

博士（栄養学）学位論文

非アルコール性脂肪肝（non-alcoholic fatty liver : NAFL）および
非アルコール性脂肪性肝炎（non-alcoholic steatohepatitis : NASH）における
ストレス誘導バイオマーカーの検討

**Stress-induced Biomarkers in Liver with Non-Alcoholic Fatty Liver (NAFL)
and Non-Alcoholic Steatohepatitis (NASH)**

2015年

指導教員 田中明教授

氏名 小野裕美
ONO, Hiromi

女子栄養大学

略号

NAFLD : Nonalcoholic fatty liver disease

NAFL : Nonalcoholic fatty liver

NASH : Non-alcoholic steatohepatitis

MT : Metallothionein

AdN : Adiponectin

HO-1 : Heme oxygenase-1

SOD : Superoxide dismutase

HE : Hematoxylin and Eosin

ATL : Alanine aminotransferase

AST : Aspartate aminotransferase

T-Bil : Total bilirubin

TC : Total Cholesterol

TG : Triglyceride

ChE : Choline esterase

目次

1. Introduction	
1-1 NASHの発症メカニズムとストレス誘導バイオマーカー	(p.1)
1-2 メタロチオネイン (Metallothionein)	(p.6)
1-3 アディポネクチン (Adiponekuchin)	(p.9)
1-4 ヘムオキシゲナーゼ (HO-1)	(p.11)
2. 背景と目的	(p.13)
3. 対象と方法	
3-1 対象	(p.15)
3-2 方法	(p.16)
3-3 抗体	(p.16)
3-4 免疫組織染色	(p.16)
3-5 免疫染色の半定量的評価	(p.17)
3-6 統計分析	(p.17)
4. 結果	
4-1 本研究におけるNAFLおよびNASHの対象の特性	(p.17)
4-2 NAFL肝臓およびNASH肝臓のHE染色による病理学的調査	(p.18)
4-3 正常、NAFLおよびNASH肝臓におけるMT-1/2、MT-3、HO-1およびアディポネクチンの免疫組織染色	(p.18)
4-4 肝臓でのMT-1/2、MT-3、HO-1およびアディポネクチンの染色パターンと血清の肝機能障害マーカーとの相関	(p.20)
4-5 NASHにおけるMT-1/2低発現群とMT-1/2高発現群とNAFLおよびコントロール4群における、他のストレス誘導バイオマーカーの比較	(p.20)
4-6 免疫染色の結果、半定量法による発現をコントロール、NAFLおよびNASHの3群間で比較	(p.21)
4-7 肝臓でのMT-1/2、MT-3、HO-1およびアディポネクチンの染色パターンと肝機能に関連する血清臨床診断マーカーの間の相関	(p.21)
5. 考察	(p.21)
参考文献	(p.24)

図・表

図 1. NASH への進行	(p. 3)
図 2. NASH の進展メカニズム (Two hit theory)	(p. 4)
図 3. NASH の進展メカニズム (Multiple parallel hits hypothesis)	(p. 5)
図 4. メタロチオネインの構造	(p. 8)
図 5. NASH の進展におけるアディポネクチンの関与	(p.10)
図 6. ヘムオキシゲナーゼ	(p.12)
図 7. HE 染色	(p.32)
図 8. MT-1/2 染色	(p.33)
図 9. MT-3 染色	(p.34)
図 10. HO-1 染色	(p.35)
図 11. アディポネクチン染色	(p.36)
図 12. 半定量法による免疫染色発現のコントロール、NAFL および NASH の 3 群間で比較	(p.39)
図 13. 肝臓での MT-1/2、MT-3,HO-1,およびアディポネクチン染色パターンと 肝機能に関連する血漿診断マーカーの間の相関	(p.40)
表 1. コントロール、NAFL 患者および NASH 患者の臨床特性	(p.31)
表 2. 肝臓での MT-1/2、MT-3,HO-1,およびアディポネクチン染色パターンと 肝機能に関連する血漿診断マーカーの間の相関	(p.37)
表 3. NASH における MT-1/2 低発現群、MT-1/2 高発現群、NAFL およびコントロール の 4 群における他のストレス誘導バイオマーカー比較	(p.38)
謝 辞	(p.41)

非アルコール性脂肪肝 (NAFL) および非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) におけるストレス誘発性バイオマーカーの検討

1. Introduction

1-1 NASH の発症メカニズムとストレス誘導バイオマーカー

食の欧米化に伴い、我が国では肥満者、ひいては内臓脂肪の蓄積によってインスリン抵抗性を基盤とするメタボリックシンドロームの患者が増加の傾向にある。非アルコール性脂肪性肝疾患 (Nonalcoholic fatty liver disease :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る。

NAFLD には良性の単純脂肪肝 (Nonalcoholic fatty liver :NAFL) と、それが進行した非アルコール性脂肪性肝炎 (Nonalcoholic steatohepatitis :NASH) が含まれ、NASH は肝硬変、肝臓癌へと進行しうる疾患である¹⁻⁸。(図1) 我が国の人口の0.75%が NASH 患者で、人数にして約 100 万人であると推定されており、今後肥満人口の増加に伴いさらに増えることが予想される。しかし、どのような NAFL 患者が NASH 患者へと進行するのかは不明である。NAFLD の実態は現在十分に解明されておらず、その実態を解明することは急務である。

NASH の発生機序として、two hit theory が提唱されてきた (図2)⁹。まず、first hit として肝臓の細胞に脂質 (トリグリセリド : TG) が蓄積し、脂肪肝が生じ、ついで酸化ストレス・アディポサイトカインなどの second hit と想定される刺激が加わり、炎症細胞浸潤や線維化が生じて NASH が形成されると考えられている^{2,3,10-13}。しかし、近年アディポサイトカインや酸化ストレス、食事因子など様々な因子が並行して肝臓に作用し NASH の病態進展に関与しているという multiple parallel hits hypothesis [多重並行ヒット仮説] (図3) も提唱されている¹⁴。

どちらにしても NASH 発症においては酸化ストレスこそが脂肪肝に細胞障害と線維化をもたらす、最大の要因であると理解している。酸化ストレス誘導バイオマーカの発現原因と酸化障害については、ストレス誘導バイオマーカの変化が肝障害の原因なのか、あるいは結果なのかは不明確なままであるが、本研究においては、NASH および NAFLD のヒト肝臓における発現を検討するために NASH 発症との関連を推定される 4 種のストレス誘導バイオマーカを想定した。NAFL 肝臓及び、NASH 肝臓における局在性の異なる 4 種のストレス誘導バイオマーカ【メタロチオネイン(Metallothionein ; MT) MT-1/2・MT-3・ヘムオキシゲナーゼ 1 (Heme oxygenase-1 ; HO-1)・アディポネクチン (Adiponectin)】のヒト肝臓における発現を分析し、それらと血漿バイオマーカから示唆される病理的損傷の度合いとの関係を検討し、NASH の成因に迫りたいと考えた。



図1. NASHへの進行

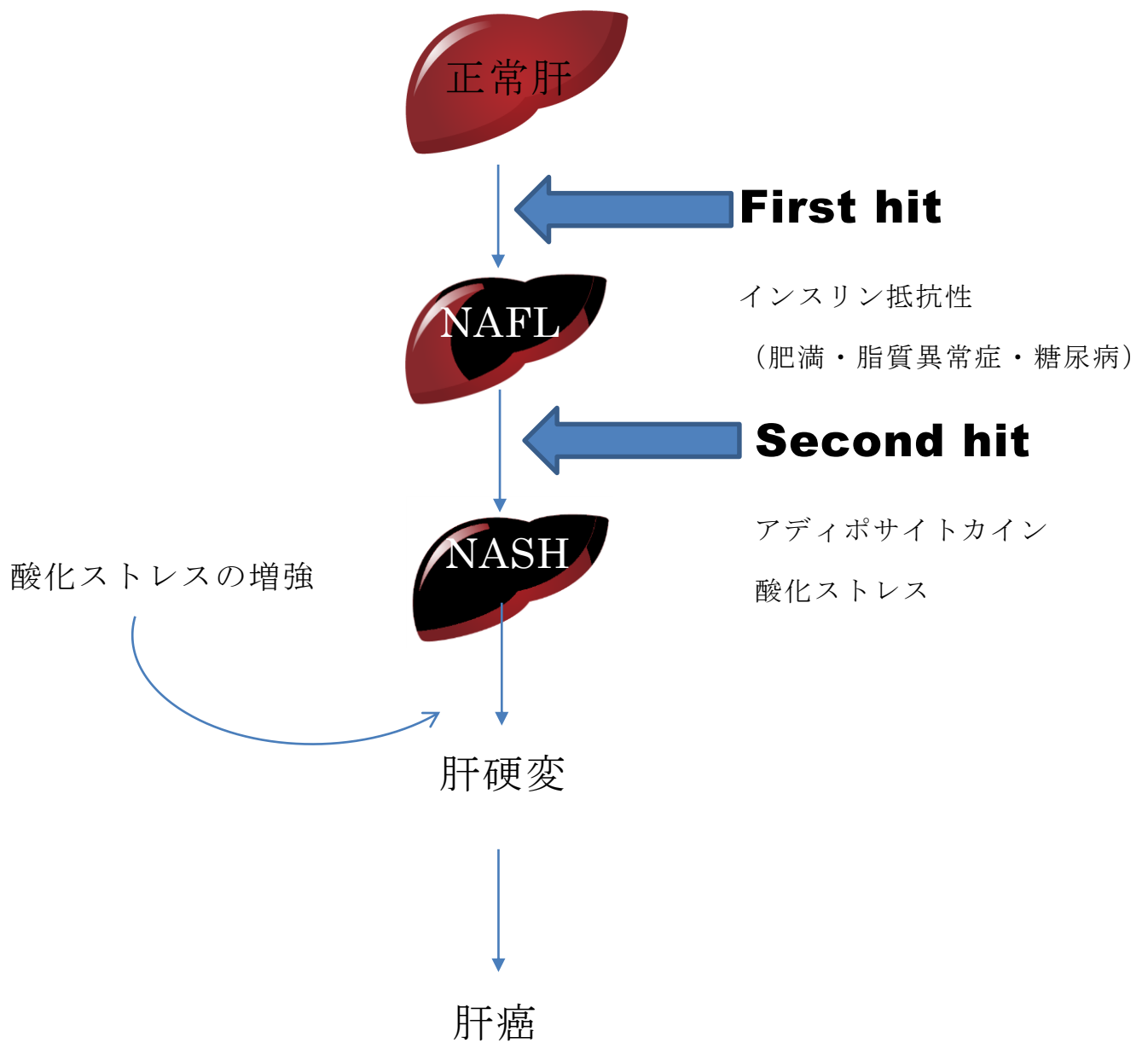


図 2. NASH の進展メカニズム (Two hit theory)

