

エタノールの糖尿病病態への影響：レプチン受容体欠損マウスを用いた検討

牛飼美晴, 川口博明, 阿部正治, 堀内正久

エタノールの糖尿病病態への影響：レプチン受容体欠損マウスを用いた検討

牛飼美晴, 川口博明, 阿部正治, 堀内正久

鹿児島大学大学院 医歯学総合研究科 衛生学・健康増進医学分野

Effects of ethanol intake on pathophysiology of diabetes: a study using *db* mice, an animal model of diabetes with a leptin receptor deficiency

Miharu Ushikai, Hiroaki Kawaguchi, Masaharu Abe, Masahisa Horiuchi

Department of Hygiene and Health Promotion Medicine, Kagoshima University Graduate School of Medical and Dental Sciences, Kagoshima University

(Received 2017 May. 12; Revised May. 20; Accepted Jun. 9)

Abstract

Purpose: We evaluated the influence of ethanol intake on pathophysiology of diabetes using *db* mice, an animal model of type 2 diabetes.

Methods: The concentration of ethanol used was evaluated by the preference test. Then, 6 homozygotes (*db*) as diabetes and 6 heterozygotes as non-diabetes were used. The mice were randomly separated to water group and ethanol group (5% ethanol was supplied), then they were kept for 9 weeks. Finally, they were anesthetized by after 6 h fasting, and organs were removed after blood collection from the heart.

Results: The ethanol concentration used was determined as 5%, which was not discriminated from water by *db* and control mice. Mice supplied with ethanol showed significantly lower intake of food, which was compensated by the energy from ethanol. *db*-ethanol (EtOH) mice showed lower plasma glucose and HbA1c, indicating that glucose metabolism was not aggravated. On the other hand, in biochemical and histological examinations of liver, *db*-EtOH showed significantly higher content of triglycerides in association with vacuolization change, possibly due to fat accumulation in the liver.

Conclusions: Low concentration of ethanol aggravated fatty liver in *db* mice, in regardless of aggravation of glycemic control. This may indicate that fatty liver is a significant marker to consider alcohol intake in patients with diabetes.

Key words: diabetes, alcohol, fatty liver, energy intake

緒言

糖尿病患者数は、年々増加傾向にある（「平成27年度国民栄養・健康調査」2015 http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kenkou_eiyou_chousa.html）。糖尿病患者数の増加には、戦後の運動や食事などの生活習慣の変化が大きく影響している。糖尿病の発症や進行を抑えるために、栄養や運動、生活習慣の改善が保健指導において考慮される。栄養に関することとして、エネルギー摂取量を考慮するうえで、アルコール摂取について考える必要がある¹⁻³⁾。しかし、現状では、糖尿病患者のアルコール摂取量について、保健指導の現場では十分考慮されていない⁴⁾。実際、アルコール摂取（飲酒）についての指針は示されていないのが現状である（社団法人日本栄養士会全国病院栄養士協議会「糖尿病栄養食事指導マニュアル」2008 <https://www.dietitian.or.jp/data/guide/h19-1.pdf>）。また、糖尿病患者のアルコール摂取の糖尿病病態への影響に関する疫学調査の結果は、必ずしも一致していない^{5,6)}。糖尿病患者にとってのアルコールは、好ましくない食品として位置づけられ、肝臓疾患などとの合併症のある患者にとっては、禁酒とされる。また、肝機能障害や合併症が発症していない糖尿病患者に対しての飲酒の指導では、飲酒量の制限が必要なのかどうか判断が難しい。したがって、飲酒が糖尿病の急性・慢性合併症に及ぼす影響を理解し、指導することが望まれる。

動物モデルを用いたアルコール摂取の研究は、投与アルコール濃度を10%以上とし、急性毒性による病態や臓器の影響を評価したものが多^{7,8)}。糖尿病モデル動物においても、1型糖尿病ラットに高濃度アルコールを投与し、アルコール性脂肪肝の発生機序についての報告がある⁹⁾。しかし、体重減少を生じさせない低濃度アルコールの影響を評価した動物実験は、ほとんど行われていない。

本研究では、アルコール低濃度・長期間摂取が糖尿病病態に与える影響について、糖尿病モデルマウスを用いて検討した。アルコール濃度については、対照群と嗜好性に差のない濃度を設定した。また、摂取期間については、マウスの寿命は約2年であることより、人間に換算して約7年間に相当する9週間をアルコール摂取期間と設定した。本研究は、鹿児島大学動物実験委員会の承認（承認番号：MD13111、MD14109）を得て実施した。

