

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 26 日現在

機関番号：24302

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500985

研究課題名(和文) 過栄養性脂肪肝の進行に対する栄養成分の機能性

研究課題名(英文) Functionality of the nutrients for attenuation of fatty liver disease caused by overfeeding.

研究代表者

桑波田 雅士 (Kawahata, Masashi)

京都府立大学・生命環境科学研究科(系)・准教授

研究者番号：30304512

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)は、メタボリックシンドロームの肝臓における表現型であり、肥満や糖尿病を合併する患者が多い。さらに肝線維化の進展は、その病態を非アルコール性脂肪肝炎(NASH)へと悪化させる。

本研究では、ゼラチン加水分解物(gelatin hydrolysate: GH)の摂取が四塩化炭素連続投与による慢性肝障害モデルラットの肝線維化を抑制すること、ならびにストレプトゾトシン投与による糖尿病モデルラットの血糖値上昇を抑制することを見出した。

GHはメタボリックシンドロームや脂肪肝の進展を抑制する機能性成分として有効かもしれない。

研究成果の概要(英文)：The non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is a phenotype in the livers of the metabolic syndrome. The patients are often complicated with obesity and diabetes. It is known that progression of liver fibrosis deteriorates NAFLD to non-alcoholic steatohepatitis (NASH).

Present study found that supplementation of gelatin hydrolysate (GH) delayed hepatic fibrosis in rats with chronic liver disease. Furthermore, GH attenuated an increase in blood glucose level in rats with diabetes.

The GH may be effective as a functional ingredient controlling progression of metabolic syndrome and the fatty liver.

研究分野：病態栄養学

キーワード：ゼラチン 加水分解物 肝線維化 血糖値

1. 研究開始当初の背景

肥満人口、糖尿病患者の増加に伴い、着実に非アルコール性脂肪性肝疾患 (nonalcoholic fatty liver disease: NAFLD) も増加し、患者数は約 1,000 万人といわれる。さらに NAFLD は肝線維化の進展に伴い脂肪肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis: NASH) 肝硬変へと進行し、さらには肝細胞癌を発生させることから、重大な社会問題となっている。

NAFLD 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、NASH への進行も含め、その発症は two-hit theory により説明されている。すなわち内臓脂肪型肥満に伴うインスリン抵抗性および高インスリン血症などが原因で脂肪肝が発症する (1st hit)、さらに肝臓に対する酸化ストレスの亢進などが引き金となり (2nd hit)、炎症反応やアポトーシスの過剰誘導が起こる。その結果、線維化を伴う NASH に進行すると考えられている。メカニズムの解明は治療への応用にもつながり、薬物療法におけるインスリン抵抗性改善薬の投与、抗酸化療法としてのビタミン投与や瀉血 (除鉄) が効果をあげている。しかしながら食事療法に関しては、未だ確立されていない部分も多い。

2. 研究の目的

脂肪肝患者に対する食生活指導では肥満是正、内臓脂肪の減量を目標とした食事療法と運動療法が基本とされており、病態の進行抑制効果も実証されている。患者の多くに肥満が認められることから、指導者側は適正カロリー摂取を目標に食事制限の指導をおこなうケースが多いと考える。脂肪肝に対し抑制効果を示す栄養成分を見出せば、摂取を促す指導もあわせて実施できることとなり、患者の QOL や治療意欲の向上にもつながることが予想される。しかしながら日本肝臓学会編集の 2010 年診療ガイドでは、食事療法の重要性は述べられているが、栄養成分に関しては薬物療法の項目に抗酸化ビタミンの応用が記載されているにすぎない。本研究では NAFLD 食事療法への応用を目標とし、まず、動物実験レベルにおいて脂肪肝進行を抑制する栄養成分を探索すること、ならびに病態評価マーカーを同定することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) たんぱく質加水分解物摂取が四塩化炭素投与による慢性肝障害モデルラットの病態進行に及ぼす影響

実験動物として SD 系雄性ラットを用いた。四塩化炭素とオリーブオイルの等量混合液を週 2 回、皮下投与 (1.0 ml/kg 体重) することで、慢性肝障害を誘発させた。飼育期間中、ラットは 3 群に分け、食事たんぱく質として、20%カゼイン食、16%カゼイン+4%小麦グルテン加水分解物食、あるいは 16%カゼ

