

食餌性脂肪肝発症ラットにおよぼす食餌組成 および運動負荷の影響

谷 由 美 子・宮 地 成 子

Effects of Diet Composition and Forced Exercise on Lipids of Liver and Serum in Dietetic Fatty Liver Rats

Y. TANI and S. MIYACHI

緒 言

脂肪肝には飢餓，糖尿病のような糖質の利用不十分による生理的な脂肪肝と，コリン，メチオニン，イノシットなどの不足や，脂肪の過剰摂取およびコレステロールの多食などの食事異常による脂肪肝および，ヒ素，黄リン，四塩化炭素，クロロホルム，アルコールなどによる中毒性脂肪肝があり，肝脂肪の蓄積抑制効果については，コリン，イノシット，メチオニンなどの添加，食餌脂肪および食餌タンパク質の種類，量の検討はされているが^{1)~4)}，脂肪肝形成後の食餌組成による回復効果についての報告はあまりみられない．一方，運動負荷によって肝臓の総脂質，トリグリセリド，血清のコレステロール，トリグリセリドなどが減少することは多く報告されている^{5)~9)}．そこで私達は，食餌性脂肪肝を形成したラットに対して，一般に肝障害の治療に効果があるとされているタンパク食による回復効果と合わせて運動負荷の効果も検討するため本研究を行った．

実 験 方 法

1. 実験動物および飼育方法

4週齢のWistar系雄ラット30匹を6日間予備飼育後，1%コレステロール添加脂肪食(ラード20%，エネルギー比40%)を20日間投与し，うち10匹を解剖して(FL区)肝および血清脂質を測定し，脂肪肝形成を確認した．残り20匹をひき続き1%コレステロール添加脂肪食投与非運動区(F-NE区)，1%コレステロール添加脂肪食投与運動区(F-E区)，ラードの代わりにコーンオイル4%(エネルギー比10%)としたタンパク食(カゼイン29%，エネルギー比30%)投与非運動区(P-NE区)，タンパク食投与運動区(P-E区)の4区各5匹ずつにわけ，7週齢より62日間飼育して16週齢に解剖した．飼育は温度 25 ± 2 ℃，湿度55~65%の自然採光下で行い運動区は毎日強制的にトレッドミル走(15m/分)を30分負荷した．解剖は絶食16時間後にエーテル麻酔して行い，採血後体脂肪(腹腔内および睾丸周囲の脂肪)および臓器重量を測定し，肝組織の一部を10%ホルマリン固定し，標本作成および鑑定を三輪臨床検査センターへ依頼した．血清は常法どおり分離して肝臓とともに分析に供した．飼料組成はTable 1に示したとおりで，各区等エネルギーとなるように与え，毎日残存量より飼料摂取量を求め，体重

Table 1 Composition of diets

Groups Contents	Fat diet		Protein diet		Control diet (CE-2) ³⁾		
	% (g)	% (kcal)	% (g)	% (kcal)		% (g)	% (kcal)
Corn starch	50.75	44	57	60	Nitrogen free extract	52.7	61
Casein	18	16	29	30	Crude protein	23.6	27
Lard	20	40	—	—	Crude fat	4.4	12
Corn oil	—	—	4	10	Crude fiber	4.9	
Cellulose	4		4		Ash	6.6	
Mixed minerals ¹⁾	4		4		Vitamin	0.4	
Mixed vitamins ²⁾	2		2				
Cholesterol	1		—				
Sodium cholate	0.25		—				

1) Mixture of minerals is prepared by Harper's method (Oriental Yeast Co., Ltd.)

2) Mixture of vitamins is purchased from Oriental Yeast Co., Ltd.

3) Purchased from Clea Japan, Inc.

