	2.378 ± 0.25	1.611 ± 0.13**	2.967 ± 0.26	1.571 ± 0.07**	2.202 ± 0.16‡	1.454 ± 0.04**	2.202 ± 0.34‡	1.393 ± 0.09*
Met	0.973 ± 0.15	0.313 ± 0.10**	1.417 ± 0.14 [†]	0.737 ± 0.04 [¶]	0.995 ± 0.07‡	0.472 ± 0.01 [¶]	1.042 ± 0.18‡	0.482 ± 0.08 [¶]
Ile	2.081 ± 0.23	1.406 ± 0.10*	2.504 ± 0.25	1.332 ± 0.05**	1.875 ± 0.12‡	1.256 ± 0.04**	1.877 ± 0.29‡	1.209 ± 0.08 [¶]
Leu	4.362 ± 0.45	2.902 ± 0.26**	5.175 ± 0.48	2.690 ± 0.13**	3.839 ± 0.29‡	2.526 ± 0.06**	3.847 ± 0.58‡	2.435 ± 0.15 [¶]
Tyr	1.657 ± 0.16	1.003 ± 0.09**	2.151 ± 0.19	1.171 ± 0.04 [¶]	1.521 ± 0.10‡	1.043 ± 0.03**	1.590 ± 0.28‡	1.012 ± 0.08*
Phe	2.279 ± 0.22	1.509 ± 0.15**	2.743 ± 0.25	1.419 ± 0.06**	2.073 ± 0.16‡	1.369 ± 0.04**	2.098 ± 0.32‡	1.308 ± 0.10*
Hyls	0.095 ± 0.06	0.064 ± 0.01	0.169 ± 0.01	0.145 ± 0.03 [¶]	0.106 ± 0.03	0.125 ± 0.01 [¶]	0.116 ± 0.04	0.130 ± 0.01 [¶]
Orn	0.073 ± 0.02	0.053 ± 0.01	0.081 ± 0.01	0.089 ± 0.01	0.069 ± 0.01	0.055 ± 0.00	0.076 ± 0.01	0.055 ± 0.01
Lys	3.245 ± 0.30	2.226 ± 0.20**	3.888 ± 0.33	2.218 ± 0.09**	2.951 ± 0.20‡	2.031 ± 0.06**	2.962 ± 0.44‡	2.003 ± 0.12*
His	1.103 ± 0.09	0.778 ± 0.08*	1.342 ± 0.11	0.700 ± 0.03**	1.020 ± 0.08‡	0.681 ± 0.02**	1.040 ± 0.16‡	0.658 ± 0.05*
Arg	2.611 ± 0.26	1.734 ± 0.14**	2.986 ± 0.30	1.648 ± 0.08**	2.317 ± 0.17	1.628 ± 0.04*	2.350 ± 0.37	1.665 ± 0.08*
Total	41.653 ± 4.16	27.647 ± 2.47**	49.676 ± 4.43	27.345 ± 1.07**	37.507 ± 2.70‡	25.617 ± 0.58**	37.545 ± 5.50‡	25.640 ± 1.29*

データは平均値±標準偏差

*は同じ飼育期間のコントロール群との有意差を示す *P<0.05 **P<0.01

他の記号は全てP<0.05を示す †: vs Cont4w ‡: vs Cont8w ¶: vs HFC4w //: vs HFC8w §: vs HFC12w

によって確認されたように、肝細胞内に多量の脂質が沈着し、正常細胞が減少したため、蓄えられるアミノ酸の量が減少したと考えられる。その中でも、コントロール群と比べて特に含有量の低かったメチオニンは、必須アミノ酸であることから、今回の実験で使用した高脂肪・高コレステロール (HFC) 飼料に含まれるメチオニンの割合が関与しているのではないかと考えられる。HFC飼料は、メチオニンを100g中に0.3g含むSP飼料¹⁰⁾ 73gにパームヤシ油20g、コレステロール5g、コール酸2gを加えたものであり、メチオニン含量は0.22g/100gと推定される。メチオニン欠乏食によるNASH発症モデルラットを用いた実験がある¹¹⁾ ことから、メチオニン不足は脂肪肝を惹起させるものであるといえる。今回の実験において発症した脂肪肝は、脂質とコレステロールの過剰摂取だけでなく、アミノ酸インバランスも影響している可能性が示された。

