

ラットにおけるフルクトース飲料摂取時のL-アルギニン およびクエン酸併用投与の影響

林 あつみ

(平成 20 年 9 月 30 日受理)

The Effect of L-Arginine or Citric Acid on Rats' Intake of Fructose Fluid

HAYASHI, Atsumi

(Received on September 30, 2008)

キーワード：フルクトース, L-アルギニン, クエン酸
Key words : fructose, L-arginine, citric acid

緒 言

糖質はヒトの重要なエネルギー源であり、日本人の食事摂取基準 2005 年版では炭水化物摂取エネルギー比率として 50~70% を成人の目標量としている¹⁾。食物中には多種多様の糖質が含まれているが、ほとんどは植物に由来する。貯蔵多糖であるデンプン、ブドウやタマネギなどの果物や野菜中に少量存在する遊離グルコース、ハチミツの主要成分であり果物や野菜に遊離糖として存在しているフルクトースなどである。

ヒトの脳、神経組織、赤血球などは通常、グルコースをエネルギーとして利用する。グルコースと比較するとフルクトースは腸管からの吸収は遅く、解糖の最初の律速酵素に作用されないため速やかに代謝され、結果として糖新生やグルコーゲン合成、さらには体脂肪合成を促進しやすいことが知られている。フルクトースは清涼飲料水や調理に甘味料として使用されるショ糖の構成糖であり、さらに転化糖や異性化液糖として多くの飲料に含有されており、日常の食生活において摂取する機会の多い糖質である。このことから、フルクトース摂取量の増加とともにすべての世代に亘る肥満者の増加と肥満に起因する生活習慣病との関連について注目されている。

糖質の種類によるヒトの生理機能への影響については、摂食調節²⁾、食後の産熱効果³⁾、血糖反応⁴⁾、血圧⁵⁾および血中脂質変化⁶⁾などについて報告されているが、それらは吸収、代謝の違いによるものと考えられる。糖は脳の機能や運動能力など多くの生理機能に影響を及ぼし、ヒトの健康に大きく関係している。

一方、高血圧、糖尿病における内皮機能障害は一酸化窒素産生障害に因ることが知られており^{7,8)}、生理的状态では

塩基性アミノ酸であるL-アルギニンから一酸化窒素を生成する。また、クエン酸は、柑橘類に含有される α ヒドロキシ酸の一種で、クエン酸回路の中間体として糖質代謝の中心的役割を果たしている。

本研究では、フルクトースにL-アルギニンおよびクエン酸を併用投与することによる影響を検討した。

研究方法

実験 1

4 週齢雄性高血圧自然発症ラット (SHR/Izm) 23 匹を三協ラボサービス株式会社より購入した。実験期間中はチャールスリバー配合 CRF-1 固形飼料を自由摂取させた。1 週間の予備飼育の後 4 群に分け、飲料水に試料を混合した。1 群目は control 群 (5 匹) とし、水道水を自由摂取させ、2 群目はフルクトース群 (6 匹)、3 群目はグルコース群 (6 匹)、4 群目はショ糖群 (6 匹) とし、各糖を水に 5% となるように溶解したものを 5 週齢から 11 週齢まで自由摂取させた。飲水量、摂食量、体重の測定を行った。

実験 2

1. 実験動物および飼育方法

4 週齢雄性高血圧自然発症ラット (SHR/Izm) 14 匹を三協ラボサービス株式会社より購入した。実験期間中はチャールスリバー配合 CRF-1 固形飼料を自由摂取させた。1 週間の予備飼育の後 4 群に分け、飲料水に試料を混合した。1 群目は control 群 (3 匹) とし、水道水を自由摂取させ、2 群目はフルクトース群 (3 匹) とし、水に 10% となるようにフルクトースを溶解したものを自由摂取させた。3 群目は 10% フルクトース溶液に 0.1% となるように L-アルギニンを添加した飲料水、4 群目には 10% フルクトース溶液に 0.1% となるようにクエン酸を添加した飲料水を各群 4 匹にそれぞれ 5 週齢から 9 週齢まで供与した。

