高脂肪・高コレステロール食負荷による肝臓薬物代謝酵素への影響

鈴木祥菜, 佐藤陽子, 梅垣敬三, 千葉 剛*

Influence of High-fat and High-cholesterol Diet on Major CYP Activities in the Liver

Sachina Suzuki, Yoko Sato, Keizo Umegaki, and Tsuyoshi Chiba*

Information Center, National Institute of Health and Nutrition, National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition; 1-23-1 Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8636, Japan.

(Received March 31, 2016; Accepted May 20, 2016)

We previously reported that a high-fat and high-cholesterol (HFHC) diet for 12 weeks induced non-alcoholic steatohepatitis (NASH) and influenced major CYP subtype gene expression levels and activities in a mouse model. In the present study, we determined the effects of the HFHC diet on CYP expression levels and activities prior to the establishment of NASH. When male C57BL/6J mice were fed the HFHC or a normal chow diet (Control) *ad libitum* for 4 weeks, body weights were significantly lower, whereas liver weights and hepatic lipid contents were significantly higher in the HFHC group than in the Control group. Under these conditions, hepatic microsomal luciferin-H (human CYP2C9 substrate) hydroxylation activity was significantly lower in the HFHC group than in the Control group. In order to investigate drug efficacy in mice fed the HFHC diet, an intraperitoneal glucose tolerance test was conducted with or without a pretreatment with tolbutamide (a CYP2C substrate) after 4 weeks of feeding. The plasma glucose-lowering effects of tolbutamide were attenuated in the HFHC group even though luciferin-H hydroxylation activity was suppressed in this group. The reason for this discrepancy was attributed to the mRNA expression levels of *Cyp2c44* being lower and those of *Cyp2c29* and *Cyp2c66*, which are involved in the metabolism of tolbutamide, being higher in the HFHC group than in the Control group. These results indicate that the expression of Cyp2c in the liver is influenced by the HFHC diet prior to the establishment of NASH and its regulation differed among the subtypes examined.

Key words—CYP; diet; fatty liver; non-alcoholic steatohepatitis; tolbutamide

序 論

非アルコール性脂肪性肝疾患 (non-alcoholic fatty liver disease; NAFLD), さらには NAFLD が進展した非アルコール性脂肪性肝炎 (non-alcoholic steatohepatitis; NASH) は近年, 世界中で広まっている。NASH は, 脂肪変性, 炎症, 肝細胞障害 (風船様変性) を特徴とし, 将来的に肝硬変や肝がんを発症することが知られている。^{1,2)}

NASH の根本的な治療法は現在も確立しておらず, 食事や運動療法が中心となっている。しかしながら, NASH 患者は肥満, 脂質代謝異常症, 糖尿病などを罹患していることが多いため, これらの疾患に対して薬物治療が行われる。具体的には, 高脂

血症治療薬 (スタチンやプロブコールなど), インスリン抵抗性改善薬 (メトホルミンやチアゾリジンなど), 血糖降下薬 (トルブタミドなど) などが用いられる。

肝臓は薬物代謝を行う主要な臓器であり, 薬物代謝酵素である CYP が存在する。肝臓における脂肪の蓄積や炎症は, 肝臓の機能に影響を及ぼし, CYP に影響することが報告されている。³⁻⁵⁾ NASH においても, 種々の CYP の発現量や活性が変動することが報告されており,⁶⁻⁸⁾ NASH 患者における CYP の変動は薬物治療への影響が懸念される。

肝臓の病態が CYP に影響を及ぼすことが明らかとなっている一方で, 食事によっても CYP に影響を及ぼすことが明らかとなっている。当研究室でもマウスを用いた検討により通常食に比較し, 低タンパク質食において *Cyp3a* 活性が有意に増加することを認めている。⁹⁾ これらのことから, NASH の病態が確立する以前より, NASH をもたらすよ

