

<肥満や脂質・糖質代謝異常の改善に対するビタミンA 栄養状態の影響とその作用機序に関する研究>

研究年度 令和5年度

研究期間 令和5年度～令和5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

長崎県は肥満の割合が高く、さらに肥満とも関連する糖代謝異常、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しめており、健康寿命は男女とも全国平均を下回っている。最近の「国民健康・栄養調査(厚労省)」結果¹⁾では、特に長崎県の野菜摂取量は全国で下位(平成28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関与している。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%程度しか満たしていない(令和3年長崎県健康・栄養調査結果)²⁾。研究代表者らや他の研究グループが行った実験動物を用いた研究において、β-カロテンの摂取が糖尿病や非アルコール性肝疾患(NAFLD)の障害の進展を抑制させること(予防効果)やビタミンAが肥満の抑制作用を示すことが報告されている^{3~7)}。これらの結果はβ-カロテンやビタミンAの摂取による肥満、糖尿病やNAFLDの発症予防効果であるが、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。本研究では、食習慣の悪化と強く関連する肥満、糖質および脂質代謝異常を対象として、食餌因子(本研究では高脂肪食)によりこれらの各種疾患を同時に発症させたモデル動物(マウス)を用い、疾患発症後に通常食(改善食)に切り替えた後の改善過程においてビタミンA栄養状態がどのように影響するか、さらにそのメカニズムについて解明することを目的とした。13週間の高脂肪食摂取によりメタボリック症候群状態にしたマウスに対して、ビタミンAまたはβ-カロテン含量の異なる通常食(低脂肪食)を約6週間給餌し、ビタミンAやβ-カロテン含有量の違いによるメタボリック症候群(肥満、糖・脂質代謝異常)の改善効果について検討した。

2. 実験方法

5週齢C57BL/6N系雄性マウス43匹を2群に分け、1群(7匹)に標準固形飼料(CE-2食、日本クレア株式会社)を、もう1群(36匹)に高脂肪食(HFD2食、日本クレア株式会社)をそれぞれ13週間(17週齢時まで)自由摂取させた。その後18週齢時よりHFD2食摂取群のマウスを6群(各群6匹)に分け、それぞれ表1に示す各種食餌を6週間(23週齢時まで)自由摂取させ、CE-2食摂取群のマウスは継続して同じ固形飼料を自由摂取させた。22週齢時には、一晚絶食後のマウスに10%グルコース溶液の腹腔内投与(ipGTT; 1gグルコース/kg体重)を行い、尾静脈より経時的に採血し、血

糖値をグルコメーター(メディセーフフィット、テルモ株式会社)により測定した。全飼育終了後にマウスを断頭にて屠殺し、血液(血清)、肝臓、小腸、内臓脂肪組織(腸間膜、腎周囲、副睾丸の各部位)等を採取した。血清や肝臓の糖質、脂質代謝に関わる各種生化学指標(血清グルコース濃度、血清インスリン濃度、血清および肝臓のトリグリセリド、総コレステロール量)については、各種測定キットを用いて解析した。肝臓および副睾丸脂肪組織の一部はホルマリン固定および組織切片作成後にヘマトキシリン-エオジン(HE)染色を行った(モルフォテクノロジー株式会社に依頼)。

実験結果は、一元配置分散分析の後、Dunnett の多重解析法により統計的有意差 ($p < 0.05$) を検定した。

本研究は、長崎県立大学動物実験委員会にて承認審査(R05-07)を受け、「長崎県立大学動物実験指針」に順じ飼育(午前8時から午後8時を明期とし、室温23℃、湿度50%の環境下)を行った。