は週2回測定した。なお対照区として4週齢より5匹、市販の標準固型飼料(日本クレア(株)のCE-2)を自由に摂取させて飼育し16週齢に解剖して同様に分析を行った。

2. 肝および血清成分の測定法

肝臓は生理食塩水で洗浄し、ろ紙で余分な水分を取り、クロロホルム・メタノール(2:1 v/v)混液で磨砕抽出し100倍希釈液を調整して以下の分析に供した。即ち肝臓の総脂質(TL)は上記抽出液30mlを使用して重量法で、トリグリセリド(TG)はTG-Test Wako使用、総コレステロール(T-Chol)はZak-Henly法、TBA価は真杉ら¹⁰⁾の方法で定量しマロンジアルデヒド(MDA)量で示した。血清のアルブミン、総タンパク、A/GはA/G B-Test Wako使用、トランスアミナーゼ活性(GOT, GPT活性)はS. TA-Test Wako使用、TLはBragdon酸化法¹¹⁾、TGは日本商事(株)のTGキットGN使用、T-CholはZak-Henly法、HDL-コレステロール(HDL-Chol)はデキストラン硫酸-MgCl₂を使用して分離した後、Zak-Henly法で定量し、HDL-Chol/T-Cholも算出した。

実験結果

1. 生育状況、体脂肪量および臓器重量

飼料は対照区以外は等エネルギーとなるように投与したが、1日1匹当たりのエネルギー摂取量はTable 2に示したとおり、運動区がやや少ない傾向がみられたが、各区間に有意差は認められなかった。対照区は自由摂取させたためエネルギー摂取量は最高を示した。

生育曲線はFig. 1に、体重増加率、体脂肪および臓器重量はTable 3に示したとおり、いずれの区も順調に生育しており、脂肪肝の治療開始時(7週齢)に対する解剖時(16週齢)の体重増加率は、対照区>F-NE区>P-NE区>P-E区>F-E区となり、いずれも運動区は増加率が低く、F-NE区>F-E区は $p < 0.01$ で有意差が認められた。

Table 2 Diet intake

(rat/day)

Groups	Control	F-NE	F-E	P-NE	P-E
Weight (g)	23 ± 3	16 ± 2	15 ± 3	17 ± 2	16 ± 3
Energy (kcal)	81 ± 9	71 ± 7	67 ± 11	69 ± 8	63 ± 9

Values are means ± SD.