うな食事自体が CYP 活性に影響を及ぼしている可能性が示唆される。

マウスモデルにおいて、これまで種々の NASH 誘導食が用いられている。その中で、高脂肪・高コレステロール・コール酸含有 (high-fat and high-cholesterol; HFHC) 食は、肝臓の脂質蓄積、脂肪変性、炎症、線維化だけでなく、細胞の風船様変性を引き起こすことから、よりヒトの NASH に近い病態を誘導することが報告されている。^{10,11)} われわれは HFHC 食をマウスに 12 週間負荷し、NASH を誘導した際の医薬品の代謝に関連の深い主要な CYP について検討した。その結果、NASH を発症したマウスにおいて、肝臓における Cyp1a1, 1a2, 3a 活性の亢進、Cyp2c 活性の減少を認めた。¹²⁾ しかしながら、この変動が NASH の病態が進行したためによるものであるのか、それ以前から HFHC 食の影響によるものであるのかは明らかとなっていない。

そこで本研究では、NASH 発症前の状態における HFHC 食の影響を検討するため、マウスに HFHC 食を 4 週間負荷した際の CYP への影響を Cyp1a1, 1a2, 2c, 3a に焦点を当て検討を行った。

実験方法

1. 実験動物、飼料 C57BL/6J (雄, 10 週齢) (日本クレア株式会社) を 2 群 (各 5 匹) に群分け、一方に通常飼料 (Control), もう一方に HFHC 食 (オリエンタル酵母工業株式会社) (Table 1) を与え 4 週間飼育した。室温 23±1°C, 12 時間の明暗サイクルの環境で、飼料と水は自由に摂取させ飼育を行った。餌は、月、水、金で補充を行った。飼育期間終了後、一晩 (前日の 17 時より) 絶食を行い、イソフルラン麻酔下で心臓より全血採血を行った。全身灌流を行った後、肝臓を摘出、直ちに凍結した。血液は遠心分離 (3000 rpm, 15 分, 4°C) 後、血漿を採取した。血漿サンプル及び肝臓は測定に用いるまで -80°C にて保存した。動物実験は国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所実験動物倫理委員会の承認を得て、同委員会のガイドラインに準じて行った。

2. 血液分析 血漿中のトリグリセリド (TG), 総コレステロール (TC), 遊離脂肪酸 (non-esterified fatty acids; NEFA), グルコース, asparagine

Table 1. Composition of Experimental Diets

	Control	HFHC
Composition (wt/wt%)		
CRF-1	100	38.25
Cocoa butter	—	60
Cholesterol	—	1.25
Cholate	—	0.5
Energy composition (/100 g)		
Carbohydrate (g)	55.3	21.2
Protein (g)	21.9	8.4
Fat (g)	5.4	62.1
Total calorie (kcal)	357	677

aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP) は、酵素法 (和光純薬工業株式会社, 大阪) により測定を行った。

3. 肝臓脂質の測定 肝臓脂質は Folch 法に従って抽出した。具体的には、Polytron ホモジナイザーを用い、肝臓 (約 0.1 g) を 6 mL クロロホルム/メタノール (2:1) 中でホモジナイズした。一晩静置後、濾過により不溶性の残渣を除き、クロロホルム/メタノールを加え 10 mL に調整した。各サンプル 1 mL をマイクロチューブに分注し、加温して溶媒を除去後、残留物をイソプロパノール (10% Triton-X 含有) に再懸濁した。脂質量 (TG, TC, NEFA) は酵素法 (和光純薬工業株式会社) により測定を行った。

4. 薬物代謝酵素活性の測定 肝臓 (約 0.5 g) を 0.25 M sucrose 含有 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) でホモジナイズ後、10000×g, 4°C, 30 分で遠心、上清を採取し、105000×g, 4°C, 60 分で遠心した。上清を除去後、沈殿物を 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) に再懸濁し、ミクロソーム調製液とした。タンパク質濃度は Pierce BCA protein assay kit [サーモフィッシュャーサイエンティフィック (株), Rockford] を用い測定した。各 CYP 活性は、P450-Glo™ CYP1A1 System (Luciferin-CEE) Assay, CYP1A2 System (Luciferin-1A2) Assay, CYP2C9 System (Luciferin-H) Assay, CYP3A4 System (Luciferin-PPXE) Assay, 及び NADPH Regeneration System を使用して、GloMax-Multi+ Detection System (Promega Co., Madison) にて蛍光法により測定した。CYP 活性はタンパク質濃度