表1 食餌組成

Ingredients	HF	LF				
		LA	NA	HA	50B	500B
		g/kg				
ミルクカゼイン	261	192	192	192	192	192
L-シスチン	3	3	3	3	3	3
β-コーンスターチ	156.1	432.5	432.5	432.5	432.5	432.5
α-コーンスターチ	72.4	132	132	132	132	132
スクロース	100	100	100	100	100	100
大豆油	70	43	43	43	43	43
ラード	240	-	-	-	-	-
セルロースパウダー	50	50	50	50	50	50
AIN93Mミネラル混合	35	35	35	35	35	35
AIN93ビタミン混合(A+)	10	-	-	-	-	-
AIN93ビタミン混合(A-)	-	10	10	10	10	10
重酒石酸コリン	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
第三ブチルヒドロキノン	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014
レチニルアセテート	-	0.00005	0.0008	0.008	-	-
Beta-carotene	-	-	-	-	0.05	0.5
total energy(kcal)	5160			3825		
protein energy(kcal)	1056			780		
fat energy(kcal)	2790			387		
carbohydrate energy(kcal)	1314			2658		

HF : high-fat、LF : low-fat、LA : low-dose vitamin A、NA : normal-dose vitamin A、HA : high-dose vitamin A、50B : 50-fold excess beta-carotene、500B : 500-fold excess beta-carotene

3. 実験結果および考察

(1) 食餌摂取量、体重変化および組織重量(表2)

5週齢時より13週間高脂肪食(HFD2食)を摂取させたマウス(19週齢時HF, LA, NA, HA, 50B, 500B群)はCE-2食を摂取させたマウスより有意($p < 0.001$)に体重が高かった。その後6週間低脂肪(LF)食をベースとする食餌を摂取した群(LA, NA, HA, 50B, 500B群)では、高脂肪食摂取群(HF)に比べHA群を除き食餌総摂取エネルギー量に有意差はみられなかったが、いずれも19週齢時に比べ有意な体重減少がみられた。しかしながら、体重減少量に対する食餌中のビタミンA

やβ-カロテン含量の違いによる明確な差はみられなかった。

組織重量では、肝臓総重量は HF 群に比べ LA 群、50B 群および 500B 群では有意な差はみられない一方で、NA 群および HA 群では有意($p<0.05$)に低値を示したが、体重当たりの肝臓の相対重量は HF 群と他の群間で有意差はみられなかった。内臓脂肪組織重量では、3 か所(腸間膜、腎周囲、副睾丸)の脂肪組織の中で腸間膜および腎周囲で HF 群に比べ他の群で有意($p<0.01$ または 0.001)に低値またはその傾向を示したが、副睾丸脂肪組織重量は CE-2 群を除き HF 群と他の群との有意な差はみられず、脂肪組織の部位による差がみられた。一方、体重当たりの脂肪組織相対重量は、CE-2 群を除き概ね HF 群と他の群との有意な差はみられなかった。また、これらの組織重量についても食餌中のビタミン A やβ-カロテン含量の違いによる明確な差はみられなかった。

これらの結果から、HF 摂取群に比べ LF 食ベースの食事群では有意な体重減少を示すことが確認され、その要因として腸間膜および腎周囲内臓脂肪組織重量や肝臓重量などの減少が一部関連していると考えられたが、これらの減少量は体重減少の割合に比べ小さいことから、体脂肪重量や肝臓重量の減少だけでは説明ができない。さらに、体重当たりの組織相対重量についても概ね HF 群と LF 食ベース群間で明確な差がないことから、LF 食ベース群の体重減少は主要な体組成器官である骨格筋の重量の減少も含めたものではないかと考えられる。

