経時的CT撮影による肝脂肪蓄積の評価と自発的運動の効果

吉村 咲紀¹, 富賀 裕貴¹, 中島 志穂子², 伊藤 愛¹, 川上 翔太郎¹,
田中 宏暁^{2,3}, 上原 吉就^{2,3}, 檜垣 靖樹^{2,3}

Effects of voluntary exercise training on liver fat accumulation - Measurement of over time CT imaging -

Saki Yoshimura¹, Yuki Tomiga¹, Shihoko Nakashima², Ai Ito¹, Shotaro Kawakami¹,
Hiroaki Tanaka^{2,3}, Yoshinari Uehara^{2,3} and Yasuki Higaki^{2,3}

¹福岡大学大学院スポーツ健康科学研究科, 〒814-0180 福岡県福岡市城南区七隈8-19-1 (*Graduate School of Sports and Health Science Laboratory of Exercise Physiology, Fukuoka University, 8-19-1 Nanakuma, Jonan-ku, Fukuoka 814-0180, Japan*)

²福岡大学基盤研究機関身体活動研究所, 〒814-0180 福岡県福岡市城南区七隈8-19-1 (*Institute for Physical Activity, Fukuoka University, 8-19-1 Nanakuma, Jonan-ku, Fukuoka 814-0180, Japan*)

³福岡大学スポーツ科学部, 〒814-0180 福岡県福岡市城南区七隈8-19-1 (*Faculty of Sports and Health Science, Fukuoka University, 8-19-1 Nanakuma, Jonan-ku, Fukuoka 814-0180, Japan*)

Received : March 20, 2017 / Accepted : May 17, 2017

Abstract High fat diet consumption induces fat accumulation in the liver. An understanding of when liver fat accumulation begins is important for exploring the mechanisms underlying fatty liver. The aim of this study was to investigate the processes of fat accumulation in the liver during high fat diet consumption with or without exercise using computed tomography (CT). Male 6 week old C57BL/6J mice were randomly assigned to the normal diet or high fat diet group. After 6 weeks, mice in the high-fat diet group were further divided into voluntary wheel exercise (HFD+Ex) and no exercise (HFD) groups. We measured body weight, food intake and locomotor activity in all mice. Liver fat accumulation was measured by CT scan weekly. Blood and tissue sampling was performed at the end of the experimental period. Following the 6 week exercise period, total body, mesenteric fat and liver weight in the HFD+Ex group were significantly lower than those in the HFD group. Alanine aminotransferase levels improved in HFD+Ex mice compared with those of HFD mice. The hounsfield unit value in HFD mice decreased between 3 and 8 weeks, suggesting that liver fat accumulation accelerated during this period. In contrast this decrease was not observed one week after exercise in HFD+Ex mice. These results suggest that liver fat accumulation estimated by CT was not observed until the 3rd week of high fat feeding while the effects of voluntary wheel exercise appeared immediately.

Jpn J Phys Fitness Sports Med, 66(4): 283-291 (2017)

Keywords : high fat diet, exercise, fatty liver

緒 言

近年の食形態の変化に伴い、食事誘発性の脂肪肝有病者の増加が問題となっている。脂肪肝の要因には飲酒が挙げられたが、飲酒歴がないにも関わらず、肝細胞へ脂肪滴が蓄積した状態をSchaffnerら¹⁾は、非アルコール性脂肪肝 (NAFLD) と定義した。このNAFLDは世界的に問題となっており、その有病率は10-30%と報告されている²⁻⁵⁾。特に、NAFLDはメタボリックシンドロームと関連が強く⁶⁾、今後のメタボリックシンドローム該当者の増加と共に、より深刻化していくことが予想される。

このような肝臓の脂肪蓄積は、肝機能低下、炎症及び肝硬変、更には肝がんへ進行することが知られており、平成27年の人口動態統計によると、肝がんは悪性新生物による死因のうち男性で4位、女性で5位と上位に位置している⁷⁾。したがって、予防的観点から、肝臓の脂肪蓄積の初期段階を発見し、NAFLD予防と改善のための早期介入が不可欠であると思われる。

脂質異常症や肥満、NAFLDの予防・改善策として、有酸素運動が推奨されている。例えばメタボリックシンドローム該当者及びその予備軍に対する日常的な有酸素運動は、体重及び脂肪量の減少に加え、肝機能の評価指