方法

1. エタノール濃度検討

エタノール（Nacalai tesque、特級99.5%以上）投与濃度を検討するために、日本チャールズリバーより diabetic mice (*db*マウス；*n*=2) と対照マウス (*n*=2) を

購入した。食餌は普通食CE-2（日本クレア、炭水化物・タンパク・脂肪=50・25・4.6% kcal、3.45 kcal/g)を自由摂食とし、エタノール投与は、2ボトル法（1本には水のみ、もう1本は3～15%濃度エタノール）で行った¹⁰⁾。飲用ボトルの位置による影響を除くため、2本のボトルは1日ごとに左右の位置を入れ替えた。各濃度を2日間投与し、2日ごとに飲用量・体重・摂食量を測定した。

2. 供試動物および飼育条件

雄性2型糖尿病モデルマウス [*db*マウス (*n*=6)] とヘテロ接合体マウス [対照マウス (*n*=6)] を4週齢で日本チャールズリバーより購入した。イヤーパーチにより得られた耳組織を用いて遺伝子診断を行い確認した。約1週間の馴化期間を設け、体重と週齢を考慮し、対照水群 (+*db*H₂O)・対照エタノール群 (+*db*EtOH)・*db*水群 (*db/db*H₂O)・*db*エタノール群 (*db/db*EtOH) の4群に分けた。エタノール摂取により糖尿病の悪化が予想されること（倫理的配慮）より、各群のマウスは*n*=3匹と設定した。飼育条件は、マウスをそれぞれ1個飼にし、7時点灯、19時消灯とし、室温22-25℃、湿度60%の環境下で9週間飼育した。食餌はCE-2を自由摂食とし、1週間に2回測定した。給水はHydropac®給水具（給水口1つ）を使用し、水群は水のみ、エタノール群は5%エタノール溶液を自由飲用とし、1週間に1回測定した。体重は、毎週1回測定した。

3. 試料採取

実験開始後9週目に6時間絶食後、ペントバルビタール麻酔下（100g/kg、腹腔内投与）で、EDTA（最終濃度4mM）を含んだシリンジにて心臓採血を行い、頸椎脱臼後に安楽死させた。血液は遠心分離後、上清を保存した。脳、心臓、肝臓、脾臓、腎臓、筋肉（ひらめ筋）、白色脂肪組織（精巣上体周囲）を摘出し、重量測定後、液体窒素にて凍結し、-80℃で保存した。

4. 血中物質測定

尾静脈血で、HbA1c（DCA2000 HbA1cカートリッジ、シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティクス株式会社）を実験開始後7週目に測定した。また、心臓採血から得た血漿を用い糖代謝系指標として、グルコース（グルコースCII-テストワコー：WAKO）、インスリン（モリナガ超高感度マウスインスリン測定キット：森永生科学研究所）を測定した。脂質代謝系指標としては、TG（トリグリセライドE-テストワコー：WAKO）、コレステロール（コレステロールE-テストワコー：WAKO）、NEFA（NEFA C-テストワコー：WAKO）、レプチン（Quantikine® ELISA Mouse/Rat Leptin Immunoassay：R&D Systems）、AST・ALT（トランスアミナーゼCII-テストワコー：WAKO）を測定した。

5. 肝臓組織中指標測定

採取した組織より脂質抽出（クロロホルム・メタノール）を行い、TG、コレステロール共に血中物質と同様の方法で測定した。

6. 肝臓の病理組織標本作製

凍結肝臓を融解し、一部切り出した肝臓組織を10%中性緩衝ホルマリンで浸漬固定（24時間以上）し、定法によりパラフィン包埋後、パラフィンブロックを作製した。約4 μmの厚さで薄切し、定法により脱パラフィン後、ヘマトキシリン・エオジン染色を実施し、鏡検に供した。

