

## 正常ラットにおけるフルクトース飲料摂取時のクエン酸併用投与の影響

林 あつみ\*, 関目 綾子\*\*

(平成 22 年 10 月 7 日受理)

### The Effect of Citric Acid on Normal Rats' Intake of Fructose Fluid

HAYASHI, Atsumi and SEKIME, Ayako

(Received on October 7, 2010)

キーワード：フルクトース，クエン酸，正常ラット

Key words: fructose, citric acid, wistar rat

#### 緒言

ごはんやパンおよび芋，かぼちゃなどの野菜類に含まれる炭水化物が多糖類であるのに対し，清涼飲料水や菓子類などの甘味の強い加工食品には異性化糖が多く使用されている．異性化糖は，ブドウ糖と果糖が1個ずつ結合している砂糖と異なり，単糖であるブドウ糖と果糖に分離しているため体内に吸収されやすい．ブドウ糖の大量摂取は血糖値の急激な上昇を招き，さらに果糖においてはブドウ糖とは体内での生理作用が異なるため，循環器系などへの好ましくない影響が指摘されている<sup>1)-3)</sup>．

甘味料として添加した糖の摂取量について世界保健機関(WHO)では，総エネルギー摂取量の10%を超えないように推奨している<sup>4)</sup>．しかし，日本人の食事摂取基準2010年版では，日本人において食事摂取基準で数値を算定できるほど十分な科学的根拠は得られていないとし，摂取制限は設けられていない<sup>5)</sup>．

前報<sup>6)</sup>において，高血圧自然発症ラットを用いてクエン酸併用投与を行い，フルクトース摂取により上昇した血糖，肝臓重量，腹腔内脂肪重量の有意な低下が示された．今回は正常ラットを用いて血圧および血清脂質に対する影響を調べた．また，クエン酸には骨密度減少抑制作用が示唆されている<sup>7)</sup>ため，大腿骨についても比較検討を行った．

#### 研究方法

##### 1. 実験動物および飼育方法

4週齢雄性Wistarラット17匹を東京実験動物株式会社より購入した．1週間の予備飼育後，5週齢時に，コントロール群5匹，フルクトース群6匹，フルクトース+クエン酸群6匹の3群に分けた．

飼料はすべての群についてCE2(日本クレア株式会社)を自由摂取とし，飲料水はコントロール群には水道水を，

フルクトース群には水道水中に10%になるようにフルクトース(和光純薬工業株式会社)を混合し，フルクトース+クエン酸群には10%フルクトース水道水にさらにクエン酸を7週齢までは0.5%，8週齢以降は1.0%になるように溶解したものを，それぞれ自由摂取させた．

ラットは個別ケージに入れ，室温 $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ ，湿度 $55\pm 5\%$ ，12時間明暗周期(明期：8時～20時)に保持した飼育室で飼育した．実験期間中，1日おきに摂食量，飲水量および体重を測定した．

##### 2. 血圧測定

血圧は，無麻酔下，非観血式自動血圧測定装置(ソフトロンBP-98A)を用いてTail cuff法により週1回測定を行った．

##### 3. 採血および解剖方法

実験期間終了の14週齢時に12時間以上絶食し，エーテル麻酔後，腹部大動脈より採血した．血液は遠心分離後，血清を分離した．臓器は摘出後，生理食塩水で洗浄し重量を測定し，測定まで $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した．

##### 4. 血液生化学検査

血清脂質については，総コレステロール測定にはコレステロールE-テストワコー(和光純薬工業株式会社)を，トリグリセリド，HDLコレステロールの測定には，乾式臨床化学自動分析装置SPOTCHEM<sup>TM</sup>EZ SP-4430を用いた．

GOT，GPT，グルコース，尿素窒素，総ビリルビン，総たんぱく質，アルブミン，カルシウムについては乾式臨床化学自動分析装置SPOTCHEM<sup>TM</sup>EZ SP-4430を用いて測定した．

