

学位論文

Splenectomy reduces fibrosis and preneoplastic lesions
with increased triglyceride and essential fatty acid in rat
liver cirrhosis induced by a choline-deficient L-amino
acid-defined diet

(ラットコリン欠乏食 L アミノ酸置換食モデルにおいて、脾摘は肝線維化・肝
前癌性病変を抑制するが、肝中性脂肪量・必須脂肪酸量を増加させる)

申請者氏名： 大石 俊之

所属： 山口大学大学院

医学系研究科応用分子生命科学系専攻

先端分子応用医科学領域 消化器病態内科

平成 23 年 1 月作成

目次

1. 要旨	3
2. 研究の背景	3
3. 方法	4
4. 結果	7
5. 考察	9
6. 結論	11
7. 謝辞	11
8. 参考文献	11

1. 要旨

【目的】非アルコール性脂肪肝炎において、脾摘がどのような意義をもつのかを検証するために、以下の実験を行った。

【方法】5週齢のWisterラットに対して、8週間コリン欠乏食を与え、NASHモデルを作成し、その後シャム手術・脾摘術を施行し、術4週後に屠殺した。

【結果】脾摘群では、シャム群に比較して、肝線維化・肝前癌性病変が抑制され、 α SMAの発現が抑制されていた【肝線維化面積 シャム群 $8.63 \pm 4.09\%$ 、脾摘群 $5.45 \pm 3.69\%$ ($p < 0.01$)】 【肝前癌性病変の大きさ シャム群 $6.56 \pm 3.68 \times 10^6 \mu\text{m}^2/\text{cm}^2$ 、脾摘群 $4.63 \pm 3.27 \times 10^6 \mu\text{m}^2/\text{cm}^2$ ($p < 0.05$)】 【肝前癌性病変の個数 シャム群 8.33 ± 3.96 個、脾摘群 5.17 ± 1.80 個 ($p < 0.01$)】 【 α SMA陽性面積 シャム群 $4.41 \pm 2.48\%$ 、脾摘群 $2.75 \pm 1.66\%$ ($p < 0.01$)】。一方、肝中性脂肪量・肝必須脂肪酸量は脾摘群で有意に増加した【肝中性脂肪量 シャム群 $182 \pm 35.0\text{mg/g}$ 脾摘群 $230 \pm 35.0\text{mg/g}$ ($p < 0.05$)】 【肝リノール酸量 シャム群 $17.2 \pm 4.9\text{mg/g}$ 脾摘群 $23.3 \pm 6.9\text{mg/g}$ ($p < 0.05$)】 【肝 α リノレン酸量 シャム群 $118 \pm 36.6\text{mg/g}$ 脾摘群 $162 \pm 51.4\text{mg/g}$ ($p < 0.05$)】。また、脾摘群では、脂肪酸代謝関連遺伝子の発現が有意に抑制されていた。【ACO, L-CPTI, CYP4A, LCAD ($p < 0.05$), MCAD ($p < 0.01$)】。

【結論】今回の実験結果から、脾摘はラットコリン欠乏食モデルにおいて、肝脂質代謝、肝線維化・前癌性病変に対して重要な役割をもっていることが明らかとなった。

2. 研究の背景

NASH (non alcoholic steatohepatitis) は、1980年にLudwigらにより初めて報告された疾患概念である(1)。本疾患は、肝障害が引き起こされるほどのアルコールの摂取が認められないのにも関わらず、アルコール性肝障害に類似した病態を呈し、単純性脂肪肝から脂肪肝炎・肝硬変へと進行し、最終的には、肝発癌を呈する病態で(1)、世界中で罹患者数は増えているのが現状である。NASHの原因としては、最初に脂肪肝(First hit)が起こり、その後に脂肪肝炎へと移行する(Second hit)という、Dayらの提唱したtwo-hit theoryが現在のところ最も支持されている(2)。しかしながら、具体的なNASH発症メカニズムは未だ十分には解明されているとはいえない。これまでのところ、高血圧・脂質異常症・耐糖能異常などの、いわゆるメタボリック症候群が背景に

first hit である脂肪肝が発症し、その後、何らかの要因により NASH へと進展すると考えられている (2)。さらに NASH は肝硬変へと進行し、最終的には肝発癌をきたす。

一方、肝硬変患者は、脾機能亢進を呈し、汎血球減少を引き起こすこともある。著しい汎血球減少が存在する場合は、インターフェロン治療や肝細胞癌に対する抗癌剤治療、肝切除や肝移植術などの妨げになる場合もある (3)

このような脾機能亢進症には、外科的に脾摘術が施行されることが多いが、術後に肝機能が改善したとの報告がある (4)。さらに基礎研究でも、脾摘術が肝線維化を改善させたとの報告がある。その機序としては脾摘により、肝線維化を促進させると考えられている脾臓由来 TGF- β 1 が除去された可能性 (5)、肝臓中での TNF- α の発現が上昇した可能性 (6)、上昇した血小板が肝線維化を抑制した可能性 (7) などの報告がある。このように基礎・臨床研究の両面で、脾摘術が肝線維化を改善させる可能性が報告されている。

しかしながら脾摘により脂質代謝が悪化したという報告が過去に散見される。具体的には、高コレステロール(高脂肪)食を与えたウサギにおいて、脾摘により HDL コレステロールを低下させ、総コレステロール・トリグリセリドを上昇させ、大動脈の粥状変化を促進させたとする報告 (8)、普通食・高脂肪食を与えたラットにおいて、脾摘が HDL コレステロールの低下とトリグリセリドの上昇をもたらしたとする報告 (9)、普通食・高コレステロール食を与えたラット脾部分保護術群では脂質代謝の悪化を防止できたとする報告 (10) などである。つまり脾摘により脂質代謝を悪化させる可能性がある。