表2 体重変化量、食餌摂取量、組織重量

	CE-2	HF	LF				
			LA	NA	HA	50B	500B
19週齢時初体重 (g)	28.3±0.77***	43.2±1.27	43.6±1.00	43.3±1.14	43.3±1.11	43.5±0.99	43.4±1.20
25週齢時終体重 (g)	31.01±0.70***##	48.00±0.84#	42.08±0.96***##	40.17±1.26***##	38.97±0.91***#	41.60±0.88***##	41.38±1.13***##
体重変化量 (g)	2.74±0.50	4.83±0.66	-1.50±0.34***	-3.05±0.43***	-4.37±1.53***	-1.92±0.42***	-1.97±0.33***
総摂取量 (kcal)	-	625.4±17.7	591.6±15.9	584.6±13.7	563.9±7.6*	593.0±11.5	599.3±9.5
食餌効率 (体重増加量g/100kcal)	-	0.76±0.11	-0.25±0.05***	-0.52±0.07***	-0.77±0.26***	-0.33±0.08***	-0.33±0.05***
肝臓重量 (g)	1.15±0.02***	2.06±0.11	1.62±0.11	1.50±0.15*	1.51±0.18*	1.58±0.16	1.73±0.18
肝臓相対重量 (%体重)	4.16±0.09	4.41±0.22	3.98±0.21	3.81±0.28	3.98±0.39	3.90±0.34	4.29±0.36
腸間膜脂肪組織重量 (g)	0.29±0.05***	0.97±0.05	0.69±0.05**	0.59±0.06***	0.63±0.06***	0.66±0.05**	0.66±0.06**
腸間膜脂肪組織相対重量 (%体重)	1.02±0.16***	2.07±0.11	1.69±0.10	1.50±0.11*	1.65±0.13	1.62±0.11	1.64±0.11
腎周囲脂肪組織重量 (g)	0.34±0.04***	1.58±0.11	1.18±0.07**	1.10±0.07***	1.04±0.07***	1.24±0.06**	1.13±0.08**
腎周囲脂肪組織相対重量 (%体重)	1.19±0.02***	3.38±0.23	2.93±0.16	2.82±0.08	2.74±0.14*	3.08±0.14	2.82±0.12*
副睾丸脂肪組織重量 (g)	0.73±0.09***	1.35±0.12	1.51±0.09	1.28±0.05	1.51±0.16	1.51±0.10	1.44±0.11
副睾丸脂肪組織相対重量 (%体重)	2.57±0.26	2.89±0.27	3.74±0.27	3.29±0.15	3.98±0.40	3.76±0.28	3.65±0.38
内臓脂肪組織総重量 (g)	1.36±0.17***	3.90±0.18	3.37±0.12	2.97±0.15**	3.17±0.27*	3.41±0.13	3.23±0.10*
内臓脂肪組織相対総重量 (%体重)	4.78±0.52***	8.35±0.38	8.35±0.32	7.62±0.18	8.36±0.61	8.46±0.35	8.11±0.29

, : HF 群に対し有意差(それぞれ $p<0.05$, 0.01 , 0.001 . Dunnett 多群検定)あり。

###,### : 各群の 19 週齢時と 25 週齢時の間で有意差(それぞれ $p<0.05$, 0.01 , 0.001 , Student's t-test)あり。

(2) 糖代謝指標

飼育終了時の空腹時血清グルコース濃度は、HF 群に比べ CE-2 群および NA 群で有意に低値($p<0.05$)を示し、LA および HA 群でも低い傾向(それぞれ $p=0.09$, 0.10)を示したが、50B および 500B 群では HF 群とほとんど差はみられなかった(図1)。一方、空腹時血清インスリン濃度は HF

群に比べCE-2群およびすべてのLFベース食群(LA, NA, HA, 50B, 500B群)で有意に低値($p < 0.01$ または 0.001)を示した(図1)。その結果、インスリン抵抗性指数(HOMA-IR)もHF群に比べすべてのLFベース食群で有意に低値($p < 0.01$ または 0.001)を示した(図1)。この結果から、継続的なHF食摂取により惹起されるインスリン抵抗性はLFベース食に切り替えることにより改善されることが示されたが、食餌中のビタミンAが不足する場合(LA群)や β -カロテン過剰摂取時(50B、500B群)はその効果が減弱する可能性が考えられた。