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、週に2~3回飲水量、摂食量、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. 血清脂質、グルコースの測定

実験終了前8週齢時に尾静脈より採血し、遠心分離後血清を分離した。総コレステロール、HDLコレステロール、トリグリセライドおよびグルコースの測定には、臨床化学自動分析装置SPOTCHEM EZ SP-4430を用いた。

4. 解剖方法

12時間以上前より絶食し、飲料水は水道水とした。エチルエーテル麻酔下、採血を行った。肺、心臓、肝臓、胃、腎臓、胸部大動脈、腹腔内脂肪を摘出し、生理食塩水で洗浄後重量を測定し、ACE活性の測定まで -80°C で保存した。血液は遠心分離後、血清ACE活性測定まで同様に保存した。

5. ACE活性測定法

ACE活性の測定はCushman and Cheung⁹⁾の測定方法を改良した国府ら¹⁰⁾の方法に準じて行った。合成基質Hippuril-Histidyl-Leucine(ペプチド研究所)を7mMとなるようにpH8.3の200mMホウ酸緩衝液に溶解し基質として用いた。基質に2M NaClを加え、血清と 37°C 30分間反応後、1M HClで反応を停止した。酢酸エチルを加えて遊離したHippuric acidを攪拌抽出した後、酢酸エチル層を分取した。濃縮遠心機(タイテック株式会社)にて 60°C 減圧下で乾固した後、純水に溶解し228nmの吸光度を測定した。ACE活性1ユニットは、 37°C で1分間に1 μmol の基質を分解する酵素量として表した。

組織については採取後 -80°C で保存したものを、測定時、水中で各組織100mgを細切後、500 μL の200mMホウ酸緩衝液、pH8.3を加えてマイクロハンディーホモジナイザーを用いてホモジナイズした。12,000rpmで20分間の遠心分離により得られた上清をACE活性測定用試料とした。

また、Bio-Rad Protein assay法¹¹⁾によりタンパク量を測定し、データは比活性で表した。

6. 統計解析

実験データは、平均値 \pm 標準偏差で表した。各群間の比較はF検定後、等分散性を示したのものについてはStudent's t-testにより、また等分散性を示さなかったものについてはWelch's t-testにより有意差を判定した。有意水準は5%以下とした。

なお、本動物実験は「実験動物の飼養及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

実験1

糖液の種類による嗜好性について調査するために、まず5%濃度の各種糖溶液について自由摂取させ、飲水量、摂食量、体重変化を追跡した(図1)。飲水量については、すべての糖溶液を投与した群においてcontrol群と比較して有意に高く、なかでもグルコース溶液とショ糖溶液においてcontrol群の4倍以上の摂取量となった。摂食量は、いずれの群においてもcontrol群と比較して有意に低い結果となったが、飲水量が最も高かったグルコース群とショ糖群において摂食量は最も低い結果となった。体重は、ショ