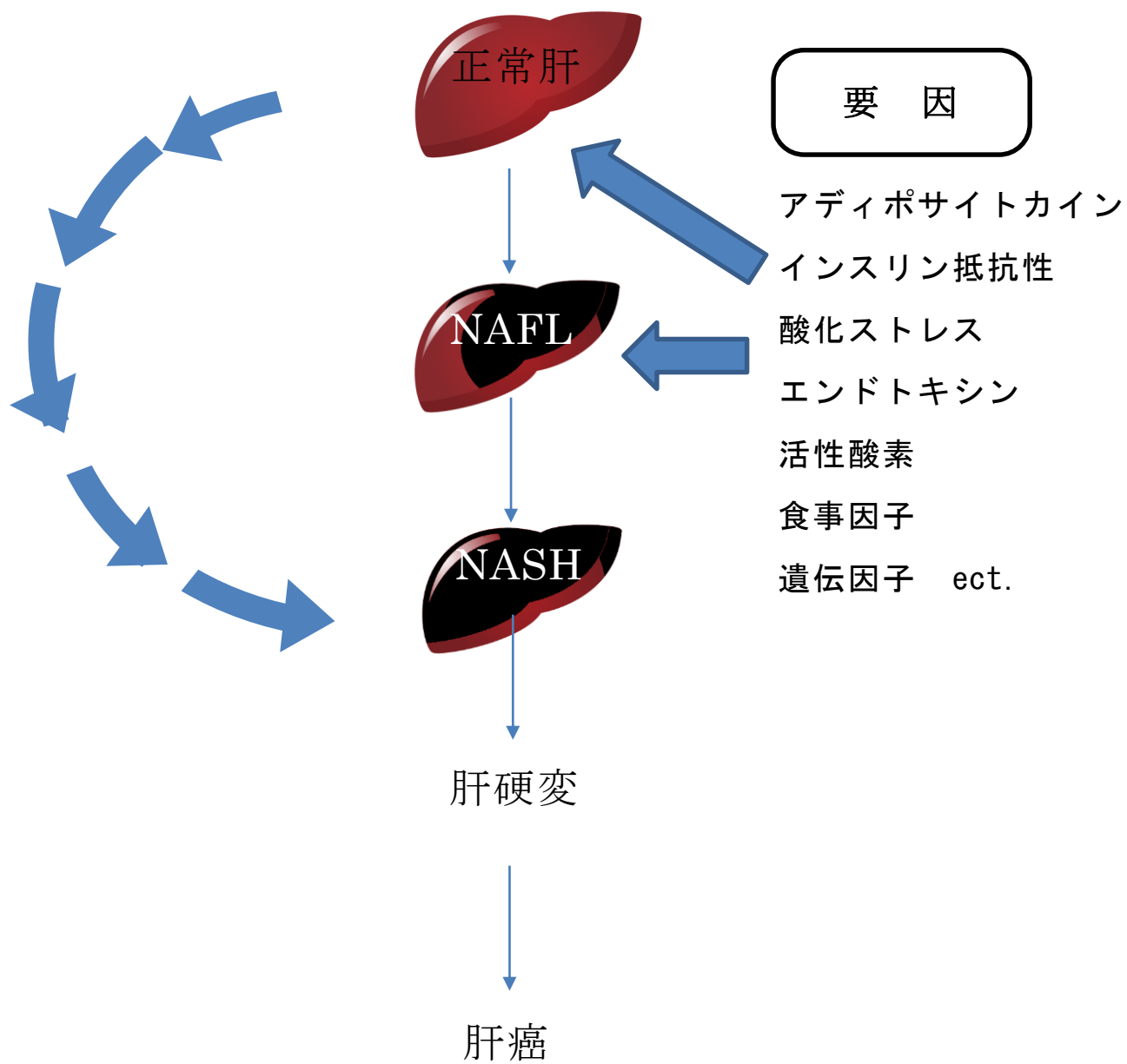


図 3. NASH の進展メカニズム (Multiple parallel hits hypothesis)

1-2 メタロチオネイン (Metallothionein)

メタロチオネイン (MT) は金属タンパク質とも呼ばれ、肝臓で合成される。61～68 のアミノ酸で構成されている低分子量 (6000～7000) タンパク質で、アミノ酸の 1/3 はシステインが占め、芳香族アミノ酸を含まない。MT は全身の臓器で発現するが、特に肝臓、腎臓、小腸および脾臓に多く含まれる。MT はカドミウム (Cd)、亜鉛 (Zn)、銅 (Cu) などの重金属と高い結合性を有するが、通常の MT のシステインには Zn が結合している (図 4)。MT は亜鉛の体内貯蔵にかかわる働きがある。つまり、体内に亜鉛を貯蔵しておく際には欠かせないタンパク質である。亜鉛欠乏症では合成が不十分で組織濃度は低下する。哺乳類の MT は 4 種類のアイソフォームがあり、MT 1 と 2 は主要なアイソフォームで多くの臓器に存在している。ヒトでは MT 1 より MT 2 が多い。MT 3 は主として脳に局在するが、腎臓や心臓でも mRNA の発現がみられ、MT 4 は扁平上皮細胞に存在する。

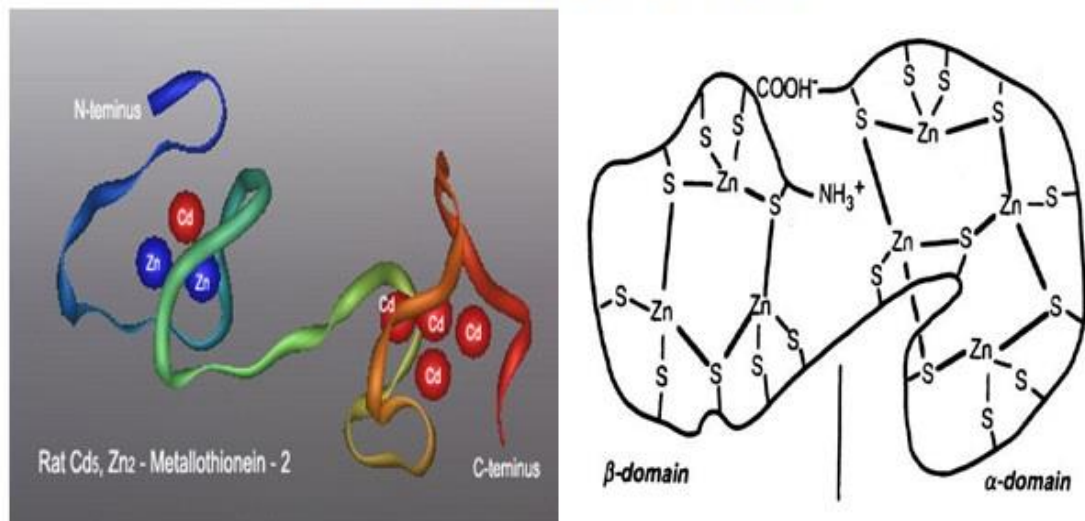
MT の生理活性として Cd、Hg、Cu などの重金属の解毒、Zn の代謝、酸化ストレスの除去などさまざまな機能がある。各種疾患の病態や治療と MT 代謝に関する研究も多数報告されている。中でも MT の発現と抗癌剤抵抗の関連を示唆する成績は注目される。癌組織の多くでは MT は増加し、大腸癌、乳癌、肺癌、腎臓癌では予後に関連するマーカーとされている。一方、肝臓癌のように MT が低下する癌もある。最近、アルツハイマー病における MT 3 の低下が指摘され、その診断における MT 測定の実用性が注目されている。

これまでのところ Non-alcoholic steatohepatitis (NASH) と MT に関する臨床研究は報告されていないが、MT 遺伝子のプロモーター領域には抗酸化反応エレメントを認めることから、NASH 病態進展に MT も関与することが推察される。

群馬大学医学部保健学科長嶺研究室で開発し、2010 年に発表 (Clinica Chimica Acta.) された、高感度 MT ELISA 測定法は臨床検体 (血清、尿、赤血球、各組織) の MT 測定が可能である¹⁵。本研究では組織学的に診断された NASH 症例に

において、この抗体を用いた免疫組織染色を行い、MT の発現レベルを検討し、NASH における MT 代謝を解明して、NASH 治療への可能性を検討した。

メタロチオネインの構造



分子量6,000
アミノ酸の30%をシステインが占める
システインのチオール基が亜鉛と結合

図4. メタロチオネインの構造

1-3 アディポネクチン (Adiponektin)

脂肪細胞から分泌される生理活性物質である「アディポサイトカイン」の一種であるアディポネクチンは、肝糖新生と脂質新生を阻害することにより、保護的アディポカインとして働くことが知られている。

筋肉に作用することでインスリン感受性を改善し、脂肪酸β酸化を亢進させることで、血中脂肪酸を抑制し低下させる。肝細胞における脂肪酸の燃焼、細胞内の新規脂肪酸合成を抑制する。また肝臓のマクロファージである、クッパー細胞に働き、炎症性サイトカインである、TNF-α産生を抑制することで肝障害を軽減する。さらに、肝線維化の中心的役割を果たす活性化した肝星細胞からの TGF-β1産生を抑制することで肝線維化を抑制する¹⁶。

肝臓の AMP キナーゼを活性化させることによるインスリン感受性の亢進、抗動脈硬化、抗炎症、心筋肥大抑制、肝脂肪蓄積抑制など、多くの作用があり、メタボリックシンドローム発症に抑制的に働く「善玉」のアディポサイトカインである。アディポサイトカインの多く (TNF-α、レプチン、アンギオテンシノーゲン、レジスチン etc.) が肥満とともにその血中脂肪が上昇するのに対し、血中アディポネクチン濃度は内臓脂肪量と強い逆相関を示すことが特徴である^{17,18}。

脂肪組織から分泌され、血中に豊富に存在するアディポネクチンは肝臓に発現するアディポネクチン受容体を介して肝臓を構成する様々な細胞に作用する。これらの働きにより脂肪肝、肝臓の炎症、肝線維化を抑制することで様々な慢性肝疾患の改善作用を有しているものと考えられる。

肥満に伴い肥大した脂肪組織の慢性炎症によってアディポサイトカインの分泌異常をきたし、善玉アディポネクチンの低下、炎症性アディポサイトカインである TNF-α の増加などが起こる。このアディポサイトカイン分泌異常が NASH の病態進展に重要な役割を果たしていることが近年の研究により明らかになりつつある。