F: Fat diet group

P: Protein diet group

NE: Non-exercise

E: Running with treadmill for 30 min/day

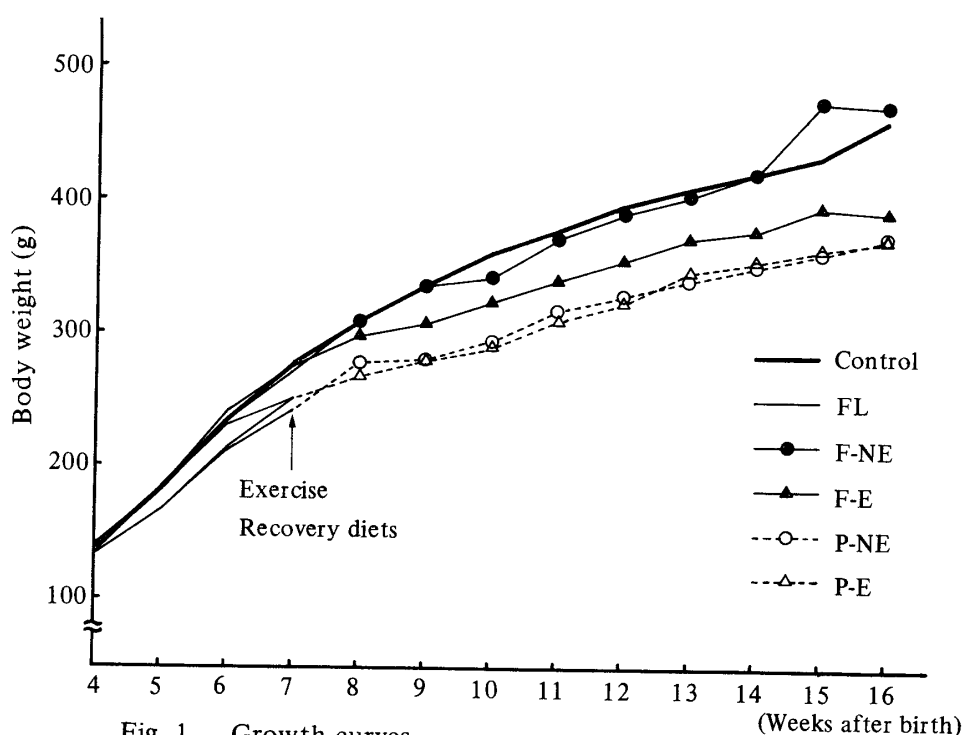


Fig. 1 Growth curves

FL: Dietetic fatty liver model groups fed fat diet

体脂肪の体重比はF-NE区が試験区4区のうち $p < 0.01$ で最も高値を示し、F群はP群より高い傾向がみられた。P-NE区とP-E区はほとんど差がなく運動負荷の影響は認められなかった。肝臓の体重比は、FL区がF-E区に対して $p < 0.05$ で、P-NE区、P-E区に対して $p < 0.01$ で有意に高値を示し、またF-NE区 $>$ F-E区、F-NE区 $>$ P-NE区、F-E区 $>$ P-E区はいずれも $p < 0.01$ で有意差を認め、運動負荷およびタンパク食による脂肪肝の回復効果が認められた。P-E区は $2.8 \pm 0.3\%$ で対照区の $2.6 \pm 0.1\%$ に最も近い値を示した。腎臓の体重比はF群がFL区、P群に比して低値となり、いずれも $p < 0.01$ で有意差を認めた。心臓の体重比はFL区がF-NE、P-NE、P-E区に対して $p < 0.01$ で有意に高値を示し、F群、P群とも運動区の方が非運動区より高い傾向があり、P-E区 $>$ P-NE区は $p < 0.05$ で有意差を認めた。

Table 3 Organs and tissues

(%)

Groups	Body weight gain ¹⁾	Adipose tissues ²⁾	Liver ²⁾	Kidneys ²⁾	Spleen ²⁾	Heart ²⁾
Control	164.4±13.3	2.9±1.2	2.6±0.1	0.59±0.04	0.22±0.08	0.31±0.04
FL	—	2.3±0.8	4.9±0.5 ^{b₁ a₅ a₆}	0.75±0.08 ^{a₁₀ a₁₁}	0.23±0.04	0.42±0.06 ^{a₁₄ a₁₅ a₁₆}
F-NE	163.2±6.1 ^{a₁}	5.4±0.8 ^{a₂ a₃ a₄}	5.5±0.8 ^{a₇ a₈}	0.55±0.07 ^{a₁₀ a₁₂}	0.20±0.02	0.32±0.04 ^{a₁₄}
F-E	141.4±12.0 ^{a₁}	3.0±0.6 ^{a₂}	4.3±0.5 ^{b₁ a₇ a₉}	0.54±0.08 ^{a₁₁ a₁₃}	0.17±0.04	0.35±0.07
P-NE	155.0±18.9	2.3±0.5 ^{a₃}	3.3±0.4 ^{a₅ a₈}	0.73±0.07 ^{a₁₂}	0.20±0.02	0.33±0.02 ^{a₁₅ b₂}
P-E	147.5±9.8	2.4±0.9 ^{a₄}	2.8±0.3 ^{a₆ a₉}	0.71±0.03 ^{a₁₃}	0.20±0.04	0.36±0.02 ^{a₁₆ b₂}

1) Ratio of final body weight (16 weeks of age) to body weight in fatty liver formation (7 weeks of age).

2) Ratio to body weight.

Values are means ± SD.