NASH の根本的な発症原因は未だ明らかではないが、その成立過程から考えると、本疾患は、肝臓における線維化と脂質代謝の両者の要因を合わせ持っている可能性があるものの、NASH に対する脾摘術の影響を検討した報告は未だ存在しない。そこで今回我々は、NASH 動物モデルの一つである、ラットコリン欠乏-L アミノ酸置換食モデル(ラット脂肪肝線維化モデル)を用いて(11)、NASH における脾摘術の意義について検討し、脾摘が肝中性脂肪、必須脂肪酸量の増加をもたらすものの、肝線維化および前癌性病変の発症を抑制することを明らかにしたのでここに報告した。

3. 方法

対象動物

5 週齢で体重 100-120g のオス Wistar ラット(日本エスエルシー株式会社から提供)を使用した。1 週間の隔離の後、実験室で飼育し、部屋は温度と湿度は一

定にコントロールされ、日照は 12 時間周期に固定された。また実験期間中、食事と水は自由に摂取できる環境下で飼育した。

実験のプロトコール

実験動物は 2 群に分けられた。シャム手術群(n=7)、脾摘群(n=7)

実験期間中、ラットは 12 週間コリン欠乏食 (CDAA 食) を与えられた。CDAA 食開始 8 週後、シャム手術、脾摘術が施行された (13 週齢)。手術から 4 週後、両群を屠殺した (17 週齢)。実験開始時から終了時まで、4 週毎に体重を測定し、脾摘時とサクリファイス時には、脾重量を測定した。

またこれに加えて普通食を与え、13 週齢でシャム手術、脾摘術を施行した群 (各群 n=6) を作成し、普通食シャム手術群・普通食脾摘術群とし、17 週齢で両群を屠殺した。

血液検査

ラットを屠殺し、門脈から 5ml の血液を採取した。白血球・赤血球・ヘモグロビン・血小板は多項目自動血球計数装置 KX-21NV (SYSMEX CORPORATION)で測定した。総蛋白・総ビリルビン・アルブミン・ALT・AST・総コレステロール・トリグリセリド・HLD コレステロールは、臨床化学自動分析装置 SPOTCHEM EZ SP-4430 (ARKRAY, Inc)で測定した。また、TGF- β 1 は Immunoassay (ELISAs, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)で測定した。

肝中性脂肪量・脂肪酸量の測定

実験終了後、全ての個体の肝脂質量・肝脂肪酸分画を測定した。中性脂肪は Folch 法で抽出し、脂肪酸分画はガスクロマトグラフ質量分析計 GC-17A (島津製作所) で測定した。

病理検査及び免疫染色検査

肝組織は、4%パラホルムアルデヒド中で固定し、固定標本からパラフィン標本を作成した。同標本から、切片を作成し、シリウスレッド染色・免疫染色を行った。免疫染色には、Vectastain ABC kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA)を使用し、抗体は anti- α -smooth muscle actin (α -SMA ;dilution1:300) (Abcam, Cambridge, MA) and anti-transforming growth factor (TGF- β 1 ; dilution 1:100) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) and glutathione S-transferase placental form (GST-P ; dilution 1:1000)-positive lesions (as preneoplastic lesions) (MBL : MEDICAL& BIOLOGICAL LABORATORIES

CO., LTD)を使用し、アビジン・ビオチン・ペルオキシダーゼ複合体法によって行った(13)。シリウスレッド・ α -SMA, TGF- β 1 陽性面積は、MetaMorph software (Universal Imaging Corporation, Downingtown, PA)を使用して行った。画像解析は40倍視野で1標本から任意に10視野を抽出し、標本面積に対する陽性面積の割合を測定し、行った。GST-P 免疫染色標本は各肝臓より3枚ずつ作成し、HS オールインワン蛍光顕微鏡 BZ-9000(KEYENCE)を用いて、各標本の切片面積、腫瘍面積を算出した。その値を元に各個体の担腫瘍率、単位切片面積あたりの腫瘍面積・腫瘍数を求め、両群間で比較検討した。

Real time RT-PCR

RNAは説明書に従ってTRIzol (Invitrogen)を使用し、それぞれの肝臓・脾臓より抽出した。cDNAは、RNAからrandom hexamersとTranscriptor First Strand cDNA synthesis kit (Roche, Indianapolis, IN)を用いて精製し、 -20°C で保存した。Real-time PCRはFast SYBR Green Master Mix、対応するプライマー、サンプルDNA、d-waterで行われた。PCRのサイクルは、 95°C 20秒を1サイクル、 95°C 3秒・ 60°C 30秒を40サイクル、 95°C 15秒・ 60°C 1分・ 95°C 15秒を1サイクルで行った。反応はStep One Plus™ Real time PCR system (Applied Biosystems, California, CA)で行われ、mRNA量はStepOne™ Software version 2.1(Applied Biosystems, CA)で定量化された。GAPDHを内在性コントロールとして使用した。以下のプライマーを使用した。GAPDH, α SMAは(14)で使用されている配列と同様のプライマー配列を使用し、acyl-CoA oxidase (ACO), liver carnitine palmitoyl-CoA transferase (L-CPT) I, cytochrome P450 4A (CYP4A), long-chain acyl-CoA dehydrogenase (LCAD), medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD), peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α), fatty acid synthase (FAS), sterol regulatory element-binding protein (SREBP)-1cは(15)で使用されている配列と同様のプライマー配列を使用した。

蛋白抽出及びウエスタンブロット

シャム手術群と脾摘群から、肝サンプルを採取した。肝サンプル(およそ40mg)は1mlのcell lysis buffer (Cell Signal Technology Inc, MA)でホモジナイズし、phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF)とComplete mini (Roche Diagnostic, Pleasanton, CA)で遠心し、蛋白を分離採取した。次に、40 μg の蛋白を同量のloading buffer(5% 2-mercaptoethanol and 95% Laemmli Sample

