

**養生片仔廣(YHK)を投与したOB/OB マウスにおける非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) :  
ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体 (PPARs) および  
ミクロゾームトリグリセリド転移蛋(MTP)への影響**

受付日: 2006年12月14日 / 受理日: 2007 年2月13日

C\_Springer Science+Business Media, LLC 2007

J. T. Stefano • C. P. M. S. de Oliveira • V. M. R. de Lima • E. P. de  
Oliveira • F. J. Carrilho

サンパウロ大学医学部消化器病学講座 (LIM-07),

Sao Paulo, SP, Brazil

M. L. Corrêa-Giannella • S. V. de S´a • D. Giannella-Neto

サンパウロ大学医学部細胞分子内分泌学研究所 (LIM-25),

Sao Paulo, SP, Brazil

E. S. de Mello • V. A. F. Alves

サンパウロ大学医学部病理学講座 (LIM-14),

Sao Paulo, SP, Brazil

J. T. Stefano ()

サンパウロ大学医学部,

**【要約】**

養生片仔廣 (YHK) は抗酸化作用、血糖降下作用があり、血漿脂質レベルを下げるとも考えられている。本研究においては、YHK投与または非投与のob/obマウスにおいて PPAR- $\alpha$ 、PPAR- $\gamma$ 、MTP の肝での発現を調査した。Ob/ob マウスはグループ分けし、経口YHK(20 mg/kg/day) を添加した溶液 (メチオニン/コリン欠乏[MCD] 食 + YHK 群)または溶媒(MCD 群)を経管栄養にて4週間にわたり投与した。組織学的検査およびmRNA抽出のために肝切片を採取した。PPAR- $\alpha$ 、PPAR- $\gamma$ 、MTPの遺伝子発現はRT-qPCRを用いて測定した。YHKの投与は、MCD群と比較してNASHの予防、体重減少、内臓脂肪の減少や血清アミノトランスフェラーゼ濃度の低下と関与していた。YHKはPPAR- $\alpha$  および MTPを増加させ、PPAR- $\gamma$  mRNA含量の減少を促した。こうした結果は、実験誘発性NASHにおいてPPAR- $\alpha$ 、PPAR- $\gamma$ 、MTPのRNA発現の調節がYHKの保護効果に関与し、肝細胞への脂質蓄積を抑制する可能性があることを示唆している。

キーワード:

非アルコール性脂肪性肝炎

メチオニン/コリン欠乏食

ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体

ミクロゾームトリグリセリド転移蛋白

養生片仔廣

逆転写定量ポリメラーゼ連鎖反応

**【緒言】**

「NASHは、肝硬変や肝不全に進展する可能性のある重要な肝疾患である[1-3]。脂肪変性からNASHへの移行を仲介するメカニズムはわかっていないが、「二つのヒット理論」が提唱されてい

る[4]。病理生理学的に見ると脂肪変性には多くの要因がからんでいるが、多くのデータからPPARとNASHの発症または進行とのあいだに関係があることが示唆されている[5, 6]。

PPARは、脂肪由来のリガンドと結合し脂質代謝を制御する遺伝子の転写を活性化するリガンド活性化転写因子のファミリーに属している。脂肪細胞に多く存在するPPAR- $\gamma$ は正常な肝臓での発現は極めて少ない[7]が、非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) の実験モデルで観察されているPPAR- $\gamma$ のアップレギュレーションは、新規の脂質合成を規制することによって脂肪変性を誘発する[8–10]。PPAR- $\alpha$ は、肝臓にもっとも多く存在するサブタイプで、ペルオキシゾームやミトコンドリアにおける $\beta$ -酸化や脂肪酸輸送に関与する一部遺伝子の発現をアップレギュレートすることにより、脂肪酸の異化作用を高める[11]。とはいえ、非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)における肝でのPPAR- $\alpha$ の発現に関しては大いに議論の余地がある。

PPAR- $\alpha$ の目的遺伝子であるミクロゾームトリグリセリド転移蛋白 (MTP)は、小胞体におけるリポ蛋白集合に中心的役割を果たしている可能性がある。インビトロでは、MTPが中性脂肪をドナー小胞からアクセプター小胞へ動員させることが示されている[12, 13]。