Significant differences are indicated with the same mark that is a₁ ~ a₁₆ : p<0.01, b₁ ~ b₂ : p<0.05

2. 脂肪肝発症および回復時における肝脂質の変動

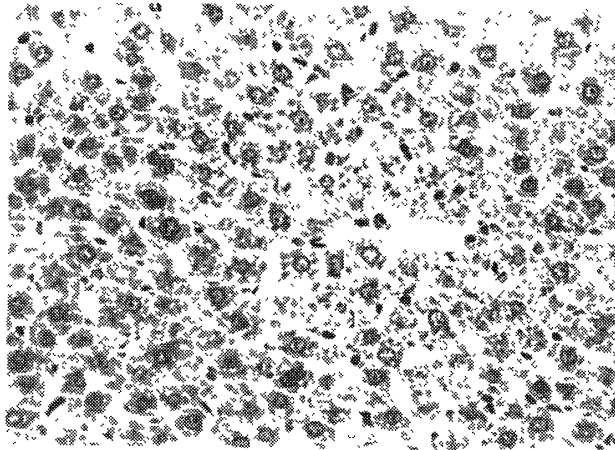
肝脂質の測定値を Table 4 に示したが、TL は 1% コレステロール添加脂肪食 20 日間投与の FL 区で 22.2±1.5% となり、Fig. 2 の組織像にもみられるように、明らかに脂肪肝の形成が認められた。その後同じ飼料を投与した F 群はさらに増加しており、FL 区に対して p<0.05 で有意差が認められたが、F-E 区の増加は F-NE 区より少なかった。また P 群は FL 区および F

Table 4 Influences of diet and exercise on lipids of liver in dietetic fatty liver rats

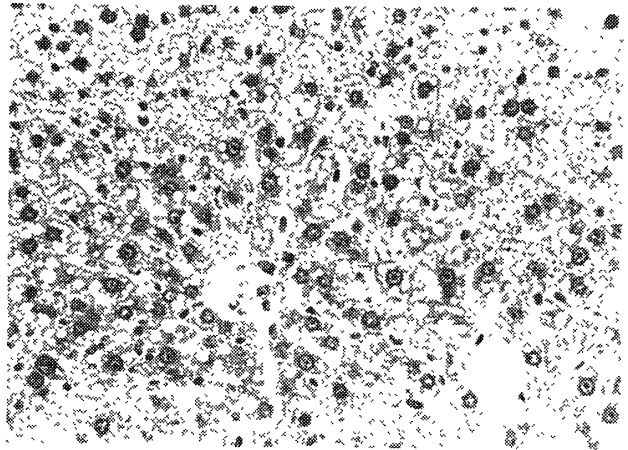
Groups	Total lipid (g/100 g)	Triglyceride (g/100 g)	Cholesterol (g/100 g)	TBA value (MDA nmol/g)
Control	5.2 ± 0.3	1.2 ± 0.1	0.35 ± 0.05	181 ± 66
FL	22.2 ± 1.5 ^{b₁ b₂ a₁ a₂}	5.4 ± 0.7 ^{a₅ a₆ a₇}	6.6 ± 0.8 ^{a₁ a₁₀ a₁₁ a₁₂}	86 ± 10 ^{a₁₆ b₃}
F-NE	27.8 ± 5.0 ^{b₁ a₃}	8.2 ± 3.2 ^{a₈}	10.5 ± 0.5 ^{a₁₀ a₁₃ a₁₄}	※
F-E	24.6 ± 1.7 ^{b₂ a₄}	6.4 ± 0.5 ^{a₅ a₉}	6.7 ± 1.2 ^{a₁₃ a₁₅}	※
P-NE	5.3 ± 0.5 ^{a₁ a₃}	1.1 ± 0.3 ^{a₆ a₈}	0.34 ± 0.01 ^{a₁₁ a₁₄}	69 ± 4 ^{a₁₆}
P-E	4.5 ± 0.7 ^{a₂ a₄}	1.1 ± 0.3 ^{a₇ a₉}	0.65 ± 0.16 ^{a₁₂ a₁₅}	72 ± 6 ^{b₃}

Values are means ± SD. Notes are the same as in Table 3.