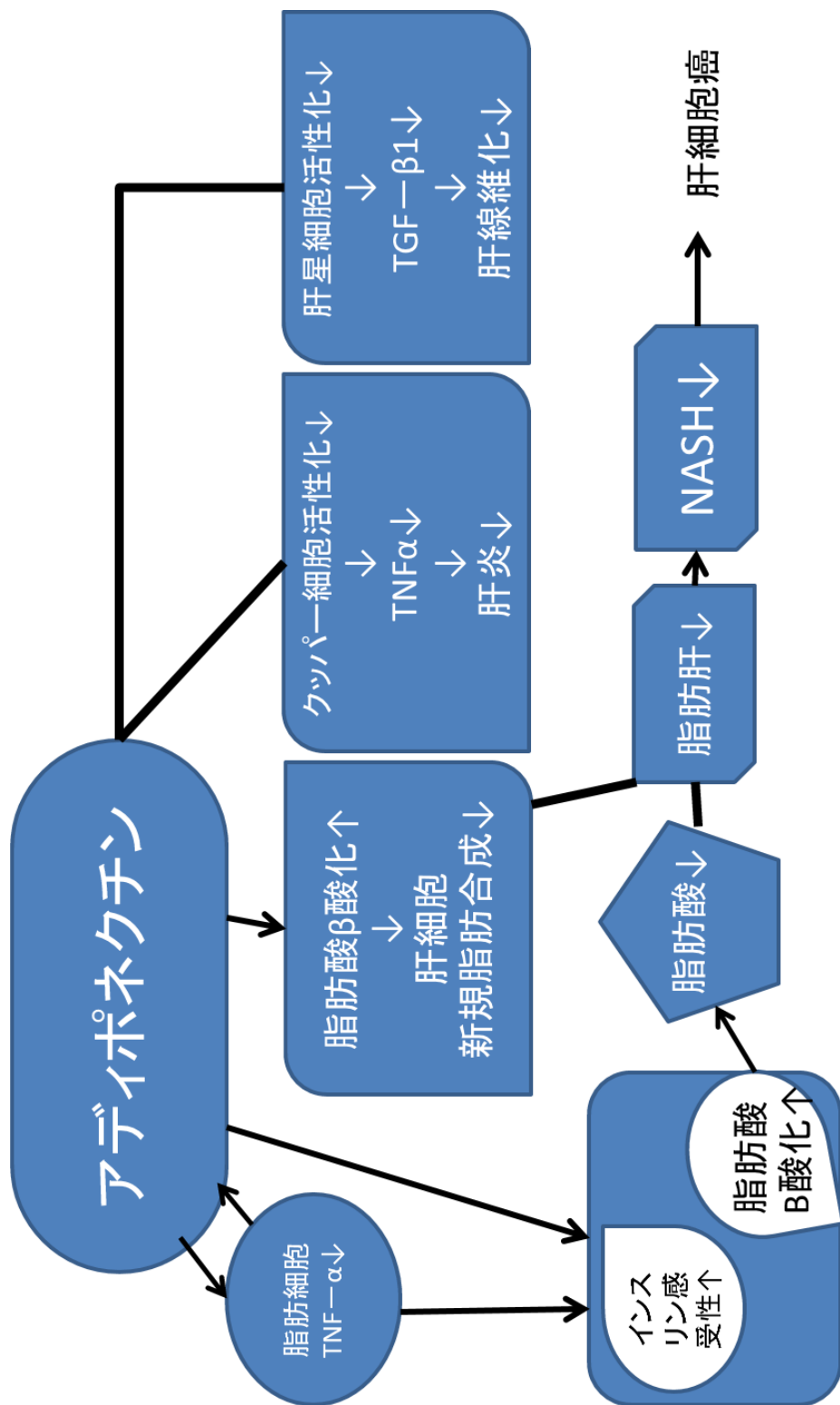


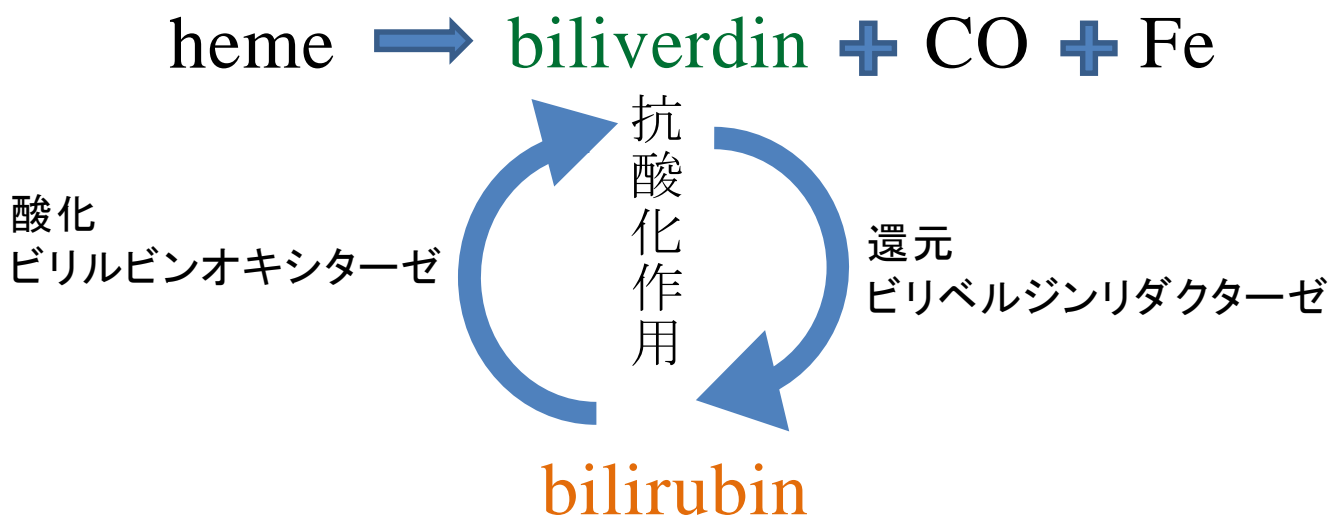
図5 NASHの進展におけるアディポネクチンの関与

1-4 ヘムオキシゲナーゼ (HO-1)

ヘムオキシゲナーゼ 1 (Heme oxygenase-1:HO-1) は転写因子 Nrf2 に制御される、ストレス誘発性抗炎症性酵素であり、スーパーオキシドジスムターゼ (superoxide dismutase:SOD) と類似の作用を担う物質である。マウスの実験で壊死性炎症を改善し、脂肪肝から NASH の進展を予防し、脂肪肝も改善することが示されている¹⁹。ヘム (heme) をビリベルジン (biliverdin) と一酸化炭素

(CO) と遊離鉄 (Fe) に分解する酵素。すなわち HO-1 はヘムのポルフィリン環を開裂し、酸素分子を転化する酸素添加酵素である。ビリルビン (bilirubin) は、緑色の胆汁色素でヘム代謝物の一つであるビリベルジンがビリベルジンレクターゼの働きにより還元されて生成される。ビリルビンが酸化されると再びビリベルジンになる。このサイクルは、ビリルビンの潜在的な抗酸化作用を示唆しており^{17,20}、ビリルビンは細胞内において抗酸化の生理作用を担っているのではないかと考えられる²¹。ビリルビンは重要な抗酸化剤として認識されている。

HO-1 は活性酸素やフリーラジカルによる酸化ストレスから生体を保護していると考えられており²²、NASH の病態進展に重要な役割を果たしていることが研究により明らかになってきた。



ヘムオキシゲナーゼ (Heme oxygenase; HO)

ヘム (heme) を、ビリベルジン (Biliverdin) と、一酸化炭素 (CO) と、遊離鉄 (Fe) に分解する酵素

2 種類のアイソフォーム

HO-1 高熱、ヘム蛋白、酸化リポ蛋白

サイトカイン、エンドトキシンなどで誘導

HO-2 生体の CO 生産に関与している

図6. ヘムオキシゲナー

2. 背景と目的

すでに Introduction で述べたように、非アルコール性脂肪性肝疾患（non-alcohol fatty liver disease: NAFLD）には、単純脂肪肝（non-alcohol fatty liver : NAFL）から非アルコール性脂肪性肝炎（non-alcoholic steatohepatitis: NASH）まで様々な進行度の病態が含まれる。一般に NAFL は進行のリスクが少ない良性の状態を示すが、一方で NASH 患者はときに進行し肝硬変や肝癌を発症する¹⁻⁸。脂肪酸とトリグリセリド代謝の異常は、NAFLD におけるトリグリセリド肝臓蓄積の基にある共通の機構であると考えられる²。NASH は、大滴性脂肪変性、肝小葉への多様な炎症性細胞の浸潤、バルーン状変性、肝細胞の壊死、マロリー体の形成および類洞周囲腔繊維症または硬変などを認め、アルコール性脂肪性肝炎と組織学的に類似している²⁻⁴。NASH の発生機序は two hit theory や multiple parallel hits hypothesis などの仮説が提唱されており不明瞭なままであるが、過剰な肝臓内脂肪蓄積が局所的な壊死性炎症反応を引き起こすことが示唆されている^{2,3,10-13}。このような壊死性炎症反応は、細胞膜や DNA の損傷をもたらす脂質の過酸化によるフリーラジカルの生産と関連している^{22,23}。

一方、NAFL と NASH において、血漿診断マーカーおよび、肝臓での局在性が異なるストレス誘導バイオマーカーの発現に関する比較研究はまだ行われていない。

そこで、本研究では NAFL 肝臓および NASH 肝臓における 4 種のストレス誘導バイオマーカーの発現状態を比較し、それらと血漿バイオマーカーから示唆される病理的損傷の度合いとの関係を調べた。様々な肝疾患において、ストレス誘導バイオマーカーであるメタロチオネイン（metallothionein:MT）1/2 は良く研究されているが²³、NAFL 肝および NASH 肝における MT-1/2 および 3 の報告は行われて

おらず、我々は特にこれらについて検討した。MT-1/2 は、肝臓における主要な抗酸化ストレスバイオマーカーの 1 つであり、転写因子 Nrf2 に制御される²⁴。

MT は、脂質の過酸化反応により組織内で発生したフリーラジカルに反応して誘発される。肝臓における MT レベルの上昇は、アルコール性肝障害や慢性ウィルス性肝炎を含む様々な慢性肝疾患において認められる¹⁹。MT-3 の肝臓局在はないと報告されているが²⁵、我々は、MT-1/2 に加えて、MT-3 の NASH 肝と NAFL 肝におけるレベルも検討した。