7. 統計解析

測定結果は、平均±標準誤差で示した。有意差検定は、Student's t-testを用いて行った。

結果

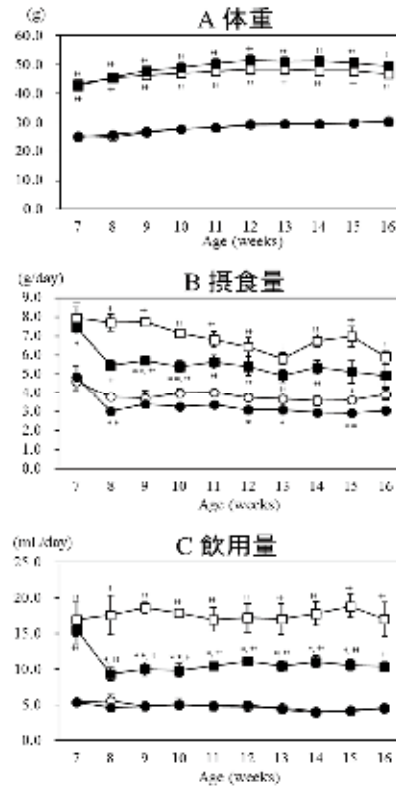
1. エタノール濃度

濃度嗜好試験を2ボトル法で実施し、対照マウスとdbマウスにとって飲用量に差のないエタノール摂取濃度を5%と設定した（未掲載データ）。

2. 体重・摂食量・飲用量

体重の平均値の推移をFig. 1 Aに示す。実験開始時（7週齢）、dbマウスは対照マウスに比べて体重が重かった。対照マウスにおいては、2群間（水・エタノール）の体重差は認められなかった。しかし、dbマウスでは、水群よりもエタノール群が重い傾向にあった（16週齢：p=0.229）。継時的な体重変化に対するエタノール摂取の影響は、遺伝子型により異なっていた。1日当たりの摂食量の推移について、Fig. 1 Bに示す。摂食量は、対照マウスおよびdbマウスともに、水群に比べてエタノール群が低い傾向を示した。1日当たりの飲用量の推移について、Fig. 1 Cに示す。国際アルコール表に基づくエタノール換算表より、5%エタノール溶液の比重を0.993 ÷ 1（水の比重と同じ）とし、測定重量（g）をmLで表記した。対照マウスでは、2群間（水・エタノール）飲用量に差が認められなかったが、dbマウスでは2群間（水・エタノール）飲用量の差が2倍近くあった。次に、エタノール由来総エネルギー量、食餌由来総エネルギー量および総摂取エネルギー量（エタノール由来+食餌由来）と、それぞれの値を各週の体重を平均した値（平均体重）で除した値をTable 1に示した。総エネルギー量は、各遺伝子型での2群間（水、エタノール）に差は認められず、同等のエネルギー摂取をしていることが分かった。また、エタノール摂取群においては、対照マウスとdbマウスのエタノール由来総エネルギー量は、対照マウスよりdbマウスが有意に高かった。しかし、平均体重あたりで換算すると有意差がなかった。

Fig.1. Body weight, food intake, and water intake during the experimental period



○: +/dbH₂O ●: +/dbEtOH □: db/dbH₂O ■: db/dbEtOH

*P < 0.05, **P < 0.01 vs. mice supplied with H₂O at the respective genotypes.

†P < 0.05, ††P < 0.01 vs. +/db mice at the respective conditions (H₂O or EtOH).

3. 臓器重量

脳、心臓、肝臓、腎臓、膵臓、白色脂肪組織、筋肉（ひらめ筋）重量の測定値をTable 1に示す。脳重量は、対照マウスに比べてdbマウスは軽く、エタノール群でさらに軽くなる傾向を示した。心臓重量は、db水群は軽くdbエタノール群で重くなる傾向にあった。肝臓重量については、対照マウスでは、2群間（水・エタノール）に差は認められなかった。dbマウスは、2群間（水・エタノール）とも対照マウスに比べて有意に重かった。さらに、dbエタノール群は、db水群に比べて有意に重かった。腎臓重量は、db群では有意に重く、エタノール群では水群に比べて軽い傾向だった。膵臓重量は、db水群が対照水群に比べて重くなる傾向を示したのに対し、dbエタノール群ではdb水群と比べて軽くなる傾向を示した。白色脂肪重量は、dbマウスは、対照マウスよりも有意に重かった。特に、dbエタノール群は、db水群に比べて有意に重い値を示した。筋肉重量は、db水群に比べてdbエタノール群は重い傾向を示した。

Table 1. Energy intake, organ weight and biochemical parameters including plasma hormones and hepatic fat content at 16 weeks of age