標として用いられる, Aspartate aminotransferase (AST) 値及び Alanine aminotransferase (ALT) 値を低下させ, 肝機能の改善にも効果がある事が報告されている⁸⁾. さらに, OLETF ラット⁹⁾ 及び高脂肪食誘発性脂肪肝モデルマウス¹⁰⁾ を用いた研究では, 運動トレーニングが脂肪酸合成を抑制すると共に脂肪酸酸化を亢進させることで, 肝臓への脂肪蓄積が抑制したことを報告している. すなわち, 運動は脂肪酸酸化亢進や脂肪酸合成抑制に作用し, 高脂肪食摂取による肝臓への脂肪蓄積に伴う肝機能の低下や脂肪肝の状態を改善させることが認められている⁸⁻¹⁰⁾.

これまで, 高脂肪食摂取による肝臓脂肪の蓄積や運動による肝臓脂肪の減少効果は多く報告されているが⁸⁻¹⁰⁾, その変化を同一個体で経時的に追って検討した研究は我々の知る限りない. その理由として, 脂肪肝の精査には肝生検が必須であったことが挙げられる. 肝生検は身体的侵襲が大きく, 同一個体に対し, 頻回に測定することが困難であった. そこで, 代替手法として, X線の照射量を抑え, 被曝リスクを軽減させた小動物におけるCT撮影機器が開発されたことで, 肝臓の脂肪蓄積を経時的に評価することが可能になった^{11,12)}.

肝臓の脂肪蓄積は, 肝細胞の炎症や肝機能の低下を引き起こす. しかしながら, 肝臓の脂肪蓄積に伴う炎症の後に肝機能低下が進行するのか, 肝機能低下が先行した後に肝臓の脂肪蓄積及び炎症を引き起こすのか, あるいはそれらは同時に進行するのか, その順序性を明らかにした研究はこれまでにない. したがって, 経時的に肝臓の脂肪蓄積を観察することは, 上記に示した課題を解決することができると考えられる. 本研究はまずその第一段階として, 同一個体を用い, 経時的なCT撮影を行うことで, 高脂肪食摂取による肝臓への脂肪蓄積及び運動による脂肪蓄積の抑制効果について時間依存的な変化を明らかにすることを目的とした.

方 法

被験動物 6週齢のC57BL/6J雄性マウス(日本クレア株式会社)23匹を用いた. 本研究は福岡大学動物実験委員会の承認(承認番号:1407765)を得て行った.

飼育環境 マウスは温度(24℃), 湿度(50-60%)を一定に設定し, 明暗期を12時間周期(明期8:00-20:00)とした部屋で飼育した.

試料 実験の普通食はチャールスリバーフォーミュラーCRF-1(オリエンタル酵母工業株式会社)を用いた. 普通食の組成(kcal比)はタンパク質25%, 脂肪13%, 炭水化物62%, 質量当たりのエネルギー量は3.57 kcal/gであった. 高脂肪食は, High Fat Diet32(日本クレア

株式会社)を用い, その組成はタンパク質20%, 脂肪57%, 炭水化物23%で, 質量当たりのエネルギー量は5.08 kcal/gであった. 両試料共にペレット状のものを採用し, 飲水及び食事は自由摂取とした.

実験プロトコール マウスは普通食(Con: n=6)群と高脂肪食群(n=17)にランダムに分け, 6週間飼育した. 6週間の食事介入後, 高脂肪食群はさらに運動(HFD+Ex: n=10)群と, 運動を行わず, 食事介入のみ継続した(HFD: n=7)群に分け, さらに6週間飼育した. 6週間の運動介入に割り付けられたマウスはマウス回転式運動量測定器(日本クレア株式会社)のゲージで飼育した. HFD+Ex群の運動は自発的運動とし, その運動量はゲージに付属するカウンターによって測定した(Fig.1).

総摂餌量及び総摂取エネルギー量の評価 摂餌量は2日ごとに計量し, 12週間の介入期間全ての摂餌量を総摂餌量及び総摂取エネルギー量として示した.

身体計測 マウスの体重及び運動量は2日ごとに測定を行った. また, マウスの腹部CT撮影は1週間ごとに測定を行った.

CT撮影 腹部CT撮影は, SkyScan1178高速in vivo X線CTスキャナ(東陽テクニカ株式会社)を用いて実施した. 毎回, 同一条件で解析を行うために, チューブに入れた水を撮影し, 水を0, 空気を-1000で表示するスケールを用いてキャリブレーションし, Hounsfield unit (HU) 値を算出した. HU値はCT Analyzer software (BRUKER, v.1.16 64-bit version) で解析した.