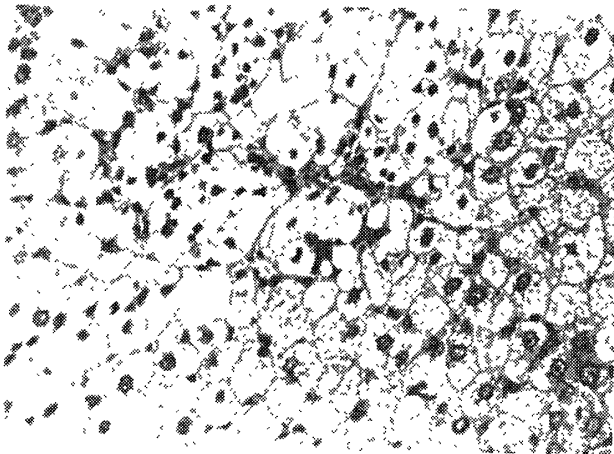
* non experimented.



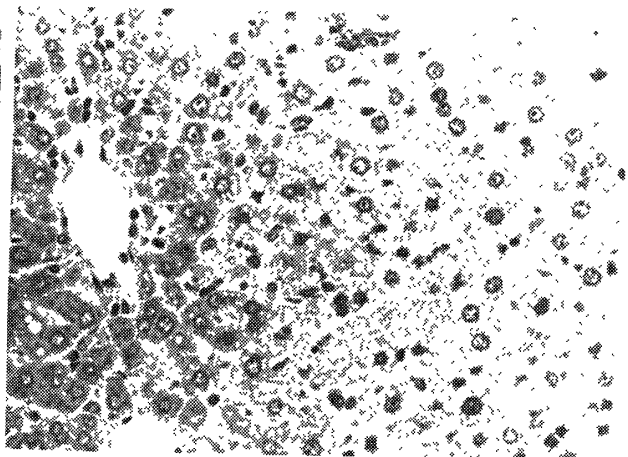
Control group



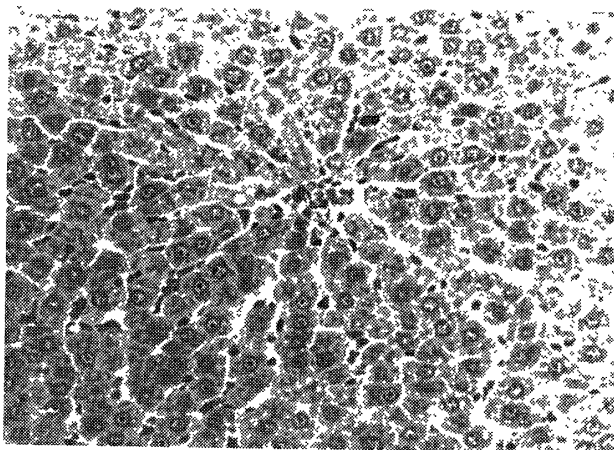
FL group (7 weeks of age)



F-NE group



F-E group



P-NE group

Fig. 2 Microscopic findings of the liver in dietetic fatty liver rats (16 weeks of age, Hematoxyline-Eosin stain, X 100)

Table 5 Influences of diet and exercise on lipids, GOT, GPT and protein of serum in dietetic fatty liver rats

Groups	GOT (karmenU.)	GPT (karmenU.)	Total lipid (mg/dl)	Triglyceride (mg/dl)	Total cholesterol (mg/dl)	HDL- cholesterol (mg/dl)	HDL- cholesterol Total cholesterol	Total protein (g/dl)	Albumin (g/dl)	A/G
Control	75±20	20±2	289±45	77.5±12.3	65±10	50.1±12.0	0.76±0.08	6.1±0.2	4.0±0.3	1.9±0.3
FL	^{a1b1} 73±6	^{a2a3b4} 21±3	^{a7a8a9a10} 383±63	^{a11} 52.9±17.0	^{a14a15a16a17} 143±23	50.0±7.4	^{a20a21} 0.36±0.10	^{a24b6} 6.2±0.2	^{a26a27} 4.1±0.3	1.9±0.3
F-NE	^{b1b2} 100±25	^{a2a4a5} 71±13	^{a7} 292±43	^{a11a12} 75.6±11.7	^{a14a18} 89±11	35.8±12.3	^{a22} 0.40±0.12	^{a24b7a25} 7.4±0.3	^{a26a28} 4.7±0.1	1.8±0.3
F-E	^{b3} 92±28	^{a4b4b5} 34±15	^{a8} 281±45	^{a13} 75.0±23.2	^{a15} 91±18	34.9±6.0	^{a23} 0.34±0.07	^{b6b7b8} 6.8±0.4	^{a27a29} 4.6±0.2	2.2±0.6
P-NE	^{b2} 66±13	^{a5a6} 19±2	^{a9} 294±31	^{a12} 44.7±7.8	^{a16a18a19} 66±7.0	48.5±5.4	^{a20a22} 0.74±0.07	^{a25} 6.1±0.5	^{a28} 4.1±0.3	2.1±0.2
P-E	^{a1b3} 56±10	^{a3a6b5} 14±2	^{a10} 265±37	^{a13} 41.4±8.1	^{a17a19} 85±11.5	61.7±14.0	^{a21a23} 0.73±0.12	^{b8} 6.2±0.4	^{a29} 4.1±0.3	1.9±0.3

