

脂肪肝モデルラット作成のための飼料組成の検討

伊佐保香*, 小幡葵*, 神谷寛実*, 久保田華奈*,

中村日南*, 三嶋智之**

*岐阜女子大学, **岐阜医療科学大学

(2019年1月30日受理)

Investigation of Diet Composition for Induction of Fatty Liver in Rat

ISA Yasuka*, OBATA Aoi*, KAMIYA Hiromi*, KUBOTA Kana*,
NAKAMURA Hina* and MISHIMA Tomoyuki**

*Department of Health and Nutrition, Faculty of Home Economics,
Gifu Women's University, 80 Taromaru, Gifu 501-2592, Japan

**School of Health Science, Gifu University of Medical Science,
795-1 Nagamine Ichihiraga, Seki, Gifu 501-3892, Japan

(Received January 30, 2019)

The experimental models for inducing fatty liver in rat are genetic models and dietary models. It was considered that the dietary models might reflect human dietary habits. However, in the some previous reports, there were some differences in animal strain, diet composition and biological analysis data. In our experiments, an appropriate dietary model is needed to seek food components for decreasing lipid in liver. Therefore, we investigated, which induced the fatty liver by high fat diet or high sucrose diet in this study. In the high fat diet (HF) group, the accumulation of epididymal and abdominal fat were observed although lower food intake compared to that of other groups. The accumulation of lipid in liver was observed in the high sucrose diet (HS) group. Furthermore the increase in the plasma AST and ALT activities were observed in the HS group. These results were indicated that the more easily inducing the fatty liver in rat were the high sucrose diet than the high fat diet.

キーワード：脂肪肝 (fatty liver), 高脂肪食 (high fat diet), 高スクロース食 (high sucrose diet),
ラット (rat), 飼料組成 (diet composition)

1 緒言

脂肪肝とは肝細胞に多量の脂質が沈着することによる脂肪変性を認める状態をいい、栄養性、内分泌性、代謝性、中毒性に分類される¹⁾。脂肪肝のうち非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD; nonalcoholic fatty liver disease) は食習慣が大きくかわっており、その場合は過剰の飲酒によるものではなく、エネルギー過剰摂取、脂質やフルクトース過剰摂取が重要な原因である。そしてその多くは肥満、2 型糖尿病、脂質異常症のリスク要因となっている²⁻⁵⁾。また NAFLD は単純性脂肪肝とされる NAFL (nonalcoholic fatty liver) から非アルコール性脂肪肝炎 (NASH; nonalcoholic steatohepatitis) へと至る例も報告されている⁶⁾ため、食習慣の改善は重要な要因となりえる。

脂肪肝を誘導する実験動物には遺伝モデルと栄養モデルがあるが、栄養モデルにおける食餌にはメチオニン-コリン欠乏食 (MCD 食)、ラードや牛脂を用いた高脂肪食、高スクロース食が挙げられる⁷⁾。これらの実験食において MCD 食は特殊な組成であるため、ヒトにおいて問題となる食生活習慣を想定するには高脂肪食や高スクロース食が適していると考えられる。我々は肝臓の脂肪蓄積を抑制あるいは改善する食品成分の探索を目的としており、そのために栄養モデルラットを実験に要する。しかしすでに高スクロース食や高脂肪食での栄養モデルを用いた研究は多くなされているものの、用いられている動物の系統や飼料の組成がいくらか異なり、さらに報告によって肝臓や体脂肪への脂肪蓄積状態および血中脂質濃度についても差異があるため、飼料の影響について比較しがたい。そこで本研究は、食品成分により脂質減少に対するモデルを作成するにあたり、高脂肪食もしくは高スクロース食をラットに投与し、脂質量への影響について比較を行うことを目的とした。