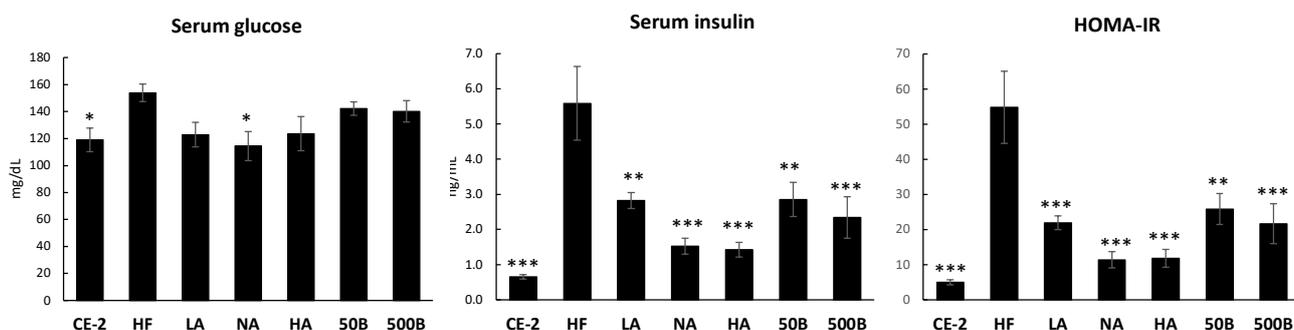


図1. 空腹時血清グルコース濃度、血清インスリン濃度およびインスリン抵抗性指数(HOMA-IR)
 , : HF群に対し有意差(それぞれ $p < 0.05$, 0.01 , 0.001 , Dunnett 多群検定)あり。
 HOMA-IR = 空腹時血清グルコース濃度(mg/dL) × 空腹時血清インスリン濃度(μ IU/mL) / 405

腹腔内へのグルコース溶液投与(ipGTT)後の血清グルコース濃度の経時変化(0, 30, 60, 120分後)を図2に示した。血清グルコース濃度はHF群に比べCE-2群およびすべてのLFベース食群(LA, NA, HA, 50B, 500B群)で概ね有意に低く推移しており、グルコース投与120分後までの血糖上昇曲線下面積(AUC_{0-120min})は、ビタミンAや β -カロテン含量の違いによる明確な差はみられなかったが、HF群に比べLA群、NA群および50B群で有意に低値($p < 0.05$ または 0.01)を示し、HA群および500B群でも低い傾向(それぞれ $p = 0.14$, 0.10)を示した。