MTP遺伝子発現のダウンレギュレーションおよびVLDL分解のアップレギュレーションは、肝細胞における細胞内脂肪沈着を促し、脂肪肝に対する感受性を高める[14, 15]。

NASHの病因におけるPPARの役割ははっきりしないが、最近の研究では、こうした症状の治療においてPPAR- $\alpha$  /PPAR- $\gamma$  アゴニストの治療効果が示唆されている[16–18]。

片仔廣から抽出した養生片仔廣 (YHK: (株) 協通事業、日本)は4つの主成分(田七、杜仲、黄精、甘草)からなり、活性酸素種(ROS)と反応してラジカル反応の伝播を阻止することが報告されている[19–21]。YHKがもつ潜在的な治療効果を評価する研究のほぼすべてにおいて、抗繊維化薬としての活性[22, 23]や実験誘発性肝損傷における保護効果[19, 20]が報告されている。最近では、無作為パイロット試験の結果、YHKを投与されたNASH患者のアミノトランスフェラーゼ値が有意に改善している[24]。また、著者らもこれまでに、高脂肪食またはメチオニン/コリン欠乏(MCD)食を摂取したob/obマウスにおいてYHKがNASHを予防することを示してきた[25]。

実験誘発性NASHにおけるYHKの保護効果についてさらに深く掘り下げるために、本研究の目的は、MCD食を与えたob/obマウスにおいてPPAR- $\alpha$ 、PPAR- $\gamma$ 、および、PPAR- $\alpha$ の目的遺伝子であるMTPの肝での発現にYHKがどのような役割を果たしているかを評価することにあった。

## 【材料と方法】

### 材料

YHKは日本の協通事業より提供を受けた(<http://www.kyotsujigyo.com>)。本サプリメントには4種の異なる植物由来成分が含まれる(田七[40%–60%]、杜仲 [30%–40%]、黄精 [8%–12%]、甘草[8–12])。

### 実験動物

8週齢、体重 30–40 gの雄性ob/ob マウス (Jackson Laboratories, 米国、メイン州バーハーバー)は温度・湿度を管理した室内で飼育し、12-時間明・暗サイクルを維持し、食餌や水は量を制限せずに与えた。動物実験の手順はすべてヘルシンキ宣言1975年東京修正(NIH刊行 No.85–23; 1996年修正)およびサンパウロ大学医学部の動物実験指針に従った。対照群のob/ob マウス(n = 5)には随

意に普通食(Nuvilab; Nutrientes Ltd., ブラジル、コロombo)を与えた。ob/ob マウスにMCD食(炭水化物62.5%、でんぷん、蔗糖添加;蛋白質17%、メチオニン/コリン無添加、カゼイン添加;脂質7%、大豆油添加; AIN-93M ビタミン混合1%; AIN-93M ミネラル混合3.5%) (Rhooster Ind. Com. Ltd., ブラジル、サンパウロ)を1日5 g、4週間与えることでNASHを誘発した。ob/ob マウスは普通食を与えた対照群と2つの実験群とに分け、実験群の食餌は以下の通りとした:(1)MCD群(n = 5)にはMCD食のほかに溶媒(生理的リンゲル液)を;また(2) MCD + YHK 群 (n=5)にはMCD食のほかにYHK溶液(20 mg/kg)をそれぞれ毎日経管栄養で投与した。MCD食に加えYHKまたは溶媒を4週間投与した後、ob/obマウスを屠殺した(12週目)。生化学分析、mRNA抽出、組織学的検査のために血漿検体および肝臓(組織)を採取した。本研究実施期間中、食餌の摂取量は給餌の際に毎日残された食餌を観察することで判断した。

### 生化学分析

血清アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)値、血清アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST)値、血清コレステロール値、血清トリグリセリド値は自動測定装置(Modular P800; Roche Diagnostics; 米国、インディアナ州インディアナポリス)を用い標準的方法で測定した。

### 組織学的分析

肝組織は4%ホルムアルデヒドの中で固定し、組織学的分析のためにヘマトキシリン/エオシン染色およびマッソントリクローム染色を施した。組織学的変数は、NASH活動性スコアを基に作成した以下のようなスコアリングシステムを用い、熟練した肝病理学専門家によって盲検法に従ってスコア化した[26]:大空胞性の脂肪変性(0-3)、小葉の炎症性変化(0-3)、肝細胞の風船状腫大(バルーンング)(0-2)。サンプルのすべてにおいて繊維化は最小限にとどまったためスコア化しなかった。