Table 2. Primer Sequences (5'-3')

	Forward	Reverse
GAPDH	TGATGCTGGTGCTGAGTATGTCGT	TCTCGTGGTTCACACCCATCACAA
<i>Cyp1a1</i>	AGCTTGGCCTGGATTACTGT	AACCCCATCAACCCAGTAG
<i>Cyp1a2</i>	ACATCACAAGTGCCCTGTTCAAGC	ATCTTCCTCTGCACGTTAGGCCAT
<i>Cyp2c29</i>	AGCCTACTGTCATATTGCACGGGT	CATGCCCCAAATTTTCGCAGGGTCAT
<i>Cyp2c39</i>	CACAGCTAAAGTCCAGGAAGAG	TGAATCATGGCATCGGTATAGG
<i>Cyp2c44</i>	GAGTTTCCCAACCCAGAGAAG	CGAGGGAGAAAGGAACAAAGTAG
<i>Cyp2c55</i>	ACACACTGGCTGTTGCTATG	GTGAGAGGAGTAGTGAGAGAGATG
<i>Cyp2c66</i>	GGTCTGGCTCGAACAGAATTA	CCATTGGCAACTGGAGTAGTAT
<i>Cyp3a11</i>	AGGCAGAAGGCAAAGAAAGGCAAG	TGAGGGAATCCACGTTCACTCCAA

で補正し、コントロールに対する割合 (%) で示した。

5. CYP mRNA 発現量の測定 肝臓より TRIzol Plus RNA Purification System (Life Technologies, Carlsbad) を使用して Total RNA を抽出、PrimeScript RT Master Mix (タカラバイオ株式会社, 草津) で cDNA 合成を行った。SYBR Green PCR Master Mix 及び Thermal Cycler Dice Real Time System Single (タカラバイオ株式会社) を使用し、各遺伝子に特異的なプライマー (Table 2) を用いて定量的 RT-PCR を行った。遺伝子の発現量は、各プライマーを用いて作製した PCR 産物を塩基配列よりコピー数を算出したスタンダードとし、絶対定量法により各遺伝子発現のコピー数として算出した後、GAPDH に対する目的遺伝子の発現量の割合で表した。

6. グルコース負荷試験 (IPGTT) C57BL/6J (雄, 10 週齢) を 4 群 (各 6 匹) に群分け、Control 食 (2 群) 又は HFHC 食 (2 群) を与え、4 週間飼育した。一晚 (前日の 17 時より) 絶食後、各飼料の一方にトルブタミド (SIGMA, T0891, Lot. 80K1496) 40 mg/kg BW, もう一方に Vehicle [大豆油 (10% DMSO 含有)] を経口投与した。¹³⁾ トルブタミド投与 30 分後、すべての群にグルコース 2 g/kg BW を腹腔内投与した。グルコースの投与 -30, 0, 15, 30, 60, 120, 180 分後に尾部より採血を行い、ブリーズ II (バイエル薬品株式会社) を用い血糖値を測定した。

7. 統計処理 各データは平均値 ± 標準誤差 (S.E.M.) で示した。統計処理はすべて Student *t*-test (PASW Statistics Base18, IBM, Armonk) で行った。*p* < 0.05 を有意差ありとした。

Table 3. Body and Tissue Weights of Mice after 4 Weeks

	Control	HFHC
Body weight (g)	23.2 ± 0.44	19.4 ± 1.41*
Liver (g)	1.00 ± 0.03	1.24 ± 0.08*
Liver/BW (%)	4.31 ± 0.08	6.40 ± 0.23***
Kidney (g)	0.29 ± 0.01	0.23 ± 0.01**
Spleen (g)	0.057 ± 0.002	0.046 ± 0.004*
Epididymal fat (g)	0.31 ± 0.03	0.22 ± 0.06

C57BL/6J mice were fed the control diet or HFHC diet for 4 weeks. Data are represented as the mean ± S.E.M. *n* = 5 in each diet. **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001 vs. control.