		+/db		db/db	
		H ₂ O	EtOH	H ₂ O	EtOH
体重	g	30.7 ± 0.4	30.1 ± 0.9	46.8 ± 1.2 ^{††}	49.6 ± 1.6 ^{††}
エタノール由来エネルギー	kcal		83.0 ± 7.5		187.9 ± 11.8 ^{††}
	kcal/平均体重		2.91 ± 0.30		3.78 ± 0.22
食餌由来エネルギー	kcal	841.1 ± 28.2	695.7 ± 12.3 ^{**}	1525.1 ± 70.4 ^{††}	1191.4 ± 77.3 ^{*, ††}
	kcal/平均体重	29.5 ± 1.1	24.3 ± 0.4 [*]	32.2 ± 1.4	24.1 ± 2.4 [*]
食餌およびエタノール由来エネルギー	kcal	841.1 ± 28.2	778.7 ± 14.3	1525.1 ± 70.4 [†]	1349.3 ± 79.0 [†]
	kcal/平均体重	29.5 ± 1.1	27.2 ± 0.6	32.2 ± 1.4	27.9 ± 2.5
臓器					
脳	g	0.434 ± 0.010	0.428 ± 0.009	0.399 ± 0.026 [†]	0.378 ± 0.017
心臓	g	0.143 ± 0.003	0.148 ± 0.006	0.126 ± 0.005 [†]	0.149 ± 0.012
肝臓	g	1.334 ± 0.088	1.390 ± 0.041	2.380 ± 0.221 [†]	4.108 ± 0.352 ^{*, ††}
腎臓	g	0.391 ± 0.002	0.358 ± 0.004 ^{**}	0.504 ± 0.041	0.468 ± 0.044
膵臓	g	0.218 ± 0.025	0.254 ± 0.026	0.273 ± 0.045	0.231 ± 0.016
白色脂肪組織	g	0.632 ± 0.050	0.544 ± 0.035	2.465 ± 0.124 ^{††}	3.036 ± 0.136 ^{*, ††}
筋肉(ひらめ筋)	g	0.011 ± 0.002	0.011 ± 0.001	0.009 ± 0.001	0.010 ± 0.001
血漿					
グルコース	mg/dL	100.3 ± 7.4	92.3 ± 1.2	353.3 ± 19.9 ^{††}	312.7 ± 19.6 ^{††}
HbA1c [#]	%	3.7 ± 0.1	3.1 ± 0.3	9.6 ± 0.5 ^{††}	8.8 ± 0.6 ^{††}
インスリン	ng/mL	1.82 ± 0.11	2.47 ± 0.29	4.36 ± 0.98	5.04 ± 2.1
レプチン	ng/mL	0.58 ± 0.13	0.62 ± 0.19	3.34 ± 0.35 ^{††}	3.67 ± 0.47 ^{††}
中性脂肪	mg/dL	30.8 ± 9.3	25.0 ± 3.8	53.3 ± 11.7	63.3 ± 13.7
遊離脂肪酸	mEq/L	0.25 ± 0.04	0.28 ± 0.02	0.50 ± 0.12	0.49 ± 0.07 [†]
コレステロール	mg/dL	86.7 ± 7.7	103.3 ± 11.5	121.3 ± 8.0 [†]	131.7 ± 20.5
AST	U/L	35.9 ± 3.3	52.0 ± 6.1	35.0 ± 4.7	32.0 ± 5.2
ALT	U/L	8.1 ± 0.9	8.8 ± 1.2	18.4 ± 1.1 ^{††}	23.3 ± 7.4
肝臓脂質					
中性脂肪	mg/g	12.1 ± 6.2	9.1 ± 1.9	24.3 ± 1.1	59.4 ± 6.3 ^{**, ††}
コレステロール	mg/g	2.5 ± 0.5	3.2 ± 0.5	6.4 ± 0.2 ^{††}	7.7 ± 1.1 [†]