### RNAの抽出

肝組織はディスマンプレート(B. Braun Biotech International, ドイツ、メルズンゲン)を用い液体窒素温度で粉碎(~50 mg)した後、トリゾル試薬(Invitrogen Life Technologies, 米国、カリフォルニア州カールスバード)を用いメーカーの指示に従って総RNAを作成した。総RNAはRNaseフリーの純水のなかで溶解し、分光測定法でRNA濃度を測定した。RNAのインテグリティは260/280-nm吸光度比>1.8で、アガロースゲル電気泳動で分解の兆候は認められず、適当と判断された。検体は逆転写定量ポリメラーゼ連鎖反応(RT-qPCR)法で処理するまで-80°Cに保持した。

### RT-qPCR分析

定量的RT-qPCR法によってPPAR- $\alpha$ 、PPAR- $\gamma$ 、MTPの転写レベルを測定し、結果はハウスキーピング $\beta$ -アクチンmRNAの相対値に従って標準化した。高レベルの特異性を達成しゲノムDNAの検出を回避するために、遺伝子特異的プライマー対は隣接する二つのエクソン上に設定した。プライマーはプライマー3プログラム([http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi))を用い、同じGC含量とアニーリング温度をもつよう設計した[27]。

$\beta$ -アクチン(165-bp 生成物): NM-007393

センス: 5'-TGTTACCAACTGGGACGACA-3'

アンチセンス: 5'-GGGGTGTGAAGGTCTCAA-3'

PPAR- $\alpha$  (168-bp 生成物): NM-011144 センス: 5\_-ATGCCAGTACTGCCGTTTTTC-3\_

アンチセンス: 5\_-TTGCCCAGAGATTTGAGGTC-3\_

PPAR- $\gamma$  (197-bp 生成物): NM-011146

センス: 5\_-CATAAAGTCCTTCCCGCTGA-3\_

アンチセンス: 5\_-GAAACTGGCACCCCTTGAAAA-3\_

MTP (171-bp 生成物): NM-008642

センス: 5\_-CCT CTT GGC AGT GCT TTT TC-3\_

アンチセンス: 5\_-ATT TTG TAG CCC ACG CTG TC-3\_

ワンステップリアルタイム定量RT-PCRのためにQuantitect SYBR Green RT-PCR (Qiagen GmbH, ドイツ, ヒルデン)を用い、Rotor-Gene RG-3000 (Corbett Research, オーストラリア, シドニー)中でメーカー提供の指示に従いmRNAの発現を実施した。ゲノムDNA汚染評価のために、逆転写酵素を抜いた反応も行い対照とした。反応混合物の組成はSYBR RT-PCR Master Mix 12.5  $\mu$ l、QuantiTect RT Mix 0.25  $\mu$ l、0.2 mMセンス/アンチセンスプライマー、総RNAテンプレート5  $\mu$ l (20 ng/ $\mu$ l)だった。

反応（混合物）は以下のサイクル条件下で培養した：RTのために50°Cで30分間、95°Cにまで加熱して15分間、次いで、94°Cで20秒、56°Cで30秒、72°Cで30秒を35サイクル。1サイクル終了ごとに蛍光変化をモニターし、（すべての）サイクルが終了した時点でPCR生成物のアイデンティティを確認するために融解曲線分析を実施した(72°C、1秒当たり0.2°Cで99°Cに上昇、連続蛍光読取)。適切な大きさのユニークな生成物フラグメントを視覚化するためにアンプリコンの特異性についてもアガロースゲル電気泳動によって確認した。

PPAR- $\alpha$ 、PPAR- $\gamma$ 、MTPのRNA含量は $\beta$ -アクチンのRNA含量と比較した転写数として測定し、さらに対照群の肝臓の平均値に対して標準化した。各目的遺伝子やハウスキーピング遺伝子の増幅効率を評価するために、5つの異なるRNA濃度(500、100、20、4、0.8 ng/ $\mu$ l)で2倍系列希釈を用い、対照群の肝RNA検体から標準曲線を作成した。PPAR- $\gamma$  遺伝子に対する相対定量は、 $\beta$ -アクチンの等価増幅効率を基に、 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法 [28]を用いて算出した。 $\beta$ -アクチンと比較したPPAR- $\alpha$ 遺伝子およびMTP遺伝子の相対発現比を評価するために、Pfaffl [29]が論文中に記している数学的モデルを用いた。対照群のPPAR遺伝子、MTP遺伝子、ハウスキーピング遺伝子の増幅は、日を変えて実施した二回の異なる実験において採取した各検体につき二回ずつ実施した。