マウスは腹部CT撮影直前に3種混合麻酔として, 塩素メドミジン(ドミツール, 日本全業工業株式会社), ミタゾラム(ミタゾラム, サンド株式会社), 酒石酸ブトルファノール(ベトルファール, Meiji Seika)¹³⁾を混和させたものを腹腔内注射し, 体動がみられなくなった状態で撮影用ベッドへ移動させ, 撮影した. 撮影はfast mode 161um pixels, 41mm FOVモードで全身を360度スキャンした. CT撮影後は拮抗薬として塩酸アチパメゾール(アンチセダン, 日本全業工業株式会社)を腹腔内注射した.

撮影された腹部の水平面のスライス画像より肝臓部分を範囲指定した. 指定した範囲の肝臓のHU値は, 各個体のスライス画像よりランダムに5か所測定し, 最大値と最小値を除いた3つの平均値を測定値として採用した.

血液サンプル及び組織サンプル 血液サンプルは6時間の絶食後に麻酔薬として, 3種混合麻酔をマウス体重10

Fig. 1 Study design.

Control chow diet (Con), High fat diet (HFD), High fat diet and wheel running exercise (HFD+Ex), Computed tomography (CT).

gあたり0.03 ml腹腔内注射した後に、マウスの尾部より採取した。血漿ALT値と血漿AST値はトランスアミナーゼCII-テストワコー（和光純薬工業）を用いて測定した。

組織サンプルは、頸椎脱臼後、肝臓及び腸間膜脂肪を摘出し、計量したのち、液体窒素で凍結させ、 -80°C で保存した。肝組織はO.C.Tコンパウンドを用いて包埋後、クリオスタットで $10\text{ }\mu\text{m}$ の新鮮凍結切片を作製し、スライドガラスに貼付した。この肝切片は室温で30分間風乾した後、O.C.TコンパウンドをPBSで除去し、水洗した。そして、60% 2-プロパノールに浸し（1分）、oil red O染色液（Sigma-Aldrich Co.）中に 37°C のインキュベーターに静置した（15分）。その後、60% 2-プロパノールに浸し（1分）、水洗した。次にヘマトキシリンで核を染め、水溶性封入剤で封入し、顕鏡した。組織画像はFS $\times 100$ （オリンパス）を用いて20倍で撮影した。Oil Red O染色陽性面積の定量は、蛍光画像解析システムLumina Vision（MITANI CORPORATION）を用いて行った。

統計処理 実験データはすべて平均 $\pm$ 標準偏差で示した。統計解析にはIBM SPSS Statistics, Version 20（IBM Corp.）を用いた。体重、総摂餌量、総摂取エネルギー量、血液サンプルデータ及び組織重量は、一元配置分散分析で解析を行った。また、腹部CT撮影によって得られたHU値の経時変化及び群間の比較は二元配置分散分析を用いて解析した。時間的要因または群間の比較において主効果が認められた場合、事後検定としてBonferroniによる多重比較を行った。有意水準は危険率 $p < 0.05$ をもって有意とした。

結 果

高脂肪食摂取における体重及び組織重量の変化 HFD群及びHFD+Ex群の最終体重は、Con群と比較して有意に増加した（ $p < 0.01$, Table 1）。また、HFD+Ex群の最終体重はHFD群と比較して、有意に減少した（ $p < 0.01$, Table 1）。

体重における経時変化について、HFD群は介入前値（pre）と比較して、高脂肪食摂取開始から1週目で有意に高値を示し、介入終了の12週目まで増加した（ $p < 0.01$ ）。また、HFD+Ex群の体重はpreと比較して、高脂肪食摂取開始1週目から6週目まで有意に高値を示したが（ $p < 0.01$ ）、運動開始1週目から3週目にかけて有意に減少した（ $p < 0.01$ ）。

体重における群間比較について、HFD群はCon群と比較して高脂肪食摂取開始1週目から介入終了の12週目まで有意な高値を示した（ $p < 0.01$, Fig. 2）。また、HFD+Ex群の体重はHFD群と比較して、運動介入開始1週目から6週目にかけて低値を示した（ $p < 0.01$, Fig. 2）。

HFD群の肝重量及び腸間膜脂肪量はCon群とHFD+Ex群より高値を示し（ $p < 0.05$, Table 1）、Con群とHFD+Ex群との間に有意な差は認められなかった（Table 1）。

摂餌量の変化 HFD群の12週間の総摂餌量はCon群と比較して少ない傾向にあったが（ $p = 0.07$, Table 1）、HFD群とHFD+Ex群の12週間の総エネルギー摂取量はCon群と比較して有意な高値を示した（ $p < 0.05$, Table 1）。

腹部CT撮影におけるHU値の経時変化 脂肪肝の診

Fig. 2 Effect of high fat diet and wheel running exercise on body weight.