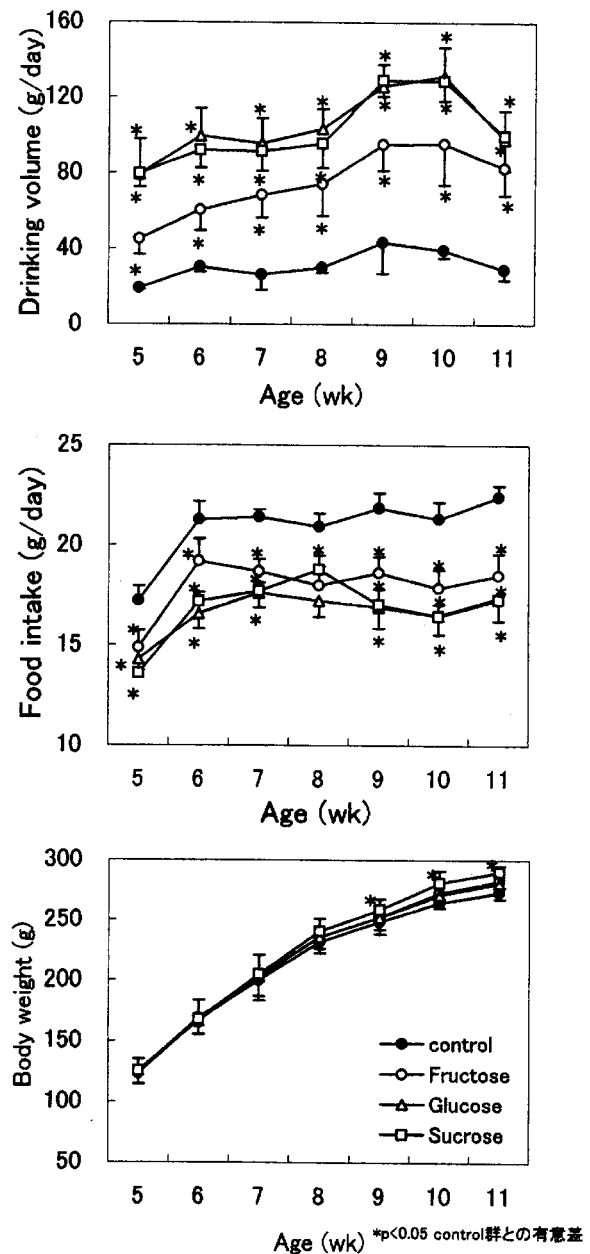


図1 糖液の種類による飲料水、摂食量、体重変化

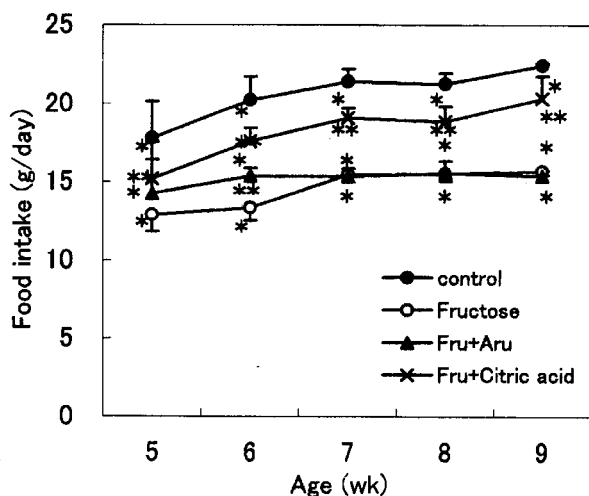
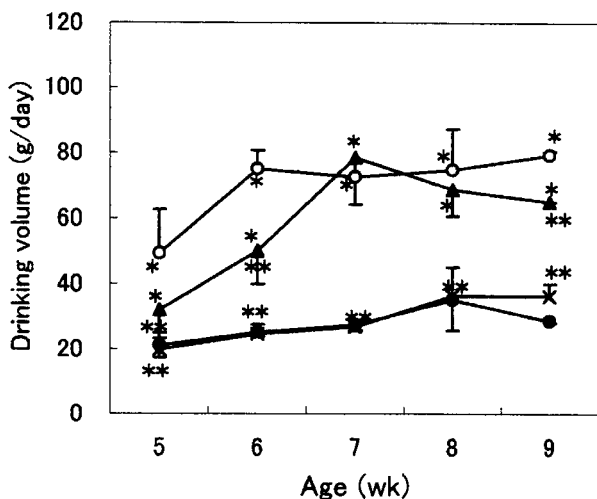
糖群のみ9週齢以降control群と比較して、有意に増加した。

実験2

1. 飲水量, 摂食量および体重変化

実験期間中の飲水量, 摂食量の変化を図2に示した。飲水量は, 10%フルクトース群およびアルギニン添加群においてcontrol群と比較して有意に高くなり, クエン酸添加群についてはcontrol群と同様の傾向を示した。摂食量については実験1と同様に飲水量が多かった群において摂食量の抑制が示された。特に飲水量が多かったフルクトース群およびアルギニン添加群において摂食量は有意に減少した。クエン酸添加群ではフルクトース群と比較して有意に増加した。