Buffer[Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA]と混合し、100°Cで3分間熱して、10% SDS-PAGE で分離した。分離したバンドは、Immobilon-P transfer membrane (Millipore, Billerica, MA)に移され、blocking buffer (0.1% Tween-20 [Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan])、0.2% I-Block™ reagent (Tropix, Inc., Bedford, MA)、1mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) (Invitrogen Corp, Carlsbad, CA)で1時間ブロッキングを行った。

メンブレンは、washing buffer (0.1% Tween-20, 1 mM Tris-HCl buffer [pH 7.5])で洗浄され、blocking buffer 中で、一次抗体(α -SMA [Abcam Inc, Cambridge, MA], and β -actin [Abcam Inc, Cambridge, MA])と一緒に、室温で1時間インキュベートされた。洗浄後、メンブレンは、二次抗体と一緒に室温で1時間インキュベートされた。バンドは、説明書に従い、ECL (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ)と autoradiography を用いて、確認した。

統計学的解析

統計学的解析は、Student の t 検定を用いた。結果は mean \pm SD で表し、P < 0.05 を統計学的有意とした。

4. 結果

体重の推移

実験開始から終了まで、両群間で体重の推移に有意差は認められなかった。(図 1A)

脾臓/体重比の推移

脾摘時 (13 週齢) の脾臓/体重比、サクリファイス時 (17 週齢) の脾臓/体重比を、13 週齢の通常食ラット (n=8) の脾臓/体重比と比較した。通常食ラットと比較して、脾摘時・サクリファイス時のシャム手術群、脾摘群で脾臓/体重比の増加が認められた (普通食群 [13weeks old]; $2.6 \times 10^{-3} \pm 0.4 \times 10^{-3}$ 脾摘群 [13weeks old] $5.7 \times 10^{-3} \pm 3.1 \times 10^{-3}$, P < 0.05, シャム手術群 [17weeks old] $6.4 \times 10^{-3} \pm 1.5 \times 10^{-3}$, P < 0.01) (図 1B)。脾摘時・サクリファイス時の群間では、脾臓/体重比には有意差は認められなかった (図 1B)。

血液検査

血液検査は、脾摘群で、白血球数の上昇 (シャム手術群; $6020 \pm 1800/\mu\text{l}$, 脾摘群;

13100±3900/μl, P<0.01)と血小板数の上昇(シャム手術群; $30.3 \times 10^4 \pm 8.07 \times 10^4$, 脾摘群; $39.6 \times 10^4 \pm 12.0 \times 10^4$, P<0.05)が認められたが、他項目は両群間で有意差は認められなかった(表 1、図 1C)。

肝組織標本での α-SMA 免疫染色

肝組織標本解析では、全ての個体で肝線維化が認められた。肝線維はシリウスレッド染色を用いて評価された。脾摘群では、シャム手術群に比べ、肝線維化が明らかに減少した(図 1D, 1E)。統計学的解析でも、シャム手術群に比較し、脾摘群では有意に肝線維化が抑制された(図 1F, シャム手術群; $8.63 \pm 4.09\%$ 、脾摘群; $5.45 \pm 3.69\%$, P<0.01)。活性化星細胞のマーカーである、α-SMA は、シャム手術群で著明な発現が認められた(図 2A)。一方、脾摘群では、α-SMA 陽性面積が著明に減少した(図 2B)。画像解析を行ったところ、シャム手術群に比較し、脾摘群では α-SMA の陽性面積は著しく減少した(シャム手術群; $4.41 \pm 2.48\%$ 、脾摘群; $2.75 \pm 1.66\%$, P<0.01) (図 2C)。

肝組織中の α-SMA 蛋白のウェスタンブロット解析

脾摘の活性化星細胞に対する抑制効果を確認するために、α-SMA 蛋白のウェスタンブロット解析を行った。脾摘群では、シャム手術群に比較し、α-SMA 蛋白の発現は有意に減少した(図 2D)。

肝組織中の α-SMA mRNA の Real-time RT-PCR 解析

脾摘が活性化星細胞を抑制していることを確認するために、Real-time RT-PCR 法を用いて、αSMA mRNA の発現を測定した。脾摘群では、シャム手術群に比較し、αSMA mRNA の発現は有意に抑制された(シャム手術群; 2.12 ± 0.93 , 脾摘群; 1.18 ± 0.42 , P<0.05) (図 2E)。

肝組織標本での TGF-β1 免疫染色

免疫染色で、TGF-β1 の発現を解析した(図 3A)。脾摘は TGF-β1 の発現を著明に抑制した(図 3B)。血清 TGF-β1 値は両群で差が認められなかったにもかかわらず(Figure 1C)、画像解析では、脾摘は TGF-β1 の発現を著明に抑制した(シャム手術群; $6.68 \pm 2.52\%$ 、脾摘群; $4.21 \pm 2.54\%$, P<0.01) (図 3C)。

脾摘の GST-P 陽性結節に対する効果

各個体の担腫瘍率は、両群とも 100%であった(図 3D)。しかし、脾摘群では、腫瘍の大きさ・個数は、シャム群と比較して有意に減少していた(大きさ:シャム

手術群; $6.56 \pm 3.68 \times 10^6 \mu\text{m}^2/\text{cm}^2$, 脾摘群; $4.63 \pm 3.27 \times 10^6 \mu\text{m}^2/\text{cm}^2$, $P < 0.05$) (個数: シヤム手術群; 8.33 ± 3.96 個、脾摘群; 5.17 ± 1.80 個, $P < 0.01$) (図 3E, 3F).