#### 【統計解析】

不対両側スチューデントのt検定を用い、PPAR- $\alpha$ 、PPAR- $\gamma$ 、MTPの遺伝子発現について3群間の統計的有意性を評価した。生化学分析のために、各群の結果を一変量分散分析を用いて比較した。統計解析はすべてJMP Release 5.1.1 software (SAS Institute Inc., 米国、ノースカロライナ州ケアリー)を用いて実施した。値は平均値 $\pm$  SDとして表し、結果は、 $P < 0.05$ の確率レベルで統計的に有意とみなした。

#### 【結果】

##### 生化学分析

食餌の摂取量は3群間で差がなかったが、対照群と比較してMCD 群では体重が有意に減少し、MCD+YHK群もまた、MCDのみを摂取した群と比較して体重が有意に減少した（表1）。MCD+YHK群ではMCD群と比較して内臓脂肪の顕著な減少が認められ（図1）、AST、ALT、コレステロール、トリグリセリドの各血清濃度が、MCDのみを摂取した群と比べて有意に低下した(表1)。

### 組織病理学的分析

図2は、4週間、MCD食に加え溶媒（MCD群）もしくはYHK溶液(MCD+YHK群)を投与したob/obマウスから採取した肝組織の顕微鏡写真である。MCD群では、大空胞性および微小空胞性の中等度のびまん性脂肪変性、肝細胞のバルーニング、びまん性炎症性浸潤が認められた(図.2A)。MCD+YHK群では、肝脂肪変性は認められず、軽度のバルーニングや最小限の炎症のみにとどまった(図. 2B)。

### RT-qPCRによる遺伝子発現

対照群と比較するとMCD群およびMCD+ YHK群においてPPAR-α mRNA含量の増加が有意に認められた。MCDのみを与えた群と比較するとYHKを投与した群ではPPAR-α mRNA含量が有意に増加した(図.3A)。図.3Bにある通り、MCD群と対照群を比べるとPPAR-γ mRNA含量に相対的な変化は認められなかったが、MCD群と比較してMCD + YHK 群のPPAR-γ mRNA含量は統計的に有意な減少が認められた。対照群と比べてMCD群のMTP mRNA含量には有意の変化は認められなかったが、MCD + YHK群のMTP mRNA含量はMCD群や対照群と比べて統計的に有意の増加が認められた(図.3C)。

表 1 メチオニン/コリン欠乏食に加えYHKを投与した群(MCD + YHK) または非投与群（MCD）におけるob/ob マウスの 血清アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)値、血清アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)値、血清トリグリセリド値、血清コレステロール値、体重の変化

| グループ     | N | AST (U/L)       | ALT (U/L)       | トリグリセリド (mg/dl) | コレステロール (mg/dl) | 体重の変化 (%) |
|----------|---|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------|
| 対照群      | 5 | 146 ± 63        | 25 ± 2          | 75 ± 35         | 89 ± 31         | 13.6      |
| MCD群     | 5 | 623.7 ± 460.8** | 230.0 ± 165.2** | 93.0 ± 27.0**   | 105.0 ± 48.6**  | 4.6**     |
| MCD+YHK群 | 5 | 217.3 ± 97.9*   | 38.7 ± 9.1*     | 65.7 ± 25.5*    | 80.0 ± 15.1*    | -9.6*     |

注. データは平均 ± SDとして表示。 基準値: AST, 10–34 U/L; ALT, 10–44 U/L; トリグリセリドおよびコレステロール, 45–89 mg/dl.