そこで, 各群のエネルギー摂取量を比較したところ有意な差は見られなかった。各栄養素からのエネルギー摂取比率を算出した結果を図3に示した。飲料水よりフルクトースを摂取した群, 特にアルギニン添加群において糖質エネルギー比率が高い傾向が見られたが有意な差ではなかった。本重についても各群間に有意な差は観察されなかった。



*p<0.05 control群との有意差
**p<0.05 Fructose群との有意差

図2 飲料水および摂食量

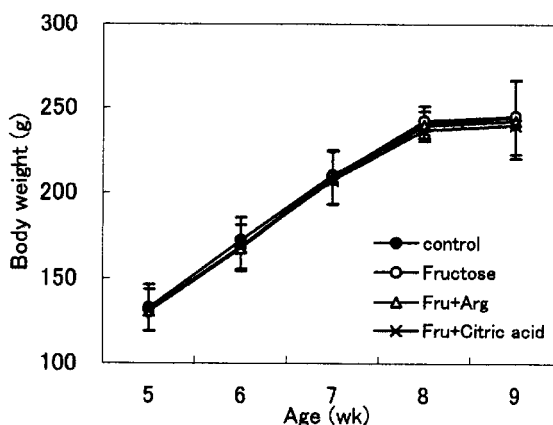
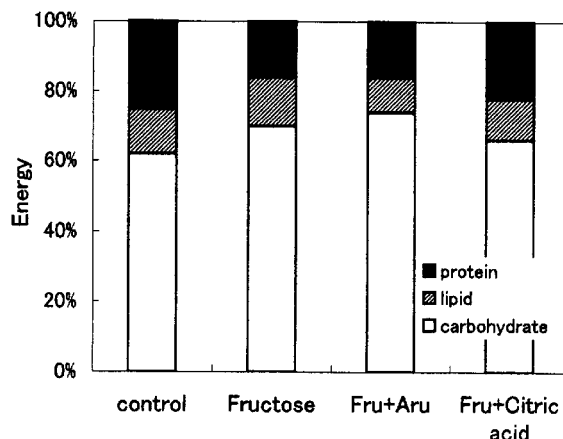
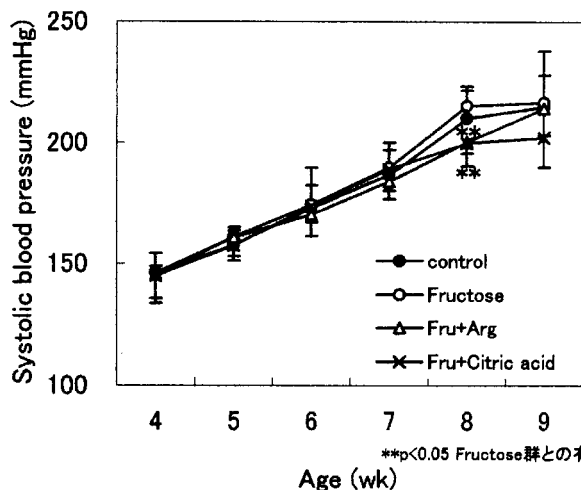


図3 エネルギー摂取比率および体重変化

2. 血圧およびACE活性

フルクトース摂取による血圧に対する影響について検討した(図4)。その結果, 8週齢においてアルギニン添加群およびクエン酸添加群においてフルクトース群と比較して有意な上昇抑制が観察された。そこで, レニン-アンギオテンシン系との関連を調べるために8週齢時の血清および解剖後各臓器のアンギオテンシン変換酵素(ACE)活性の測定を行ったところ, 腎臓についてはクエン酸併用投与群においてcontrol群と比較して有意に低く, 血清および胸



**p<0.05 Fructose群との有意差

図4 収縮期血圧

表1 血清および臓器ACE活性

	control	Fructose	Fru+Arg	Fru+Citric acid
serum (mU/mL)	173.8±43.68	200.5±18.40	190.7±9.67	187.8±19.11
(mU/mg protein)				
thoracic aorta	45.64±12.876	53.77±4.663	48.56±6.313	45.98±7.903
kidney	0.879±0.295	0.903±0.604	0.814±0.342	0.363±0.269 *
lung	156.9±38.76	151.4±17.61	166.6±31.48	158.4±19.04
heart	0.249±0.233	0.197±0.217	0.440±0.317	1.215±2.429

*p<0.05 control群との有意差

部大動脈についてはフルクトース群に比較して低い傾向にあったものの有意な差ではなかった (表1).

