

＜糖尿病発症モデルマウスを用いた食事療法時における ビタミンA・β-カロテン摂取の影響とその機序＞

研究年度 令和6年度

研究期間 令和6年度～令和6年度

研究代表者名 駿河 和仁

共同研究者名 なし

1. はじめに

長崎県は全国的に肥満の割合が高く、さらに肥満と関連するメタボリック症候群(糖・脂質代謝異常、高血圧)などの生活習慣病の罹患率も国内上位を占めており、健康寿命は男女とも全国平均を下回っている¹⁾。長崎県はこのような状況を脱却するために2023年より「長崎健康革命(健康長寿日本一の長崎県づくり)」の実施・推進を行っている。前述の生活習慣病を引き起こす健康課題の改善に向けて「運動、食事、禁煙、健診」の4つに焦点が当てられているが、特に「食事」面については、「野菜摂取の増加」と「減塩」対策が課題として挙げられている²⁾。最近の「国民健康・栄養調査(厚労省)³⁾」結果では、特に長崎県の野菜摂取量は全国で下位(2018年調査で男性43位、女性40位)を示しており、野菜に含まれる種々のビタミンやミネラル類、食物繊維の摂取不足が、肥満やそれに関連する生活習慣病発症にも幾分か関与している可能性が考えられる。野菜の中でも特に緑黄色野菜に多く含まれる抗酸化物質であるβ-カロテンは、摂取後必要に応じて体内でビタミンAに転換され、生体の正常な代謝機能の維持にも関与しているが、長崎県民の野菜摂取量が低いことと関連して、β-カロテンを含むビタミンA摂取量も1日必要量の60-70%程度しか満たしていないことから潜在的な不足状態であると考えられる(令和3年長崎県健康・栄養調査結果⁴⁾)。これまで研究代表者らや他の研究グループの研究において、ビタミンAが肥満の抑制作用を示すことやβ-カロテンが糖尿病や代謝異常関連脂肪性肝疾患(MAFLD)の発症、進展を抑制させること(予防効果)が報告されているが⁵⁻⁷⁾、同様の効果がこれらの疾患の改善過程においてもみられるかは明らかではない。本研究は、肥満および糖・脂質代謝異常発症後の食事療法時による改善過程において、ビタミンAやその前駆体であるβ-カロテン摂取による改善効果およびそのメカニズムを明らかにすることを目的とした。実験にはスクロースの長期間摂取により肥満および糖・脂質代謝異常を発症させたモデルマウスを用い、代謝異常発症後にスクロース摂取を中断した後の改善過程におけるビタミンAやβ-カロテン摂取の影響について検討した。

2. 実験方法

4週齢のC57/BL6N雄性マウス(36匹)を標準固形飼料(CE-2)にて1週間馴化後6群(各群6匹)に分け、①コントロール食群(C群)は15週齢までCE-2飼料および蒸留水を自由摂取させた。他の5群は14週齢までCE-2飼料および30%スクロース溶液を自由摂取させた(肥満誘導期)。その後、15週齢から23週齢までC群はAIN93M食および蒸留水を自由摂取させ、他の5群は、②肥満非改善群(S群)にAIN93-M食および30%スクロース溶液を、③～⑥の各群(肥満改善食群)にはビタミンA含量の異なるAIN-93M食(③ビタミンA欠乏食群:AD、④ビタミンA基準食群:AN、⑤ビ

タミン A10 倍添加群 : AE)、および⑥β-カロテン添加食群 : BC) および蒸留水を自由摂取させた(飼育の概要は図 1、食餌組成は表 1 に示す)。飼育期間終了 1 週間前(22 週齢)に、腹腔内グルコース負荷試験(ipGTT)を実施し、血糖値の変動を測定した。全飼育終了後に各群のマウスを断頭・屠殺後、血清および主要組織(空腸、肝臓、脂肪組織など)を採取し、糖代謝指標(血清グルコース濃度、血清インスリン濃度)、脂質代謝指標(血清および肝臓のトリグリセリド、総コレステロール、遊離脂肪酸)および肝臓の総ビタミン A 量の測定を行った。さらに、肝臓の組織切片の評価による肝障害(脂肪滴の蓄積)の程度についてはヘマトキシリン-エオジン(HE)染色により評価を行った。

実験結果は、肥満誘導期は water 群と 30% sucrose 群の 2 群間で student's t-test にて比較し、肥満改善期のデータは、一元配置分散分析後、Dunnnett の多群解析により S 群に対する統計的有意差($p<0.05$)を検定した。なお、C 群は reference 群とし、統計解析からは除いた。

本研究は、長崎県立大学動物実験委員会にて承認審査(R06-07)を受け、「長崎県立大学動物実験指針」に準じ、飼育(午前 8 時から午後 8 時までを明期とし、室温 23℃、湿度 50%の環境下)を行った。

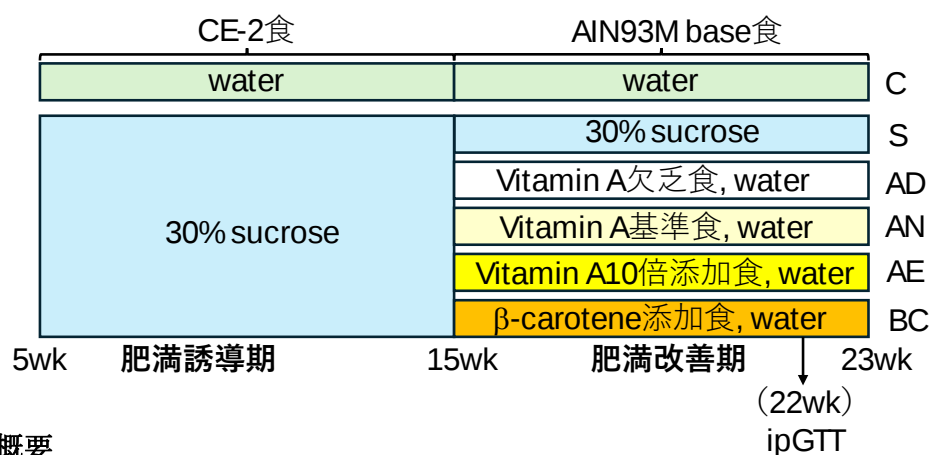


図 1 飼育概要

表 1 食餌組成

Ingredients	C, S, AN群	AD群	AE群	BC群
		g/kg		
α-コーンスターチ	155	155	155	155
β-コーンスターチ	466	466	466	466
スクロース	100	100	100	100
ビタミンフリーカゼイン	140	140	140	140
セルロースパウダー	50	50	50	50
大豆油	40	40	40*	40**
AIN93ビタミン混合 (A-)	—	10	—	10
AIN93ビタミン混合 (A+)	10	—	10	—
AIN93M ミネラル混合	35	35	35	35
L-シスチン	1.8	1.8	1.8	1.8
重酒石酸コリン	2.5	2.5	2.5	2.5
第三ブチルヒドロキノン	0.008	0.008	0.008	0.008

* : 0.012 g レチニルアセテート / 40 g oil

** : 0.072 g β-カロテン / 40 g oil

AIN93ビタミン混合 (A-) : ビタミンA不含

AIN93ビタミン混合 (A+) : ビタミンA含

3. 実験結果および考察

(1) 肥満誘導期の体重変化(5～14週齢)およびグルコース負荷試験(14週齢)

肥満誘導期のマウス体重は、スクロース摂取開始から1週間後の6週齢以降から水摂取群に比べ有意に高く推移し、9週間の体重増加率は水摂取群が35.2%、スクロース摂取群が71.9%であった(図2)。14週齢時のグルコース負荷試験(ipGTT)時の血糖値は、負荷前の0分時(空腹時)では、水摂取群に比べスクロース摂取群で有意に低値を示したが、グルコース負荷120分後では水摂取群に比べスクロース摂取群の方が有意に高値を示した(図3左)。その結果スクロース負荷後120分までに血糖上昇曲線化面積(AUC)値は、水摂取群に比べスクロース摂取群の方が有意に高値を示しており(図3右)、スクロース摂取群では肥満に伴う耐糖能異常が発症しているものと考えられた。