Values are means ± SD.

Notes are the same as in Table 3.

群に比して有意に ($p < 0.01$) 低値を示し、脂肪肝は完全に回復していた。P-E 区は対照区より低く、タンパク食および運動負荷の効果が顕著に認められた。TG, T-Chol も TL と同様の傾向がみられ、P 群は FL 区、F 群に比して有意に ($p < 0.01$) 低値を示し、TG は対照区とほぼ同じ値となった。F 群ではいずれの脂質も運動区で低下し、T-Chol は有意差 ($p < 0.01$) を認めた。TBA 価は FL 区に比して P-NE 区は $p < 0.01$ 、P-E 区は $p < 0.05$ で有意に低値となった。対照区は MDA 181 ± 66 nmol/g となり、FL 区より著しく高値を示した。また肝組織の顕微鏡写真を Fig. 2 に示したが、FL 区は肝小葉全体に脂肪滴 (空胞) が分布し脂肪肝の症状が認められた。F-NE 区は肝小葉全体に肝細胞が腫大し、核の濃縮化がみられ著しい細胞障害が認められた。F-E 区は FL 区とほぼ同じ状態だった。P-NE 区は対照区と同様に完全に脂肪滴が消失していた。P-E 区も同じであった。

3. 脂肪肝発症および回復時における血清脂質, GOT, GPT, タンパクの変動

血清成分の測定値を Table 5 に示した。TL は、F-NE, F-E, P-NE, 対照区はほぼ同じ値を示し、これらに比して FL 区は有意に ($p < 0.01$) 高値を示し、P-E 区は試験食中最低値を示した。また、F 群、P 群ともに運動区が低い傾向となった。TG は FL 区に比して F 群は対照区とほぼ同じ値で高く (FL 区 $<$ F-NE 区, $p < 0.01$) P 群は低く、F 群に比して P 群は有意に ($p < 0.01$) 低値となった。T-Chol は TL と同様に FL 区が有意に ($p < 0.01$) 高く、F 群は P 群に比して高い傾向があり、F-NE 区は P-NE 区より $p < 0.01$ で有意に高値を示した。また肝 Chol と同様に、P-NE 区 $<$ P-E 区 ($p < 0.01$) となった。HDL-Chol/T-Chol は P 群は、FL 区、F 群に比して有意に ($p < 0.01$) 高値を示し対照区に近い値となったが、F 群、P 群とも運動負荷による効果は認められなかった。一般に肝障害の指標の一つとされる GOT, GPT については肝脂質および血清 TG と同様に FL 区に比して F 群は高く、P 群は低く、F 群、P 群とも運動区の方が低値となった。血清タンパク、アルブミンは F 群が FL 区、P 群に比して有意に高値となったが、A/G は各区間に有意差は認められなかった。

考 察

4 週齢の Wistar 系ラットを 1% コレステロール添加脂肪食 (ラード 20%, エネルギー比 40%) で 20 日間飼育しその一部を解剖したところ、肝 TL は 22.2 ± 1.5 g/100 g となり、正常肝の脂肪は 3~5% といわれているところから明らかに脂肪肝の形成がみられた。この脂肪肝発症ラットにトレッドミル走負荷またはタンパク食 (カゼイン 29%, エネルギー比 30%) を投与し、その回復状況を観察した。