3. 血清脂質およびグルコース濃度の変化

血清総コレステロール, HDLコレステロールおよびトリグリセリドについては各群間に有意な差は見られなかった. 血清グルコース濃度は, クエン酸添加群についてフルクトース群と比較して, 有意に低下した (図5).

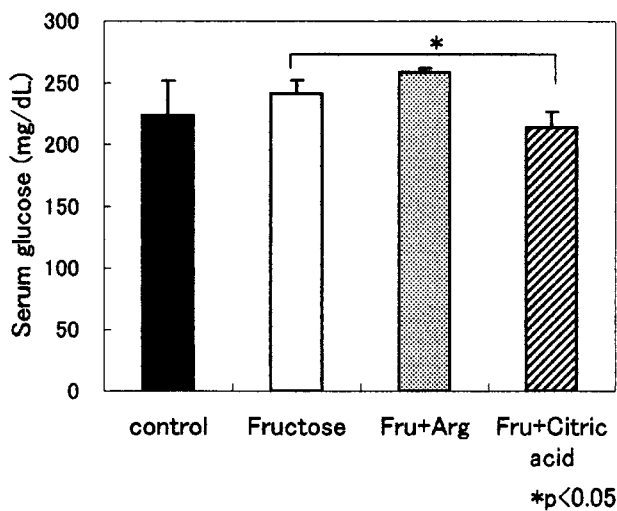


図5 血清グルコース

4. 臓器重量

解剖後の臓器重量の結果を表2に示した. 肝臓についてはフルクトース群においてcontrol群より有意に高く, クエン酸添加群ではフルクトース群に比較して有意に低い結果となった. 腹腔内脂肪は, フルクトース群およびアルギニン添加群についてcontrol群より有意に高く, クエン酸添加群ではフルクトース群に比較して有意な減少が観察された.

考 察

糖質の摂取と生活習慣病との関連については様々な報告がなされている^{12,13)}. 今回は, 糖の種類による嗜好性, フルクトース摂取による影響とL-アルギニンおよびクエン酸の併用投与における影響について検討した.

まず, 各5%濃度のフルクトース, グルコース, ショ糖溶液をラットに自由摂取させたところ, グルコース, ショ糖そしてフルクトースの順に摂取量が多い結果となった. 摂食量については飲料水から摂取したエネルギー分抑制したと考えられた. 糖質の飲用と食事量の低下についてはグルコース, ショ糖, フルクトースについて同様の報告がある^{2,14,15)}. しかし, 飲料としての摂取量はそれほど多くないため, 必ずしも食事量の減少をもたらすとは言えないという報告もある¹⁶⁾.

表2 臓器重量

(g/100g body weight)	control	Fructose	Fru+Arg	Fru+Citric acid
lung	0.443±0.055	0.420±0.026	0.463±0.023 **	0.463±0.038
heart	0.420±0.009	0.427±0.022	0.438±0.012 *	0.438±0.011 *
liver	3.263±0.039	3.463±0.072 *	3.448±0.123	3.326±0.049 **
stomach	0.484±0.015	0.457±0.012 *	0.463±0.024	0.499±0.021 **
kidney	0.843±0.008	0.868±0.014 *	0.859±0.019	0.884±0.059
abdominal adipose tissue	0.844±0.116	1.032±0.062 *	1.180±0.209 *	0.727±0.138 **