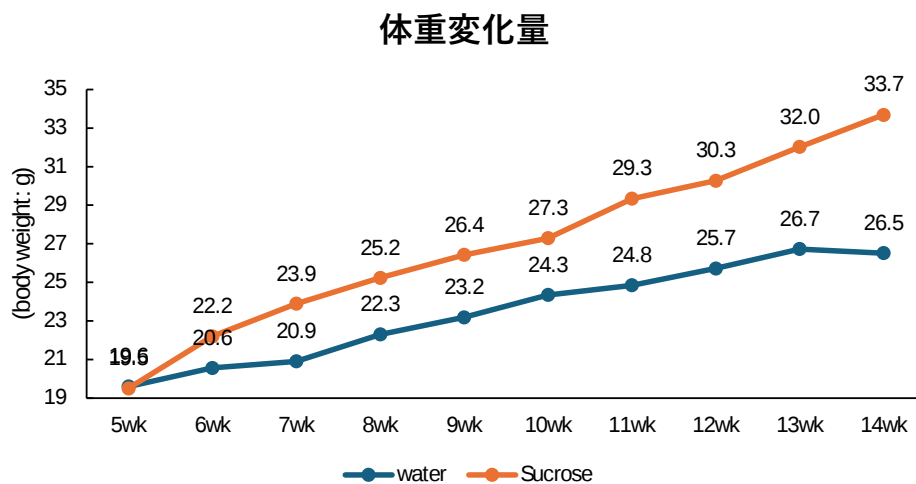


図2 肥満誘導期(5～14週齢)の体重変化

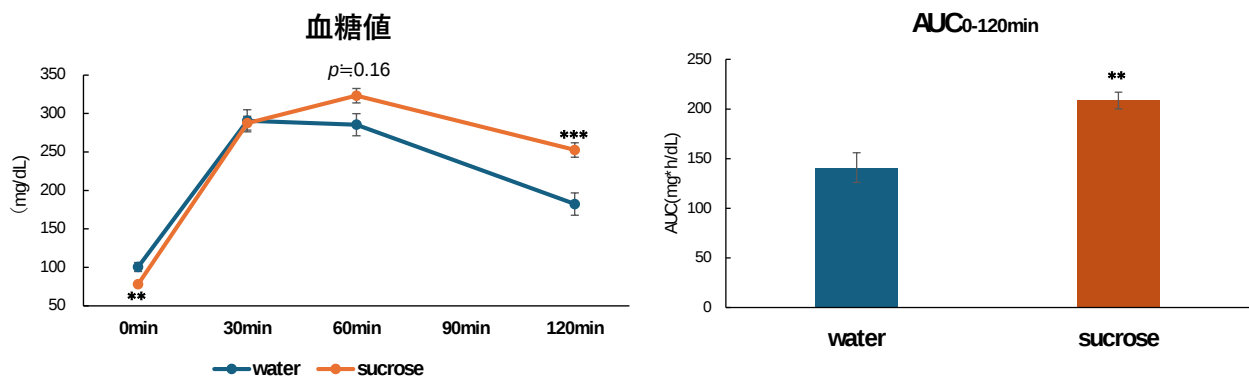


図3 肥満誘導期(14週齢時)の腹腔内グルコース経口負荷後の血糖値の変動および血糖値上昇曲線下面積(AUC)