肝脂質量・肝脂肪酸量の解析

脾摘群では、肝脂質量・肝必須脂肪酸量は有意に増加した(中性脂肪量:シヤム手術群; $182 \pm 35.0\text{mg/g}$ 脾摘群; $230 \pm 35.0\text{mg/g}$, $p < 0.05$) (リノール酸:シヤム手術群; $17.2 \pm 4.9\text{mg/g}$ 脾摘群 $23.3 \pm 6.9\text{mg/g}$, $p < 0.05$) (α リノレン酸:シヤム手術群; $118 \pm 36.6\text{mg/g}$ 脾摘群; $162 \pm 51.4\text{mg/g}$, $p < 0.05$) (図 4A,4B,4C)。

肝組織中の脂質代謝関連遺伝子の解析

脾摘群では、L-CPTI, ACO, CYP4A, LCAD mRNA [$p < 0.05$] 及び MCAD mRNA [$p < 0.01$]の発現が有意に抑制された(図 4D,4E,4F,4G,4H)。しかし、PPAR α , FAS, SREBP-1c の発現に違いは認められなかった(図 4I,4J,4K)。また普通食シヤム術群・普通食脾摘術群の間では、L-CPTI, ACO, CYP4A, LCAD, MCAD mRNA の発現に違いは認められなかった(図 5A,5B,5C,5D,5E)。

5. 考察

過去の報告では、肝硬変ラットモデルにおいて、脾臓マクロファージから産生された TGF- β 1 が、障害肝の肝細胞増殖を阻害している可能性があること、そのため、同モデルの腫大した脾臓を摘出することにより障害肝の再生を促進させる可能性も示唆されている (5)。今回このような結果がもたらされた理由として、シャント血流の変化に伴う門脈血流の増加や肝内血流量の変化だけでなく (4)、脾摘による TGF- β 1 の動態変化 (5) などが考えられた。

TGF- β 1 は肝星細胞の活性化を引き起こし、細胞外マトリックスの産生を促進する作用をもつサイトカインであり (16)、肝線維化を促進する主要因子である。CDAA 食群での脾摘に伴い TGF- β 1 の発現は低下し、肝星細胞の活性化が抑制されたため肝線維化が改善したとも考えられる。活性化星細胞は α SMA 陽性細胞や α SMA mRNA によって検出され、肝線維化を引き起こす細胞である。ぶた血清前処理 (ラットにぶた血清を注射投与すると、実質細胞を障害せずに、星細胞を活性化し肝線維化を引き起こす) を用いた我々の以前の研究では(19)、CDAA 食単独投与を行ったラットに比べ、CDAA 食投与にぶた血清を投与したラットでは、より強い肝星細胞の活性化を引き起こした。これにより、肝マロンジアルデヒドは増加し、これに相関し肝前癌性病変である GSTP 陽性結節も増加した。これらの結果から、ラットコリン欠乏食モデルでは、肝星細胞の活性化は、前癌性病変の発症を促進することが明らかとなった。以上から、脾摘によって活性化肝星細胞が抑制されることにより、前癌性病変も抑

制されたものと考えられる。

肝脂肪酸量が増加する機序としては、肝脂肪酸合成の増加、肝への取り込みの増加もしくは肝脂質代謝の低下が考えられる。必須脂肪酸は、ヒトや他の哺乳類の生存に必要な不可欠な脂肪酸であり、体内では合成することができない、つまり食事から摂取しなければならないものである(18, 19)。必須脂肪酸には、 ω 3由来の α -リノレン酸と ω 6由来のリノール酸の2種類が存在することがわかっている。

このことから、肝脂肪化の増悪は脂肪酸代謝の低下によって引き起こされた可能性が高いと考えられる。つまり、脾摘群では、肝脂肪酸代謝が低下することにより、肝必須脂肪酸量の増加がもたらされ、それにより肝中性脂肪量の増加がもたらされたと考えられる。

本モデルは低栄養脂肪肝モデルのため(11)、血中脂質に関しては、両群間で有意差は認められなかったが、通常食や高脂肪食を使用した過去の報告によると、脾摘は血中脂質代謝を悪化させることが報告されている(8)(9)(10)。これも脾摘により肝脂肪化の増悪が引き起こされたため、生じた可能性があると考えられる。

肝臓での必須脂肪酸量やその働きについてははっきりとしたことはわかっていない。我々の実験は、NASHのエンドステージにおいて、必須脂肪酸量と中性脂肪量は相関しており、線維化の程度は逆相関していることを明らかにした。以上から、NASHが肝硬変に進行するときは肝必須脂肪酸量は減少することが示唆された。

脾摘術がNASHの病態を改善させるか否かという点に関しては、NASHの病因・病態について、未だ詳細な報告がなされていないため、ここでは明確に述べることはできない。しかしながら、今回の実験において、肝線維化・前癌性病変のみを抽出・比較した場合、脾摘により両者は明らかに抑制されていた。このためNASHによる肝硬変症例であっても、脾摘により肝線維化を改善させる可能性があると考えられる。また、ヒトにおいて、NASHのHCC発症頻度は、19.5年の観察期間で0.28%との報告があるが(20)(21)(22)(23)、脾摘はこの頻度を抑制しうる潜在的可能性がある治療法であると考えられた。

過去の臨床研究によると(26)、NASH症例では、HCC非合併例では、合併例に比べ、肝脂肪化が著明であり、高齢化と線維化の進展がHCCの発症リスクを上昇させることが判明した。これを踏まえると、NASHが肝硬変に進行するときは、肝中性脂肪量は減少することが示唆される。言い換えると、NASHのエンドステージでは、何らかの要因により病態が改善すると、肝線維化は減少するが肝脂肪化は増加することが示唆される。このことは、我々の実験結果とも一致している。

以上を踏まえると、NASH 患者でも、肝線維化・肝硬変に伴う症状・病態が主体で、それらが予後の大部分を規定していると考えられる患者では、脾摘を積極的に試みても良いと思われる。一方、肥満を伴いコントロールが不良な生活習慣病、動脈硬化性疾患による症状・病態が予後を規定していると考えられる NASH 症例に対する脾摘は、生活習慣病関連疾患のさらなる増悪を引き起こされる可能性があることに十分な注意を払うことが必要であろう。

6. 結論

脾摘はラットコリン欠乏食モデルにおいて、肝脂質代謝、肝線維化・前癌性病変に対して重要な役割をもっていることが明らかとなった。本研究は日本学術振興会、厚生労働省、知的クラスター創成事業、日本科学技術振興機構からの科学研究費補助金によって行われたものである。

7. 謝辞

本研究は日本学術振興会、厚生労働省、知的クラスター創成事業、日本科学技術振興機構からの科学研究費補助金によって行われたものである。

8. 参考文献

1. Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Oh BJ.