結 果

1. 体重、各臓器重量及び血液分析 C57BL/6J マウス (雄, 10 週齢) に HFHC 食あるいは Control 食を 4 週間与えた。体重は Control 群に比較して HFHC 群で有意に低値を示し、腎臓、脾臓重量も、HFHC 群で有意に低値を示した。一方、肝臓重量及び体重当たりの肝臓重量の割合は HFHC 群で有意に高値を示しており、肝臓の肥大が確認された (Table 3)。肝臓の脂質含量を測定すると、Control 群に比較して HFHC 群において、TG では差は認められなかったが、TC 及び NEFA で有意に高値を示した (Fig. 1)。

血中の肝機能指標 (AST, ALT, ALP) において Control 群に比較して HFHC 群において有意に高値を示した (Table 4)。TC 量においても HFHC 群で有意に高値を示したが、TG 及び NEFA 量においては有意に低値を示した (Table 4)。

2. 肝臓 CYP mRNA 発現量及び CYP 活性 C57BL/6J マウス (雄, 10 週齢) に HFHC 食あるいは Control 食を 4 週間与えた後、肝臓における

Fig. 1. Hepatic Lipid Contents

After experimental periods, lipids were extracted from the liver, and TG, TC and NEFA contents were measured by enzymatic methods. Data was represented the mean and S.E.M., $n=5$ in each diet. ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ vs. control.

Table 4. Plasma Biomarker Levels of Mice after 4 Weeks

	Control	HFHC
AST (IU/L)	57.3±6.7	118.8±10.9**
ALT (IU/L)	3.8±0.2	23.6±3.1**
ALP (IU/L)	55.8±1.6	85.5±5.1**
TC (mg/dL)	68.2±2.2	82.1±5.5*
TG (mg/dL)	115.3±5.5	27.8±1.4***
NEFA (mEq/L)	1.04±0.03	0.79±0.08*
Glucose (mg/dL)	113.1±4.2	124.8±7.7

C57BL/6J mice were fed the control diet or HFHC diet for 4 weeks. Data are represented as the mean±S.E.M. $n=5$ in each diet. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ vs. control.

主要 CYP mRNA 発現量を測定した。その結果、Control 群に比較して HFHC 群で *Cyp1a1*, *1a2* mRNA 発現の増加傾向が認められ、*Cyp2c29* 及び

3a11 mRNA 発現の有意な増加が認められた [Fig. 2(A)]。そこで、同肝臓よりミクロソーム画分を調製したのち、CYP 活性を測定したところ、Control 群に比較して HFHC 群で luciferin-CEE (ヒト CYP1A1 基質) dechloroethylation 活性、luciferin-1A2 (ヒト CYP1A2 基質) demethylation 活性、luciferin-PPXE (ヒト CYP3A4 基質) dealkylation 活性の増加傾向が認められ、luciferin-H (ヒト CYP2C9 基質) hydroxylation 活性の有意な低下が認められた (Fig. 3)。

Luciferin-CEE dechloroethylation 活性、luciferin-1A2 demethylation 活性、luciferin-PPXE dealkylation 活性においては、マウスにおいて対応すると想定される *Cyp1a1*, *1a2*, *3a11* mRNA 発現と同様の傾向を示していたものの、luciferin-H hydroxylation 活性に関しては、マウスにおいて対応すると想定される *Cyp2c29* mRNA 発現が亢進しているにもかかわらず、その活性が低下していた。この原因を調べるため、その他の *Cyp2c* サブタイプについても遺伝子発現を検討したところ、Control 群と比較して HFHC 群において、*Cyp2c39*, *2c55* 及び *2c66* mRNA 発現において有意に亢進若しくは亢進傾向を示した [Fig. 2(B)]。一方、*Cyp2c44* の mRNA 発現量は有意に低値を示した [Fig. 2(B)]。この結果より、HFHC 群における luciferin-H hydroxylation 活性の低下は、*Cyp2c44* mRNA 発現量の低下が影響している可能性が考えられた。