イン+4%ゼラチン加水分解物 (gelatin hydrolysate: GH) 食のいずれかを給餌し、11 週間飼育した。毎週、尾静脈採血を実施し、血液生化学検査をおこなった。11 週間後、深麻酔により安楽死させ、血漿および肝臓を実験に供した。肝切片の組織学的検討、肝臓中の可溶性コラーゲン含有量の検討をおこない、病態進行の程度を比較検討した。

(2) 高脂肪、高コレステロール食で飼育した Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) ラットの病態に及ぼす GH 摂取の影響

実験動物として、過食に起因する肥満を呈し、メタボリックシンドロームあるいは 2 型糖尿病モデル動物として使用される OLETF ラットを用いた。7 週齢の OLETF ラットを 20%カゼイン・5%脂肪含有飼料で維持する対照群、16%カゼイン・4%GH・5%脂肪含有飼料で維持する GH 群、20%カゼイン・25%脂肪・5%コレステロール含有飼料で維持する高脂肪高コレステロール群、および 16%カゼイン・4%GH・25%脂肪・5%コレステロール含有飼料で維持する GH 高脂肪高コレステロール群の 4 群に分けた。それぞれの飼料で飼育をはじめ、毎週、尾静脈採血を実施し、血液生化学検査をおこなった。13 週間飼育したのち、深麻酔により安楽死させ、肝臓を採取した。肝切片の組織学的検討をおこない、GH 摂取の影響を検討した。

(3) ストレプトゾトシン誘発性糖尿病モデルラットの病態に及ぼす GH 摂取の影響

8 週齢の SD 系雄性ラットに対し、0.05M クエン酸緩衝液 (pH4.5) に溶解したストレプトゾトシン溶液を頸静脈へ投与することで (45 mg/ml/kg 体重) 糖尿病を誘発した。ストレプトゾトシン投与後から 20%カゼイン食で維持した対照群、12%カゼイン+8%GH 食で維持した GH 群に分け、飼育した。1 週間後、深麻酔により安楽死させ、血漿および膵臓を実験に供した。血漿は生化学検査に供し、膵臓は組織学的検討に供した。また一部の実験動物は、飼育 1 週間後に 1 晩絶食させ、翌日、40%グルコース溶液を胃内投与することで (5 mL/kg 体重) 経口糖負荷試験をおこなった。経時的に尾静脈採血をおこない、血漿グルコース濃度およびインスリン濃度を測定した。

4. 研究成果

(1) GH の摂取は、四塩化炭素連続投与による慢性肝障害モデルラットの病態進行を抑制する。

肝障害の指標とされる血漿アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) 活性およびアラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) 活性は、実験開始後より全ての群で上昇が認められたが、対照群や小麦グルテン加水分解物添加食で維持した群と比較して、

GH 添加食で維持した群では、常に低値を示した。飼育期間中の摂餌量、体重変化や解剖後の肝臓重量に差は認められなかった。肝臓切片のアザン染色により、病理組織学的な検討をおこなったところ、他群と比較して GH 群では線維化が軽度であった。さらに肝臓中の可溶性コラーゲン量を測定したところ、対照群と比較して、GH 群では有意に低値を示した。以上の結果から、GH の摂取は、四塩化炭素投与による慢性炎症に伴う肝線維化の進行を抑制する可能性を見出した。すなわち、線維化を伴う NASH の発症に対し、GH は予防効果あるいは進行抑制効果を示す可能性が示唆された。

(2) 4% GH の添加は、自然発症糖尿病モデル (OLETF) ラットへの高脂肪、高コレステロール食給餌による脂肪肝発症を抑制できなかった。

13 週間の飼育期間中、体重、血漿 AST 活性、ALT 活性および血漿グルコース濃度に関し、GH 添加による影響は認められなかった。また、肝臓切片を用いた組織学的検討では、高脂肪、高コレステロール食を摂取した群で重度の脂肪蓄積による脂肪肝が認められたが、GH 添加による影響は認められなかった。今回の実験において、飼料中の脂肪およびコレステロール含有量、および GH 添加量に関する検討は実施しなかった。脂肪、コレステロール含有量が高すぎた、あるいは脂肪、コレステロール含有量に対する GH 添加量が少なすぎた結果、GH による効果を確認できなかった可能性も考えられた。しかしながら本実験系においては、GH 摂取による脂肪肝抑制効果は見出せなかった。