血清中のアディポネクチンはELISA法の測定キット(マウス/ラットアディポネクチンELISAキット，大塚製薬株式会社)を用いることにより測定した．

##### 5. アンギオテンシン変換酵素(ACE)活性測定

血清および臓器について前報と<sup>6)</sup>同様にACE活性の測定を行った．

\* 栄養科 栄養学研究室

\*\* 栄養科 栄養生化学研究室

## 6. 大腿骨の測定

ラットの右大腿骨を摘出し、周辺組織を除去した後、湿重量を測定した。およそ1週間50℃で乾燥し、重量変化が見られなくなった最小の数値を乾燥重量とした。また、ノギスを用いて骨長、骨径、骨周囲径を測定した。乾燥させた大腿骨を粉碎・灰化後、1 mol/L HCl 30 mLを加えて30分間攪拌溶解し、濾過した。濾液はカルシウムが析出しないよう10 mol/L NaOHを加え、測定時の緩衝液で緩衝能を確認した。液量を測定後、カルシウムE-テストワコーを用いてカルシウム濃度を測定し、大腿骨1本当たりのカルシウム量を算出した。

## 7. 統計解析

データは、平均値±標準偏差で示した。各群間の比較は、F検定により等分散性を検定後、T検定により有意差検定を行った。有意水準は5%以下とした。

なお、本動物実験は、「実験動物の飼養および保管等に関する基準」(昭和55年3月、総理府告示第6号)を遵守して実施した。

## 研究結果

### 1. 摂食量、飲水量および体重変化

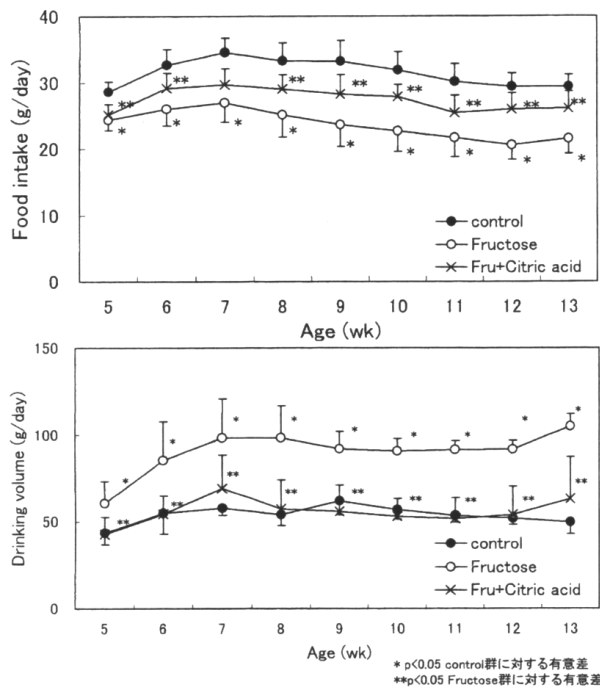


図1 摂食量および飲水量

実験期間中の摂食量および飲水量を図1に示した。10%フルクトース群において飲水量がコントロール群と比較して有意に高く、摂食量は有意に低い結果となった。クエン酸添加群においてはフルクトース群と比較して飲水量は有意に低く、摂食量は有意に高い結果となった。クエン酸添加群は、摂食量、飲水量ともにコントロール群と同様の傾向を示した。