平均体重：各週ごとの体重を平均した値。

エタノール：7.1 kcal/g、食餌：3.45 kcal/g として計算。

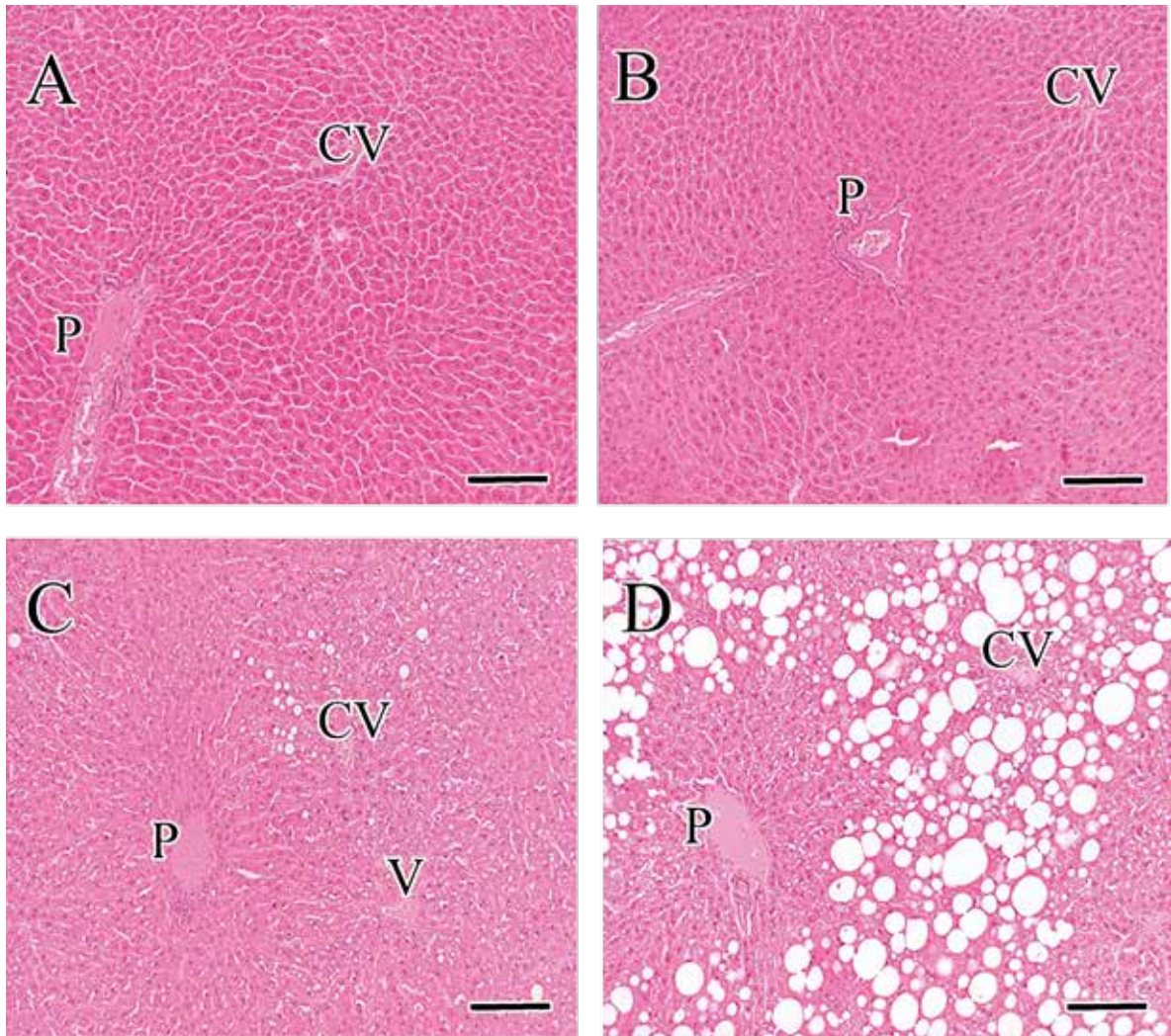
AST：aspartate aminotransferase, ALT：alanine aminotransferase.

[#]The values of HbA1c were measured at 14 weeks of age.

P* < 0.05, *P* < 0.01 vs. mice supplied with H₂O at the respective genotypes.

[†]*P* < 0.05, ^{††}*P* < 0.01 vs. +/db mice at the respective conditions (H₂O or EtOH).

Fig. 2. Histopathological examination of liver tissues stained with hematoxylin/eosin



Tissues are shown at $\times 100$ magnification (bar: 100 μm).

A: +/db H₂O B: +/db EtOH C: db/db H₂O D: db/db EtOH

P: portal area CV: central vein V: vein.