*: v.s. Con $p < 0.05$, **: v.s. Con $p < 0.01$, ++: v.s. HFD $p < 0.01$

Control chow diet (Con), High fat diet (HFD), High fat diet and wheel running exercise (HFD+Ex).

Table 1. Characteristics of the animals

	Con (n = 5)	HFD (n = 6)	HFD + Ex (n = 10)
Final body weight (g)	26.0 $\pm$ 1.0	37.8 $\pm$ 2.9 **	29.2 $\pm$ 1.3***
Liver weight (mg)	1310 $\pm$ 145	1883 $\pm$ 222*	1419 $\pm$ 61 ⁺
Liver to Body weight ratio (%)	4.98 $\pm$ 0.42	4.97 $\pm$ 0.38	4.88 $\pm$ 0.34
Mesenteric fat (mg)	158 $\pm$ 29	603 $\pm$ 152*	245 $\pm$ 36 ⁺
Total food intake (g/mice)	232.7 $\pm$ 8.2	206.4 $\pm$ 4.5	221.5 $\pm$ 9.5
Total energy intake (kcal/mice)	830.7 $\pm$ 29.2	1047.3 $\pm$ 155.3*	1124.5 $\pm$ 48.0*
Plasma AST levels (IU/L)	80.8 $\pm$ 7.3	152.7 $\pm$ 32.6*	124.2 $\pm$ 9.1
Plasma ALT levels (IU/L)	55.8 $\pm$ 4.4	81.2 $\pm$ 11.5*	54.4 $\pm$ 9.1 ⁺
Final HU values (HU)	74.7 $\pm$ 3.7	30.8 $\pm$ 10.6*	58.9 $\pm$ 8.6 ⁺

Data are means $\pm$ standard deviation

*: v.s. Con $p < 0.05$, **: v.s. Con $p < 0.01$, +: v.s. HFD $p < 0.05$, ++: v.s. HFD $p < 0.01$

Aspartate aminotransferase (AST), Alanine aminotransferase (ALT), Hounsfield unit (HU)

Control chow diet (Con), High fat diet (HFD), High fat diet and wheel running exercise (HFD+Ex).

断には非侵襲的な方法としてCTが用いられており、その評価指標としてHU値が採用されている。このHU値は脂肪化が進行するほど低下するとされている¹⁴⁾。肝臓の脂肪蓄積における経時的変化について、Con群のHU値は介入期間中、50–80 HUの基準値内で推移し、有意な変化を認めなかった。HFD群のHU値はpreと比較し、高脂肪食摂取開始3週目まで低下せず、高脂肪食摂取開始3週後より6週目にかけて減少傾向が認められ、8週目で有意に減少した ($p < 0.01$)。また、高脂肪食摂取開始から8週目以降、HFD群のHU値は変化しなかった。

一方、HFD+Ex群のHU値は運動を開始した直後からHU値のさらなる低下を示さず、定常状態となった。

肝臓の脂肪蓄積における群間比較について、HFD群のHU値はCon群と比較して高脂肪食摂取開始から6週目と8週目以降で有意な低値を示した ($p < 0.01$, Fig. 3 A)。一方、HFD+Ex群のHU値は運動を開始した直後からCon群と比較して有意な差を認めず、HFD群と比較して運動開始から2週目以降で有意な高値を示した ($p < 0.01$, Fig. 3 A)。

高脂肪食摂取6週目のHFD群のHU値 (53.1 ± 6.0) は、

Con群のHU値 (77.2 ± 3.6) と比較して有意な低値を示し、その分布は左に推移していた ($p < 0.05$, Fig. 3 B). 一方、運動を6週間行ったHFD+Ex群のHU値 (58.9 ± 8.0) は、HFD群のHU値 (30.8 ± 9.7) と比較して有意に高値となり、その分布は右に推移した ($p < 0.01$, Fig. 3 C).