HFC群においてほとんどのアミノ酸量が低下している中で、コントロール群に比べて高い傾向を示したヒドロキシプロリンとヒドロキシリジンは非代償性肝硬変の血清においても両者の値が上昇することが報告されている¹²⁾。ヒドロキシプロリンはコラーゲン特有のアミノ酸であり、コラーゲンのらせ

ん構造の安定性を担っている。体内のプロリンからプロリンヒドロキシラーゼによって形成され、コラーゲンの構成要素となるが、この酵素活性は脂肪肝において軽度高値、アルコール性肝炎で著しく高値を示すことが知られている¹³⁾。ヒドロキシプロリンの量はコラーゲン量の推定に用いられることから、肝臓中のヒドロキシプロリン量の増加は、コラーゲンの増加を示すといえる。今回の実験においては16週目の2群間に有意差が認められたことから、HFC16週群の肝臓中のコラーゲン量はコントロール群に比べて有意に増加していることが示された。

しかし、以前筆者はHFCを8週間投与させたラットにおいて、肝細胞の肥大、大滴性脂肪の沈着、肝細胞周囲の線維化という、NASHの診断基準を満たす組織変化が生じることを報告した¹⁴⁾。肝臓中のヒドロキシプロリン量がコントロール群に比べて有意に上昇するよりも前の段階で、線維の増生が確認できたということから、NASH発症初期に増生する線維成分には、コラーゲン以外の細胞外マトリックスも含まれることが示唆された。

5. まとめ

本研究において高脂肪・高コレステロール飼料の継続摂取によるNASH発症には、低タンパク質食によるアミノ酸インバランスも関与している可能性があること、肝臓中に増生する初期の線維成分は、コラーゲン以外の線維成分も含まれることが示唆された。この結果は、肝臓の線維化抑制メカニズム解明の一助になる知見であると思われる。

6. 謝辞

本研究においてラット肝臓のアミノ酸分析にご協力いただきました株式会社ニッピ バイオマトリックス研究所の楠畑 雅氏に感謝申し上げます。

引用文献

- 1) van der Poorten D, Milner KL, et al. Visceral fat: A key mediator of steatohepatitis in metabolic liver disease. *Hepatology*, 48(2): 449-57 (2008)
- 2) Ludwig J, Viggiano TR, et al. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc*, 55(7): 434-8 (1980)
- 3) Vernon G, Baranova A, Younossi ZM. Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. *Aliment Pharmacol Ther*, 34(3): 274-85 (2011)
- 4) Pitt HA. Hepato-pancreato-biliary fat: the good, the bad and the ugly. *HPB*, 9: 92-7 (2007)
- 5) Musso G, Gambino R, et al. Dietary habits and their relations to insulin resistance and postprandial lipemia in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*, 37(4): 909-16 (2003)
- 6) Cortez-Pinto H, Jesus L, et al. How different is the dietary pattern in non-alcoholic steatohepatitis patients? *Clin Nutr*, 25(5): 816-23 (2006)
- 7) Barakat HA, Hamza AH. Glycine alleviates liver injury induced by deficiency in methionine and or choline in rats. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 16(6): 728-36 (2012)
- 8) Kawakami S, Han KH, et al. Effects of dietary supplementation with betaine on a nonalcoholic steatohepatitis (NASH) mouse model. *J Nutr Sci Vitaminol*. 58(5): 371-5 (2012)
- 9) Machado MV, Cortez-Pinto H. Leptin in the treatment of lipodystrophy-associated nonalcoholic fatty liver disease: are we there already? *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 7(6): 513-5 (2013)
- 10) 土倉覚. 高血圧モデル動物の各系統と特徴 SP用飼料 飼料成分内容. SHR等疾患モデル共同研究会 (8) (2001)
- 11) de Lima VM, Oliveira CP, et al. A rodent model of NASH with cirrhosis, oval cell proliferation and hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*, 49(6): 1055-61 (2008)
- 12) Kucharz EJ. Serum hydroxyproline and hydroxylysine levels in patients with decompensated cirrhosis. *Rom J Intern Med*. 32(4): 271-4 (1994)
- 13) Mezey E, Potter JJ, et al. Hepatic collagen proline hydroxylase activity in alcoholic liver disease. *Clin Chim Acta*. 68(3): 313-20 (1976)
- 14) 野口知里. 高脂肪・高コレステロール継続摂取によるNASHの発症と発症後の摂取脂質量減少に伴う回復効果：ラットにおける検討. 金城学院大学大学院人間生活学研究科論集 (12) : 1-8 (2012)