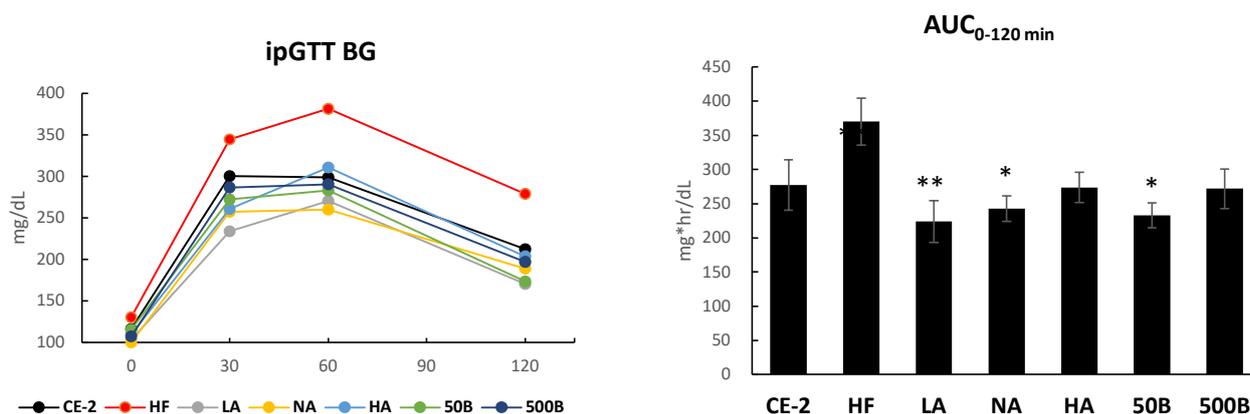


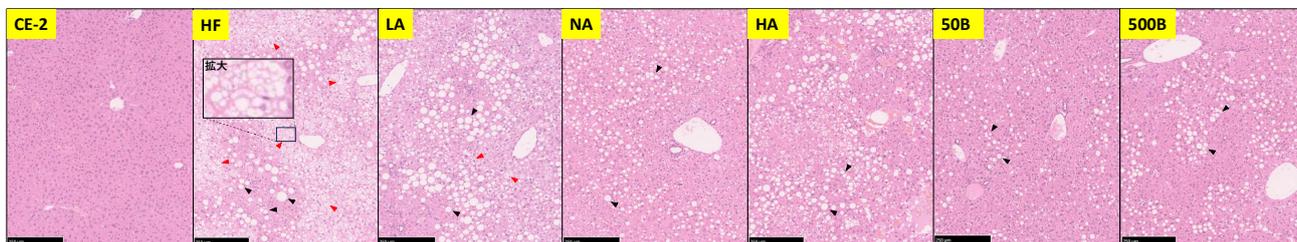
図2. 腹腔内グルコース投与試験(ipGTT)時の血清グルコース濃度(BG)の推移と血糖上昇曲線下面積(AUC)
 , : HF群に対し有意差(それぞれ $p < 0.05$, 0.01 , Dunnett 多群検定)あり。

(3) 脂質代謝指標

肝臓組織切片のHE染色像(図3-A)において、CE-2群では脂肪滴はみられなかったが、HF群で広範囲に小滴性の脂肪滴がみられ、大滴性の脂肪滴も散在していた。またLF食ベース群(LA, NA, HA, 50B, 500B群)の中でもLA群は大滴性の脂肪滴が主流で小滴性の脂肪滴も散在していたが、その他の群では大滴性の脂肪滴が散在しているものの、小滴性の脂肪滴は殆どみられなかった。特に小滴性脂肪滴の沈着は、非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)では組織学的にNASH(非アルコール性脂肪肝炎)への進展(肝細胞の風船様変性やマロニーデンク体)と関連することが近年報告されていることから⁸⁾、HF群はNASHへの進展がみられるものと考えられ、LFベース食群の中では小滴性脂肪滴沈着がみられたLA群もその傾向にあると考えられ、ビタミンA摂取量の不足はNASHの改善を抑制する可能性が示唆された。

副睾丸脂肪組織切片のHE染色像(図3-B)では、CE-2群に比べHF群の脂肪細胞サイズが明らかに肥大していたが、各LF食ベース群の脂肪細胞サイズにおいてもビタミンAやβ-カロテン含量の違いに関わらずHF群と差は殆どみられず、肥大化した脂肪細胞が残存していた。この結果は、前述した副睾丸脂肪組織重量がHF群に比べLF食ベース群においても減少はみられなかったこと一致している。一方で、腸間膜脂肪組織や腎周囲脂肪組織重量はHF群に比べLF食ベース群で低下していたことから、これらの脂肪組織ではLF食ベース群で脂肪細胞サイズの減少が起こっていたものと推察される。