Nonalcoholic steatohepatitis : Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. Mayo Clin Proc. 1980 Jul;55(7):434-8.

2. Day CP, James OF.

Steatohepatitis: a tale of two "hits"?

Gastroenterology. 1998 Apr;114(4):842-5.

3. McCormick PA, Walker S, Benepal R.

Hypersplenism is related to age of onset of liver disease.

Ir J Med Sci. 2007 Dec;176(4):293-6. Epub 2007 Oct 18.

4. Murata K, Ito K, Yoneda K, Shiraki K, Sakurai H, Ito M

Splenectomy improves liver function in patients with liver cirrhosis.

- Hepatogastroenterology. 2008 Jul-Aug;55(85):1407-11.
5. Imura S, Shimada M, Utsunomiya T et al.
Impact of splenectomy in patients with liver cirrhosis: Results from 18 patients in a single center experience.
Hepatol Res. 2010 Sep;40(9):894-900.
 6. Akahoshi T, Hashizume M, Tanoue K et al.
Role of the spleen in liver fibrosis in rats may be mediated by transforming growth factor beta-1.
J Gastroenterol Hepatol. 2002 Jan;17(1):59-65.
 7. Murata K, Shiraki K, Sugimoto K et al.
Splenectomy enhances liver regeneration through tumor necrosis factor (TNF)-alpha following dimethylnitrosamine-induced cirrhotic rat model.
Hepatogastroenterology. 2001 Jul-Aug;48(40):1022-7.
 8. Watanabe M, Murata S, Hashimoto I et al.
Platelets contribute to the reduction of liver fibrosis in mice.
J Gastroenterol Hepatol. 2009 Jan;24(1):78-89. Epub 2008 Jun 25.
 9. Kanichi Asai, Masafumi Kuzuya, Michitaka Naito, Chiaki Funaki and Fumio Kuzuya
Effects of Splenectomy on Serum Lipids and Experimental Atherosclerosis.
Angiology. 1988 Jun;39(6):497-504.
 10. Fatouros M, Bourantas K, Bairaktari E, Elisaf M, Tsolas O, Cassioumis D
Role of the spleen in lipid metabolism.
Br J Surg. 1995 Dec;82(12):1675-7.
 11. Paulo DN, Paulo IC, Morais AA et al.
Is splenectomy a dyslipidemic intervention? Experimental response of serum lipids

- to different diets and operations.
- Microsurgery. 2009;29(2):154-60.
12. Koteish A, Diehl AM
- Animal models of steatosis.
- Semin Liver Dis. 2001;21(1):89-104.
13. Kawaguchi K, Sakaida I, Tsuchiya M, Omori K, Takami T, Okita K.
- Pioglitazone prevents hepatic steatosis, fibrosis, and enzyme-altered lesions in rat liver cirrhosis induced by a choline-deficient L-amino acid-defined diet.
- Biochem Biophys Res Commun. 2004 Feb 27;315(1):187-95.
14. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH.
- A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues.
- J Biol Chem. 1957 May;226(1):497-509.
15. Ishigaki N, Yamamoto N, Jin H, Uchida K, Terai S, Sakaida I.
- Continuos intravenous infusion of atrial natriuretic peptide (ANP) prevented liver fibrosis in rat.
- Biochem Biophys Res Commun. 2009 Jan 16;378(3):354-9. Epub 2008 Nov 6.
16. Tajima K, Terai S, Takami T, Kawaguchi K, Okita K, Sakaida I.
- Importance of inhibitor of DNA binding/differentiation 2 in hepatic stellate cell differentiation and proliferation.
- Hepatology. 2007 Aug;37(8):647-55. Epub 2007 Jun 6.
17. Ringseis R, Muschick A, Eder K.
- Dietary oxidized fat prevents ethanol-induced triacylglycerol accumulation and increases expression of PPARalpha target genes in rat liver.

- J Nutr. 2007 Jan;137(1):77-83.
18. Hellerbrand C, Stefanovic B, Giordano F, Burchardt ER, Brenner DA.
The role of TGF beta1 in initiating hepatic stellate cell activation in vivo.
J Hepatol. 1999 Jan;30(1):77-87.
19. Sakaida I, Hironaka K, Uchida K, Suzuki C, Kayano K, Okita K.
Fibrosis accelerates the development of enzyme-altered lesions in the rat liver.
Hepatology. 1998 Nov;28(5):1247-52.
20. Das, U.N., Horrobin, D.F., Begin, M.E. et al.
Clinical significance of essential fatty acids.
Nutrition 1988, 4, 337-342.
21. Das, U.N.
Essential fatty acids: Biology and their clinical implications.
Asian Pacific J. Pharmacol. 1991, 6, 317-330.
22. Adams LA, Lymp JF, St Sauver J et al.
The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: a population-based cohort study.
Gastroenterology. 2005 Jul;129(1):113-21.
23. Ekstedt M, Franzén LE, Mathiesen UL et al.
Long-term follow-up of patients with NAFLD and elevated liver enzymes.
Hepatology. 2006 Oct;44(4):865-73.
24. Ong JP, Pitts A, Younossi ZM.
Increased overall mortality and liver-related mortality in non-alcoholic fatty liver disease.
J Hepatol. 2008 Oct;49(4):608-12. Epub 2008 Jul 9.

25. Rafiq N, Bai C, Fang Y et al.

Long-term follow-up of patients with nonalcoholic fatty liver.