体脂肪の体重比は F-NE 区が有意に高く、各区ほぼ等エネルギー摂取しているが、コレステロール添加脂肪食はタンパク食に比して体脂肪の蓄積が著しいことを認めた。また運動負荷による有意 ($p < 0.01$) の低下が F 群にみとめられたことより、運動によるエネルギー消費増加の供給に体脂肪が優先的に利用されることが推察される。臓器の体重比については、肝臓は脂肪肝の形成とともに高値を示しており、肝 TL とほぼ平行して F 群 $>$ P 群、非運動区 $>$ 運動区となった。腎臓は F 群が有意に低値となり腎臓重量も低かった。心臓も FL 区が有意に高値となり、脂肪の蓄積が推察され、また運動区が非運動区に比して高値の傾向を示したのは、運動負荷による心筋の発達も考えられる。

肝脂質は TL, TG, T-Chol とともに FL 区に比してタンパク食群は有意に ($p < 0.01$) 低値を示し、脂肪肝の回復効果が著しかった。運動負荷の効果は T-Chol の F 群のみに有意差がみられ、TL, TG とともに F-E 区は FL 区に比してわずかに増加しているが、F-NE 区に比して低値

を示した。過酸化脂質は糖尿病、動脈硬化症など各種疾患で増加するといわれているが、本実験において肝 TBA 価は、脂肪肝の回復効果の著しかった P 群で有意に低下しており興味深い。これは肝 TL の減少と食餌脂肪の減少の影響が推察される。

血清 TL は、FL 区に比して F 群、P 群ともいずれも有意に ($p < 0.01$) 低下して F 群および P-NE 区は対照区とほぼ同値となった。これは生体の恒常性維持能力の作用で、P-E 区の著しい低下は F-E 区の低下とともに運動負荷の効果とも考えられる。肝 TL は F 群が著しく増加したのに対して、血清 TG は試験区 4 区および対照区間に有意差がなかった。片山ら¹²⁾は脂肪肝の回復したものほど血清 TG が上昇し、肝の TL, TG, T-Chol が低下すると報告しており、肝脂質については本研究と一致するが、血清 TG は脂肪肝の回復が著しい P 群が有意に低値を示し肝 TL と平行した。すなわち片山らは低タンパク食による脂肪肝形成のため血清 TG は低値を示したが、本研究ではタンパクレベルは標準の脂肪食による脂肪肝形成のため血清 TG は高値を示しており、これがタンパク質の増加、脂肪の減少の食餌組成の影響で低下したものと考えられる。血清 T-Chol は P 群が低値を示したが、血清 T-Chol については食餌タンパクレベルの上昇による低下¹⁾、食餌脂肪の種類すなわちラードに比してコーンオイル投与による低下¹³⁾および低脂肪食による低下¹⁴⁾などの報告があり、P 群の場合各因子の複合作用によって低下したと思われる。HDL-Chol/T-Chol は血清 T-Chol とは反対に P 群が有意に高く、脂肪肝の回復と相関した。急性肝疾患において著しく上昇する GOT, GPT 活性は、P 群で有意に低下し肝機能の回復が認められ、F 群、P 群とも運動区で低値を示し、特に P-E 区は FL 区に対して有意に低下し回復が著しかった。屋代、木村ら⁵⁾¹⁵⁾⁻¹⁷⁾は肝 TL, TG, 血清 TG, T-Chol とも食餌タンパクレベルの上昇につれて減少し、運動負荷によってさらに低下すること、また食餌タンパクレベル 4% においては、非運動区では脂肪肝を認めたのに対して運動区では脂肪変性が全く認められなかったと報告している。運動負荷の効果は、血清 T-Chol については Simko¹⁸⁾、Kiens¹⁹⁾らの報告が、血清 TG については Kiens¹⁹⁾、Tsai⁸⁾、Applegate⁶⁾らの報告がある。本実験においてもタンパク質増加の P 群において肝脂質、血清脂質および GOT, GPT の著しい回復と運動負荷によって肝 T-Chol の F 群に有意差 ($p < 0.01$) が認められ、肝 TL, 血清 TL, GOT, GPT についても運動負荷による低下傾向が認められ、P-E 区が最も脂肪肝の回復効果が顕著にみられた。