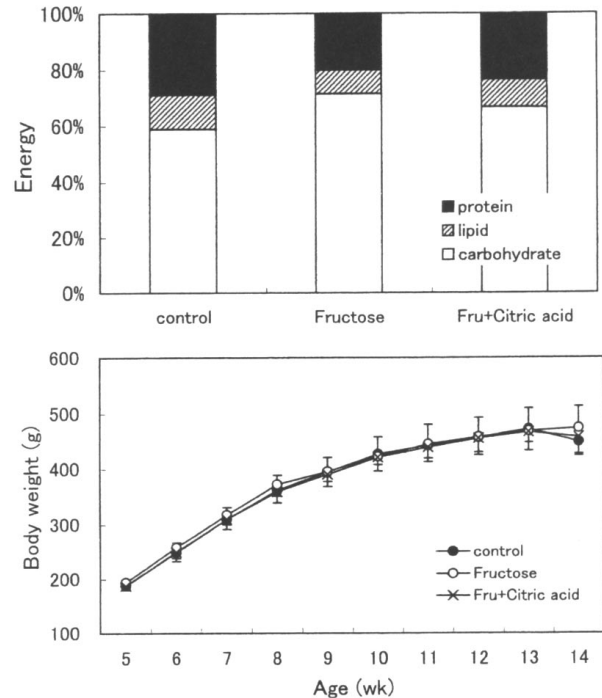


図2 エネルギー摂取比率および体重変化

そこで、各群の飼料と飲水からのエネルギー摂取比率を算出したところ(図2)、フルクトース群について糖質エネルギー比が高い傾向にあったが、有意な差ではなかった。体重変化は各群間に差は見られなかった。

### 2. 血圧およびACE活性

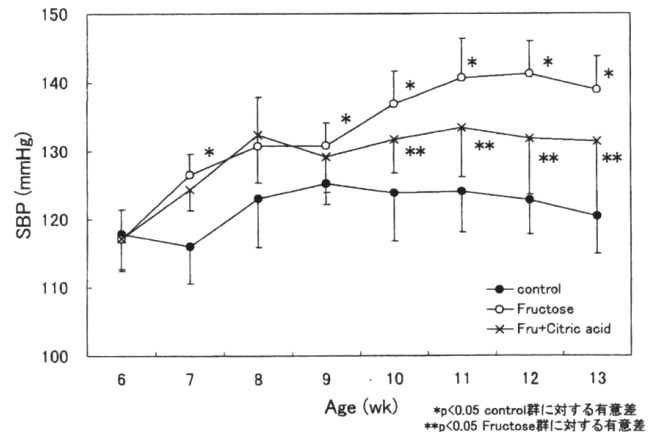


図3 収縮期血圧

収縮期血圧では、7週齢よりフルクトース群においてコントロール群と比較して有意に上昇し、クエン酸添加群ではフルクトース摂取によって上昇した血圧を有意に抑制した(図3)。拡張期血圧は12週齢以降に収縮期血圧と同様の傾向が観察された。

そこで、昇圧の調節系であるレニン-アンジオテンシン系の関与について調べるために循環系および組織ACE活性を測定した。その結果、血清ACE活性は、血圧と同様にフルクトース摂取により有意に上昇し、クエン酸添加により有意な抑制を示した(図4)。臓器については胸部大動

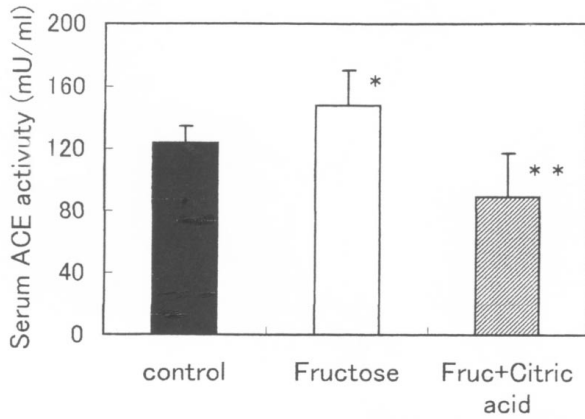


図4 血清ACE活性

脈, 肺, 心臓, 腎臓, 脳, 肝臓についてACE活性を測定したが, いずれも有意な差は見られなかった。

### 3. 臓器重量

表1 臓器重量

(g/100g body weight)	control	Fructose	Fruc+Citric acid
lung	0.337±0.023	0.346±0.039	0.330±0.021
heart	0.268±0.020	0.277±0.015	0.270±0.033
liver	3.019±0.141	3.765±0.199 *	3.379±0.115 **
stomach	0.440±0.036	0.387±0.030 *	0.440±0.035 **
kidney	0.634±0.058	0.627±0.040	0.702±0.025 **
abdominal adipose tissue	2.257±0.673	2.380±0.383	2.358±0.492

