

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月24日現在

機関番号：35409

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2011

課題番号：20700596

研究課題名（和文）C型慢性肝疾患の亜鉛および多価不飽和脂肪酸による病態進展抑制効果に関する研究

研究課題名（英文）Effect of zinc and polyunsaturated fatty acid on chronic hepatitis C.

研究代表者

村上 泰子（MURAKAMI YASUKO）

福山大学・生命工学部・講師

研究者番号：90326413

研究成果の概要（和文）：

C型慢性肝炎に代表される炎症性の慢性肝疾患の病態進展への亜鉛やエイコサペンタエン酸（EPA）補充の効果を検討するために、動物モデル等を用いた実験において、肝障害、肝線維化、抗酸化系への影響を検討した。今回用いた慢性肝疾患動物モデルにおいては亜鉛や EPA 補充による明らかな線維化抑制効果は観察されなかったが、EPA 補充によりトランスアミナーゼや肝オレイン酸量の有意な減少が観察されるなど、肝の炎症や肝脂質代謝の改善に有効であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We investigated the effects of zinc and eicosapentaenoic acid (EPA) supplementation on the liver injury, fibrosis and antioxidant capacity in animal chronic liver disease model. EPA supplementation improved serum transaminase levels and hepatic oleic acid accumulation. These findings may indicate that EPA supplementation improves liver inflammation and hepatic lipid metabolism in chronic liver disease patients.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：慢性肝炎、亜鉛、エイコサペンタエン酸

1. 研究開始当初の背景

C型慢性肝疾患インターフェロン無効例や今後患者数の増加が危惧される非アルコール性脂肪性肝炎（NASH）例に対して将来的に肝硬変、肝癌への進展を阻止する措置は本邦の重要な課題である。これら慢性肝疾患には酸化ストレスの亢進が存在しており、肝炎、肝線維化、発癌といった病態進展へ関与して

いることが知られている。我々は以前の研究において慢性肝疾患に存在する脂質代謝異常と、抗酸化物質、n-3系多価不飽和脂肪酸（PUFA）補給による病態改善効果を確認している。

一方、慢性肝疾患では病態の進展に伴い低亜鉛状態が生じるが、低亜鉛状態は、肝酸化傷害の増大、肝星細胞の活性化によるコラー

ゲン産生の増加、アンモニア代謝障害を生じさせ、線維化や窒素代謝障害を進行させる一因と考えられている。

2. 研究の目的

我々は先に、ペグインターフェロン・リバビリン併用療法を施行するC型慢性肝炎患者に対し、亜鉛とビタミンE・Cの同時投与を行い、低亜鉛亜鉛の改善に伴い血清ALT値が全症例で基準値内に改善することを確認している。そこでこれらn-3系PUFAや亜鉛の効果をさらに調査することにより、慢性肝疾患における、より効果的な栄養療法の構築に役立てられると考えた。

本研究の目的は、動物・細胞実験において亜鉛欠乏時および慢性肝障害モデルにおける亜鉛、n-3系脂質補給が、抗酸化系、線維化系、肝障害に及ぼす影響を検討することである。併せてC型慢性肝炎と似通った病態進展を示すNASH患者への抗酸化ビタミン、EPA投与の効果についても検討する。

3. 研究の方法

(1) 低亜鉛食摂餌ラットにおける亜鉛および魚油補給、薬剤性肝障害が抗酸化系に及ぼす影響

低亜鉛摂餌ラットにジメチルニトロサミン(DMN、30mg/kg BW、3 times/week)を2週間投与し肝線維化を誘発させ、低亜鉛食、低亜鉛-高EPA食、高亜鉛食、高亜鉛-高EPA食の影響を検討した。

(2) 株化肝星細胞に及ぼす亜鉛動態の影響

ヒト株化肝星細胞(HSC)(L190細胞)およびラットより分離したHSCにおいて亜鉛キレート剤(DTPAまたはTPEN)200 μ Mと硫酸亜鉛を単独あるいは同時添加して培養し、肝星細胞の活性化に及ぼす影響を検討した。

(3) 慢性肝疾患モデルに対する亜鉛およびEPA補充の効果

コリン欠乏高脂肪(CDHF)食を4週間摂食させたラットに対し、その後6週間の亜硝酸塩投与(30mg/kg/day)を行い、肝炎・肝線維化を誘発させる。この間の亜鉛、EPA補給の違いが各指標に与える影響を検討した。

(4) NASH患者への抗酸化ビタミンおよびEPA補給の効果

NASH患者に抗酸化ビタミン(ビタミンE: 300mg/day、ビタミンC: 600mg/day)およびEPA(1,800 mg/day)の補充療法を行い、病態への影響を検討した。

4. 研究成果

(1) 低亜鉛食摂餌ラットにおける亜鉛および魚油補給、薬剤性肝障害が抗酸化系に及ぼ

す影響

低亜鉛食摂餌ラットにおける薬剤性(DMN)肝障害では低亜鉛摂餌群において、EPA補給は肝障害指標である血清ALT値の減少($P<0.1$)および、血清SOD活性の維持($P<0.05$)に関与していた。亜鉛補給による明らかな差異は認められなかったが、活性化伊東細胞に特異的に発現される α SMAタンパク質のイムノブローディング陽性バンドのシグナルは低亜鉛食>コントロール食>高亜鉛食の傾向がみられた。