ヘムオキシゲナーゼ (heme oxygenase-1: HO-1) も MT 同様に、転写因子 Nrf2 に制御されるストレス誘発性抗炎症性酵素である。正常細胞において、Nrf2 は細胞質で分解されているが、酸化ストレスなどの刺激により安定化して核内へ移行する。これにより細胞はストレスに対する抵抗性を獲得する。

HO-1 の誘導は、脂質過酸化反応により引き出される酸化障害に対する適応応答であり、NASH の進行を抑えるのに重要だと考えられる。

アディポネクチンは、肝糖新生と脂質新生を阻害することにより保護的アディポカインとして働くことが知られている¹⁸。NASH および NAFL 患者の酸化ストレスと炎症レベルはコントロールと比較すると高くなっており、低アディポネクチン血症および C 反応性タンパク質 (C-reactive protein) の高値も指摘されている^{26,27}。

酸化ストレスは、NASH および NAFL の病理発生において主要な役割を果たすと考えられる^{2,3,10-13}。しかしながら、酸化ストレス誘導バイオマーカーの発現原因と酸化障害については、ストレス誘導バイオマーカーの変化が肝障害の原因なのか、あるいは結果なのかは不明確なままである。そこで、バイオマーカーの変化が原因なのか、結果なのかを明らかにするために、局在性の異なる 4 種のストレス誘導バイオマーカーの NASH および NAFL のヒト肝臓における発現を検討するこ

とした。また、NASH および NAFL において、バイオマーカーの肝臓での発現パターンと血漿中の臨床診断マーカーとの関連性も調べた。

3. 対象と方法

3-1 対象

この研究では、患者 37 名のホルマリン固定しパラフィン包埋した肝生検サンプルを用いた。5 症例はほぼ正常であり、14 症例は NAFL、18 症例は NASH であった。この研究で使用した組織診断基準では、大滴性脂肪変性が存在するが壊死性炎症のないものを NAFL、大滴性脂肪変性が存在し、肝細胞の壊死を伴う、または伴わない小葉の炎症があるものを NASH とした。アルコール性肝炎（一日 20g、一週 140g 未満）と B 型および C 型肝炎を含む他の肝疾患は、病歴、家族のインタビュー、検査室データ、肝臓の組織学的検査、肝胆道超音波検査を全例におこなうことにより厳密に除外した。検査室で行った血液肝機能検査項目は、アラニンアミノトランスフェラーゼ（alanine aminotransferase: ALT）、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（aspartate aminotransferase: AST）、総ビリルビン（total bilirubin: T-Bil）、アルブミンおよび総タンパク値であった。血清グルコース、コレステロール（cholesterol: TC）およびトリグリセリド（triglyceride: TG）値も測定した。これらの項目は、神戸朝日病院で日常的に行われているものである。生検症例から、組織学的に正常な肝臓サンプル 5 症例を選んだ。これらの患者の特性を表 1 にまとめた。この研究は神戸病院地域倫理委員会、および女子栄養大学倫理委員会の承認を得ており、また、ヘルシンキ宣言の条項に従っておこない、各患者から同意書を得た。

3-2 方法

37 症例の生検サンプルを用いて、ヘマトキシリン-エオジン染色 (Hematoxylin and Eosin: HE) と、メタロチオネイン (metallothionein: MT) 1/2、3、ヘムオキシゲナーゼ (heme oxygenase-1: HO-1) およびアディポネクチン (adiponekuchin) に特異的な抗体を用いた免疫染色を行い、病理学的に観察した。同症例の肝機能の関連する血漿診断マーカーも測定した。

3-3 抗体

ウサギ抗 MT-1/2 ポリクローナル抗体は、ラット MT-1/2 を抗原として群馬大学大学院保健学科で作成した²⁸⁻³⁰。この抗体は、アセチル化メチオニン残基を含むアミノ末端フラグメントペプチド (7 アミノ酸残基) を認識する。この抗体は、MT-1 と MT-2 のどちらにも高い特異性と類似性を示した。MT-3 モノクローナル抗体は、ヒトリコンビナント MT-3 を抗原としてフロンティア研究所 (日本、北海道) で作成した。この抗体は、ヒトリコンビナント MT-3 のアミノ末端からの 17 アミノ酸残基を認識した³¹。HO-1 抗体とアディポネクチン抗体は、それぞれ Enzo Life Science (アメリカ合衆国、ニューヨーク州) と R&D Systems (アメリカ合衆国、ミネソタ州) から購入した。

3-4 免疫組織染色

肝臓切片 (厚さ 3 μ m) にてプレパラートを作成。規定に従ってキシレンで脱パラフィン化し、段階的エタノール処理で脱水した。MT-1/2、MT-3、HO-1 およびアディポネクチンの免疫染色には、メタノール中で 0.3% H₂O₂ 存在下 30 分反応させることにより、内在性ペルオキシダーゼ活性を急速に除去した。切片を 10 mM クエン酸緩衝液 (pH 6.0) 中で 5 分間マイクロウェーブ処理することにより抗原を賦活化した。生体内と浸透圧が同じになるように塩濃度調整のためにリン酸緩衝

液生理食塩水（phosphate buffered saline: PBS）で洗浄後、切片を一次抗体（1:50 希釈）と室温（room temperature: RT）にて 120 分反応させた。0.05% Tween 20 を含む PBS で 3 回洗浄後、切片を 2 次抗体（histofine Simple Steiner MAX-PO (Multi); ニチレイ、東京、日本）と RT にて 60 分反応させた。0.05 M トリス緩衝生理食塩水（pH 7.6）中、0.003%過酸化水素存在下において、ペルオキシダーゼ活性を 0.2 mg/mL の 3,3'ジアミノベンジジン四塩酸塩（diaminobenzidine tetrahydrochloride）で展開した。最後に切片を Mayer のヘマトキシリンで核を対比染色した。

3-5 免疫染色の半定量的評価

染色された面積を ImageJ 1.38 x ソフトウェア（Wayne Rasbans, NIH, ベセスダ、アメリカ合衆国）を用いて定量した。染色された面積は、デジタル画像中の全肝臓に対する染色域（免疫組織化学で茶色で示される部分）の割合から計算した。全ての試料から、標本当たり 1 視野（200 倍率）をランダムに選択した。

3-6 統計分析

統計分析は Spearman と Pearson's tests および the Mann-Whitney U-test を用いておこなった。P<0.05 を統計学的に有意とした。

4. 結果

4-1 本研究における NAFL および NASH の対象の特性

血清 ALT、AST および LDH 値は NAFL 症例よりも NASH 症例で高かった（P<0.01）。血漿コリンエステラーゼ（choline esterase: ChE）値は、NAFL 症

例よりも NASH 症例で高かった。ChE は、肝細胞でつくられる酵素で血液中へ放出され、一般に肝機能障害では、肝臓の ChE をつくる能力が低下するため数値が下がる。しかし、ChE は脂質代謝にも関連するため、栄養過多による脂肪肝などでは多くつくられ、数値が上昇する。これらの血液パラメーターから、NAFL よりも NASH で肝障害が重度であることが示された。（表 1）

4-2 NAFL 肝臓および NASH 肝臓の HE 染色による病理学的調査

組織学診断のために HE 染色をおこなった（図 7 A, B, C）。肝臓の組織診は、群馬大学医学部病理学名誉教授の鈴木慶二先生に依頼した。NASH 症例においては、脂肪肝と壊死性炎症の重症度を決定するために、各組織片を検査した。脂肪肝の重症度は次のような 1~4 のスコアで表した。タイプ 1 はほぼ正常、タイプ 2 は最大 1/3 の細胞が脂肪を含む、タイプ 3 は 1/3~2/3 の細胞が脂肪を含む、タイプ 4 は 2/3 以上の肝細胞が脂肪を含むとした。炎症と脂肪蓄積状態は Matteorni ら³¹によって最初に開発された基準に従って 4 段階の基準に基づいて評価し、スコアをつけた。上記の基準に基づいて、NASH 症例（図 7 C, タイプ 4）および NAFL（図 7 B, タイプ 3）と診断した。

4-3 正常、NAFL および NASH 肝臓における MT-1/2、MT-3、HO-1 およびアディポネクチンの免疫組織染色

図 8~11 に 4 種のストレスバイオマーカー MT1/2 染色（図 8）、MT-3（図 9）、HO-1（図 10）およびアディポネクチン（図 11）のコントロール（A）、NAFL（B）および NASH（C）肝における免疫組織化学染色（図 12）に、免疫組織染色の半定量的評価による MT-1/2、HO-1 およびアディポネクチンの発現レベルを示す。MT1/2、HO-1 およびアディポネクチンの発現は、NAFL やコントロールと比べ、NASH で有意に減少していた（ $p < 0.05$ ）。しかしなが

ら、MT-3 の染色濃度は 3 群全てにおいて低く、3 群間において明確な差を認めなかった。(図 9・図 1 2)

4 種のバイオマーカーの中で MT-1/2 は肝細胞で強く染色されたが、特に正常群および NAFL 群の肝細胞が強く染色された (図 8・図 1 2)。

MT-1/2 は、中程度の脂肪滴を含む NAFL 肝細胞でも強く検出されたが

(図 8 B)、大量の脂肪滴を含む NASH 肝細胞では染色が有意に減少していた (図 8 C・図 1 2) ($p<0.05$)。しかしながら、MT-1/2 の発現パターンは、肝細胞中の脂肪滴の数と必ずしも対応していなかった。核が MT-1/2 染色で強く染まった肝細胞が、正常および NAFL 症例ではしばしば観察されたが、NASH 症例では非常に稀であった。

MT-3 (図 9) は MT-1/2 の様に肝細胞で染色されなかったが、血管 (ほとんどが平滑筋細胞) での染色がみられ、それは NAFL (図 9 B) と NASH 肝臓 (図 9 C) よりもコントロール (図 9 A) でより明らかであった。NAFL において、肝細胞中の脂質膜またはリポフスチン様粒子の比較的強い染色が観察されたが (図 9 B)、正常肝細胞ではみられなかった。NAFL で観察されたこれら染色物の数は、NASH 肝細胞では減少していた (図 9 C)。

HO-1 (図 1 0) はクッパー細胞にのみ恒常的に発現しており、肝細胞には全く観察されなかった。HO-1 の発現は (図 1 2)、コントロール (A) と NAFL (B) よりも NASH (C) で有意に低かった ($p<0.05$)。NASH において、HO-1 の発現は NAFL と比較して有意に減少していた (図 1 2) ($p<0.05$)。

肝臓において、アディポネクチン (図 1 1) は肝細胞では全く染色されなかったが、血管の平滑筋細胞と内皮細胞で染色された (図 1 1 A)。血管数は NASH (図 1 1 C) と NAFL (図 1 1 B) の間で異なっていたが、肝臓の血管でのアディポネクチン染色は、NAFL より NASH で有意に低くなっていた (図 1 2) ($p<0.05$)。