\*p<0.05 control群に対する有意差  
\*\*p<0.05 Fructose群に対する有意差

解剖後の臓器重量の結果を表1に示した。肝臓についてフルクトース摂取によりコントロール群と比較して有意に高くなり, クエン酸添加によりその有意な抑制が観察された。

### 4. 血清脂質

表2 血液データ

	control	Fructose	Fruc+Citric acid
Total cholesterol(mg/dL)	64.6±5.9	56.8±6.1	57.8±0.2
HDL cholesterol(mg/dL)	21.8±1.5	17.2±6.0	19.2±1.3
Triglycerides(mg/dL)	44.4±13.3	234.0±122.3*	148.2±26.9
Glucose(mg/dL)	143.8±23.5	206.3±13.8	235.8±51.9
GOT(IU/L)	150.0±41.9	130.8±28.6	88.7±22.4
GPT(IU/L)	38.8±15.1	53.3±20.4	33.8±12.2
BUN(mg/dL)	19.8±5.1	12.0±3.0	19.8±1.7
T-Bil(mg/dL)	0.3±0.2	0.3±0.1	0.2±0.1
Total protein(g/dL)	6.1±0.4	6.1±0.3	5.9±0.8
Albumin(g/dL)	3.4±0.3	3.7±0.2	3.5±0.4
Calcium(mg/dL)	10.7±1.1	11.4±0.5	11.2±0.5
Adiponectin(μg/mL)	7.5±0.9	7.8±0.5	8.0±0.6

\*p<0.05 control群に対する有意差

血液生化学検査の結果を表2に示した。血清トリグリセリドについて, コントロール群に比較してフルクトース摂取群で有意に上昇し, クエン酸添加群で有意ではないものの低下傾向が示された。血清総コレステロールおよびHDLコレステロールには各群間に有意な差は見られなかった。

血清グルコース, GOT, GPT, 尿素窒素, 総ビリルビン, アルブミン, 総たんぱく質, カルシウムについてはフルクトース飲水あるいはクエン酸添加による影響は観察されなかった。

また, 脂肪組織が分泌している生理活性物質のうちアディポネクチンについて測定した。今回の実験においてフルクトース摂取およびクエン酸添加による影響は観察されなかった(結果は示さない)。

### 5. 大腿骨に対する影響

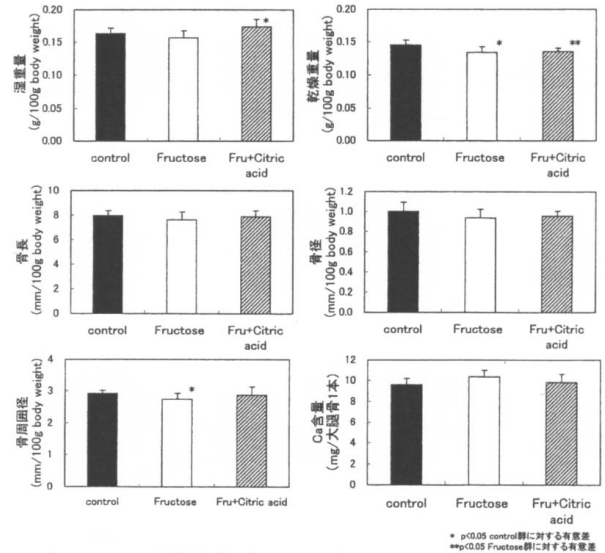


図5 大腿骨重量, サイズおよびカルシウム含量

大腿骨の湿重量, 乾燥重量, 骨長, 骨径, 骨周囲径, カルシウム含量の測定結果を図5に示した。骨の大きさは, 体格により異なることを考慮に入れ, 今回はすべての値について体重100gあたりで算出した。