(2) 株化肝星細胞に及ぼす亜鉛動態の影響

ラットより分離したHSCでは非膜透過性亜鉛キレート剤であるDTPA存在下で活性型タンパク質分解酵素Matrix Metalloproteinase(MMP-9)の出現が観察され、亜鉛濃度がECM分解系に影響を及ぼすことが示唆された。MMP-9は基底膜のIV型コラーゲンを主な基質として働き、炎症時におけるECMリモデリング、細胞浸潤などにも関与することから、亜鉛欠乏状態が肝線維化においてHSCによる基底膜コラーゲンの分解や遊走性を高めることで障害部位への移動及びHSCの分散を引き起こす可能性が考察された。

(3) 慢性肝疾患モデルに対する亜鉛およびEPA補充の効果

コリン欠乏高脂肪食摂餌ラットに対し、亜硝酸塩を腹腔内投与し、慢性肝障害(CH)モデルを作成し、①コントロール群、②CH群、③EPA補給群、④EPA・亜鉛補給群に割り付け検討を行った。EPA補給には高EPA含有油脂(EPA-28、マルハニチロ)を2%飼料添加した。亜鉛補給に亜鉛含有量が通常試料の約10倍(342mg/kg試料)となるように炭酸亜鉛添加した。

体重、肝重量および主な血液生化学検査値を表1に示す。CH群、EPA補給群、EPA・亜鉛補給群の比較において体重増加率や肝重量に明らかな差は認められなかった。しかし、EPA補給を行ったEPA補給群、EPA・亜鉛補給群ではCH群に対し、血清総タンパク濃度の低下が抑制されていた。EPA補給群およびEPA・亜鉛補給群ではCH群に対し、血清AST値は有意の低値を示し($p<0.05$ 、図1)、EPAによる肝炎症抑制効果が示唆された。血清亜鉛濃度はEPA・亜鉛補給群で高値であり、血清亜鉛濃度はCH群、EPA補給群、EPA・亜鉛補給群で血清アルブミン濃度と有意の正の相関を示した。

肝線維化の組織学的観察、ならびに線維化関連遺伝子のmRNA発現において、EPAおよび亜鉛補給の明らかな効果は観察されなかった(図2)。EPA補給群、EPA・亜鉛補給群ではCH群で観察された抗酸化指標の低下、過酸化脂質指標の上昇が抑制されていたが、

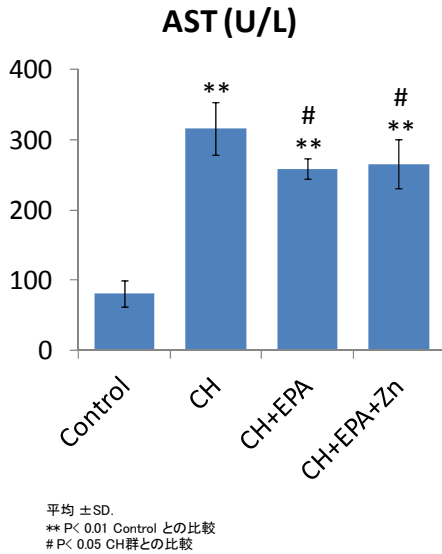
意な変化ではなかった。

表 1 体重、肝重量、血液生化学検査値の比較

	Control (n=6)	CH (n=6)	CH+EPA (n=6)	CH+ EPA+ Zn (n=6)
Change in body weight (%)	111.1 ± 14.3	41.0 ± 9.4**	47.3 ± 111.2**	41.0 ± 7.9**
Liver weight (g)	9.1 ± 0.6	8.9 ± 2.3	11.2 ± 1.9	11.1 ± 1.6
Liver/body weight (%)	2.7 ± 0.1	3.9 ± 0.7**	4.6 ± 0.5**	4.7 ± 0.6**
Total protein (g/dL)	6.3 ± 0.3	4.5 ± 0.2**	5.0 ± 0.5**#	5.2 ± 0.5**#
Albumin (g/dL)	3.7 ± 0.1	2.5 ± 0.2**	2.7 ± 0.3**	2.8 ± 0.3**
BTR	6.52 ± 0.66	2.17 ± 0.29**	2.81 ± 0.68**	2.64 ± 0.63**
Zinc (μg/dL)	189 ± 10	129 ± 11**	129 ± 16**	195 ± 42#

平均 ± SD. BTR :分岐鎖アミノ酸/チロシンモル比.
** P< 0.01 Control との比較
* P< 0.05 Control との比較
P< 0.05 CH群との比較

図 1 肝炎症マーカーの比較



肝 PL 脂肪酸組成の検討では EPA 補給を行った 2 群では CH 群に比し、n-3 系脂肪酸の上昇と伴に n-6 系脂質およびオレイン酸 (18:1 n-9) の有意な低下が確認された (表 2)。肝 TG 脂肪酸量においても EPA 補給はオレイン酸を主体とする一価不飽和脂肪酸量を減少させていた。