高脂肪食摂取と運動が肝機能マーカーに及ぼす影響

HFD群の血漿ALTはCon群とHFD+Ex群より高値で

あった ($p < 0.05$, Table 1). しかしながら、Con群とHFD+Ex群の間に有意な差は認められなかった (Table 1). HFD群の血漿ASTはALTと同様に、Con群とHFD+Ex群より高値であった ($p < 0.05$, Table 1).

高脂肪食摂取と運動が肝臓組織に及ぼす影響 HFD群の肝臓の肉眼所見は、Con群及びHFD+Ex群と比較して黄白色であった (Fig. 4 A). 肝組織切片のOil red O

Fig. 3 Change over time in hounsfield unit (HU) volume due to high fat diet and wheel running exercise (A). Effect of high fat diet on hounsfield unit volume in first 6 weeks (B) and next 6 weeks (C).

*: v.s. Con $p < 0.05$, **: v.s. Con $p < 0.01$, ++: v.s. HFD $p < 0.01$

Control chow diet (Con), High fat diet (HFD), High fat diet and wheel running exercise (HFD+Ex), Computed tomography (CT).

染色において、肝臓の脂肪滴はHFD群とHFD+Ex群の両群で認められた。Con群と比較し、HFD群のOil Red O染色陽性面積は有意に高値であり ($p < 0.01$, Fig. 4 B), Con群とHFD+Ex群の間には有意な差を認めなかった。

考 察

近年、偏った食生活と不活動な生活により、肥満者の増加と同時にNAFLD有病者の増加が問題となっている。このNAFLD有病者に対して早期介入を行うために、肝臓の脂肪化の進展や運動の有効性を明らかにすることは重要である。そこで本研究は食事誘発性の肝臓脂肪蓄積及び運動による改善効果出現の時期を明らかにすることを目的とした。その結果、高脂肪食摂取における肝臓への脂肪蓄積は高脂肪食摂取開始3週後から急増すること、そして、運動による肝臓脂肪の減少は即時的にもたらされることが明らかとなった。

高脂肪食摂取は体脂肪の蓄積と同様に肝臓に蓄積する

脂肪量を増加させることが報告されている^{15,16)}。本研究においても、HFD群の腸間膜脂肪量及び肝重量はCon群とHFD+Ex群より高く、体重は高脂肪食摂取直後から急速に増加していた。また、マウスに対する高脂肪食摂取^{17,18)}及び高脂肪と高スクロースの混合食摂取¹⁹⁾は、肝臓内のtriacylglycerol (TAG) 量を2週間以内に増加させる。したがって、肝臓への脂肪蓄積が高脂肪食摂取後、比較的早期に進行することが示唆されている。一方、本研究における1週間ごとのCT撮影によって得られたHU値は3週目まで低下しなかった。つまり、CT画像の解析では3週目までは画像上で認められるほどの明らかな肝臓への脂肪蓄積は観察されないことが示唆された。Zaragoza-Hermansら²⁰⁾は高脂肪食摂取が短期的な脂肪酸分解能を向上させることを報告している。このことから、高脂肪食摂取は短期的に脂肪分解を高めることにより、CT画像で確認され得る、顕著な肝臓への脂肪蓄積が一定の期間認められなかったのかもしれない。また、本

Fig. 4 Effects of high fat diet and wheel running exercise on hepatic steatosis. Representative images of liver from Con, HFD and HFD+Ex (A). Lipid quantification by Oil Red O staining (B). Representative images of Oil Red O staining (C).

** : v.s. Con $p < 0.01$, ++ : v.s. HFD $p < 0.01$

Control chow diet (Con), High fat diet (HFD), High fat diet and wheel running exercise (HFD+Ex).