その結果, フルクトース摂取により体重100gあたり的大腿骨湿重量, 乾燥重量とも低下し, クエン酸添加により有意な上昇を示した。骨長, 骨径, 骨周囲径については有意な差ではないもののフルクトース摂取群において低下傾向を示し, クエン酸添加群について増加傾向が観察された。しかし, 大腿骨1本あたりのカルシウム含量には各群間に差は見られなかった。

### 考察

今回は正常 Wistar ラットを用いることにより, 飲料水混合によるフルクトース自由摂取の影響, およびクエン酸同時摂取による影響について検討した。

摂食量および飲水量については, 前報<sup>6)</sup>の高血圧自然発症ラットと同様に, 飲料水中にフルクトースを混合したため, 飲水量が増加し摂食量が低下した。しかし, クエン酸を混合することにより, コントロール群と同程度の飲水量に抑えられ, 摂食量の増加を示した。

フルクトース群における血圧上昇の原因の一つとして,

飲水量の増加に伴い循環血液量が増加し、そのことが血圧上昇を招いた一つの因子であることが考えられる。しかし、クエン酸添加群においてもコントロール群と比較すると有意ではないものの上昇傾向を示したことより、フルクトースによる血圧上昇に、循環血液量の増加以外の要因が関与するものと考えられる。本実験より、高血圧ラットのみならず正常血圧ラットにおいてもクエン酸にはフルクトースによる血圧上昇を抑制する作用があることが明らかとなった。

血圧上昇の要因を探ることを目的として、血圧の調節系であるレニン-アンジオテンシン系の関与について調べた。循環系および組織 ACE 活性を測定したところ、組織 ACE 活性には各群間に有意な差は見られなかったが、血清 ACE 活性においてフルクトース摂取により上昇し、クエン酸混合投与によりその抑制作用を示すことがわかった。このことより、循環レニンアンジオテンシン系が何らかの関与を有する可能性が示唆された。循環系の抑制は一過性のものと考えられる。高血圧自然発症ラットでは、腎臓 ACE 活性の有意な抑制、また胸部大動脈 ACE 活性の抑制傾向が示され<sup>6)</sup>、今回の正常血圧ラットと異なるものであった。ヒトを対象とした研究において、正常血圧者と血圧高値者で血漿レニン活性やアルドステロン濃度等の動向が異なるという報告<sup>8)</sup>があり、正常者と高血圧者では血圧上昇機構が異なることが考えられた。しかし、クエン酸はどちらの場合も、フルクトースによる血圧上昇を抑制した。クエン酸については、 $\alpha$ -リポ酸、クエン酸、ウコン配合体を投与した場合、軽症高血圧を低下させたという報告があり<sup>9)</sup>、その機序について今後明らかにしていく必要がある。血清脂質では、血清トリグリセリドがフルクトース摂取において有意に増加し、クエン酸添加により有意ではないものの低下傾向を示した。また、肝臓重量も同様の結果を示したことより、脂質代謝に影響を与えたことが示唆された。しかし、高血圧ラットでは血清トリグリセリドに有意な差は見られなかった<sup>6)</sup>ことより、脂質代謝においても両者は異なる機構を有することが推察される。血中遊離脂肪酸は血管内皮に直接作用し、血管 NO 産生や利用障害を介して血管抵抗を増加させ、高血圧の発症に直接関与する可能性がある<sup>10)</sup>ことより本態性高血圧モデル動物と正常ラットにおいて脂質代謝の動向は異なるものと考えられる。

近年、脂肪細胞は様々な生理活性物質を分泌していることが明らかになってきている。その一つであるアディポネクチンは、動脈硬化、心臓病に深く関わっていることが明らかにされている<sup>11)-13)</sup>。そこで血中アディポネクチン濃度の測定を行ったが、フルクトース摂取による影響は見られなかった。