慢性肝障害動物モデルの本検討では、EPA 補給を行った群で血清 AST の改善が観察された一方で、肝線維化系に対する明らかな効果は認められなかった。肝脂肪酸測定により、EPA 投与がコリン欠乏による脂肪蓄積代謝系

に大きな影響を与えることが観察され、今後の詳細な検討の必要性が示唆された。

図 2 肝線維化関連遺伝子 mRNA 発現量

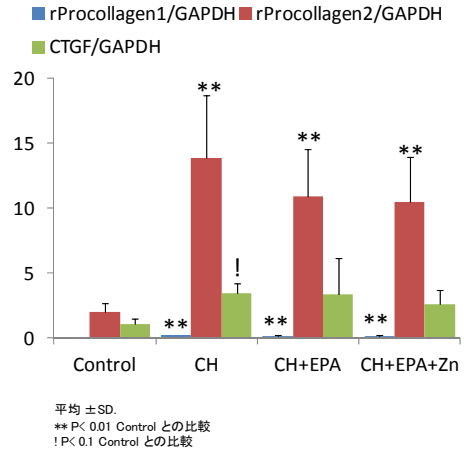
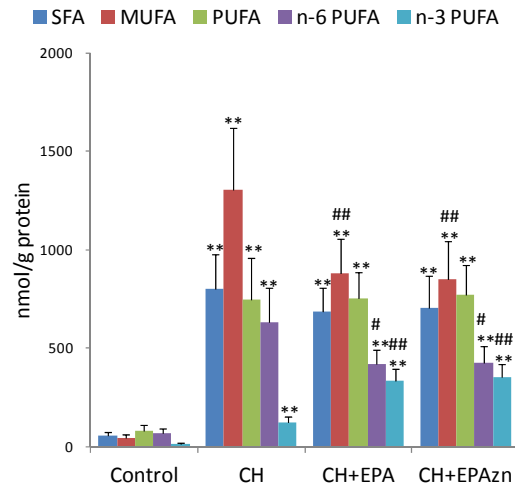


表 2 肝臓リン脂質における主要な脂肪酸組成 (mol%)

	CONTROL	CH	CH+EPA	CH+EPA+Zn
16:0	19.64 ± 0.60	20.60 ± 0.76	21.31 ± 0.70**	20.61 ± 0.55
18:0	24.96 ± 0.39	20.37 ± 0.64**	21.33 ± 0.64**	20.62 ± 0.70**
18:1n-9	3.00 ± 0.35	15.83 ± 0.74**	11.57 ± 0.83***#	12.42 ± 1.46***#
18:2n-6	12.16 ± 0.87	7.97 ± 0.56**	8.40 ± 0.52**	8.59 ± 0.50**
20:4n-6	26.05 ± 1.13	19.19 ± 1.11**	14.63 ± 0.52***#	14.18 ± 0.57***#
20:5n-3	0.24 ± 0.04	0.20 ± 0.05	1.66 ± 0.13***#	1.73 ± 0.09***#
22:6n-3	6.83 ± 0.36	6.85 ± 0.42	11.48 ± 0.41***#	11.21 ± 0.77***#

平均 ± SD.
** P< 0.01 Control との比較
P< 0.01 CH群との比較

図 3 EPA 補給の肝臓中性脂肪脂肪酸量に与える影響 (nmol/ g protein)



(4)NASH 患者への抗酸化ビタミンおよび EPA 補給の効果

NASH 患者を食事指導 (Diet 群)、抗酸化ビタミン投与 (Vit 群)、抗酸化ビタミン+EPA 投与 (EPA 群) に割り付け、治療開始時と 3 ヶ月後で比較検討を行ったところ、血清 AST、ALT 値は Vit 群で低下傾向を示した。TNF- α は Vit 群で低下傾向を示したが、他の群では変化は見られなかった。結果から、NASH 患者において長期的に適正体重を目指した減量、特に体脂肪率の減少は重要と考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① 川上貴代、村上泰子、富岡加代子、沖田美佐子、非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) 患者における食事療法と抗酸化ビタミンおよび EPA 投与の影響、日本臨床栄養学雑誌、31 (1) 2010、32-38、査読有

[学会発表] (計 3 件)

- ① T. Kawakami, Y. Murakami, K. Tomioka, M. Tabuchi, K. Katayama, M. Okita. Supplementation of antioxidative vitamins treatment for nonalcoholic steatohepatitis. 7th Asia Pacific Conference on Clinical Nutrition. June 7, 2011. Bangkok, Thailand
- ② 川上貴代、片山敬子、村上泰子、富岡加代子、田淵真愉美、株化肝星細胞活性化に及ぼす亜鉛動態の影響、第 65 回日本栄養・食糧学会大会、2011 年 5 月 14 日、東京
- ③ 片山敬子、村上泰子 他、肝線維化モデルラットにおける亜鉛投与の影響、第 63 回日本栄養・食糧学会大会、2009 年 5 月 21 日、長崎市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村上 泰子 (MURAKAMI YASUKO)
福山大学・生命工学部・講師
研究者番号：90326413

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし