

## 非アルコール性脂肪肝炎(NASH)モデルマウスの開発と評価

Development and assessment of a non-alcoholic fat hepatitis mouse model

工藤 陽香<sup>1</sup>, 青江 誠一郎<sup>2</sup>

<sup>1</sup>大妻女子大学大学院人間文化研究科, <sup>2</sup>大妻女子大学家政学部

Haruka Kudo<sup>1</sup> and Seiichiro Aoe<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Graduate School of Studies in Human Culture, Otsuma Women's University

12 sanban-cho, Chiyoda-ku, Tokyo, Japan 102-8357

<sup>2</sup>Faculty of Home Economics, Otsuma Women's University

12 sanban-cho, Chiyoda-ku, Tokyo, Japan 102-8357

キーワード：脂肪肝, NASH, ストレプトゾトシン

Key words : Fatty liver, NASH, Streptozotocin

### 抄録

【目的及び方法】メタボリックシンドロームと共に近年急増しているのが、肝臓に過度な脂肪が蓄積する非アルコール性脂肪肝炎(NASH)である。NASHモデルマウスの作製では高脂肪食を与える方法が多かったが、飼育期間が長期にわたってしまうという問題点があった。そこで、ストレプトゾトシン(STZ)を生後に投与して発生させるモデルが開発され、人間と同じ進行で脂肪肝を進行することが出来るという論文が発表された。そこで、新生児雄マウスにSTZを投与してNASHモデルマウスを作製し、発症状態を検討した。【結果】体重は、STZ群でコントロール群よりも有意に低下した。しかし、肝臓重量はSTZ群でコントロール群よりも有意に増加した。Oil Red O染色による脂肪滴数は、STZ群で有意に増加した。血清脂質は、血中総コレステロール濃度が有意に増加した。【考察】肝臓重量が有意に増加しているにも関わらず体重が減少した理由としては、糖尿病の発症が進行したためだと思われる。本研究において、STZを新生児に投与すると、早期にNASHを発症することが確認された。

### 1. 序論

近年、食の欧米化や運動不足など生活習慣の乱れに伴い、肥満と診断される人が増えている。厚生労働省の平成22年の国民健康・栄養調査<sup>1)</sup>によると、肥満者(BMI $\geq$ 25)の割合は男性30.3%、女性21.5%となっており、前年度と比べるとほぼ横ばいであるが、健康日本21<sup>2)</sup>で掲げられている目標を大きく上回っている。2008年4月より、メタボリックシンドロームに着目した特定健診・特定保健指導が実施され、それに伴い、メタボリックシンドロームにおいて併発する頻度の高い非アルコール性脂肪肝(NAFLD)が着目され始めた。日本でのNAFLD患者数は約1000万人とされており、今後さらに増加していくと予測されている。NAFLDは、飲酒量がエタノール換算で20g以下/日で、アルコール性肝障害に類似した肝病変のことであり、単純性の脂肪肝と、炎症状態である非アルコール性

脂肪肝炎(NASH)が含まれている。診断には腹部エコーやCT、生検が用いられ、中心静脈周囲肝細胞を中心に1/3以上の肝細胞に脂肪沈着があれば脂肪肝と診断し、それに加えて肝細胞の風船様腫大、炎症性細胞浸潤、肝細胞周囲線維化などが認められるとNASHであると診断される。

NAFLDからNASHへの発生機序としては、現在two-hit theoryが広く支持されている。これは、まず肝細胞へのトリグリセリドの沈着が起こり(first hit)、そこに酸化ストレスやエンドトキシンなどの曝露(second hit)が加わり発症するというものである<sup>3)</sup>。つまり、長期間による食習慣の乱れは、肝臓へ脂質を沈着させ、インスリン抵抗性を惹起させ、耐糖能を悪化させる。また、肝臓では、酸化ストレスが増大し炎症が起こるとNASHの状態になり、進行すると不可逆性の肝硬変、肝細胞ガンへと発展する。それだけでなく、内臓脂肪から