、* ; water 群に対し sucrose 群で有意差あり(それぞれ $p < 0.01$, $p < 0.001$; student's t-test)。

(2) 肥満改善期の食餌摂取量、体重変化、組織重量および肝臓総ビタミンA量（表2、図4）

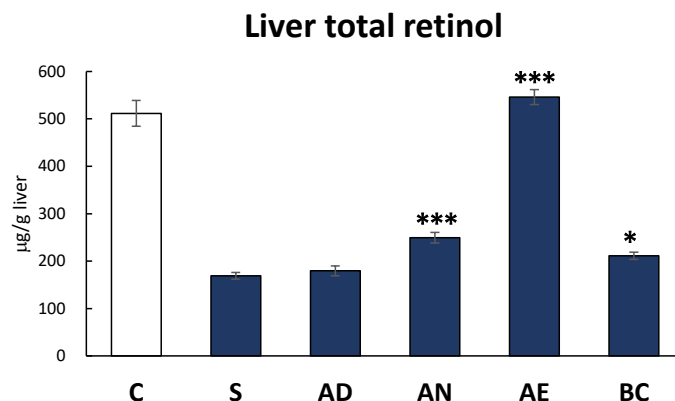
肥満改善群(AD、AN、AE および BC 群)のマウスは15週齢からスクロース摂取を中止し水摂取に切り替えた結果、食餌総摂取量はS群に比べ肥満改善群で有意に高値を示したが(表2)、S群では継続してスクロース溶液を摂取していることからその分のエネルギー摂取量が影響しているものと考えられる。15週から23週齢時までの体重変化量は、AE群で有意($p<0.01$)な減少が見られ、ANおよびBC群でも減少する傾向(それぞれ $p=0.057$ 、 $p=0.063$)が見られた(表2)。また、スクロース摂取継続群のS群と各群間と体重変化量の比較では、AD群では有意な差は見られなかったが、AN、AEおよびBC群では有意に低値を示した(表2)。さらに、内臓脂肪組織(副睾丸、腎周囲、腸間膜脂肪組織の合計)重量およびその体重比率はS群と肥満改善群(AD、AN、AE および BC 群)間では有意な差は見られなかったが、AN、AE および BC 群ではS群に比べ低い値を示した(表2)。生体内のビタミンA貯蔵量の指標である肝臓の総レチノール量は、S群に比べAD群では差は見られなかったが、AN、AE、BC群ではいずれもS群に比べ有意に高値を示し、食餌中のレチノール量や β -カロテン量と対応していた(図4)。これらの結果から、スクロース摂取による肥満発症は、スクロースの摂取の中断により減量効果が見られたが、その影響はビタミンAや β -カロテン摂取の有無による影響があるものと考えられた。

表2 食餌摂取量、体重、肝臓および内臓脂肪組織重量

	C (reference)	S	AD	AN	AE	BC
15週齢時体重 (g)	27.39 $\pm$ 0.24	35.78 $\pm$ 1.52	35.92 $\pm$ 0.92	35.88 $\pm$ 0.99	35.52 $\pm$ 0.90	35.67 $\pm$ 0.89
23週齢時体重 (g)	32.86 $\pm$ 0.68	36.88 $\pm$ 1.07	35.08 $\pm$ 1.07	33.40 $\pm$ 1.87	33.57 $\pm$ 0.94 ^{##}	34.13 $\pm$ 0.76
体重変化量 (g)	5.57 $\pm$ 0.50	1.10 $\pm$ 0.74	-0.83 $\pm$ 0.53	-2.48 $\pm$ 1.01 ^{**}	-1.95 $\pm$ 0.44 [*]	-1.53 $\pm$ 0.64 [*]
総摂取量 (g)	198.4 $\pm$ 15.4	112.3 $\pm$ 2.4	192.4 $\pm$ 6.3 ^{***}	202.2 $\pm$ 6.0 ^{***}	199.5 $\pm$ 7.8 ^{***}	194.2 $\pm$ 4.6 ^{***}
肝臓重量 (g)	31.5 $\pm$ 0.7	35.3 $\pm$ 1.1	32.2 $\pm$ 1.8	33.6 $\pm$ 1.0	32.1 $\pm$ 0.8	33.2 $\pm$ 0.6
肝臓相対重量 (%体重)	3.44 $\pm$ 0.13	3.78 $\pm$ 0.31	3.74 $\pm$ 0.07	3.78 $\pm$ 0.15	3.86 $\pm$ 0.08	3.75 $\pm$ 0.08
内臓脂肪合計重量 (g)	2.21 $\pm$ 0.22	3.03 $\pm$ 0.29	2.70 $\pm$ 0.18	2.27 $\pm$ 0.38	2.39 $\pm$ 0.20	2.55 $\pm$ 0.18
内臓脂肪合計相対重量 (%体重)	6.95 $\pm$ 0.57	8.48 $\pm$ 0.60	8.00 $\pm$ 0.31	6.81 $\pm$ 0.90	7.41 $\pm$ 0.47	7.65 $\pm$ 0.40