要 約

食餌性脂肪肝を形成したラットに対し、一般に肝障害治療に効果があるとされているタンパク食による回復効果と合わせて、脂質代謝と関係深い運動負荷の効果を検討した。

1. 肝臓の体重比は、脂肪肝形成時 (FL 区) に比して 1% コレステロール添加脂肪食投与運動区 (F-E 区) ($p < 0.05$)、タンパク食投与比運動区 (P-NE 区)、タンパク食投与運動区 (P-E 区) ($p < 0.01$) で有意に低下した。
2. 肝 TL, TG, T-Chol において P 群は FL 区、F 群に比して有意に ($p < 0.01$) 低値を示し、肝 TBA 価も FL 区に比して P 群で有意に低下した。
3. FL 区に比して P 群において GOT, GPT, 血清 TL, T-Chol は有意に低下し、血清 TG も低下傾向がみられ、HDL-Chol/T-Chol は有意に上昇した。
4. F 群は肝脂質いずれも運動区で低下し、P 群は、肝 TL が運動区で低下した。
5. F 群、P 群とも GOT, GPT, 血清 TL はいずれも運動区で低下傾向がみられた。

文 献

- 1) 田中千寿子, 曾根正江, 野崎幸久 : 栄養と食糧, 34, 555 (1981)
- 2) Nagata Y., Tanaka K., and Sugano M. : J. Nutr. Sci. Vitaminol., 27, 583 (1981)
- 3) Sugano M., Tanaka K., Ide T., and Imaizumi K. : Daizu Tanpakushitsu Eiyō Kenkyukai Kaisi, 3, 33 (1982)
- 4) R. Strength : Highlights Agric. Res., 29, 18 (1982)
- 5) Yashiro M. and Kimura S. : J. Nutr. Sci. Vitaminol., 25, 213 (1979)
- 6) E. A. Applegate, D. E. Upton and J. S. Stern : Physiol. Behav., 28, 917 (1982)
- 7) J. O. Pierre, B. Jacques and J. B. Pierre : IRCS Med. Sci. : Libr. Compend., 9, 316 (1981)
- 8) A. C. Tsai, J. Bach and K. T. Borer : Am. J. Clin. Nutr., 34, 373 (1981)
- 9) 鈴木正成, 橋場直彦, 佐藤雄二, 加藤剛 : 脂質研究, 22, 208 (1980)
- 10) 真杉文紀, 中村哲也 : ビタミン, 51, 21 (1977)
- 11) 北村元仕編 : 実践臨床化学, 医歯薬出版, 東京, 440 (1974)
- 12) 片山吉穂, 福田富美子, 下志万千鶴子 : 大阪市立大学生活科学部紀要, 29, 15 (1981)
- 13) SHO H., Chinen I., Fukuda N. and Uchihara K. : J. Nutr. Sci. Vitaminol., 27, 463 (1981)
- 14) B. Vessby, B. Karlstroem, H. Lithell, I. B. Gustafsson and I. Werner : Hum. Nutr. : Appl. Nutr., 36, 179 (1982)
- 15) 屋代正範, 木村修一 : 脂質研究, 22, 211 (1980)
- 16) Yashiro M. and Kimura S. : J. Nutr. Sci. Vitaminol., 26, 59 (1980)
- 17) Yashiro M., Hoshino T. and Kimura S. : J. Nutr. Sci. Vitaminol., 26, 71 (1980)
- 18) V. Simko and R. E. Kelley : Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol., 40, 145 (1979)
- 19) B. Kiens, I. Joergensen, S. Lewis, G. Jensen, H. Lithell, B. Vessby, S. Hoe, and P. Schnohr : Eur. J. Clin. Invest., 10, 203 (1980)