Clin Gastroenterol Hepatol. 2009 Feb;7(2):234-8. Epub 2008 Nov 7.

26. Etsuko Hashimoto, Satoru Yatsuji, Maki Tobari et al.

Hepatocellular carcinoma in patients with nonalcoholic steatohepatitis.

J Gastroenterol. 2009;44 Suppl 19:89-95. Epub 2009 Jan 16.

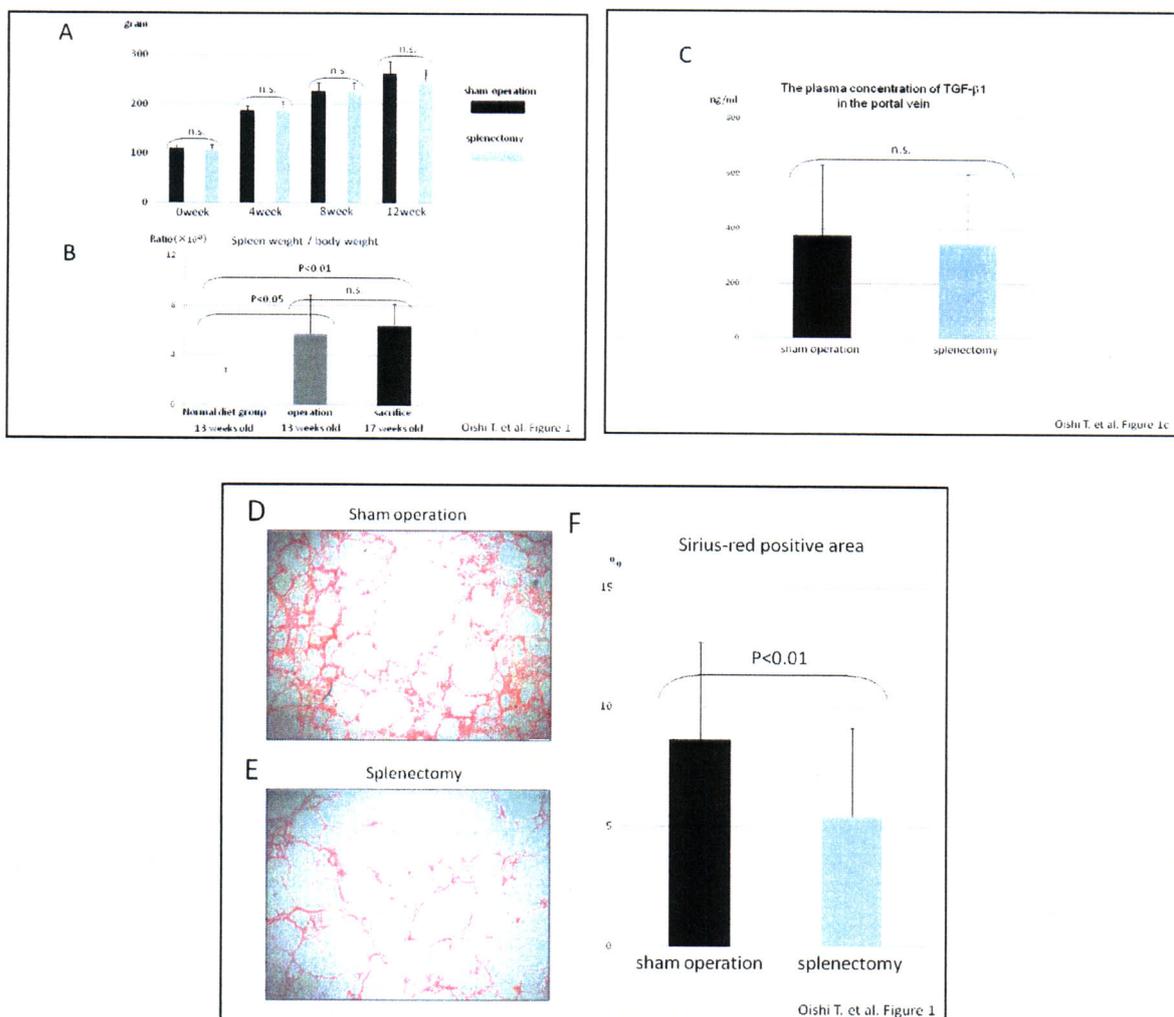


図 1

実験開始時から終了時までの体重の推移(A)。

脾臓/体重の重量比(B)。

門脈血中の TGF- β 1 の濃度(C)。

シャム手術群・脾摘群の肝パラフィン標本を用いたシリウスレッド染色(D, E)。

(元の倍率は 40 倍)