研究では6週齢のC57BL/6Jマウスを用いたが、他の先行研究^{17,19)}と比べ、介入した週齢が若いことが脂肪蓄積の速度に影響している可能性も考えられる。実際、本研究とほぼ同じ週齢時に介入した研究によると、肝臓内血中遊離脂肪酸及びコレステロール値は、2週間の高脂肪食摂取では変化せず、4週間において初めて有意な増加を示したことを報告している¹⁸⁾。肝臓の脂肪蓄積の進行とCT画像のHU値の低下は負の相関を示すことから¹⁴⁾、本研究において高脂肪食摂取開始3週後から8週目にかけてHFD群のHU値が減少したことは、肝臓の脂肪蓄積がこれらの期間に急速に進行することを示唆している。

肝臓の脂肪蓄積には脂肪分解と合成の相対的なバランスが関与しているものと考えられる。脂肪酸分解に関与するperoxisome proliferator-activated receptor- α (PPAR- α)は肝臓のミトコンドリアにおける脂肪酸の β 酸化を活性化させることによって、脂質分解を促進させる²¹⁾が、高脂肪食摂取開始から4週間でこのPPAR- α の発現低下が報告されている²²⁾。一方、脂肪合成に関与する肝臓のsterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c)は高脂肪食摂取2週間で、fatty acid synthase (FAS)は4週間で亢進し^{19,23-25)}、脂肪酸トランスポーターであるcluster of differentiation 36 (CD36)は、5週間で発現量が増加し、肝臓への脂肪蓄積を誘発させることが報告されている²⁶⁾。これらの知見と本研究の結果を考え合わせると、高脂肪食摂取開始3週目までは肝臓への脂肪蓄積が観察されず、4週目以降で観察された急速な脂肪蓄積の背景には、マウスの週齢や脂肪分解と合成に関わる分子の調節機構が関与するものと考えられる。今後はこの時期で惹起される肝組織の変化について分子生物学的手法を用いて検討する必要がある。

HFD+Ex群において運動開始直後から介入終了までの6週間で、HU値のさらなる低下が認められなかったことから、肝臓への脂肪蓄積は日常的な自発的運動によって即時的に抑制されたことが示唆された。肝臓の脂肪蓄積抑制効果と共に体重も運動介入開始直後より減少がみられた。本研究に用いたマウスは1日平均4.6 kmの運動を行っていた。これは肥満に対し、運動効果が認められる運動量であり²⁷⁾、HFD+Ex群は運動量の増加によってエネルギー消費量が増加し、出納バランスがHFD群よりも負に傾いたために、体重の増加及び肝臓への脂肪蓄積が抑制されたと考えられる。運動が肝臓の脂肪蓄積に対して抑制的に働くメカニズムとして、1つ目に、運動様式にかかわらず、脂質代謝に関わる肝臓ミトコンドリア機能が活性化すること²⁸⁾、また2つ目に、運動が肝臓におけるAMPK活性を促進し、脂肪酸酸化の増加と脂肪蓄積の抑制を引き起こすことなどが報告されている^{29,30)}。従って、運動による即時効果にはこれら

の因子が関連している可能性が推察される。

先行研究において、肝臓の脂肪蓄積と肝機能低下には密接な関係があるといわれている³¹⁾。特に、肝臓から放出されるALTは肝臓に障害をきたすと高値となることが報告されている^{31,32)}。本研究において、HFD群の血漿ALTはCon群とHFD+Ex群より高値となった。これはHFD群の肝臓に脂肪が蓄積したことで肝機能が悪化したためであると考えられる。他の先行研究では³³⁾、高脂肪食摂取は肝機能の悪化を引き起こすことが報告されている。HFD+Ex群の血漿ALTはCon群との間に有意差を認めなかったことから肝機能が改善したと考えられる。これらの結果より、自発的運動が高脂肪食摂取環境下においても肝機能の改善をもたらす事が明らかとなった。

本研究でのCT撮影による経時的観察では、肝臓への脂肪蓄積が高脂肪食摂取開始3週後から8週目にかけて急激に進行し、さらに、運動のもたらす脂肪の蓄積抑制効果は運動介入を開始した直後から認められることが明らかとなった。今後は、高脂肪食摂取による肝臓への脂肪蓄積が起こる時期と脂肪蓄積が抑制される運動直後の時期について、脂肪蓄積亢進及び脂肪分解促進に関わる分子メカニズムを解明する研究へと発展させる必要がある。これらが解明されることにより、将来的には早期のNAFLD有病者の運動処方や食事療法の効果を引き出す理論的説明が可能となり、改善を促す創薬への期待も高まるものと思われる。