放出された遊離脂肪酸とグリセロールは、門脈を介して肝臓に直接流入し、脂質異常症や高血糖などを引き起こし、インスリン抵抗性につながる可能性が示唆されている<sup>4)</sup>。

これまでに、NASH モデルのマウスの作成はいくつかの方法がある。代表的なものは、メチオニン・コリン欠乏(MCD)食である。これは、肝臓から組織に脂質を輸送するリポたんぱく質の合成ができなくなるため、肝臓に脂肪が蓄積し、脂肪肝になるというメカニズムである。ところが、MCD 食は体重減少が起きることが問題点として挙げられる。それに対し、高脂肪食を与え続けるとメタボリックシンドロームの症状が現れると共に、脂肪肝になり、NASH を発症させることができるが、NASH を発症させるまで飼育するには24週間と時間がかかることが問題である。

ストレプトゾトシン(STZ)とは、膵臓のβ細胞を破壊することで糖尿病モデルを作成するとき用いられる試薬である。しかし、先行研究により、このSTZを仔マウスに注射することによって人間と同じ進行で脂肪肝を進行することが出来ることが報告された。この方法では、6週齢で脂肪肝になり、8週齢で風船様腫大や炎症が発生する。そこで、本研究ではSTZを新生児マウスに投与することによって、体重や血中脂質の変化、また6週齢時での脂肪肝の発症程度について検討を行った。

## 2. 方法

### 2.1. 動物実験

生後2日目のC57BL/6J新生児雄マウス(日本チャールズ・リバー株式会社)に、pH4.0に調製したクエン酸緩衝液とストレプトゾトシン(和光純薬工業)を5mg/mlになるように溶解し、調整したストレプトゾトシン試薬を0.3ml皮下注射した。コントロール群にはクエン酸緩衝液を0.3ml皮下注射した。新生児は離乳後(生後4週)、HFD32(日本クレア)を2週間摂取させた。飼育期間中、飼料と水は自由摂取とした。なお、クエン酸緩衝液を投与した群をコントロール群(n=5)、STZを投与した群をSTZ群(n=10)とする。

### 2.2. 動物解剖とサンプル採取

解剖は、エーテル麻酔下で開腹し、心臓より採血、肝臓を摘出し、重量を測定した。血液は氷中保存し、6000rpm、15分間、4℃で遠心分離し、血清を採り、-80℃で保存した。

## 2.3. 分析方法

### (1)血清分析

採取した血液は、血清を分離し、トリグリセリド、遊離脂肪酸、総コレステロール濃度を酵素法にて分析した。トリグリセリドの定量には「トリグリセライドE-テストワコー」、遊離脂肪酸の定量には「NEFA C-テストワコー」、総コレステロール濃度の定量には「コレステロールE-テストワコー」(いずれも和光純薬工業株式会社)を使用した。

### (2)肝細胞の脂肪滴数の計測

摘出された肝臓は、中性ホルマリン液中で固定した後、栄養・病理学研究所にOil Red O染色を委託した。染色後の各肝臓切片は、光学顕微鏡下で写真撮影した。切片の画像は、Win Roof(ver6.0.1, Mitani Corp)を用いて、1mm<sup>2</sup>当たりの細胞数を計測した。

## 2.4. 統計解析

すべての測定結果は平均±標準偏差で示した。平均値の差の検定は、Studentのt検定を用いた。統計解析はJMP 9.0.0(SAS Institute社)を用いた。

## 3. 結果

### (1)成長結果および臓器重量

最終体重は、STZ群でコントロール群よりも有意に低かった。しかし、肝臓重量はSTZ群でコントロール群よりも有意に増加した(Table1)。

Table1 最終体重と肝臓重量

	コントロール群	STZ群
最終体重(g)	19.5±1.7	17.4±1.3 *
肝臓重量(g)	1.1±0.1	1.3±0.2 *

\*はコントロール群と比べて有意差があることを示す。(p<0.05)