シリウスレッド染色の画像解析 (F)。

Data are means \pm SD. n.s. ; 有意差なし。

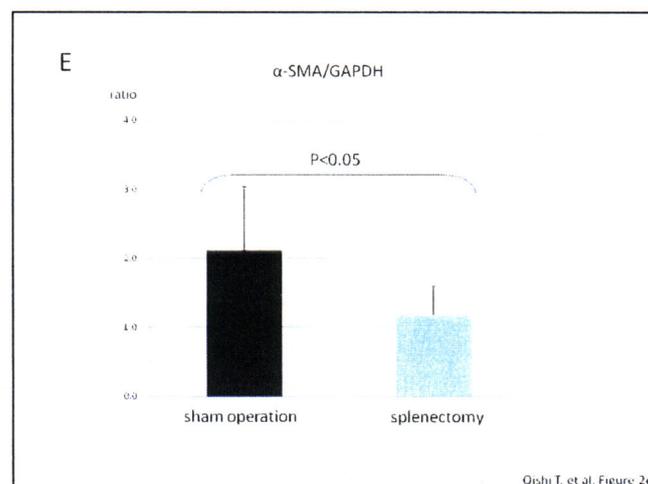
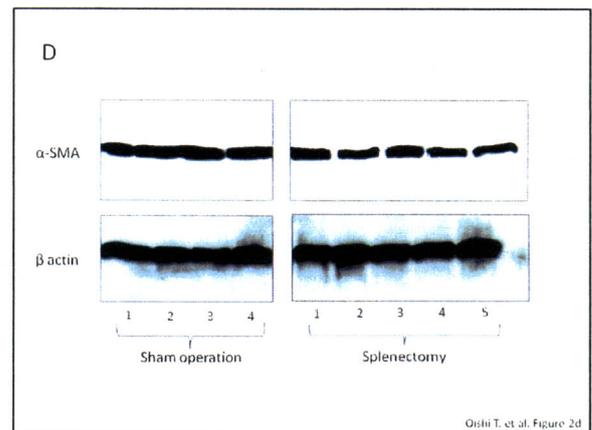
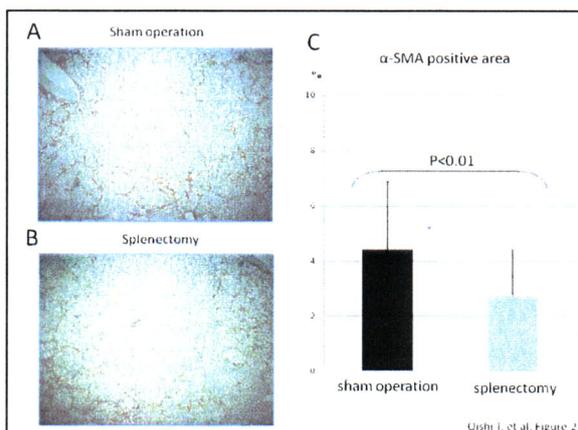


図 2

シャム手術群の α -SMA 免疫染色(A)。脾摘群の α -SMA 免疫染色(B)。

(元の倍率は 40 倍)。 α -SMA 陽性面積の画像解析 (C)。

ウエスタンブロットでは、脾摘群では、 α -SMA の発現は有意に抑制されていた(D)。

Real-Time RT PCR では、肝臓中 α -SMA mRNA の発現は脾摘群で有意に抑制されていた(E)。 Data are means \pm SD.

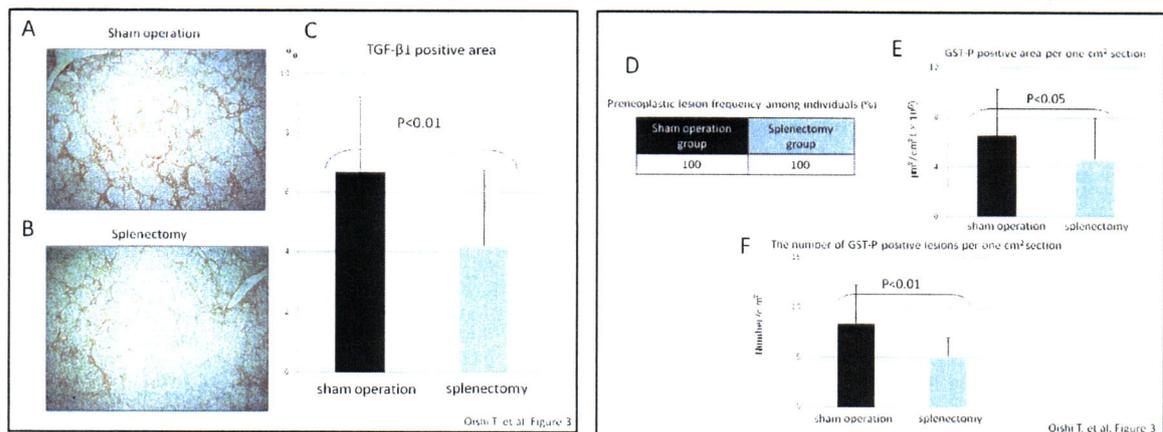


図 3

シャム手術群の TGF-β1 免疫染色(A)。脾摘群の TGF-β1 免疫染色(B)。

(元の倍率は 40 倍)。 TGF-β1 陽性面積の画像解析(C)。

各個体の担前癌性病変率(D)。各標本につき、1cm²あたりの GST-P 陽性面積(E)。

各標本につき、1cm²あたりの GST-P 陽性結節の個数(F)

Data are means \pm SD.