4-4 肝臓での MT-1/2、MT-3、HO-1 およびアディポネクチンの染色パターンと血清の肝機能障害マーカーとの相関

MT-1/2 は、T-Bil と正の相関 ($p<0.001$)、ChE と負の相関 ($p=0.002$) を認めた。(表 2)

MT-3 は肝臓および血漿のどのパラメーターとも相関を示さなかった。

HO-1 は血漿アディポネクチンと正の相関 ($p=0.01$) があつた。アディポネクチン染色パターンは、ALT と負の相関があつた ($p=0.02$)。

これらの結果より、MT-1/2、HO-1 およびアディポネクチン染色パターンはお互いに正の相関があり、これらのストレス誘導バイオマーカーは血漿の肝臓機能障害マーカーと負の相関を持つ傾向があると示された。

4-5 NASH における MT-1/2 低発現群と MT-1/2 高発現群と NAFL およびコントロール 4 群における、他のストレス誘導バイオマーカーの比較

NASH 症例を MT-1/2 低発現群と MT-1/2 高発現群に分け、NASH における HO-1、アディポネクチン、および血漿の肝臓診断マーカーを比較し、また、これらのパラメーターを、NAFL と正常コントロールのそれと比較した。

免疫染色の半定量的評価から、NASH の MT-1/2 低発現群における、MT-1/2 の発現レベルは、NAFL 症例およびコントロールに比較して有意に低かつた。

($p<0.001$) NASH の MT-1/2 低発現群における HO-1 発現レベルは、NAFL 症例群 ($p<0.05$) およびコントロール ($p<0.01$) のそれよりも有意に低かつた。NASH の MT-1/2 発現群におけるアディポネクチンの発現は、NAFL 症例群よりも、NASH の方が有意に低かつた ($p<0.05$)。(表 3)

4-6 免疫染色の結果、半定量法による発現をコントロール、NAFLおよびNASHの3群間で比較(図12)

免疫染色の結果、コントロールおよびNAFLと比較して、NASHの肝臓におけるMT-1/2、HO-1およびアディポネクチンの発現は、有意に減少していた。(p<0.05) また、MT-3は群で有意差を認めなかった。

4-7 肝臓でのMT-1/2、MT-3、HO-1およびアディポネクチンの染色パターンと肝機能に関連する血清臨床診断マーカーの間の相関

MT-1/2、HO-1およびアディポネクチン染色パターンは互いに正の相関があり、これらのストレス誘導バイオマーカーは血漿肝機能障害マーカーと負の相関を持つ傾向がある。(図13)

5. 考察

肝臓中の異なる細胞に局在する4種のストレス誘導バイオマーカーの発現レベルを測定し、NASHとNAFL症例におけるこれらのバイオマーカーの病理学的重要性を比較した。バイオマーカーは、肝細胞(MT-1/2)、クッパー細胞(HO-1)、血管の平滑筋細胞と内皮細胞(アディポネクチン、MT-3)に局在していた。我々が知る限りにおいて、本研究は、HO-1^{23, 24}とアディポネクチン^{27, 28}で既に示されているように、MT-1/2の肝細胞での発現が、NASHの進行と強く関連することを報告した初めての研究である。MT-1/2は、特に単純脂肪肝(NAFL)および正常コントロールのヒト肝細胞において、広範囲に強く発現するが、NASHでは有意に発現が低下していることを示した。NASHにおいてMT-1/2は、組織学的傷害が主に観察される部位である^{4,8,11}、肝細胞の細胞質に有意に多く局在して

いた。MT-1/2 発現に壊死性炎症反応の程度と有意な相関があることが指摘されている³³。MT-1/2 発現と壊死性炎症反応の程度との負の相関は³³、MT-1/2 濃度減少に伴った脂質の過酸化が NASH の壊死性炎症反応に関与することを示す。過酸化が肝障害の原因と指摘されており、MT 1/2 は好中球と抗酸化ストレス誘導 NF-kB 活性化の強力な抑制物質であることが知られている³³。したがって、MT-1/2 濃度減少は抗酸化ストレス作用の低下を示し、NASH で観察される病理学的特性の原因の一つと考えられる。

HO-1 は、肝細胞には全く観察されずクッパー細胞のみに恒常的に発現していた。HO-1 の発現は NAFL よりも NASH で有意に減少しており、肝臓における疾患の重症度を反映していた。内在性 HO-1 の増加は、肝細胞を保護し、炎症性細胞の浸潤および肝星細胞の変性を阻害することにより²²、肝臓の繊維化を抑制する可能性がある。HO-1 レベルの増加と脂質過酸化の間に有意な相関が認められている^{23, 24}。HO-1 の発現は、脂質の過酸化に引き起こされた酸化的ストレスへの適応反応であり、疾患の進行の調節に重要である²⁵。これらの効果は HO-1 発現の抑制と、TNF- α および IL-6 発現の増加に伴うものであった²²。多くのデータにより、脂肪肝や 非アルコール性脂肪性肝炎における壊死性炎症の改善において、HO-1 が保護的役割を果たすという、生化学的、生態学的および生物分子学的証拠が得られている。

内臓肥満は NAFL の主要なリスクファクターであり、脂肪細胞でのトリグリセリドの蓄積増加と遊離脂肪酸増加は、肝臓での脂質貯蔵、インスリン抵抗性および肝障害の進行を増すと考えられる²⁶。アディポネクチンは肥満においては低下しており、全身性炎症と肝障害の原因と思われる。アディポネクチンはヒト血清中に豊富に含まれるが、肥満においてはそのレベルが減少し、NAFL や NASH^{27, 28} の患者においては更に低くなっている。アディポネクチンは、肝臓における過剰な脂肪の蓄積を抑制し、炎症や繊維化を防ぐように働く。肝臓においてアディポネクチン

(図5)は主に血管(平滑筋細胞と内皮細胞)で観察されたが、これはNAFLやコントロールと比べ、NASHで有意に低くなっていた。アディポネクチンが低値であるということは、年齢、性別、BMI、インスリン抵抗性およびメタボリックシンドロームに依存しないNASHの特性であった。組織の低アディポネクチン値は、脂肪肝と壊死性炎症の程度に有意に相関し、したがってNAFLD進行の原因となる可能性が報告されている²⁶⁻²⁸。

ストレス誘導バイオマーカーを用いた免疫組織化学染色研究の結果、MT-1/2はNASHの肝細胞における新規のストレス誘導バイオマーカーであることが示された。抗酸化障害タンパク質であるMT-1/2は、高濃度で肝臓に存在する^{16,29}。NASHの主な細胞傷害は肝細胞であることが知られている。したがって、MT-1/2は、肝細胞に存在しないHO-1²²⁻²⁵やアディポネクチン²⁶⁻²⁸より、NASHにおける肝障害の保護作用においてより重要な役割を果たしているのではないだろうか。

肝細胞癌(hepatocellular carcinoma: HCC)は肝臓の最も頻度の高い原発性悪性腫瘍である。約70-90%のHCC症例がB型およびC型肝炎感染を伴っているが、発展途上国においてはNASH発症の増加はHCCの主要因子になっている³²。コホート研究においてNASHの高リスク原因因子が明らかになっていないため、NASH患者におけるHCC発症のリスクを決定することが必要である。最近、ParkとYu³⁴は、肝細胞の核および細胞質MT-1/2の発現が消失した非癌性肝疾患と比べるとMT1/2の発現がHCCで顕著であり、HCCの予後マーカーとしての利用が示唆されている。我々の研究において、NASH肝細胞におけるMT-1/2の減少は肝障害の重症度と関連しているという結果が得られており、肝臓におけるMT-1/2の発現は、NASH症例のHCC発症の予測マーカーとして利用できる可能性がある。

強力な抗酸化効果のある脂質低下剤であるプロブコールは、NASH患者の治療薬として知られているため³⁶⁻⁴⁰、プロブコールによるMT-1/2の肝臓での発現を

我々は検討している。プロブコールによる有意な MT-1/2 発現増加がラット肝臓で見られた（発表予定 Nakajima.K ら）。プロブコールが HO-1^{41,42}、アディポネクチン^{39,43} および SOD^{43,44,45} を肝臓や他の組織において発現させることが既に報告されているが、プロブコールによる MT-1/2 の誘発についての報告は無い。肝細胞での MT-1/2 の発現増加は、酸化ストレス誘導傷害を抑制することから³⁶⁻⁴⁰、NASH 患者におけるプロブコールの有効性は MT1/2 の発現上昇を介している可能性がある。

結論として、今回の 免疫組織化学研究から、NASH は NAFL と比較して酸化ストレス誘導バイオマーカーの肝臓における発現が低いというエビデンスが得られた。これらの結果から、NAFL においては、これらストレス誘導バイオマーカーの酸化ストレスに対する保護機能が発揮されるが、これらのパラメーターの抗酸化ストレス機能が減少すると、脂肪滴で発生した脂質過酸化による継続的な酸化ストレスが誘発され、それにより NAFL から NASH へと進行し、肝繊維症や、おそらく肝癌発症という結果になる。特に MT-1/2 は NASH における新規のストレス誘導損傷を示す重要なマーカーとなることが示され、肝細胞における酸化ストレス誘導傷害の治療ターゲットとしての可能性がある。さらに薬剤開発に際しての有用な指標になるかもしれない。

参考文献

1. Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T, et al. Non-alcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological study. *Gastroenterology* 1999; 116: 1413-1419.

2. James OFL, Day CP. Non-alcoholic steatohepatitis (NASH): a disease of emerging identity and importance. *J Hepatol* 1998; 29: 495-501.
3. Sheth SG, Gordon FD, Chopra S. Non-alcoholic steatohepatitis. *Ann Intern Med* 1997; 126: 137-145.
4. Ludwig J, McGill DB, Lindor KD. Review: non-alcoholic steatohepatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 1997; 12: 398-403.
5. Bacon BR, Farahvash MJ, Janney CG, et al. Nonalcoholic steatohepatitis: an expanded clinical entity. *Gastroenterology* 1994; 107: 1103-1109.
6. Teri MR, James OFL, Burt AD, et al. The natural history of non-alcoholic fatty liver: a follow-up study. *Hepatology* 1995; 22: 1714-1719.
7. Powell EE, Cooksley WGE, Hanson R, et al. The natural history of non-alcoholic steatohepatitis: a follow-up study of forty-two patients for up to 21 years. *Hepatology* 1990; 11: 74-80.
8. Lee RG. Non-alcoholic steatohepatitis: a study of 49 patients. *Hum Pathol* 1989; 20: 594-598.
9. Li T, Danelisen I, Belló-Klein A, et al. Effects of probucol on changes of antioxidant enzymes in adriamycin-induced cardiomyopathy in rats *Cardiovasc Res.* 2000; 46(3): 523-530.
10. Sanyal AJ, Campbell-Sargent C, Mirshahi F, et al. Non-alcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology* 2001; 120: 1183-1192.