^{*}, ^{**}, ^{***} : S群に対し有意差あり (それぞれ $p<0.05$, 0.01 , 0.001 ; Dunnett 多群検定)

^{##}:15週齢時に比べ有意差あり ($p<0.01$; student's t-test)

**図4 肝臓総レチノール量**

^{*}, ^{***} : S群に対し有意差あり (それぞれ $p<0.05$, 0.001 ; Dunnett 多群検定)

(3) 糖代謝異常への影響

23週齢時(解剖時)の空腹時の血清グルコース濃度、インスリン濃度およびインスリン抵抗性指数(HOMA-IR)はいずれもS群に比べ各肥満改善群(AD、AN、AE、BC群)の間では有意な差は見られなかったが、血清インスリン濃度およびHOMA-IRはAN、AEおよびBC群ではS群に比べ低い値を示した(図5)。この結果は、上述の内臓脂肪重量およびその体重比率の結果と類似していた。しかしながら、腹腔内グルコース負荷試験(ipGTT)の結果からはグルコース負荷後の血糖値上昇曲線下面積(AUC)にS群と各肥満改善群(AD、AN、AE、BC群)の間では差はほとんど見られなかった(図6)。これらの結果から、スクロース摂取に起因する糖代謝異常に対しては、スクロース摂取中断時のビタミンAや β -カロテン摂取による明確な改善効果は示さないものと考えられた。

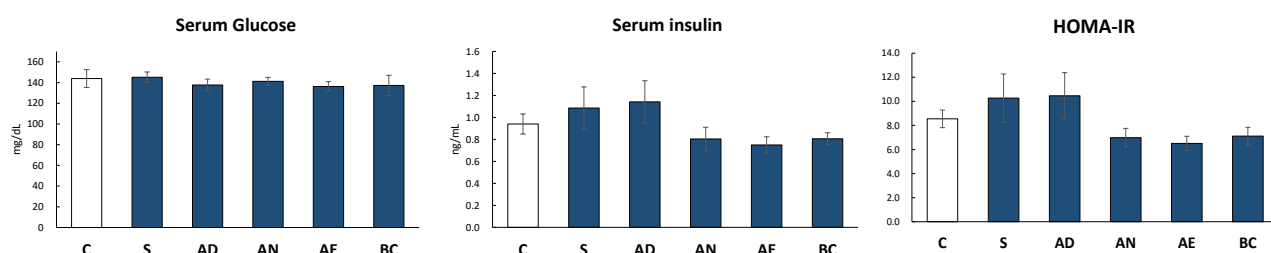


図5 空腹時の血清グルコース濃度、血清インスリン濃度およびインスリン抵抗性指数(HOMA-IR)

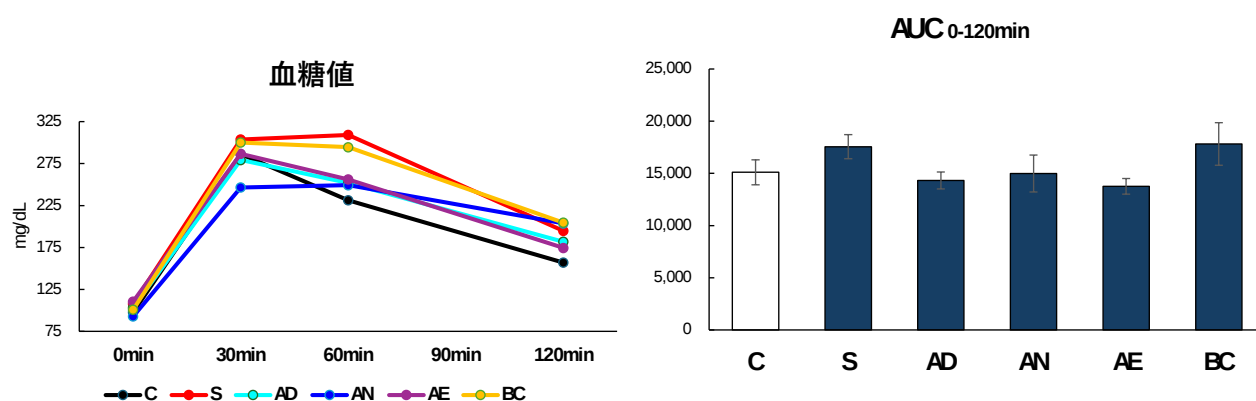


図6 22週齢時の腹腔内グルコース経口負荷後の血糖値の変動および血糖値上昇曲線下面積(AUC)