\*P < 0.05 対 MCD 群;\*\*P < 0.05 対対照群。

### 【考察】

著者らは本研究において、YHK (漢方薬)の投与によりMCD食を与えたob/ob マウスの脂肪性肝炎が縮退し、実験誘発性NASHにおいてPPAR-α、PPAR-γ、MTPの RNA発現調整がYHKの保護効果に関与し、肝細胞への脂肪蓄積を抑制している可能性があることを示した。ob/ob マウスは自然に脂肪肝を発症しているが、より重大な損傷の発生には、代謝上にいわゆる「第二のヒット」が加わらなければならない。MCDモデルにおいては、脂質過酸化およびミトコンドリアにおける

ROS産生の増大に伴ってミトコンドリアの機能不全が起きている[30–34]。著者らはこれまで、YHKの抗酸化作用がROSおよび脂質過酸化の細胞傷害性を抑制し、ミトコンドリアの損傷を防止し、結果的に、MCD食を与えられた被験動物のNASH発症を抑えるのではないかと考えてきた[25]。マウスにおける脂肪性肝炎発症は肝脂質ターンオーバーの経路の活性化に負うところが大きい。げっ歯類の場合、こうした経路は主としてPPAR、CPT1、ChREBP、SREBP1、MTPなどの一部遺伝子によって調節されている[35]。本研究においては、YHK投与ob/obマウスとYHK非投与ob/obマウスにおけるPPAR- $\alpha$ 、PPAR- $\gamma$ 、MTPの肝でのmRNA発現を比較することによって、MCD食によって実験的に誘発したNASHにおけるYHKの保護効果についてさらなる調査を行った。YHKを投与したマウスでは、PPAR- $\alpha$  およびその目的遺伝子であるMTPのmRNA含量が増加し、PPAR- $\gamma$  mRNAのダウンレギュレーションが認められた。

ob/ob マウスなど肝脂肪が蓄積しやすい素因をもつ場合のPPAR- $\alpha$ の発現増加は、肝脂質ターンオーバーにおけるPPAR- $\alpha$ の役割、特にミトコンドリアにおける $\beta$ -酸化に関与する一部遺伝子のアップレギュレーションがその原因とされている[36]。本研究において（対照群の）ob/obマウスと比較してMCD群のob/obマウスにおいてPPAR- $\alpha$  mRNA含量のアップレギュレーションが有意に認められたのは、おそらく、メチオニン/コリン欠乏食を摂取した結果、ホスファチジルコリン欠乏が起き、肝細胞へのトリグリセリド沈着が亢進したことによるものとみられる[37]。YHKの投与はPPAR- $\alpha$  mRNAのさらなるアップレギュレーションを誘発した。このことは、YHKには抗酸化作用に加え、脂質の過剰負荷から保護することによってNASHの発症を抑制する可能性があることを示唆している。Ipら[38]は、アゴニストによるPPAR- $\alpha$ の活性化で肝の脂肪酸処理が促され、最終的に肝の脂質過酸化基質が枯渇して肝臓のグリセリド含量が減少することをMCD食摂取マウスにおいて示した。本研究においてはPPAR- $\alpha$ の活性化については評価をおこなわなかった。また、発現レベルとPPARの活性とは必ずしも一致するものではないが、YHK投与後にPPAR- $\alpha$ の目的遺伝子であるMTPのmRNA発現が増加[39]していることは、PPAR- $\alpha$  mRNAの増加が結果的に機能的意義をもたらすことを示している。

図. 1 4週間にわたりメチオニン/コリン欠乏（MCD）食に加え溶媒を投与したob/obマウス（A）とMCDに加えYHKを投与したob/obマウス（B）。内臓脂肪の減少が顕著に認められる。

図. 2 (A) メチオニン/コリン欠乏（MCD）食を与えたob/obマウスの肝組織学的特徴: 中等度のびまん性の大空胞性および微小空胞性の脂肪変性、肝細胞バルーニング、びまん性炎症性浸潤。(B) MCDに加え養生片仔廣(MCD+YHK)を投与したob/obマウスの肝組織学的特徴: 肝の脂肪変性はなく、軽度のバルーニングと最小限の炎症のみ。