11. Weltman MD, Farrell GC, Hall P, et al. Hepatic cytochrome P450 2E1 is increased in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 1998; 27: 128-133.
12. Berson A, De Beco V, Letteron P, et al. Steatohepatitis-inducing drugs cause mitochondrial dysfunction and lipid peroxidation in rat hepatocytes. *Gastroenterology* 1998; 114: 764-774.
13. Day CP, James OFW. Steatohepatitis: a tale of two 'Hits'. *Gastroenterology* 1998; 114: 842-845.
14. Strobel A, Issad, Camoin, et al. A leptin missense mutation associated with hypogonadism and morbid obesity. *Nat Genet* 1998;(18):213-5
15. Nakajima K, Kodaira T, Kato M, et al. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for metallothionein- I and –II in plasma of humans and experimental animals. *Clin Chim Acta*. 2010;411(9-10):758-761
16. Tamura S, Shimomura I. Contribution of adipose tissue and de novo lipogenesis to nonalcoholic fatty liver. *J Clin. Invest* 115. 1139-1142. 2005
17. Malaguarnera L, Madeddu R, Palio E, et al. Heme oxygenase-1 levels and oxidative stress-related parameters in non-alcoholic fatty liver disease patients. *J Hepatol*. 2005; 42(4): 585-591.
18. Inoue M, Tazuma S, Kanno K, et al. Bach1 gene ablation reduces steatohepatitis in mouse MCD diet model. *J Clin Biochem Nutr*. 2011; 48(2): 161-166.

19. Mohommad MK, Zhou Z, Cave M, et al. Zinc and liver disease. *Nutr Clin Pract.* 2012; 27(1): 8-20.
20. Wu BJ, Kathir K, Witting PK, et al. Antioxidants protect from atherosclerosis by a heme oxygenase-1 pathway that is independent of free radical scavenging. *J Exp Med* 2006; 203: 1117-1127.
21. Wang RQ, Nan YM, Han F, et al. The role of heme oxygenase-1 in non-alcoholic steatohepatitis. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi.* 2010; 18(9): 680-684.
22. Slater TF. Free-radical mechanisms in tissue injury. *Biochem J* 1984; 222: 1-15.
23. Halliwell B. Free radicals, antioxidant, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet* 1994; 344: 721-724.
24. Ohtsuji M, Katsuoka F, Kobayashi A, et al. Nrf1 and Nrf2 play distinct roles in activation of antioxidant response element-dependent genes. *J Biol Chem.* 2008; 283(48): 33554-33562.
25. Hozumi I, Suzuki JS, Kanazawa H, et al. Metallothionein-3 is expressed in the brain and various peripheral organs of the rat. *Neurosci Lett.* 2008; 438(1): 54-58.
26. Buechler C, Wanninger J, Neumeier M. Review: Adiponectin, a key adipokine in obesity related liver diseases. *World J Gastroenterol.* 2011; 17: 2801-2811.

27. Targher G, Bertolini L, Zenari L. Hypoadiponectinemia is closely associated with nonalcoholic hepatic steatosis in obese subjects. *Diabetes Care* 2004; 27: 2085-2086.
28. Targher G, Bertolini L, Rodella S, et al. Associations between plasma adiponectin concentrations and liver histology in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2006; 64: 679-683.
29. Nakazato K, Nakajima K, Kusakabe T, et al. Immunohistochemical staining with newly developed metallothionein fragment antibodies against NH₂-terminal, middle-regional and COOH-terminal peptides in rabbits. *Pathol Int* 2008; 58: 765-770.
30. Nakazato K, Nakajima K, Nakano T, et al. Metallothionein (MT) 1/2 expression in MT 1/2 and MT 3 knock-out mice and Long-Evans Cinnamon (LEC) rats. *J Toxicol Sci*. 2012; 37(1): 169-175.
31. Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T et al. Non-alcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology* 1999; 116: 1413-19
32. Manuel Y, Thomas Y, Pellegrini O. Review : Metallothionein and tissue damage. *IARC Sci Publ*.1992; 118: 231-237.
33. M Levrero. Viral hepatitis and liver cancer: the case of hepatitis C. *Oncogene* 2006; 25: 3834-3847.

34. Park Y, Yu E. Expression of metallothionein-1 and metallothionein-2 as a prognostic marker in hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2013; May 10th [Epub ahead of print]
35. Ratziu V, Zelber-Sagi S. Pharmacologic therapy of non-alcoholic steatohepatitis. *Clin Liver Dis*. 2009; 13(4): 667-688.
36. Merat S, Aduli M, Kazemi R, et al. Liver histology changes in nonalcoholic steatohepatitis after one year of treatment with probucol. *Dig Dis Sci*. 2008; 53(8): 2246-2250.
37. Tokushige K, Hashimoto E, Yatsuji S, et al. Combined pantethine and probucol therapy for Japanese patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Hepatol Res*. 2007; 37(10): 872-877.
38. Merat S, Malekzadeh R, Sohrabi MR, et al. Probucol in the treatment of non-alcoholic steatohepatitis: a double-blind randomized controlled study. *J Hepatol*. 2003; 38(4): 414-418.
39. Merat S, Malekzadeh R, Sohrabi MR, et al. Probucol in the treatment of nonalcoholic steatohepatitis: an open-labeled study. *J Clin Gastroenterol*. 2003; 36(3): 266-268.

40. Deng YM, Wu BJ, Witting PK, et al. Probucol protects against smooth muscle cell proliferation by upregulating heme oxygenase-1. *Circulation*. 2004; 110(13): 1855-1860.
41. Li C, Hossieny P, Wu BJ, et al. Review: Pharmacologic induction of heme oxygenase-1. *Antioxid Redox Signal*. 2007; 9(12): 2227-2239.
42. Delaigle AM, Senou M, Guiot Y, et al. Induction of adiponectin in skeletal muscle of type 2 diabetic mice: In vivo and in vitro studies. *Diabetologia*. 2006; 49(6): 1311-1323.
43. Rong H, Tan M. Effect of probucol on serum malondialdehyde and superoxide dismutase in patients with primary hypertension. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2012; 37(5): 458-462.
44. Li T, Danelisen I, Belló-Klein A, et al. Effects of probucol on changes of antioxidant enzymes in adriamycin-induced cardiomyopathy in rats *Cardiovasc Res*. 2000; 46(3): 523-530.
45. Strobel A, Issad, Camoin, et al. A leptin missense mutation associated with hypogonadism and morbid obesity. *Nat Genet* 1998;(18):213-5

表 1. コントロール、NAFL 患者および NASH 患者の臨床特性

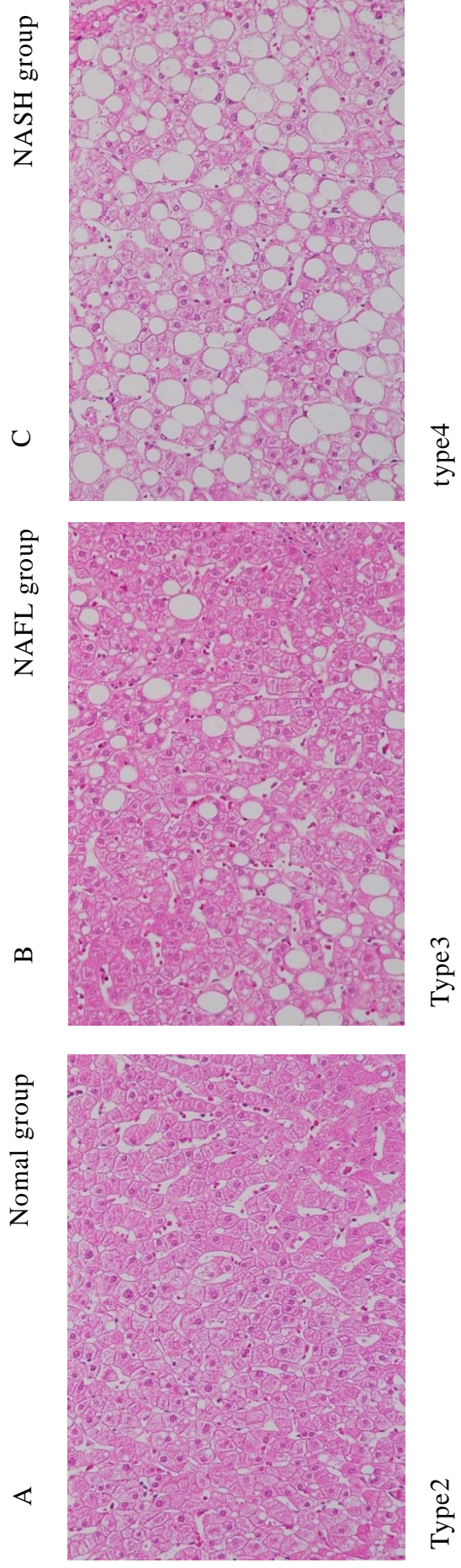
	normal		NAFL		NASH		p value		
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	normal-NAFL	normal-NASH	
Age	year	52.8	13.9	47.6	13.7	57.2	14.8	0.48	0.56
Gender	(M/F)	2/3		7/12		4/14		=	=
Height	cm	157	12.7	158	11	155	10	0.93	0.71
Weight	kg	58	10	65	12	66	13	0.2	0.17
BMI	Kg/m ²	23.2	1.6	26.2	5.1	27.3	3.9	0.04	0
DM	%	20		10.5		27.8		<0.01	<0.01
HT	%	20		33.3		50		<0.01	<0.01
GOT(AST)	IU/l	48	26.8	35.8	19.9	62.8	30.5	0.38	0.32
GPT(ALT)	IU/l	48	24.7	43	23	94	52.5	0.7	0.01
ALP	IU/l	345	95.5	275	83.5	249	111	0.24	0.14
LDH	IU/l	205	52.5	178	51	230	55.4	0.34	0.4
ChE	IU/l	6027	1290	5323	2166	6662	1014	0.38	0.35

BMI: Body Mass Index

DM: Diabetes Mellitus; 糖尿病例の頻度

HT: Hypertension; 高血圧例の頻度

P<0.05 を統計的に有意とする



脂肪肝の重症度

- Type1 ほぼ正常
- Type2 最大 1/3 の細胞が脂肪を含む
- Type3 1/3 ~ 2/3 の細胞が脂肪を含む
- Type4 2/3 の細胞が脂肪を含む