(4) 脂質代謝異常への影響

23週齢時(解剖時)に摘出した肝臓組織切片のヘマトキシリン・エオジン(HE)染色の結果、S群では明確な脂肪滴が多く観察されたが、肥満改善群(AD、AN、AE、BC群)では殆ど脂肪滴は見られなかった(図7)。空腹時の血清トリグリセリド濃度および遊離脂肪酸濃度はいずれもS群に比べ各肥満改善群(AD、AN、AE、BC群)の間では有意な差は見られなかったが、血清総コレステロール濃度はS群に比べAE群で有意に低値($p < 0.05$)を示し、AD群でも低い傾向($p = 0.076$)を示した(図8上)。肝臓のトリグリセリド量は、S群に対しAN群およびAE群で有意に低値を示し、肝臓総コ

レステロール量および遊離脂肪酸量はいずれもS群に対しAN群、AE群およびBC群)で有意に低値を示し、AD群でも低い傾向を示した(図8下)。これらの結果から、スクロース摂取による肝臓の脂質蓄積は、摂取中断後は顕著に改善されており、特にその効果はAN群、AE群およびBC群で大きいことからビタミンAや β -カロテン摂取の有無による影響があるものと考えられた。

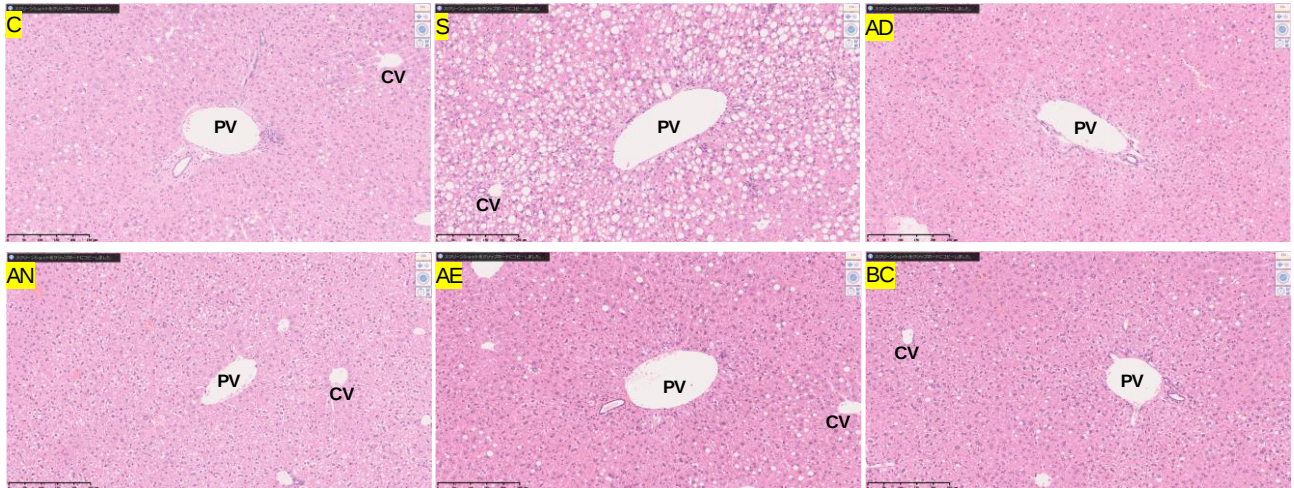


図7 肝臓のヘマトキシリン・エオジン(HF)染色像

CV ; 中心静脈、PV ; 門脈

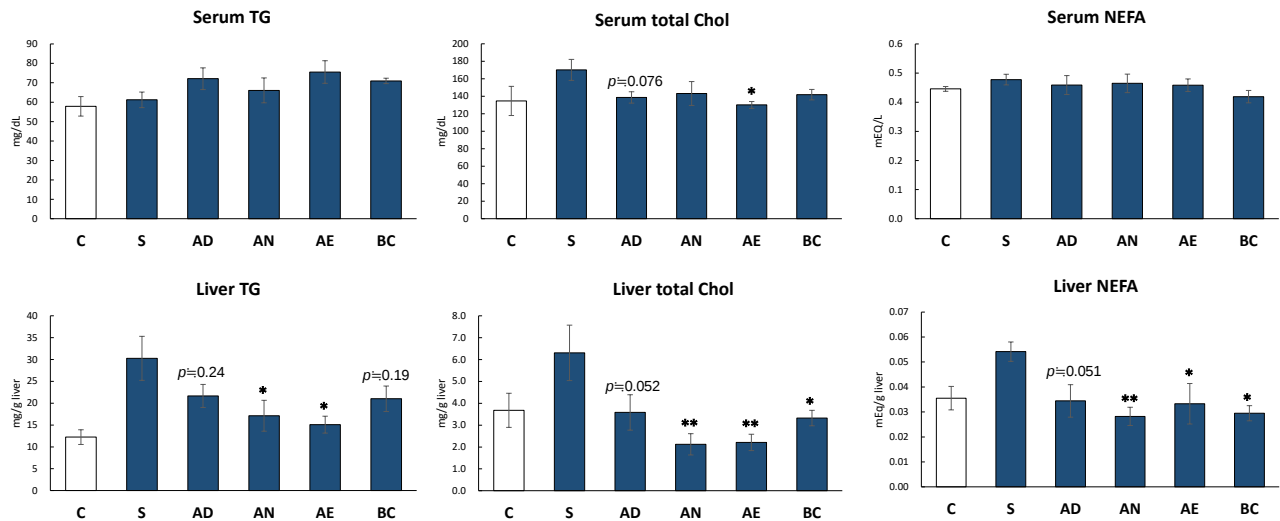


図8 血清および肝臓のトリグリセリド(TG)、総コレステロール(total Chol)および遊離脂肪酸(NEFA)量

*,** : S群に対し有意差あり (それぞれ $p < 0.05$, 0.01 ; Dunnett 多群検定)

4. おわりに

本研究は長期のスクロース摂取により発症した肥満や糖・脂質代謝異常に対して、スクロース摂取中断後のこれらの疾患の改善に対するビタミンAや β -カロテンの摂取による影響について検討し