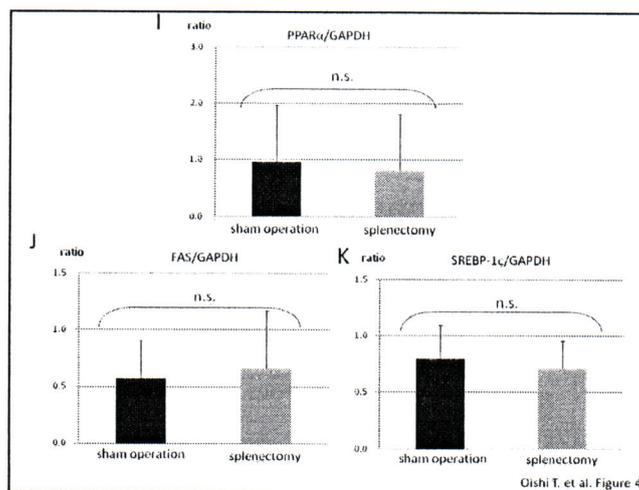
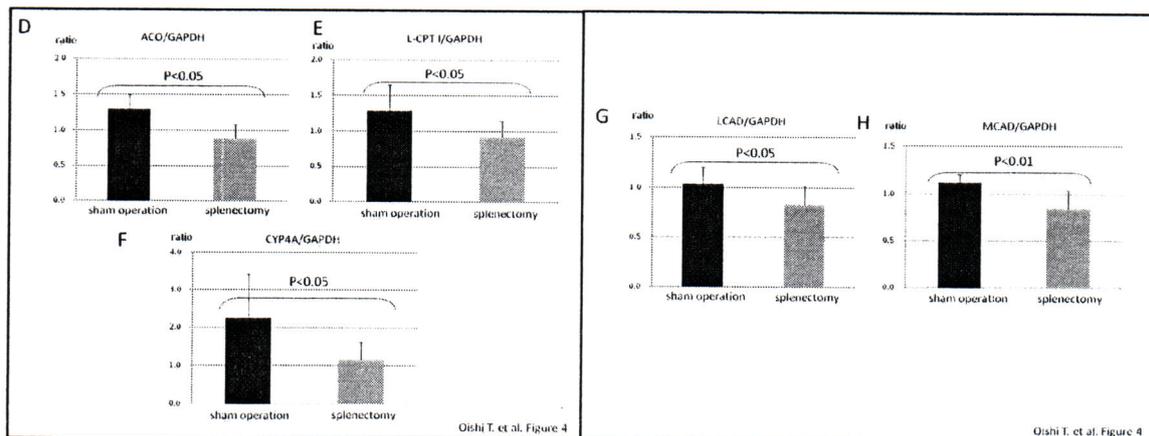
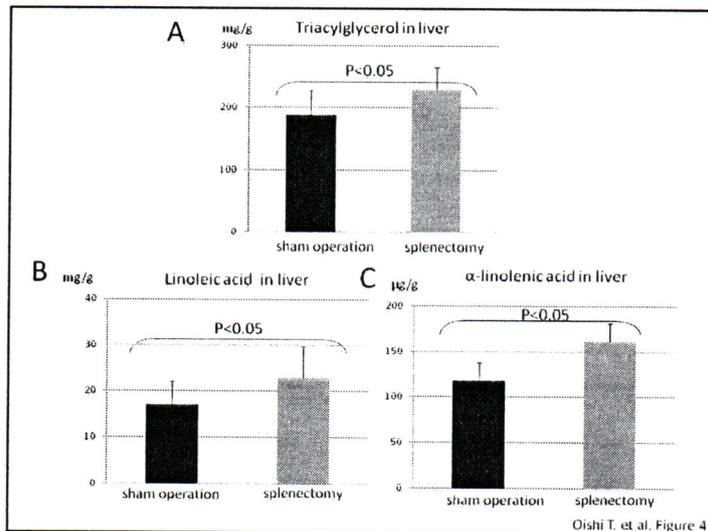


図 4

シャム手術群・脾摘群の肝中性脂肪量(A)、肝リノール酸量(B)、肝 α リノレン酸量(C)。両群の肝臓中で ACO mRNA(D), L-CPTI mRNA (E), CYP4A mRNA (F), LCAD mRNA(G), MCAD mRNA (H), PPAR α mRNA (I), FAS mRNA (J), SREBP-1c mRNA (K)の発現。

Data are means \pm SD. n.s.; 有意差なし。

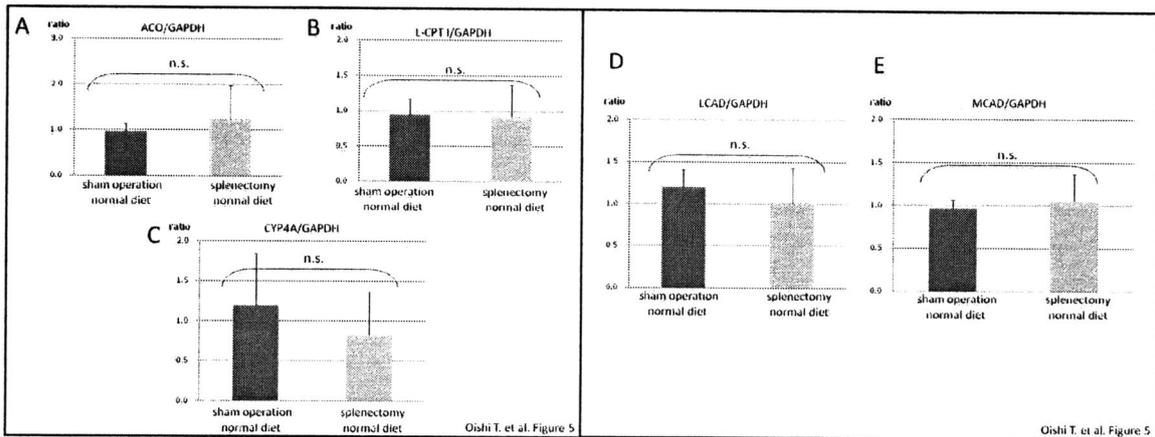


図 5

普通食を与えたシャム手術群・脾摘群の肝臓中での ACO mRNA(A), L-CPTI mRNA (B), CYP4A mRNA (C), LCAD mRNA(D), MCAD mRNA (E)の発現。

Data are means \pm SD. n.s.; 有意差なし。

	Sham operation	Splenectomy	P value
TP(g/dl)	3.4±0.6	3.9±0.6	n.s.
Alb(g/dl)	1.7±0.36	1.7±0.40	n.s.
T-bil(mg/dl)	0.3±0.1	0.3±0.1	n.s.
ALT(IU/L)	146±62.0	152±65.3	n.s.
AST(IU/L)	294±53.2	330±76.9	n.s.
WBC(/ μ l)	6020±1800	13100±3900	<0.01
RBC (/ μ l)	617±34.3 × 10 ⁴	591±84.0 × 10 ⁴	n.s.
Hb(g/dl)	10±0.44	10±1.0	n.s.
Plt (/ μ l)	30.3±8.07 × 10 ⁴	39.6±12.0 × 10 ⁴	<0.05
T-Cho(mg/dl)	50±0	50±0	n.s.
TG(mg/dl)	41±21	29±9.0	n.s.
HDL-Cho(mg/dl)	15±3.5	13±5.3	n.s.

Oishi T. et al. Table 1

表 1

シャム手術群・脾摘群の血液検査結果

Data are means ± SD. n.s.; 有意差なし