図 7 . HE 染色 (200 倍)

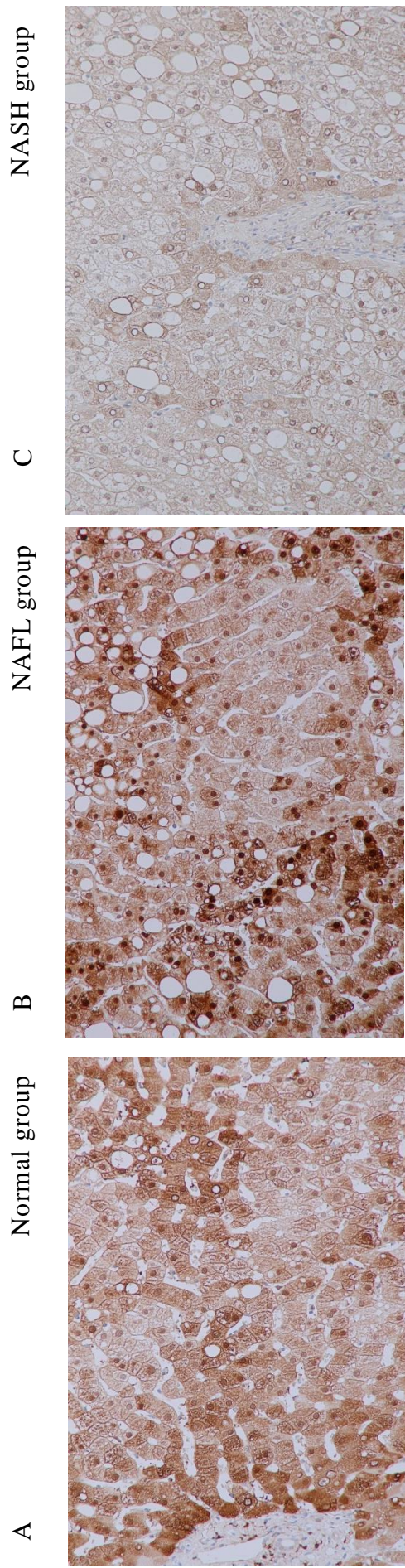
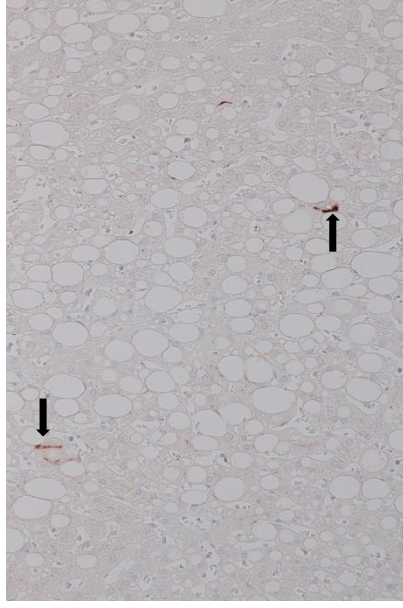


图 8. MT-1/2 染色 (200 倍)

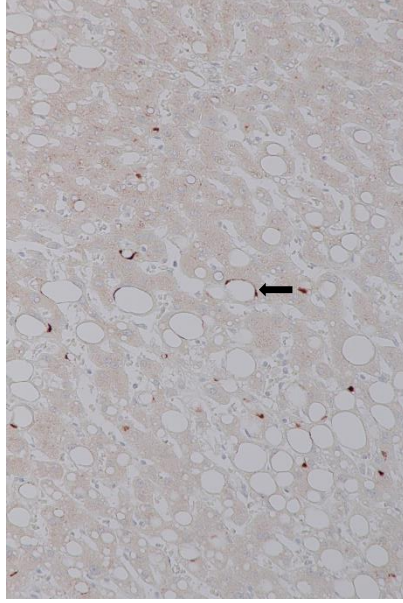
NASH group

C



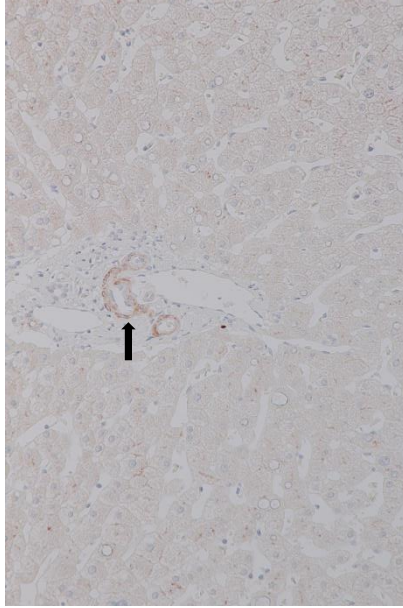
NAFLgroup

B



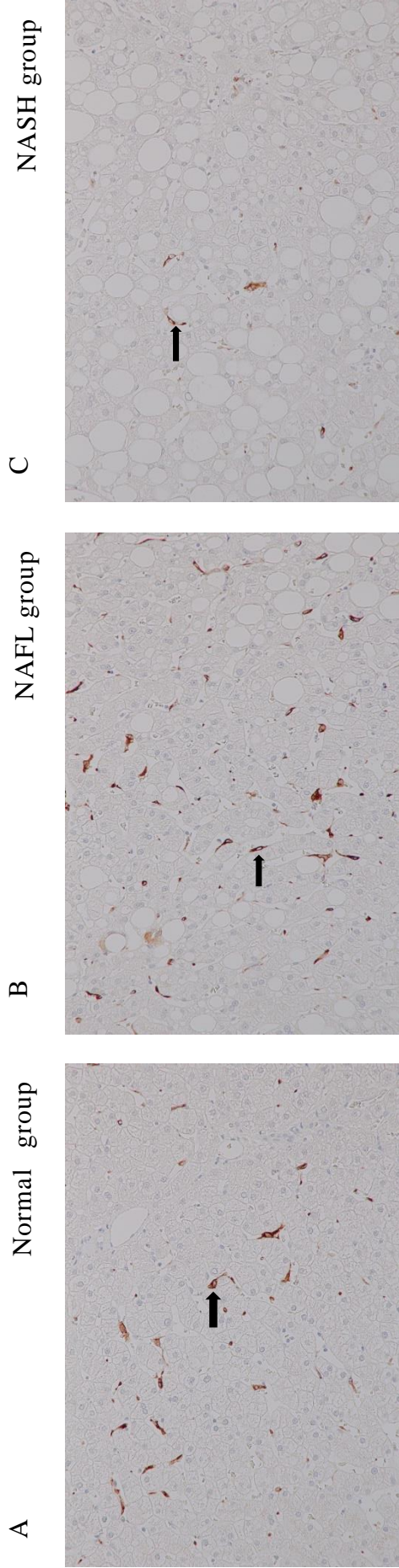
Normal group

A



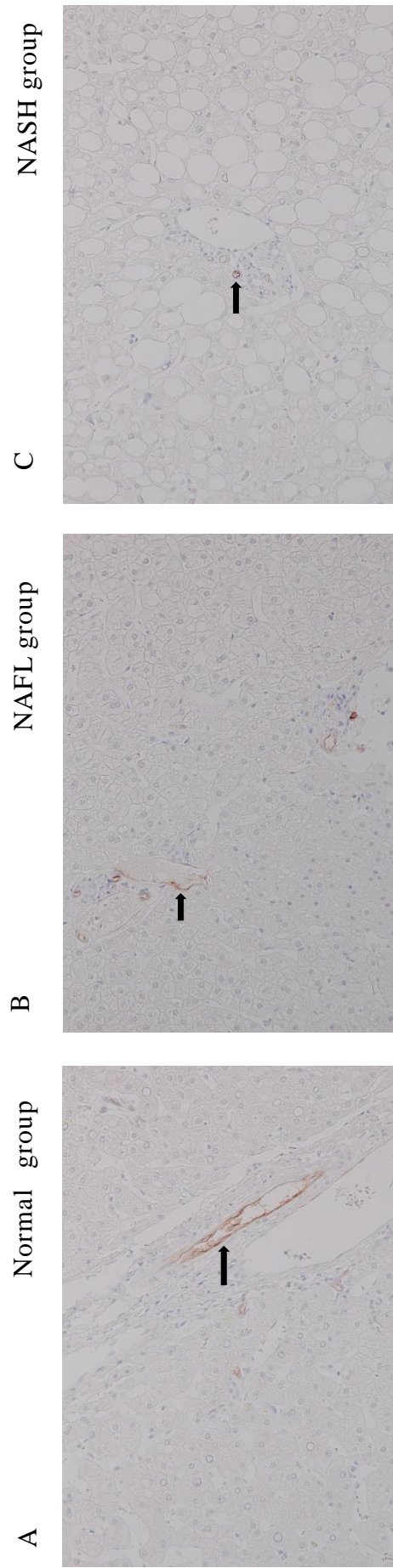
矢印は局在を示す

図9. MT-3染色 (200倍)



矢印は局在を示す

図10. HO-1染色 (200倍)



矢印は局在を示す

図11. アディポネクチン染色 (200倍)

表 2. 肝臓での MT-1/2、MT-3、HO-1、およびアディポネクチン
染色パターンと肝機能に関連する血漿診断マーカーの間の相関

		MT-1/2	MT-3	HO-1	adiponectin
MT-1/2	r				
	p				
	N				
MT-3	r	0.33			
	p	0.25			
	N	14			
HO-1	r	0.20	-0.37		
	p	0.25	0.19		
	N	35	14		
adiponectin	r	0.08	0.06	0.44	
	p	0.64	0.84	0.01	
	N	35	14	35	
platelet	r	0.07	-0.41	0.15	0.30
	p	0.70	0.15	0.40	0.09
	N	34	14	34	34
albumin	r	-0.14	0.44	-0.26	-0.01
	p	0.45	0.11	0.15	0.96
	N	33	14	33	33
ALP	r	-0.03	-0.33	-0.11	0.27
	p	0.89	0.24	0.53	0.13
	N	33	14	33	33
ALT	r	-0.17	-0.27	-0.15	-0.39
	p	0.33	0.36	0.38	0.02
	N	34	14	34	33
AST	r	-0.28	-0.30	-0.27	-0.20
	p	0.11	0.30	0.13	0.25
	N	34	14	34	34
T-Bil	r	0.526	0.10	0.24	0.04
	p	0.00	0.73	0.17	0.83
	N	33	14	33	33
ChE	r	-0.390	-0.32	0.12	-0.03
	p	0.02	0.26	0.51	0.85
	N	33	14	34	34

r ; 相関係数

p ; p 値 (p<0.05 を統計的に有意とする)