利益相反自己申告：申告すべきものはなし

謝 辞

本研究を行うにあたり、多大なるご尽力を賜りました、福岡大学スポーツ健康科学研究科の皆さま、アニマルセンターの清水直美先生、職員の皆さまに感謝申し上げます。

本研究は文部科学省科学研究費助成事業（基盤B：15H03082）の助成を受けて実施した。

文 献

- 1) Schaffner F, Thaler H. Nonalcoholic fatty liver disease. *Prog Liver Dis* 8: 283-298, 1986.
- 2) Williams CD, Stengel J, Asike MI, Torres DM, Shaw J, Contreras M, Landt CL, Harrison SA. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis among a largely middle-aged population utilizing ultrasound and liver biopsy: a prospective study. *Gastroenterology* 140: 124-131, 2011.
- 3) Vernon G, Baranova A, Younossi ZM. Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. *Aliment Pharmacol Ther* 34: 274-285, 2011.
- 4) Eguchi Y, Hyogo H, Ono M, Mizuta T, Ono N, Fujimo-

- to K, Chayama K, Saibara T; JSG-NAFLD. Prevalence and associated metabolic factors of nonalcoholic fatty liver disease in the general population from 2009 to 2010 in Japan: a multicenter large retrospective study. *J Gastroenterol* 47: 586–595, 2012.
- 5) Jimba S, Nakagami T, Takahashi M, Wakamatsu T, Hirota Y, Iwamoto Y, Wasada T. Prevalence of non-alcoholic fatty liver disease and its association with impaired glucose metabolism in Japanese adults. *Diabet Med* 22: 1141–1145, 2005.
 - 6) Hamaguchi M, Kojima T, Takeda N, Nakagawa T, Taniguchi H, Fujii K, Omatsu T, Nakajima T, Sarui H, Shimazaki M, Kato T, Okuda J, Ida K. The metabolic syndrome as a predictor of nonalcoholic fatty liver disease. *Ann Intern Med* 143: 722–728, 2005.
 - 7) 厚生労働省. 人口動態統計月報年計 (概数) の概況 (平成27年).
 - 8) Yoshimura E, Kumahara H, Tobina T, Ayabe M, Matono S, Anzai K, Higaki Y, Kiyonaga A, Tanaka H. A 12-week aerobic exercise program without energy restriction improves intrahepatic fat, liver function and atherosclerosis-related factors. *Obes Res Clin Pract* 5: e169–266, 2011.
 - 9) Rector RS, Uptergrove GM, Morris EM, Borengasser SJ, Laughlin MH, Booth FW, Thyfault JP, Ibdah JA. Daily exercise vs. caloric restriction for prevention of nonalcoholic fatty liver disease in the OLETF rat model. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 300: G874–883, 2011.
 - 10) Jordy AB, Kraakman ML, Gardner T, Estevez E, Kammoun HL, Weir JM, Kiens B, Meikle PJ, Febbraio MA, Henstridge DC. Analysis of the liver lipidome reveals insights into the protective effect of exercise on high-fat diet-induced hepatosteatosis in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 308: E778–791, 2015.
 - 11) Baliga MS, Jagetia GC, Venkatesh P, Reddy R, Ulloor JN. Radioprotective effect of abana, a polyherbal drug following total body irradiation. *Br J Radiol* 77: 1027–1035, 2004.
 - 12) Van der Meeren A, Lebaron-Jacobs L. Behavioural consequences of an 8 Gy total body irradiation in mice: regulation by interleukin-4. *Can J Physiol Pharmacol* 79: 140–143, 2001.
 - 13) Kawai S, Takagi Y, Kaneko S, Kurosawa T. Effect of three types of mixed anesthetic agents alternate to ketamine in mice. *Exp Anim* 60: 481–487, 2011.
 - 14) Saba L, di Martino M, Bosco S, Del Monte M, de Cecco CN, Lombardo V, Piga M, Catalano C. MDCT classification of steatotic liver: a multicentric analysis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 27: 290–297, 2015.
 - 15) Xu ZJ, Fan JG, Ding XD, Qiao L, Wang GL. Characterization of high-fat, diet-induced, non-alcoholic steatohepatitis with fibrosis in rats. *Dig Dis Sci* 55: 931–940, 2010.
 - 16) Lieber CS, Leo MA, Mak KM, Xu Y, Cao Q, Ren C, Ponomarenko A, DeCarli LM. Model of nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Clin Nutr* 79: 502–509, 2004.