3. 糖負荷試験 (IPGTT) HFHC 群において luciferin-H hydroxylation 活性が低下していたことから、C57BL/6J マウス (雄, 10 週齢) に HFHC 食あるいは Control 食を 4 週間与えた後、トルブタミドの血糖低下作用への影響を IPGTT により検討した。

Control 群においては、Vehicle 投与に比較し、トルブタミド投与によりグルコース負荷後の血糖値の上昇が抑制され、AUC も有意に低値を示したことから、トルブタミドが作用していることが確認できた [Fig. 4(A)]。一方、HFHC 群においては、トルブタミド投与による血糖の上昇抑制が認められず、また AUC においても、Vehicle と差が認められないことから、トルブタミドが作用していないことが認められた [Fig. 4(B)]。

Fig. 2. CYP mRNA Expression Levels in Livers

Total RNA was extracted from the liver and mRNA expression levels of major CYP subtypes (A) and other Cyp2c subtypes (B) were measured by quantitative RT-PCR. Data was represented the mean and S.E.M., $n=5$ in each diet. ** $p<0.01$ vs. control.

考 察

本研究では、NASH 発症前における HFHC 食による CYP への影響についてマウスを用いて検討した。本実験で用いた HFHC 食は NASH の特徴である肝臓の脂質蓄積、脂肪変性、炎症、線維化、細胞の風船様変性などを引き起こし、マウスにおいてヒ

トの NASH に近い病態を誘導することが報告されている。^{10,11)} この HFHC 食をマウスに 6 週間負荷した実験では、肝臓脂質 (TC, NEFA) の蓄積が認められるが、脂肪変性、炎症、線維化などの NASH の特徴において有意差は認められず、NASH 発症前の状態であることが報告されている。¹¹⁾ しかしながら、コントロール食に比較し、脂

Fig. 3. Hepatic Microsomal CYP Activities

Microsomal fractions were prepared from the liver, and the activities of major CYP subtypes were measured by a luminescent method. Luciferin-CEE; human CYP1A1 substrate, luciferin-1A2; human CYP1A2 substrate, luciferin-H; human CYP2C9 substrate, luciferin-PPXE; human CYP3A4 substrate. Data was represented the mean and S.E.M., $n=5$ in each diet. * $p<0.05$ vs. control.

肪変性、炎症、線維化のいずれにおいても、若干、高値を示していたことから、本研究においては、6週間よりも短い4週間で検討を行った。その結果、HFHC食4週間負荷において、luciferin-H（ヒトCYP2C9基質）hydroxylation活性の有意な低下が認められたにもかかわらず、トルブタミドの薬効の減弱が認められた。

HFHC食によるCYPの変動にはいくつかの原因が考えられる。

肝臓のCYPは化学物質や内在性基質の代謝に関与しているが、肝疾患を有する患者においてこの作用が影響される。ヒトにおいてはCYP2C9, 2D6, 2E1は肝疾患の影響を受け難いが、CYP1A, 2C19, 3Aは影響を受け易いとされる。¹⁴⁾ またCYPの変動パターンは、肝疾患の病因に応じて異なることが報告されている。¹⁴⁾ 本実験において、HFHC食4週間負荷において、AST, ALT, ALPが高値を示しており、肝機能が悪化し始めていることが示唆される。