4. 血中物質測定

血中物質の測定結果をTable 1に示す。血糖値は各遺伝子型の2群間（水、エタノール）では差が認められなかった。HbA1cは、各遺伝子型での2群間（水、エタノール）では差がなく、むしろ、dbエタノール群ではdb水群と比べて低くなる傾向を示した。エタノールによって、dbマウスの血糖コントロールの悪化のないことが示唆された。インスリン、レプチン、中性脂肪、遊離脂肪酸、コレステロール、ともに対照マウスよりもdbマウスが高くなる傾向にあった。肝臓機能障害を調べるため、AST・ALTを測定した。ASTについては、対照マウスでは、

水群に比べエタノール群が高い傾向にあったが、db群では反対に低い傾向にあった。ALTについては、対照マウスよりもdbマウスが有意に高くなる結果を示した。

5. 肝臓中の脂質指標

対照マウスとdbマウスにおいて、肝臓重量に有意な差が認められたため、肝臓1gあたりの脂質指標をTable 1に示す。肝臓組織1gあたりの中性脂肪、コレステロールは、どちらも対照マウスよりもdbマウスが高かった。特に中性脂肪は、db水群よりdbエタノール群で高くなっており、有意差が認められた。

各群の肝臓の組織染色をFig. 2 A-Dに示す。dbマウス

では空胞変性が認められ、脂肪滴と考えられた。特に、空胞変性は、*db*エタノール群の中心静脈側に多く存在していた。

考察

2型糖尿病病態におけるエタノールの長期摂取が臓器へ及ぼす影響を検討する目的で、2型糖尿病モデルマウスに5%エタノールの長期摂取実験を行った。5%エタノール摂取においては、マウスの体重減少はなく、急性毒性はないと考えられた。また、摂取エタノール量は、*db*マウスが対照マウスの2倍程度であったが、体重あたりで比較すると有意な差はなく、得られた結果を比較する場合、*db*マウスと対照マウスではほぼ同程度のエタノール摂取量だったと考えられる。糖尿病モデルマウスに与える影響として体重変化をみると、対照マウスに比べて、*db*マウスの体重がより増加する傾向を示した。対照マウスと*db*マウス両群間のエタノール由来エネルギー量/平均体重に有意な差が認められなかったことより、糖尿病病態において、エタノールを摂取することで中性脂肪の蓄積が増強され、脂肪肝・脂肪量増加を招き体重が増加したのと考えられた。また、臓器へ及ぼす影響として、肝臓重量の変化が著しく、肝臓中の中性脂肪の値から*db*エタノール群では脂肪肝の増強が考えられた。組織では、肝細胞の小葉中心性の空胞変性を認めた。さらに、その空胞変性は、一つの大空胞が肝細胞の核を辺縁に押しやるような形態を示しており、ヒトのアルコール性脂肪肝の組織像に類似している¹¹⁾。肝臓重量の変化に加えて、腎臓重量において、いずれの遺伝子型マウスにおいても、エタノール摂取群が水群に比べて、有意に軽い値を示した。エタノール摂取群は、エタノール摂取の分、水摂取群と比べてたんぱく摂取量が少なくなっており、このことが、腎臓重量に影響を与えたことが考えられた。

肝臓中の中性脂肪の上昇については、まず、食餌由来の脂質増加が予想された。しかし、*db*エタノール群の食餌由来エネルギー量は減少し、食餌由来の脂質摂取量は低下していた。同様に、食餌由来の糖質摂取量が減少していることより、中性脂肪の合成量は増えていないと考えられた。また、アルコール代謝では、ミトコンドリアのNAD⁺はNADHに還元され、脂肪酸分解の酸化基質としてのNAD⁺が減少する。本研究結果において、アルコール摂取によって脂肪酸分解が抑制され、脂肪蓄積を促進した可能性が考えられた¹²⁾。血中中性脂肪値に差はないことから、肝臓中性脂肪の分泌は顕著には抑制されていないと考えた。この点は、VLDLに含まれる中性脂肪含量を測定する必要があるかもしれない。今回使用した糖尿病モデルマウスは、自然発症性のレプチン受容体欠損マウスで、全身性にレプチンシグナルが低下して