 - 17) Lee YS, Li P, Huh JY, Hwang IJ, Lu M, Kim JI, Ham M, Talukdar S, Chen A, Lu WJ, Bandyopadhyay GK, Schwendener R, Olefsky J, Kim JB. Inflammation is necessary for long-term but not short-term high-fat diet-induced insulin resistance. *Diabetes* 60: 2474–2483, 2011.
 - 18) Do GM, Oh HY, Kwon EY, Cho YY, Shin SK, Park HJ, Jeon SM, Kim E, Hur CG, Park TS, Sung MK, McGregor RA, Choi MS. Long-term adaptation of global transcription and metabolism in the liver of high-fat diet-fed C57BL/6J mice. *Mol Nutr Food Res* 55: S173–185, 2011.
 - 19) Yang ZH, Miyahara H, Takeo J, Katayama M. Diet high in fat and sucrose induces rapid onset of obesity-related metabolic syndrome partly through rapid response of genes involved in lipogenesis, insulin signaling and inflammation in mice. *Diabetol Metab Syndr* 4: 32, 2012.
 - 20) Zaragoza-Hermans N, Felber JP. Studies on the metabolic effects induced in the rat by a high-fat diet. ($U-^{14}C$) glucose metabolism in epididymal adipose tissue. *Eur J Biochem* 25: 89–95, 1972.
 - 21) Abdelmegeed MA, Yoo SH, Henderson LE, Gonzalez FJ, Woodcroft KJ, Song BJ. PPAR α expression protects male mice from high fat-induced nonalcoholic fatty liver. *J Nutr* 14: 603–610, 2011.
 - 22) Fidaleo M, Fracassi A, Zuurro A, Lavecchia R, Moreno S, Sartori C. Cocoa protective effects against abnormal fat storage and oxidative stress induced by a high-fat diet involve PPAR α signalling activation. *Food Funct* 5: 2931–2939, 2014.
 - 23) Ciapaite J, van den Broek NM, Te Brinke H, Nicolay K, Jeneson JA, Houten SM, Prompers JJ. Differential effects of short- and long-term high-fat diet feeding on hepatic fatty acid metabolism in rats. *Biochim Biophys Acta* 1811: 441–451, 2011.
 - 24) Ferre P, Foulle F. Hepatic steatosis: a role for de novo lipogenesis and the transcription factor SREBP-1c. *Diabetes Obes Metab* 12: 83–92, 2010.
 - 25) Tessari P, Coracina A, Cosma A, Tiengo A. Hepatic lipid metabolism and non-alcoholic fatty liver disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 19: 291–302, 2009.
 - 26) Koonen DP, Jacobs RL, Febbraio M, Young ME, Soltys CL, Ong H, Vance DE, Dyck JR. Increased hepatic CD36 expression contributes to dyslipidemia associated with diet-induced obesity. *Diabetes* 56: 2863–2871, 2007.
 - 27) de Carvalho FP, Benfato ID, Moretto TL, Barthichoto M, de Oliveira CA. Voluntary running decreases non-exercise activity in lean and diet-induced obese mice. *Physiol Behav* 165: 249–256, 2016.
 - 28) Fletcher JA, Meers GM, Linden MA, Kearney ML, Morris EM, Thyfault JP, Rector RS. Impact of various exercise modalities on hepatic mitochondrial function. *Med Sci Sports Exerc* 46: 1089–1097, 2014.
 - 29) Cho J, Kim S, Lee S, Kang H. Effect of training intensity on nonalcoholic fatty liver disease. *Med Sci Sports*

- Exerc* 47: 1624-1634, 2015.
- 30) Luyckx FH, Deseive C, Thiry A, Dewe W, Scheen AJ, Gielen JE, Lefebvre PJ. Liver abnormalities in severely obese subjects: effect of drastic weight loss after gastropasty. *Int J Obes Relat Metab Disord* 22: 222-226, 1998.
- 31) Prati D, Taioli E, Zanella A, Della Torre E, Butelli S, Del Vecchio E, Vianello L, Zanuso F, Mozzi F, Milani S, Conte D, Colombo M, Sirchia G. Updated definitions of healthy ranges for serum alanine aminotransferase levels. *Ann Intern Med* 137: 1-10, 2002.
- 32) Chang Y, Ryu S, Sung E, Jang Y. Higher concentrations of alanine aminotransferase within the reference interval predict nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Chem* 53: 686-692, 2007.
- 33) Kristiansen MN, Veidal SS, Rigbolt KT, Tolbol KS, Roth JD, Jelsing J, Vrang N, Feigh M. Obese diet-induced mouse models of nonalcoholic steatohepatitis-tracking disease by liver biopsy. *World J Hepatol* 8: 673-684, 2016.