本研究において認められたCYPの変動は、この肝機能の悪化が原因の1つと考えられる。

また、タンパク質の摂取量が原因している可能性もある。HFHC4週間負荷後の体重はControl群に比較してHFHC群で有意に低値を示し、この体重減少は少ないタンパク質摂取が原因と考えられる。¹⁵⁾ このタンパク質摂取量が体重だけでなく、肝臓のCYP活性に影響している可能性も示唆される。当研究室でコントロール食と高脂肪食若しくは高タンパク質食を比較した場合、主要肝ミクロソームCYP活性に差は認められなかったものの、コントロール食と低タンパク質食を比較した場合、低タンパク質食でCYP活性の亢進が認められている。⁹⁾ しかしながら、低タンパク質食では肝臓重量も低下しており、タンパク質摂取量の影響を示すには更なる検討が必要である。

HFHC食によりCyp2c活性の指標として測定したluciferin-H hydroxylation活性は低下していたこ

Fig. 4. Influences of HFHC Diet on the Efficacy of Tolbutamide

Mice were fed control (A) or HFHC (B) diet for 4 weeks. After overnight fasting, tolbutamide was administered (*p.o.* 40 mg/kg BW), then plasma glucose levels were measured after glucose administration (*i.p.* 2 g/kg BW). The area under the curve for plasma glucose during the 180-min period after glucose administration was calculated. ○ : vehicle, ● : tolbutamide. Values are means $\pm$ S.E.M., $n=6$. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ vs. vehicle.

とから、トルブタミドによる血糖低下作用が亢進していることを予想して IPGTT を行ったが、予想に反してトルブタミドによる血糖低下作用は減弱されていた。この原因としていくつか考えられる。本実験で用いた CYP 活性の測定はヒト CYP 活性用の試薬であるため、マウスにおいては他のタイプ若しくはサブタイプ活性が影響している可能性を否定できない。また、HFHC 食により luciferin-H hydroxylation 活性は低下している一方で、HFHC 食では肝臓が肥大していることから、個体レベルでの総 luciferin-H hydroxylation (若しくは Cyp2c) 活性は低下していない可能性がある。しかしながら、HFHC 食による肝臓の肥大率は約 20% であるのに

対して、luciferin-H hydroxylation 活性の低下は約 35% であったことから、トルブタミドの薬効の減弱を説明できない。トルブタミドは、ヒトにおいて CYP2C8, 2C9, 2C19 で代謝されるが、主に CYP2C9 が代謝に寄与している。¹⁶⁻¹⁸⁾ これはヒトの肝臓ミクロソーム中の CYP2C サブファミリーの各平均量の違いが関連し、¹⁹⁾ CYP2C9 に比較して CYP2C8 で代謝されるトルブタミド量は 1/3 より少なく、CYP2C19 で代謝される量はそれよりもさらに少ないとされている。¹⁸⁾ 本研究においては、HFHC 食により Cyp2c29, 2c39, 2c55, 2c66 mRNA 発現が亢進しており、このうち、Cyp2c29, 2c39 はヒト CYP2C8 とホモロジーが高く、²⁰⁾ Cyp2c66 は

ヒト CYP2C9 とホモロジーが高いため,²¹⁾ マウスにおいては Cyp2c29, 2c39, 2c66 がトルブタミドの代謝に関与していると考えられる。実際に Cyp2c29 及び 2c39 がトルブタミドの代謝に寄与しているという報告があるが,²²⁾ 現時点で Cyp2c66 に関する報告はなく、いずれのサブタイプの関与が大きいのかは、更なる検討が必要である。