いる。本糖尿病モデルマウスでは、レプチンシグナル低下による脂肪合成促進や脂肪酸酸化抑制が報告されている^{13,14)}。アルコール摂取によって、これらの変化が増強されている可能性が考えられた。食餌摂取由来の脂質摂取量は低下していることより、脂肪合成亢進よりも脂肪酸酸化抑制が優位にはたらく、脂肪蓄積が増加した可能性を最も考えているが、より詳細な解析が求められる。今回の研究では、アルコール摂取期間を9週間としたが、脂肪肝の線維化や肝がん発症への関与を検討するためには、さらに長期の摂取期間を考慮することが必要である。

臨床的に、糖尿病患者は非糖尿病患者に比べて脂肪肝の発症頻度が高いことが知られている¹⁵⁾。糖尿病は、肥満を介して、脂肪肝や非アルコール性脂肪肝炎(NASH)を生じることが報告されている¹⁶⁾。最近の報告では、血中レプチンレベルがアルコール性脂肪肝を改善するという報告¹⁷⁾や、*db*マウスでは、オートファジー抑制が脂肪肝悪化に関連しているとの報告もある¹⁸⁾。今後、本モデルマウスで認められた現象をさらに解析することで、アルコールによる糖尿病における脂肪肝増強の病態発症機構の一部が明らかにされることが期待される。糖尿病病態においてアルコール摂取が、対照群に比べて脂肪肝をより増強する可能性のあることから、糖尿病患者のアルコール摂取の指標として、脂肪肝に着目していく必要性も示唆される。本研究では、エタノール摂取により、両遺伝子型マウスの血糖やHbA1cが低い値を示した(有意差はない)。食餌由来のエネルギー量が少なくなるということと、エタノール代謝物の糖代謝への影響も考慮される。エタノールは肝臓で代謝され、細胞質NADHを産生することから、肝臓では乳酸由来のピルビン酸が不足し、ピルビン酸由来の糖新生が抑制されることが報告されている¹⁹⁾。糖新生の亢進は空腹時血糖上昇の主な要因であり、エタノール摂取が絶食下での血糖低下に関与している可能性はある。一方、摂食時においては、骨格筋での糖代謝が重要であるが、本研究では、十分な検討ができておらず、今後の検討課題と考えられた。

本研究結果の解釈において、次の2つの注意点を有している。1つ目は、エタノールによる糖尿病病態における脂肪肝の増強は、6時間絶食条件の結果であることである。従って、摂食条件において、脂肪肝の程度がどのようになるかは不明である。本研究の解釈はあくまでも、絶食条件においての結果に基づいている。ただ、ヒトにおいても、腹部エコー実施時は、絶食条件(朝食を抜く)で行うことが多いこともあり、糖尿病患者のエタノール摂取時の脂肪肝増強については、臨床的にも検討されるべきであろう。2つ目の注意点は、本研究に利用した糖尿病モデルマウスは、レプチン受容体の遺伝的欠損動物であることである。レプチン受容体欠損マウスは、

食欲を抑制するホルモンであるレプチンが作用できないため、過食肥満となり糖尿病を発症する。しかし、ヒト糖尿病では、単一遺伝子変異で病態が発症進行するわけではないことから、ヒトの臨床病態を反映しているのかという点に関して十分な考察を必要とする。

結論

体重減少を示さないアルコール投与によって、糖代謝の悪化を生じない範囲で、糖尿病病態において脂肪肝が増強することが示された。脂肪肝増強のメカニズムは不明であるが、脂肪酸酸化の抑制が最も考えられる。動物実験での結果であるが、糖尿病患者のアルコール摂取保健指導において、アルコール摂取量や食事を評価するために、健常者以上に「脂肪肝」を指標とする可能性が考えられ、より詳細な検討がなされることが期待される。