N ; 患者数

表 3 NASH におけるMT-1 / 2 低発現群とMT-1 / 2 高発現群とNAFL およびコントロールの 4 群に
おける、他のストレス誘導バイオマーカー比較

	NASH												
	MT1/2 Low (A)		MT1/2 High (B)		p value (A vs B)	NAFL (C)		Normal (D)		p value			
	mean	SD	mean	SD		mean	SD	mean	SD	A vs C	A vs D	B vs C	B vs D
MT1/2	6.4	2.4	19.8	6.7	<0.001	22.1	6.4	19.5	3.8	<0.001	<0.01	NS	NS
HO-1	0.4	0.2	0.6	0.3	NS	0.7	0.3	1.0	0.5	<0.05	<0.01	NS	NS
Adiponectin	0.03	0.06	0.03	0.05	NS	0.29	0.36	0.21	0.14	<0.05	NS	NS	<0.05

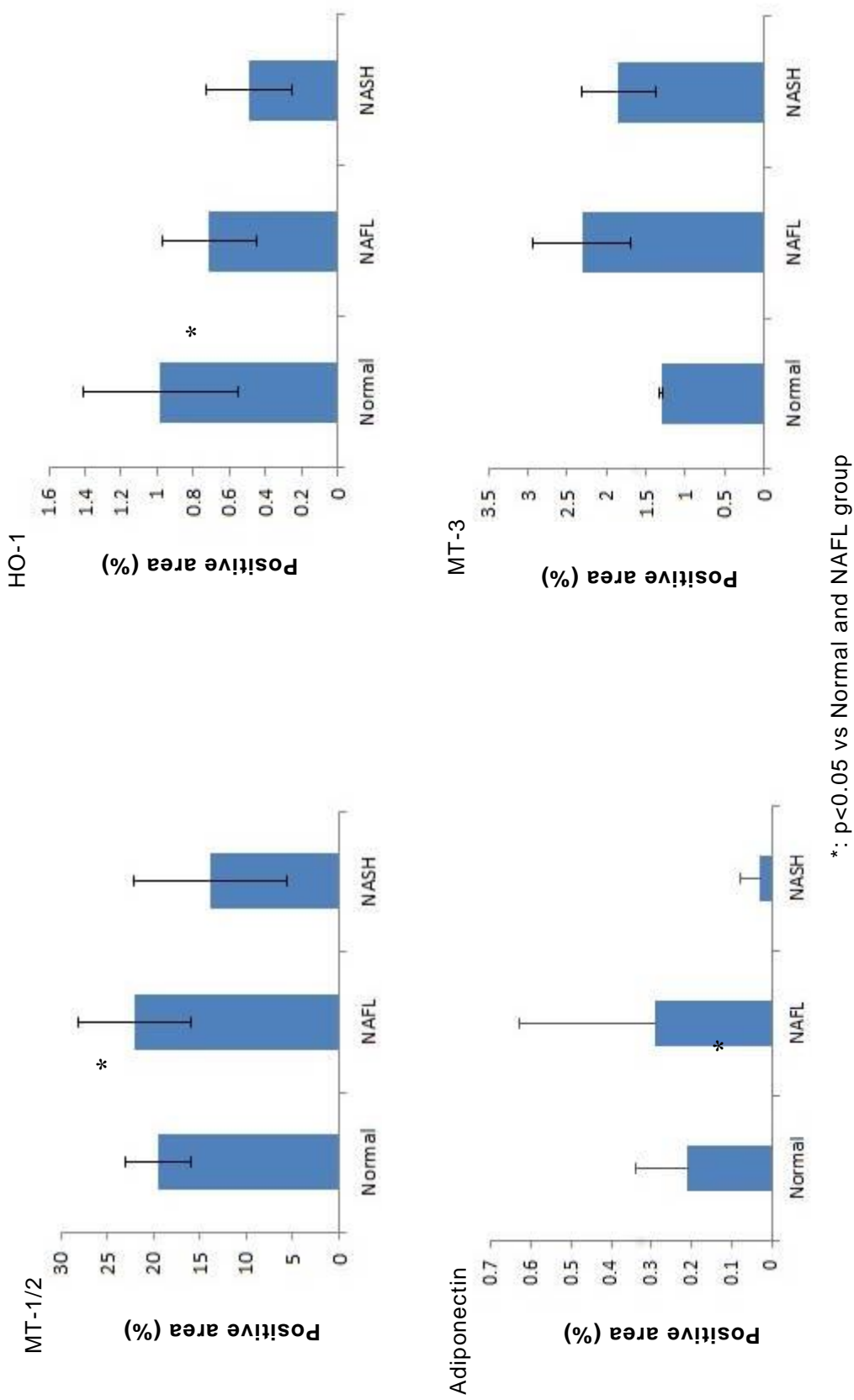


図 1 2 半定量法による免疫染色発現のコントロール、NAFL および NASH の 3 群間で比較

Figure 3

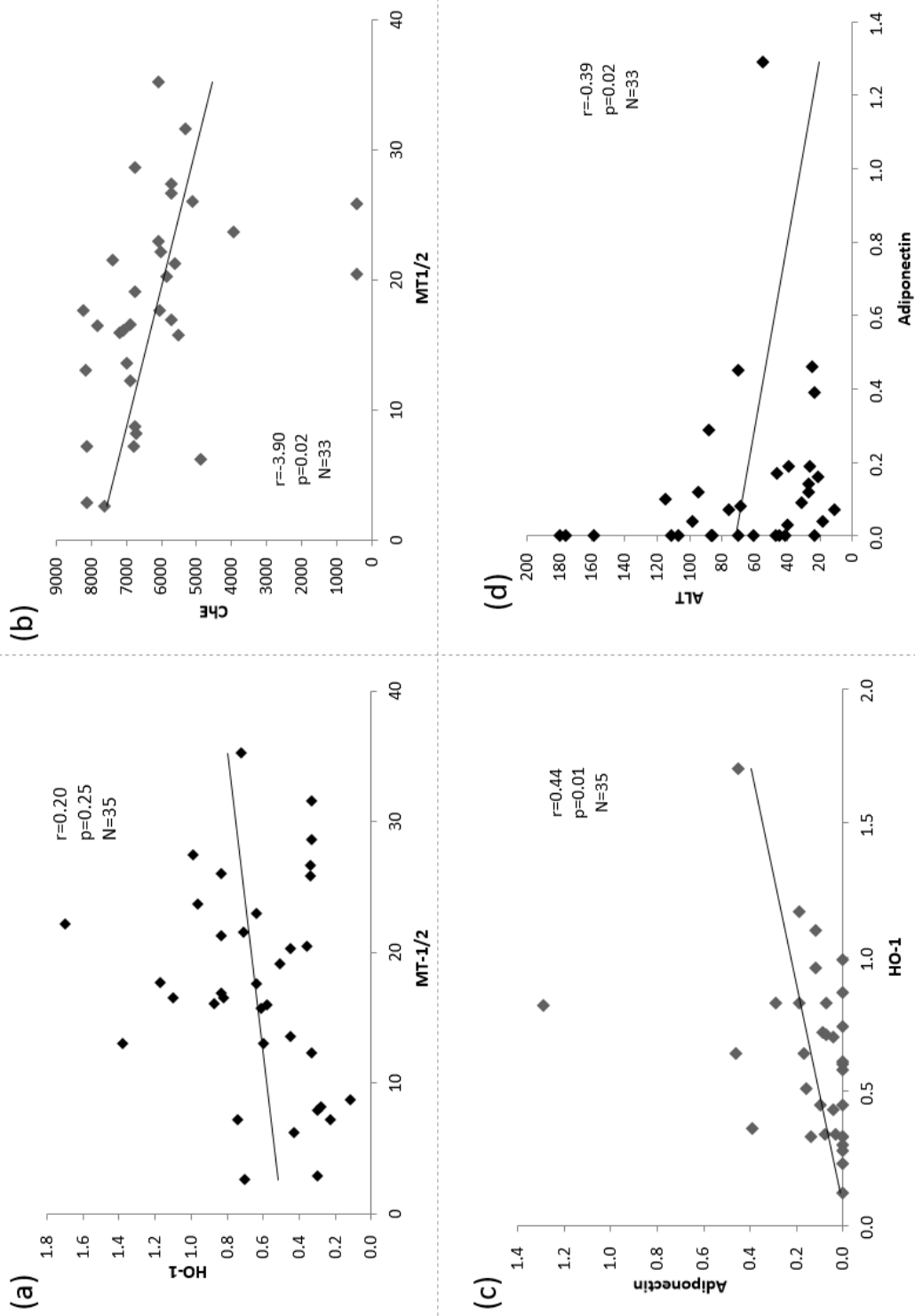


図 1 3 . 肝臓での MT-1/2、MT-3、HO-1 およびアディポネクチンの染色パターンと肝機能

に関連する血清臨床診断マーカーの相関

謝 辞

本論文の作成にあたり、終始適切なご助言・ご指導賜った女子栄養大学臨床栄養医学研究室 田中 明教授に対して深甚なる感謝を申し上げます。

共同研究者としてご協力いただいた群馬大学大学院保健学研究科 長嶺竹明教授、中里享美准教授、中嶋克行先生には一方ならぬお世話になりました。心からの感謝と謝意を表します。

修士研究時より臨床治験を実施させていただき、本研究に貴重な生検標本をご提供くださり、温かく見守りサポートいただいた神戸朝日病院の金 守良院長に心よりの感謝を申し上げます。

私は、神戸で阪神淡路大震災を体験したことで、医と食を繋ぐことをコンセプトとした株式会社ドクターミールを起業し、そのかたわらで大学院に入学しました。そのきっかけを与えてくださった女子栄養大学の先輩である、公益社団法人兵庫県食生活改善協会 金谷滋子常務理事、女子栄養大学 吉田企世子名誉教授、岸 朝子さん、大学院生時代にお世話になった工藤秀機先生、御逝去された小松文夫先生、学生時代からお世話になった奥脇義行先生、また母校での研究生生活ができたことで、女子栄養大学 香川芳子学長・香川靖雄副学長はじめ多くの学生時代にお世話になった先生方や先輩達に接する機会を得、時には励まし、応援いただきお見守りくださったことで、精神的にも支えられてきました。本当にありがとうございました。

最後に、母校での学位取得に理解を示し、神戸からの通学も含めて全てにサポートし支え続けてくれた夫と息子達、そして母、加えて私の不在の間、公私なく会社の業務を支え遂行してくれた株式会社ドクターミール統括マネージャーの田所奈美さん、神戸での生活基盤を保持し支えてくれた足元よりの応援があったからこそ、と心から感謝しています。ありがとうございました。