2 材料と方法

1) 実験方法

試薬は特に記載がない場合、ナカライテスク株式会社 (京都、日本) より購入した。実験動物として日本 SLC 株式会社 (浜松、日本) より 4 週齢の Wistar ST 系雄性ラットを購入した。ラットは実験環境に慣らすため、個別ケージにて 3 日間の予備飼育を行った後、体重が等しくなるように各群 6 匹からなる 3 群に群分けした。予備飼育期間中は、AIN-93G に従ったコントロール食を与え、本飼育期間中は各組成に従った飼料を 28 日間自由摂取させた (Table 1)。試験群は、コントロール群 (C 群)、高脂肪食群 (HF 群) および高スクロース食群 (HS 群) とし、HF 群と HS 群の飼料にはオロト酸 (東京化成工業株式会社、東京、日本) を 1% 添加した。高脂肪食には、ラード (日本クレア株式会社、東京、日本) を 30% 添加、高スクロース食にはスクロースを 60% 添加し、 α -コーンスターチにて割合を調整した。

Table 1. Composition of the experimental diets

Ingredients (%)	Control	HF	HS
Casein	20.0	20.0	20.0
L-cystine	0.3	0.3	0.3
α -Cornstarch	52.95	28.95	1.95
Sucrose	10.0	10.0	60.0
Soy Oil	7.0	—	7.0
Lard	—	30.0	—
Cellulose	5.0	5.0	5.0
Orotic acid	—	1.0	1.0
AIN-93G vitamin mixture	1.0	1.0	1.0
AIN-93G mineral mixture	3.5	3.5	3.5
<i>tert</i> -Butylhydroquinone	0.0014	0.0014	0.0014
Choline bitartrate	0.25	0.25	0.25

飼育期間中は毎日、体重および飼料摂取量を測定した。ラットは室温（ $24 \pm 1^\circ\text{C}$ ）および湿度（ $55 \pm 5\%$ ）がコントロールされた施設にて、明暗 12 時間サイクルの条件下で飼育した。飼育 14 日目には、前日より一晩絶食させた後、尾静脈より採血し、血漿トリグリセリド（TG）濃度の測定に供した。

ラットは飼育 28 日目にセボフルラン（和光純薬工業株式会社、大阪、日本）による麻酔下にて開腹し、腹部大動脈よりヘパリンナトリウム処理したシリンジにて採血し、脱血死させた。血液は氷冷保存し、速やかに遠心分離（ $1,500 \times g$, 10min, 4°C ）し、血漿を得た。得られた血漿は速やかに HDL・コレステロール濃度の測定に供し、残りは分析に供するまで -20°C にて保存した。肝臓、腎臓、脂肪組織を摘出し、生理食塩水にて軽く洗浄後、重量を測定した。肝臓は冷却した 0.25M スクロース溶液にて灌流し、小葉の一部を採取して氷冷した。肝臓の一部は凍結切片を作製後、ホルマリン固定し、オイルレッド O 染色後、ヘマトキシリンにて染色を行った。残りの肝臓は、分析に供するまで -20°C にて保存した。

血漿中の TG、リン脂質、総コレステロール、AST・ALT 活性は、それぞれテストワコー（和光純薬工業株式会社）にて測定した。肝臓は、クロロホルム・メタノール溶液（2 : 1）を加えてホモジナイズ後、一晩抽出したものをろ過し、脂質抽出液を得た。得られた脂質抽出液は緩衝液にて希釈後、Zac Henly 変法にてコレステロール量を、また上記のキットにて TG 量の測定に供した。総脂質量は、重量法にて測定した。

なお動物実験は、「動物実験の飼育及び保管などに関する基準（昭和 55 年 3 月、総理府告示第 6 号）」を遵守し、岐阜女子大学動物実験委員会の承認（承認番号第 74 号・1）を得て行った。