### (2)組織染色および血清分析

Oil Red O染色による脂肪滴数は、STZ群で有意に増加した。

血清脂質は、血清トリグリセリド濃度、血清遊離脂肪酸濃度について有意差は見られなかったが、血清総コレステロール濃度についてはSTZ群でコントロール群よりも有意に増加した。

#### 4. 考察

本実験は、生後2日目の新生児雄マウスにSTZを投与し、4週齢から高脂肪食を与えることによるNASHモデルマウスの作成し、発症状況を検討した。最終体重は、STZ群がコントロール群と比べて有意に低下した。これは、糖尿病による体重減少が原因だと思われる。STZを投与すると膵臓のβ細胞が破壊されることによって、インスリンの分泌が減少する。すると、糖が組織に取り込まない状態が継続する。それが慢性化すると、組織のエネルギー不足が発生し、脂肪や筋肉からエネルギーを得ようとするため、体重減少が発生することがある。しかし、肝臓脂質の蓄積とは、STZ群がコントロール群と比べて有意に増加した。Fujii<sup>9)</sup>らの報告によると、持続的な食餌性脂質は、脂質生成と脂肪酸酸化の増加に伴う肝臓脂質を沈着させ、酸化ストレスを引き起こすと考察している。STZによる糖尿病が発症しているにも関わらず、持続的に高脂肪食を摂取しているため、蓄積とOil Red O染色による脂肪滴数が有意に増加したと考える。血中コレステロール濃度の有意な増加に関しては、高脂肪食の継続的な摂取と、インスリン分泌の減少によってホルモン感受性リパーゼが優位となり、脂肪組織が分解されて脂質異常

症が起きているためであると思われる。

STZを投与することによるNASHのメカニズムとしては、高脂肪食を与える事による脂肪の蓄積と、STZの投与によって糖尿病が早期に発症したことによる酸化ストレスの蓄積によるものと示唆された。

#### 付記

本研究は、大妻女子大学人間生活文化研究所「共同研究プロジェクト」(D026)の助成を受けたものである。

#### 引用文献

- 1) 厚生労働省健康局総務課生活習慣病対策室. 平成23年国民健康・栄養調査の概要. 2011.
- 2) 健康日本21. 厚生労働省.
- 3) Day CP, James OF: Steatohepatitis: a tale of two 'hits?' *Gastroenterology*. 1998, 114(4): 842-855
- 4) 中村正. 肥満とメタボリックシンドローム. 生活習慣病の最前線. 中山書店, 2005, P.15.
- 5) Fujii M et al., A murine model for non-alcoholic steatohepatitis showing evidence of association between diabetes and hepatocellular carcinoma. *Med Mol Morphol*. 2013 Feb 22.

#### Abstract

The occurrence of non-alcoholic fat hepatitis (NASH) is increasing: it is a disease associated with metabolic syndrome, and leads to excessive fat accumulation in the liver. Several methods concerned with the development of a NASH mouse model have been reported, however, long-term feeding of a high-fat diet is required. Recently, a NASH mouse model produced by injection of STZ solution to new-born pups was reported. We examined this method and assessed the development of NASH parameters: body weight in the STZ group was significantly lower than the control group, however, liver weight in the STZ group was significantly higher than the control group. The average area stained with Oil Red O in the STZ group was significantly greater than the control group. Serum total cholesterol levels in the STZ group were significantly higher than the control group. It is considered that the rapidly developed diabetes in the new-born pups caused growth retardation and excess liver lipid accumulation, suggesting STZ injection causes NASH development at an early age.

(受付日: 2014年6月30日, 受理日: 2014年7月9日)

工藤 陽香 (くどう はるか)

現職：大妻女子大学大学院人間文化研究科博士後期課程 1 年

大妻女子大学大学院人間文化研究科修士課程修了。

専門は栄養生化学。現在は「マウスの耐糖能，脂質蓄積に及ぼすホエイペプチドとアミノ酸の影響」について研究を行っている。