A) 肝臓



B) 副睾丸脂肪組織

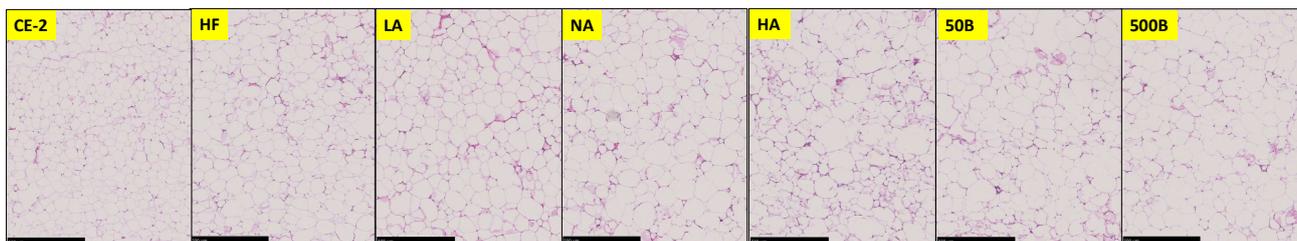


図3. 肝臓および副睾丸脂肪組織の各組織切片のヘマトキシリン・エオジン(HE)染色像
A)の▲は大滴性脂肪滴、▲は小滴性脂肪滴を示す。

空腹時の血清トリグリセリド濃度は、HF群に比べCE-2群は差がみられなかったが、LA群およびNA群では有意に高値($p < 0.05$ または 0.01)を示し、HA群、50B群および500B群でも高い傾向(それぞれ $p = 0.083$, 0.053 , 0.159)を示した(図4上)。一方、空腹時の血清総コレステロール濃度はHF群に比べCE-2群で有意に低値($p < 0.001$)を示していたが、各LF食ベース群(LA, NA, HA,

50B, 500B 群)との間には有意な差はみられなかった(図4上)。

肝臓のトリグリセリド量および総コレステロール量はいずれも HF 群に比べ CE-2 群で有意に低値(それぞれ $p<0.01$, 0.01)を示したが、各 LF 食ベース群(LA, NA, HA, 50B, 500B 群)との間には差はみられなかった(図4下)。

本研究で用いた LF 食は AIN-93 組成でげっ歯類実験動物の飼養に用いられる標準的なものであるが、Aguiar らは AIN-93 組成の食餌は C57BL/6J マウスにおいて高脂肪食摂取時と比べ脂質代謝指標(血清や肝臓のトリグリセリド量、総コレステロール量)がほぼ同等か、もしくは高い傾向があることを報告している⁹⁾。このことから、脂質代謝変動に対しては今回用いた AIN-93 組成の LF 食は適正なものでないものと考えられ、今後食餌組成の再検討を行う必要がある。