謝辞

本研究に多大なご協力を頂きました 衛生学・健康増進医学分野修士課程修了生 小迫恵美子さんに深謝致します。

文献

- 堀江義則. 飲酒と関連する内科的疾患. 診断と治療 2010 ; 98 : 1921-1927.
- 堀内正久、中熊美和、有村恵美、牛飼美晴、吉田剛一郎. 実験研究による解析、食と生活習慣関連疾患（心疾患・脂肪肝・疲労病態）日本衛生学雑誌 2015 ; 70(2) : 110-114.
- 河田純男. 肥満と糖尿病におけるアルコールの是と非. 肥満と糖尿病2008 ; 7(4) : 499-504.
- Vinson DC, Turner BJ, Manning BK, Galliher JM. Clinician suspicion of an alcohol problem: an observational study from the AAFP National Research Network. *Ann Fam Med* 2013 ; 11(1) : 53-59.
- 渡辺哲. アルコールと疫学. 治療2005 ; 87(8) : 2285-2290.
- Heianza Y, Arase Y, Saito K, Tsuji H, Fujihara K, Hsieh SD, et al. Role of alcohol drinking pattern in type 2 diabetes in Japanese men: the Toranomon Hospital Health Management Center Study 11 (TOPICS 11). *Am J Clin Nutr* 2013 ; 97(3) : 561-568.
- Hu C, Ge F, Hyodo E, Arai K, Iwata S, Lobdell H 4th, et al. Chronic ethanol consumption increases cardiomyocyte fatty acid uptake and decreases ventricular contractile function in C57BL/6J mice. *J Mol Cell Cardiol* 2013 ; 59 : 30-40.
- Xu MJ, Cai Y, Wang H, Altamirano J, Chang B, Bertola A, et al. Fat-Specific Protein 27/CIDEc Promotes Development of Alcoholic Steatohepatitis in Mice and Humans. *Gastroenterology* 2015 ; 149(4) : 1030-1041.
- 生野哲雄. 糖尿病におけるアルコール性脂肪肝発生機序に関する実験的研究. 糖尿病1981 ; 24(7) : 705-714.
- Blednov YA, Walker D, Harris RA. Blockade of the leptin-sensitive pathway markedly reduces alcohol consumption in mice. *Alcohol Clin Exp Res* 2004 ; 28 : 1683-1692.
- Vinay Kumar, Abul K Abbas, Jon C. Aster, (監修・翻訳：豊國伸哉, 高橋雅英). ロビンス基礎病理学 第9版 東京：丸善出版, 2014 : 736-742.
- Galli A, Pinaire J, Fischer M, Dorris R, Crabb DW. The transcriptional and DNA binding activity of peroxisome proliferator-activated receptor alpha is inhibited by ethanol metabolism. A novel mechanism for the development of ethanol-induced fatty liver. *J Biol Chem* 2001 ; 276(1) : 68-75.
- Schroeder-Gloekler JM, Rahman SM, Janssen RC, Qiao L, Shao J, Roper M, et al. CCAAT/enhancer-binding protein beta deletion reduces adiposity, hepatic steatosis, and diabetes in *Lepr(db/db)* mice. *J Biol Chem* 2007 ; 282(21) : 15717-15729.
- Yoshino S, Satoh T, Yamada M, Hashimoto K, Tomaru T, Katano-Toki A, et al. Protection against high-fat diet-induced obesity in *Helz2*-deficient male mice due to enhanced expression of hepatic leptin receptor. *Endocrinology* 2014 ; 155(9) : 3459-3472.
- Imamura Y, Uto H, Hiramane Y, Hosoyamada K, Ijuin S, Yoshifuku S, et al. Increasing prevalence of diabetes mellitus in association with fatty liver in a Japanese population. *J Gastroenterol* 2014 ; 49(10) : 1406-1413.
- Shima T, Uto H, Ueki K, Takamura T, Kohgo Y, Kawata S, et al. Clinicopathological features of liver injury in patients with type 2 diabetes mellitus and comparative study of histologically proven nonalcoholic fatty liver diseases with or without type 2 diabetes mellitus. *J Gastroenterol* 2013 ; 48 : 515-525.
- Tan X, Sun X, Li Q, Zhao Y, Zhong W, Sun X, et al. Leptin deficiency contributes to the pathogenesis of alcoholic fatty liver disease in mice. *Am J Pathol* 2012 ; 181(4) : 1279-1286.
- Xiao Y, Liu H, Yu J, Zhao Z, Xiao F, Xia T, et al. Activation of ERK1/2 Ameliorates Liver Steatosis in Leptin Receptor-Deficient(*db/db*) Mice via Stimulating

ATG7-Dependent Autophagy. *Diabetes* 2016 ; 65(2) : 393-405.

- 19) Tsai WW, Matsumura S, Liu W, Phillips NG, Sonntag T, Hao E, et al. ATF3 mediates inhibitory effects of ethanol on hepatic gluconeogenesis. *Proc Natl Acad Sci* 2015 ; 112(9) : 2699-2704.