クエン酸は、キレート作用により体内でのカルシウムの運搬を円滑にし、骨粗鬆症における骨量劣化を抑制するこ

とが報告されている<sup>14)</sup>ため、今回はさらに、大腿骨について測定を行った。その結果、フルクトース摂取による骨重量および骨サイズの減少とクエン酸添加群における増加が観察された。フルクトース摂取により骨形成に負の影響を来したのと考えられる。さらに、クエン酸の同時摂取によりその減少を抑制できたことが示唆された。しかし、大腿骨 1 本当たりのカルシウム含量においては各群間に顕著な差は見出せなかった。今後、骨代謝マーカー等について更に詳細な検討が必要である。

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、ご指導いただきました本学教授木元幸一先生に深謝致します。また、実験にご協力頂きました平成 21 年度管理栄養士専攻卒業の小暮亜弥子さん、山岸真理さんに感謝致します。

## 参考文献

- 1) CM Brown, AG Dulloo, G Yepuri and JP Montani: *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **294**, R730 (2008)
- 2) JP Bantle, SK Raatz, W Thomas and A Georgopoulos: *Am J Clin Nutr* **72**, 1128 (2000)
- 3) T Kawasaki, K Igarashi, T Fukusato and T Yamanouti: *J Nutr* **139**, 2067 (2009)
- 4) World Health Organization. Diet, nutrition and prevention of chronic diseases: report of a joint WHO/FAO Expert Consultation. World Health Organization, Geneva, 54 (2003)
- 5) 厚生労働省「日本人の食事摂取基準」策定検討会報告書：日本人の食事摂取基準[2010 年版]，第一出版（東京），2009，p.110-111
- 6) 林あつみ：東京家政大学研究紀要 **49**, 27 (2009)
- 7) 高寺恒慈，平光正典，井上孝司，片桐孝夫，中島千絵，小山智之，矢澤一良：日本栄養・食糧学会大会講演要旨集 **64**, 190 (2010)
- 8) 上園慶子，佐々木悠，川崎晃一，熊谷秋三： *J Health Sci* **22**: 137 (2000)
- 9) 近藤礎，越山重昭，山口正茂，橋本豪，山本直大，石川尚文： *Food Style* **21** **13**: 82 (2009)
- 10) A Fagot-Campagna, B Balkau, D Simon, JM Warnet, JR Claude, P Ducimetiere, E Eschwege: *Int J Epidemiol* **27**: 808 (1998)
- 11) N Ouchi, S Kihara, Y Arita, K Maeda, H Kuriyama, Y Okamoto, K Hotta, M Nishida, M Takahashi, T Nakamura, S Yamashita, T Funahashi, Y Matsuzawa: *Circulation* **100**: 2473 (1999)

- 12) T Pischon, CJ Girman, GS Hotamisligil, N Rifai, FB Hu, EB Rimm: *JAMA* **291**: 1730 (2004)
- 13) N Ouchi, M Ohishi, S Kihara, T Funahashi, T Nakamura, H Nagaretani, M Kumada, K Ohashi, Y Okamoto, H Nashizawa, K Kishida, N Maeda, A Nagasawa, H Kobayashi, H Hiraoka, N Komai, M Kaibe, H Rakugi, T Ogiwara, Y Matsuzawa: *Hypertension* **42**: 231 (2003)
- 14) 香西雄介, 松本友紀子, 川股亮太, 若尾博美, 櫻井孝, 鹿島雄: 歯科放射線 **45**: 186 (2006)

### Abstract

The effect of combinatorially administered citric acid on fructose intake in normal rats was investigated. The amount of food ingested was controlled similarly to hypertensive rats in fructose group, and the animals derived energy from the drinking water. The blood pressure increased significantly with the addition of 10% fructose fluid, and the rise was restrained significantly by the citric acid combination dosage. In addition, serum angiotensin I-converting enzyme (ACE) activity decreased significantly in the citric acid combination dosage, which showed a change like the blood pressure. The blood triglyceride level and liver weight also decreased significantly with the administration of a combination dosage of citric acid. It was thought that the mechanism on blood pressure and lipid metabolism were different between hypertensive rats and normal rats for the fructose and the citric acid intake. No changes were observed in the calcium absorption action of the citric acid. Further investigation is necessary to elucidate the physiological functions of citric acid.