た。その結果、ビタミン A および β -カロテンの摂取は肥満(減量)や脂質代謝異常に対して改善促進効果があることが明らかとなったが、糖代謝異常の改善に対しては大きな改善促進効果は示さなかった。当初の本研究計画では、糖・脂質代謝関連遺伝子の発現変動の解析も行う予定であったので、今後は特に肥満および脂質代謝異常改善におけるメカニズムの面からさらに検討を行い本研究を総括していく。

5. 引用文献

- 1) 「健康寿命の令和 4 年値について」 厚生労働省
<https://www.mhlw.go.jp/content/10904750/001363069.pdf>
- 2) 「はじめる！長崎健康革命」 長崎県
<https://www.pref.nagasaki.jp/object/kenkaranooshirase/oshirase/556360.html>
- 3) 平成 28 年国民健康・栄養調査「第 4 部 都道府県別結果、野菜摂取量の平均値（20 歳以上、性・都道府県別、年齢調整値）」 厚生労働省
<https://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/eiyoudl/h28-houkoku-07.pdf>
- 4) 令和 3 年度長崎県健康・栄養調査結果報告書 長崎県福祉保健部
<https://www.pref.nagasaki.jp/shared/uploads/2023/12/1703574757.pdf>
- 5) 山口範晃、駿河和仁。ビタミン A 過剰摂取は高脂肪摂食マウスの体脂肪を減少させ過剰症を伴う。第 69 回日本ビタミン学会、横浜市、平成 29 年 6 月。
- 6) Rhee EJ, Plutzky J. (2012) Retinoid metabolism and diabetes mellitus. *Diabetes Metab J*. 36(3):167-180.
- 7) Jeyakumar SM, Vajreswari A. (2015) Vitamin A as a key regulator of obesity & its associated disorders: Evidences from an obese rat model. *Indian J Med Res*. 141(3):275-284.