トルブタミドの血糖低下作用の減弱が CYP の活性化を介したものではない可能性も否定できない。トルブタミドは膵 β 細胞を刺激してインスリンの分泌を促進することにより血糖を低下させる。つまり、HFHC 食によりインスリンの分泌能が障害を受けていたり、インスリン感受性が低下している可能性も考えられる。これまでに、マウス^{23,24)} 及びヒト^{25,26)} において高脂肪食の摂取は短期間においてもインスリン抵抗性をもたらすことが示されている。これらの報告では、血中のインスリンレベルは一致してコントロールよりも高値を示していることから、インスリン分泌能が障害されているのではなく、末梢におけるインスリン感受性が低下し、その代償としてインスリン分泌が亢進していることが示されている。本研究においても HFHC 食によるトルブタミドの薬効の減弱は末梢のインスリン感受性の低下による可能性も考えられる。本研究結果が CYP の活性化を介したものであるかを明らかにするためには、肝ミクロソームを用いてトルブタミドの代謝活性を算出することで推測ができるかもしれない。しかしながら、*in vivo* での動態を把握するにはトルブタミドの血中濃度を測定し、実際にトルブタミドの代謝が亢進しているかどうかを明らかにしなければならない。本研究においては、あくまで薬物代謝酵素への影響を検討することを目的としており、CYP の遺伝子発現量や活性に着目しているため、薬物の血中動態を検討することは今後の課題とする。

本研究結果はあくまでマウスでの検討であることを考慮しなくてはならない。前述のように、マウスとヒトでは CYP サブタイプ自体が異なっている。マウスではヒトと異なる様々なサブタイプが存在しており、さらに、その挙動はサブタイプ毎に異なっており、ヒトにおいては NAFLD 進行とともに CYP2C9 の mRNA 発現量及び活性が増加し、反対に CYP2C19 の mRNA 発現量及び活性が低下する

ということが報告されている。⁸⁾ このことから、CYP 活性への影響を検討するには、種差だけでなく、サブタイプまで考慮しなければならない。また、肝臓の脂質に着目した場合、Control 群に比較して HFHC 群において、肝臓 TC 量、NEFA 量が有意に高値を示しているが、肝臓 TG 量については 2 群の間で有意差はない (Fig. 1)。本実験の結果は、Matsuzawa ら¹¹⁾ やわれわれの先行研究¹²⁾ の結果と一致するが、ヒトの NASH 患者では主に TG が蓄積されることから本研究結果を当てはめる上で考慮しなければならない点の 1 つである。しかしながら、薬物への影響をヒトで試験することは難しく、マウス等のモデルを用いた推定は今後必要であろう。

本研究結果より、脂肪やコレステロールの多い食事により、薬物代謝酵素さらには薬効に影響を及ぼすことが示唆された。脂肪やコレステロールの多い食事は高脂血症を招くと同時に、肝臓における薬物代謝酵素に影響を与え、その治療薬に影響を及ぼすことが予想される。高脂血症を始めとする生活習慣病は NASH への進展をもたらすことから、医薬品を服用している患者においてその治療薬が適切に作用しているか注意が必要である。

謝辞 本研究に関して有益なご指導、ご助言を賜りました昭和女子大学生生活科学部、横谷馨倫博士に深く感謝いたします。

利益相反 開示すべき利益相反はない。

REFERENCES

- 1) Ludwig J., Viggiano T. R., McGill D. B., Oh B. J., *Mayo Clin. Proc.*, **55**, 434–438 (1980).
- 2) Sheth S. G., Gordon F. D., Chopra S., *Ann. Intern. Med.*, **126**, 137–145 (1997).
- 3) Leclercq I., Horsmans Y., Desager J. P., Delzenne N., Geubel A. P., *J. Hepatol.*, **28**, 410–416 (1998).
- 4) Gómez-Lechón M. J., Jover R., Donato M. T., *Curr. Drug Metab.*, **10**, 692–699 (2009).
- 5) Moriya N., Kataoka H., Fujino H., Nishikawa J., Kugawa F., *Biol. Pharm. Bull.*, **35**, 473–480 (2012).
- 6) Yamazaki Y., Kakizaki S., Horiguchi N., So-