最近の研究では、ob/obマウスやハムスターにおいてアポリポ蛋白Bに脂質付加してトリグリセリドの多い超低比重リポ蛋白(VLDL)粒子とするMTPのmRNA存在量や活性が増加していることが確かめられている[40, 41]。Phillipsら[42]は、肥満ラットの肝臓でMTP mRNAが有意に増加し、MTP mRNAとMTP活性とのあいだに相関性のあることを示した。こうしたMTPの発現増加はYHKの保護効果に関与し、アポリポ蛋白Bの脂質付加を促してトリグリセリドを多く含むVLDL粒子とし、結果的に肝のVLDL分泌を促すことが考えられる。しかし、VLDLの分泌増加にもかかわらず、YHK投与後、血清トリグリセリド濃度は有意に低下した。YHK投与マウスは有意の体重減少を示しており、脂質プロフィールに及ぼす体重変化のプラス効果がMTPの活性亢進に比べてはるかに

優勢だった可能性がある。MCD食摂取後にPPAR- $\alpha$  およびMTPのmRNA含量が一致しなくなったのは、ob/obマウスにおけるMPTの発現がすでに極めて高かったためとみることもできるが、(MPTの)発現レベルとPPAR- $\alpha$  活性とが一致しない可能性も否定はできない。

Fig. 3 メチオニン/コリン欠乏 (MCD) 食に加えYHKを投与した場合(MCD + YHK群) と投与しなかった場合 (MCD群) のPPAR- $\alpha$  (A)、 PPAR- $\gamma$  (B)、 MTP (C)の肝でのmRNA発現への影響 PPAR- $\gamma$ に関しては、肝におけるその過剰発現がNAFLDの発症と密接に関係し[7, 43]、種々の脂肪産生遺伝子や脂質生成遺伝子を刺激することによって肝細胞への脂質蓄積に大きな役割を果たしていることが一部の研究によって明らかになっている[8–10, 44]。ob/obマウスにおいては肝でPPAR- $\gamma$  mRNAの顕著なアップレギュレーションが認められることが知られている[36]が、本研究においては、ob/obマウスと比較してMCD食を与えたob/obマウスにおいてはPPAR- $\gamma$  mRNA含量に相対的变化は認められなかった。YHK投与後に肝でのPPAR- $\gamma$ の存在量が有意に減少したことは、YHKの保護効果の根底にあるもう一つのメカニズムが新規の脂肪合成を減退させることである可能性を示唆している。

YHKに含まれる一部の植物由来成分が炭水化物や脂質の代謝に及ぼす影響はよく知られており[45–49]、ことにYHK投与に伴い体重や内臓脂肪が減少していることを考えると、肝臓の代謝を間接的に改善させる肝外作用が起きている可能性も否定はできない。既発表論文を基にすると、幾つかの点においてYHKの成分は有効と考えられる。たとえば、田七[45, 46]や杜仲由来成分[47, 48]は血糖降下作用が、また、ステロイド配糖体などの黄精由来成分は骨格筋においてインスリン感受性を高めることが知られている[49]。甘草 由来成分に関しては、最大の有効成分であるグリシリジン酸 (甘草酸) にミネラルコルチコイド活性、グルココルチコイド活性、抗アンドロゲン活性、エストロゲン活性がある[50]が、もっとも関連のある特性は、カルベノキソロンによる11 $\beta$ -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ阻害が介在しているとみられ、それが、肝臓のインスリン感受性を改善させるようだ[51]。しかしながら、YHK投与マウスの肝臓におけるPPAR- $\alpha$  およびPPAR- $\gamma$  のmRNA含量の変化は、インスリン感受性改善の結果ではないと著者らは考えている。なぜなら、仮にこれが正しいとするならば、肝細胞においてはインスリンがPPAR- $\gamma$  mRNA の発現を増加させ [52] PPAR- $\alpha$  mRNA発現を減少させることから考えて、PPAR mRNA 存在量の変化は観察されたものとは逆になっていなければならないはずだからである [53]。

最後に、実験誘発性NASHにおいては、PPAR- $\alpha$  およびPPAR- $\gamma$  のRNA発現の調節がYHKの保護効果に関与し、肝細胞への脂質蓄積を抑制している可能性がある。本研究においては、YHKの、特に内臓脂肪の減少にかかわる潜在的な肝外作用については調査をおこなっておらず、また、有効とみられる漢方に関する研究でよくあることだが、YHKの正式な成分分析がなされていないなど、いくつかの限界を内在している。各群間の食餌摂取量に差がなかったことから、NAFLD治療のための新規治療戦略開発のために、YHKが消費カロリーに及ぼすとみられる影響を評価し、その結果の臨床的意味について知見を示すためにはさらなる研究をおこなう必要がある。