(3) GH の摂取は、ストレプトゾトシン誘発性糖尿病モデルラットの血糖値上昇を抑制する。

GH 摂取がインスリン作用に及ぼす影響を検討する目的で、ストレプトゾトシン誘発性糖尿病モデルラットを 8% GH 添加食で維持したところ、対照群と比較して、血糖値が有意に低値を示した。膵臓の組織学的検討を実施したところ、対照群と比較して、GH 群で単位面積あたりのランゲルハンス島の数が多く観察され、その面積比も大きかった。また経口糖負荷試験を実施したところ、対照群と比較して、GH 群の糖負荷 90 分後および 120 分後の血糖値が有意に低値を示した。また測定時間を通じ、糖負荷後の血漿インスリン濃度が GH 群で高値を示す傾向が認められた。以上の結果から、GH の摂取が、ストレプトゾトシン投与による膵細胞の障害を軽減する可能性を見出した。すなわち GH は、メタボリックシンドロームや境界型糖尿病に認められる膵機能の低下に対する予防効果を示す可能性が示唆された。

本研究では、過栄養性脂肪肝の発症を GH

が抑制するという結果を得るまでにはいたらなかった。しかしながら、肝線維化の抑制や膵細胞の機能低下を抑制する機能性成分としての GH の可能性を見出すことができた。

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 7 件)

桑波田雅士 アミノ酸・ペプチドの病態栄養管理への応用に関する研究、アミノ酸研究 (日本アミノ酸学会学会誌)、査読有り、8 巻、2014 年、p 101-106.

Sato T, Yasuzawa T, Kuwahata M, et al. (他 6 名、8 番目) Type2 diabetic conditions in Otsuka long-evans tokushima fatty rats are ameliorated by 5-aminolevulinic acid, Nutr Res, 査読有り、34 巻、2014 年、p544-551, DOI:10.1016/j.nutres.2014.04.013

Kobayashi Y, Hattori M, Kuwahata M, et al. (他 8 名、7 番目) Assessment of daily food and nutrient intake in Japanese type2 diabetes mellitus patients using dietary reference intakes, Nutrients, 査読有り、5 巻、2013 年、p2276-2288, DOI: 10.3390/nu5072276

Kuwahata M, Kubota H, Kanouchi H, et al. (他 4 名、1 番目) Supplementation with branched-chain amino acids attenuates hepatic apoptosis in rats with chronic liver disease, Nutr Res, 査読有り、32 巻、2012 年、p522-529, DOI:10.1016/j.nutres.2012.06.007

[学会発表](計 8 件)

小林ゆき子、桑波田雅士、他 非アルコール性脂肪性肝疾患および糖尿病患者における食品摂取の相違点、第 18 回日本病態栄養学会年次学術集会、2015 年 1 月 10 日～1 月 11 日、国立京都国際会館 (京都府・京都市)

松本亜衣、桑波田雅士、他 STZ 誘発性糖尿病モデルラットにおけるゼラチン加水分解物摂取の影響、第 68 回日本栄養・食糧学会大会、2014 年 5 月 30 日～6 月 1 日、酪農学園大学 (北海道・江別市)

松本亜衣、桑波田雅士、他 ゼラチン加水分解物摂取が四塩化炭素投与による慢性肝障害の進行に及ぼす影響、第 67 回日本栄養・食糧学会大会、2013 年 5 月 24 日～5 月 26 日、名古屋大学 (愛知県・名古屋市)

桑波田雅士、松本亜衣、他 慢性肝障害
モデルラットの肝線維化に及ぼすゼラチ
ン加水分解物摂取の影響、第 16 回日本病
態栄養学会年次学術集会、2013 年 1 月 12
日～1 月 13 日、国立京都国際会館（京都
府・京都市）

〔図書〕(計 1 件)

Kuwahata M, et al. Humana Press,
Branched chain amino acids in clinical
nutrition volume2, 2015 年、333 (担当
pp159～168)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

桑波田 雅士(KUWAHATA, MASASHI)
京都府立大学・生命環境科学研究科・准教
授

研究者番号：30304512