2) 統計処理

結果はすべて平均値 $\pm$ 標準誤差で表し、Tukey の多重比較により危険率 5% にて有意性の判

定を行った。検定には Excel 統計（株式会社 社会情報サービス、東京）を用いた。

3 結果

飼育結果について Table 2 に示した。終体重、体重増加量は、HS 群で有意に低値を示し、一方総飼料摂取量は、HF 群および HS 群が C 群より有意に低値を示した。飼料効率について HF 群では有意に高値を、一方で HS 群では有意に低値を示した。肝臓重量は、HF、HS 群ともに大きく、特に HS 群では有意に高値を示し、外観は全体に他の群と比較して白色がかっていた。また、腎周辺脂肪量は各群間で有意差は見られなかったが HS で小さく、副睪丸周辺脂肪は HF 群で有意に高値を示した。

Table 2. Growth parameter and organ weight

Group	C	HF	HS
Final body weight (g)	305±5 ^a	287±7 ^{ab}	269±7 ^b
Body weight gain (g/28d)	178±4 ^a	162±8 ^{ab}	144±8 ^b
Food intake (g/28d)	453±9 ^a	355±9 ^c	405±14 ^b
Food efficiency (28d)	0.39±0.003 ^b	0.45±0.01 ^a	0.36±0.01 ^c
Liver weight (g)	7.02±0.95 ^b	9.29±0.35 ^{ab}	11.94±1.10 ^a
Kidney weight (g)	2.02±0.05 ^a	1.77±0.03 ^b	1.86±0.03 ^{ab}
Abdominal fat weight (g)	5.69±0.68	5.22±0.80	3.55±0.33
Epididymal fat weight (g)	3.60±0.34 ^b	5.29±0.31 ^a	3.35±0.12 ^b

Values are means ± standard error for six rats. Rats were received experimental diet (Table 1).
Values in the same row without common superscript letter are significantly different at $p<0.05$.

血漿中の脂質濃度および AST・ALT 活性を Table 3 に示した。総コレステロール濃度、HDL・コレステロール濃度、2 週目および 4 週目の TG 濃度、リン脂質濃度は、3 群間に有意な差は見られなかった。AST 活性は HS 群で最も高くなる傾向が見られ（C 群 vs HS 群, $p=0.06$ ）、ALT 活性は HS 群で他の 2 群よりも有意に高値を示した。

Table 3. Concentration of cholesterol, triglyceride, phospholipid and activity of AST and ALT in plasma

Group	C	HF	HS
Total cholesterol (mg/100 mL)	49.4±4.5	42.4±2.5	41.9±5.6
HDL-cholesterol (mg/100 mL)	27.9±3.1	18.5±1.2	21.2±3.8
TG (mg/100 mL) 2wk	100.7±10.5	89.7±8.1	82.3±6.1
TG (mg/100 mL) 4wk	97.3±7.0	91.0±12.6	83.0±9.6
Phospholipid (mg/100 mL)	111.5±6.9	99.1±4.7	93.6±8.5
AST activity (IU/L)	52.6±4.9 ^{ab}	50.5±3.5 ^b	90.3±17.2 ^a
ALT activity (IU/L)	14.0±0.7 ^b	16.5±1.3 ^b	29.7±4.9 ^a

Values are means ± standard error for six rats. Rats were received experimental diet (Table 1).
Values in the same row without common superscript letter are significantly different at $p<0.05$.

Table 4 に肝臓の総コレステロール量、TG 量および総脂質量の結果を示した。これらの量について HS 群で有意に高値を示しており、総コレステロール量と総脂質量はそれぞれコントロールの約 5 倍、TG 量は約 2 倍高値を示した。

Table 4. Hepatic contents of cholesterol, triglyceride and total lipid

Group	C	HF	HS
Cholesterol (mg/ Liver)	43.8±8.8 ^b	108.7±19.4 ^b	209.3±35.0 ^a
TG (g/ Liver)	1.1±0.2 ^b	2.1±0.2 ^a	2.3±0.3 ^a
Lipid (mg/Liver)	188.2±53.3 ^b	490.1±75.0 ^b	885.3±155.8 ^a

Values are means ± standard error for six rats. Rats were received experimental diet (Table 1).
Values in the same row without common superscript letter are significantly different at $p<0.05$.

Fig. 1 には、各群の肝臓組織切片染色画像の代表的なものを示した。すべての群で脂肪の沈着が確認できたが、特に HF 群と HS 群において顕著であった。これは Table 4 に示した脂質量の結果とも一致した。

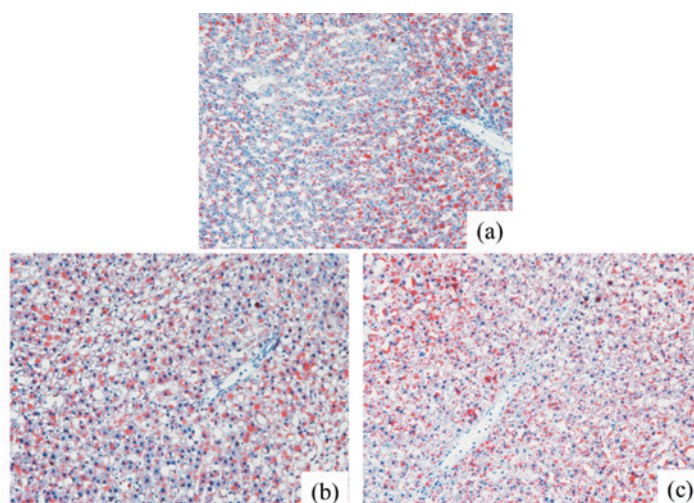


Fig. 1 Typical microphotographs of tissue specimens of the experimental rats

(a) the Control group, (b) the High fat group and (c) the High sucrose group; frozen tissues were sectioned, and then stained by Oil-red O before staining with hematoxylin ($\times 200$).

考察

脂肪肝は運動療法やカロリーや脂質の制限を行うことにより肝脂肪化の改善が認められるとされている。さらに特定の栄養素（ビタミン E など）の投与により改善することも報告されている⁶⁾。また、動物実験により脂肪肝を予防、改善するいくつかの食品成分が報告されている^{8-12), 13)}。しかしながらこれらの実験に使用された脂肪肝を誘導する栄養モデルの飼料組成はい

くらか異なり、また肝臓や血中の中性脂肪やコレステロール量にも差異がある。そのため我々は脂肪肝の予防や改善作用を有する食品成分の探索に向けて栄養モデルを作製する比較検討を行った。

本研究においては4週齢 Wistar ST ラット（雄性）を用いて、ラードを30%添加した高脂肪食もしくはスクロース含量を60%とした高スクロース食を28日間にわたって摂取させた。HF群およびHS群では肝臓重量が増加（Table 2）、肝臓脂質量が増加（Table 4 および Fig. 1）しており、各試験食の投与により肝臓脂肪の蓄積が認められた。オロト酸の投与は、血中への脂質分泌の阻害により肝臓への脂肪蓄積が誘導されることが示唆されている¹⁰⁾。今回 HF 群と HS 群はオロト酸を添加しているが、オロト酸の添加による有意差はみられなかったもののコントロールと比べると血中への脂質分泌が抑制されていると示唆され、それに伴って肝臓への脂肪蓄積が誘導されていると推察された。さらに HS 群においては HF 群と比較して肝臓への脂肪の蓄積がより強く誘導され、血漿 AST・ALT 活性の上昇から肝機能障害を惹き起こしていると推測された。飼料効率について HF 群では高値であったのに対して、HS 群では低値であり、また HF 群では腎周囲および副睪丸周囲脂肪の蓄積が認められた。これらのことから、肝臓への脂肪の蓄積誘導のモデルとしては高スクロース食投与が高脂肪食よりも効果的であると考えられ、一方で体脂肪の蓄積誘導はラードの投与が効果的であるといえる。また飼料の作製においてラードはべたつきのため扱いにくく、一方スクロース食は配合しやすいという利点もある。程度の違いはあるものの両飼料とも肝臓への脂肪蓄積を誘導したが、スクロースの過剰摂取による脂肪肝の発生には SREBP-1c (sterolregulatory element-binding protein-1c) の活性化が起因しているが、高脂肪食摂取では PPAR γ (peroxisomeproliferators-activated receptor γ) の活性化によるため、組織所見が同様に観察されたとしても発症機序が異なる¹⁴⁻¹⁶⁾。このことは脂肪肝の予防や改善に効果があるとされる食品成分の作用機序により効果に差異が生じると推測される。今後、これらの観点を踏まえ、その改善に対してより効果的に食品成分の探索のための脂肪肝誘導栄養モデルを選択することができる。

4 要約

肝臓の脂肪蓄積を抑制する食品成分の探索を目的とするうえで、脂肪肝を誘導する栄養モデルの実験動物が必要となる。そこで本研究では、高脂肪食および高スクロース食を投与した Wistar ST 系ラットにおいて、肝臓の脂質蓄積および血中脂質濃度について測定を行い、脂肪肝誘導モデル作成における適した飼料組成について検討を行った。HF 群と HS 群では、飼料摂取量が有意に低値を示し、飼料効率は HS 群が最も低値を示した。肝臓は HS 群で有意な肥大が見られ、外観も白色がかった。一方、HF 群では副睪丸周辺脂肪が他の群よりも有意に高値であった。血漿中の脂質濃度に関しては、3 群間に有意な差は見られなかったが、AST および ALT 活性は、HS 群で有意に高値を示し、肝機能障害が惹起されている可能性が推察された。肝臓の脂質濃度は、HS 群で最も高値を示し、肝臓の肥大も含めて脂肪肝が誘導されていることが推察され、HF 群よりもより脂肪肝が誘導されやすいと考えられた。

参考文献

- 1) 西原利治. 日本内科学会雑誌. 105, 2016, 406・410.
- 2) Lazo M, Hernaez R, Eberhardt MS, Bonekamp S, Kamel I, Guallar E, Koteish A, Brancati FL, Clark JM. *Am J Epidemiol.* 178, 2013, 38・45.
- 3) Younossi ZM, Stepanova M, Negro F, Hallaji S, Younossi Y, Lam B, Srishord M. *Medicine (Baltimore).* 91, 2012, 319・327.
- 4) Williams CD, Stengel J, Asike MI, Torres DM, Shaw J, Contreras M, Landt, CL, Harrison SA. *Gastroenterology.* 140, 2011, 124・131.
- 5) Farrell GC, and Larter CZ. *Hepatology.* 43, 2006, S99・S112.
- 6) 日本消化器病学会, NAFLD/NASH 診療ガイドライン 2014. 2014.
- 7) 那須民江, 内藤久雄. 日本衛生学雑誌. 70, 2015, 197・204.
- 8) 今坂俊介, 中山貞男, 小口勝司. 日本薬理学雑誌. 103, 1994, 67・78.
- 9) 大谷尚子, 片山徹之. 日本栄養・食糧学会誌. 50, 1997, 267・272.
- 10) 山本由喜子. 日本栄養・食糧学会誌. 54, 2001, 139・145.
- 11) 望月聡, 宮本安紀子, 萩原美和子, 竹嶋直樹, 大森俊郎. 日本醸造協会誌. 96, 2001, 559・563.
- 12) 大槻誠, 梅下和彦, 苔庵泰志, 西井孝文, 坂倉元, 柳田晃良, 古市幸生. 日本食品科学工学会誌. 53, 2006, 612・618.
- 13) 田中将行, 上甲孝志, 池田博明, 片岡二郎, 安原義, 古庄律. 日本食品保蔵科学会誌. 32, 2006, 135・140.
- 14) 山崎聖美. 大豆たん白研究. 13, 2010, 128・132.
- 15) Yamazaki T, Nakamori A, Sasaki E, Wada S, Ezaki O. *Hepatology.* 46, 2007, 1779・1790.
- 16) Inoue M, Ohtake T, Motomura W, Takahashi N, Hosoki Y, Miyoshi S, Suzuki Y, Saito H, Kohgo Y, Okumura T. *Biochem Biophys Res Commun.* 336, 2005, 215・222.