- hara N., Sato K., Takagi H., Mori M., Negishi M., *Gut*, **56**, 565–574 (2007).
- 7) Fisher C. D., Jackson J. P., Lickteig A. J., Augustine L. M., Cherrington N. J., *Arch. Toxicol.*, **82**, 959–964 (2008).
- 8) Fisher C. D., Lickteig A. J., Augustine L. M., Ranger-Moore J., Jackson J. P., Ferguson S. S., Cherrington N. J., *Drug Metab. Dispos.*, **37**, 2087–2094 (2009).
- 9) Yokotani K., Chiba T., Sato Y., Nakanishi T., Murata M., Umegaki K., *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* (Tokyo), **59**, 37–44 (2013).
- 10) Jeong W. I., Jeong D. H., Do S. H., Kim Y. K., Park H. Y., Kwon O. D., Kim T. H., Jeong K. S., *J. Vet. Med. Sci.*, **67**, 235–242 (2005).
- 11) Matsuzawa N., Takamura T., Kurita S., Misu H., Ota T., Ando H., Yokoyama M., Honda M., Zen Y., Nakanuma Y., Miyamoto K., Kaneko S., *Hepatology*, **46**, 1392–1403 (2007).
- 12) Suzuki S., Sato Y., Umegaki K., Chiba T., *Endocrinol. Metab. Syndr.*, **4**, 1–6 (2015).
- 13) Yokotani K., Chiba T., Sato Y., Umegaki K., *Food Hyg. Saf. Sci.*, **55**, 73–78 (2014).
- 14) Villeneuve J. P., Pichette V., *Curr. Drug Metab.*, **5**, 273–282 (2004).
- 15) Du F., Higginbotham D. A., White B. D., *J. Nutr.*, **130**, 514–521 (2000).
- 16) Srivastava P. K., Yun C. H., Beaune P. H., Ged C., Guengerich F. P., *Mol. Pharmacol.*, **40**, 69–79 (1991).
- 17) Veronese M. E., Doecke C. J., Mackenzie P. I., McManus M. E., Miners J. O., Rees D. L., Gasser R., Meyer U. A., Birkett D. J., *Biochem. J.*, **289**, 533–538 (1993).
- 18) Komatsu K., Ito K., Nakajima Y., Kanamitsu S., Imaoka S., Funae Y., Green C. E., Tyson C. A., Shimada N., Sugiyama Y., *Drug Metab. Dispos.*, **28**, 475–481 (2000).
- 19) Imaoka S., Yamada T., Hiroi T., Hayashi K., Sakaki T., Yabusaki Y., Funae Y., *Biochem. Pharmacol.*, **51**, 1041–1050 (1996).
- 20) The National Center for Biotechnology Information (NCBI) HomoloGene Database. “CYP2C8”: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/homologene/117948>, cited 15 March, 2016.
- 21) The National Center for Biotechnology Information (NCBI) HomoloGene Database. “CYP2C9”: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/homologene/133566>, cited 15 March, 2016.
- 22) DeLozier T. C., Tsao C. C., Coulter S. J., Foley J., Bradbury J. A., Zeldin D. C., Goldstein J. A., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **310**, 845–854 (2004).
- 23) Lee Y. S., Li P., Huh J. Y., Hwang I. J., Lu M., Kim J. I., Ham M., Talukdar S., Chen A., Lu W. J., Bandyopadhyay G. K., Schwendener R., Olefsky J., Kim J. B., *Diabetes*, **60**, 2474–2483 (2011).
- 24) Kahle M., Schäfer A., Seelig A., Schultheiß J., Wu M., Aichler M., Leonhardt J., Rathkolb B., Rozman J., Sarioglu H., Hauck S. M., Ueffing M., Wolf E., Kastenmueller G., Adamski J., Walch A., Hrabé de Angelis M., Neschen S., *Mol. Metab.*, **4**, 39–50 (2015).
- 25) Brøns C., Jensen C. B., Storgaard H., Hiscock N. J., White A., Appel J. S., Jacobsen S., Nilsson E., Larsen C. M., Astrup A., Quistorff B., Vaag A., *J. Physiol.*, **587**, 2387–2397 (2009).
- 26) Bisschop P. H., de Metz J., Ackermans M. T., Endert E., Pijl H., Kuipers F., Meijer A. J., Sauerwein H. P., Romijn J. A., *Am. J. Clin. Nutr.*, **73**, 554–559 (2001).