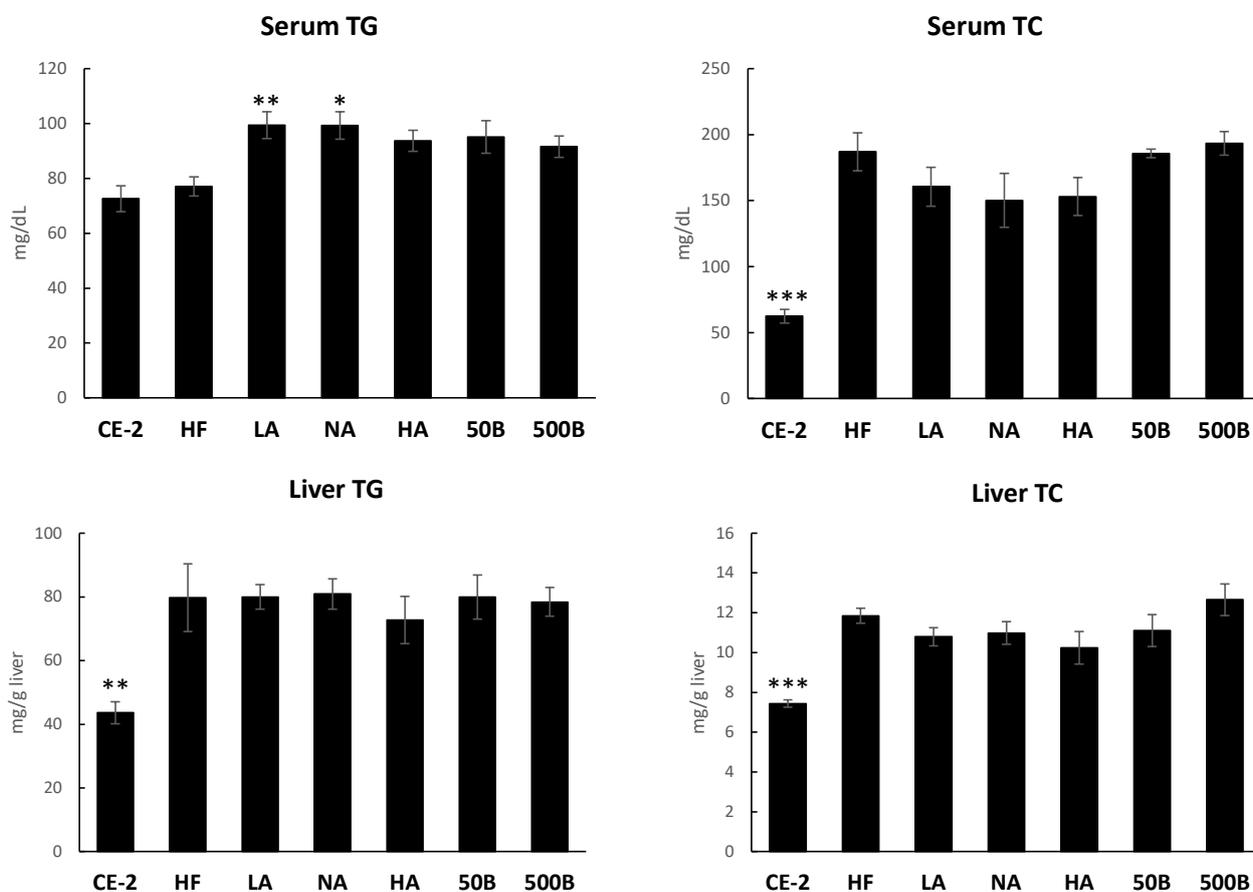


図4. 血清および肝臓のトリグリセリド量(TG)および総コレステロール量(TC)
 **,* : HF 群に対し有意差(それぞれ $p<0.05$, 0.01 , 0.001 , Dunnett 多群検定)あり。

4. おわりに

これまでの実験結果より、高脂肪食摂取による肥満発症後に低脂肪食を摂取させた群では、体重の減少や糖代謝異常の改善がみられ、特に食餌中のビタミンAが不足する場合やβ-カロテン過剰摂取時はそのインスリン抵抗性の改善効果が減弱する可能性が示された。一方、脂質代謝異常に対しては明確な改善効果はみられず、食餌中のビタミンAやβ-カロテン含有量の違いによる影響もみら

れなかった。本研究計画では、肝障害指標や糖・脂質代謝関連遺伝子の発現変動の解析なども今後行う予定であり、それらの結果も踏まえて本研究を総括していく。

5. 引用文献

- 1) 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>
- 2) 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>
- 3) 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.
- 4) Rhee EJ, Plutzky J. (2012) Retinoid metabolism and diabetes mellitus. *Diabetes Metab J.* 36(3):167-180.
- 5) Oliveros LB, Domeniconi MA, Vega VA, Gatica LV, Brigada AM, Gimenez MS. (2007) Vitamin A deficiency modifies lipid metabolism in rat liver. *Br J Nutr.* 97(2), 263-272.
- 6) Bonet LM, Ribot J, Plou A (2012) Lipid metabolism in mammalian tissues and its control by retinoic acid. *Biochim Biophys Acta.* 1821, 177-189.
- 7) 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。
- 8) Tandra S, Yeh MM, Brunt EM, Vuppalanchi R, Cummings OW, Ünalp-Arida A, Wilson LA, Chalasani N. (2011) Presence and significance of microvesicular steatosis in nonalcoholic fatty liver disease. *J Hepatol.* 55, 654-659.
- 9) Aguiar LM, Moura CS, Ballard CR, Roquette AR, Silva Maia JKD, Duarte GHB, Costa LBED, Torsoni AS, Amaya-Farfan J, Maróstica Junior MR, Cazarin CBB. (2022) Metabolic dysfunctions promoted by AIN-93G standard diet compared with three obesity-inducing diets in C57BL/6J mice. *Curr Res Physiol.* 23(5), 436-444.