*p<0.05 control群との有意差

**p<0.05 Fructose群との有意差

10%フルクトース飲水による影響については、5週間の自由摂取により血中脂質には影響しなかったが、肝臓および腹腔内脂肪の有意な増加が観察された。これまで報告されているフルクトース投与による影響については、血圧上昇作用^{17,18)}、血漿トリグリセリド上昇作用¹³⁾、血漿インスリン上昇作用^{13,18)}などがある。血圧上昇の要因としてはレニン-アンジオテンシン系の亢進¹⁹⁾、交感神経亢進によるカテコールアミン上昇^{18,20)}などが考えられている。血清脂質の上昇については、フルクトースが脂肪酸合成酵素を活性化することが明らかにされている²¹⁾。本研究における血圧測定の結果についてはフルクトース群において実験期間を通して常に高い傾向を示したものの有意な差ではなく、血清トリグリセリドには有意な変化は観察されなかった。

L-アルギニンおよびクエン酸の併用投与による影響は、血圧について8週齢時に両群とも有意な低下が観察され、クエン酸群においては9週齢時もその値を維持した。L-アルギニンによる血圧上昇抑制作用は一過性のものではあったが、クエン酸による血圧低下作用は持続するものと推察された。ACE活性の測定を行ったところ、腎臓においてcontrol群と比較して有意に抑制され、胸部大動脈および血清ACE活性についてフルクトース群と比較して低下傾向にあった。本実験におけるフルクトースによる血圧上昇傾向およびクエン酸併用投与による血圧上昇抑制作用に、レニン-アンジオテンシン系の何らかの関与が示唆された。

また、クエン酸併用投与により、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観察された。クエン酸はクエン酸回路の中間物質であり、エネルギー代謝を促進する一方、体脂肪合成の律速酵素であるアセチルCoAカルボキシラーゼの活性化物質とされている。一般的には様々な効果があると言われているが、学術的な証拠は少ない。本実験により、L-アルギニン併用投与では脂質代謝改善作用は観察されなかったが、クエン酸併用投与による血糖値上昇抑制作用、内臓脂肪の減少および肝臓重量の低下が観察され、フルクトースにより活性化された脂肪酸合成系を抑制することによる脂質代謝促進作用が推察され、生活習慣病予防に有効と考えられたが、今後さら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19年度管理栄養士専攻の二木綾子さん、武田佳子さんに感謝致します。

参考文献

- 1) 第一出版編集部編：厚生労働省策定 日本人の食事摂取基準〔2005年版〕，第一出版（東京），2005，p.70
- 2) GH Anderson, NLA Catherine, TMS Wolever: *Am J Clin Nutr* **76**, 547 (2002)
- 3) EE Blaak and WHM Saris: *Metabolism* **45**, 1235 (1996)
- 4) SL Stewart, R Black, TMS Anderson: *Nutr Res* **17**, 1249 (1997)
- 5) R Visvanathan, R Chen, M Garcia, M Horowitz, I Chapman: *Br J Nutr* **93**, 575 (2005)
- 6) M Benado, C Alcantara, R Delarosa, M Ambrose, K Mosier, M Kern: *Nutr Res* **24**, 565 (2004)
- 7) 東幸仁：分子心血管病 **9**, 141 (2008)
- 8) 岡村富夫：細胞 **40**, 318 (2008)
- 9) DW Cushman and HS Cheung: *Biochem Pharmacol* **20**, 1637 (1971)
- 10) 国府達郎, 山本研二郎：レニンと高血圧，メディカルトリビューン（東京），1986，p.465
- 11) K-C Ho, V Quarmby, DH Viskochil, EM Wilson, FS French, R Snoek, PS Rennie, N Bruchovsky: *Biochem* **28**: 6367 (1989)
- 12) 井上修二：大和ヘルス財団研究業績集 **10**: 61 (1986)
- 13) GM Reaven and BB Hoffman: *Horm Metab Res* **22**: 363 (1990)
- 14) GH Anderson: *Am J Clin Nutr* **62**: 195S (1995)
- 15) J Rodin: *Appetite* **17**: 213 (1991)
- 16) SL Stewart, R Black, TMS Wolever, GH Anderson: *Nutr Res* **17**: 1249 (1997)
- 17) S Dai and JH McNeill: *J Pharmacol Toxicol Methods* **33**: 101 (1995)
- 18) S Verma: *Eur J Pharmacol* **373**: R1 (1999)
- 19) 上園慶子, 佐々木悠, 川崎晃一, 熊谷秋三: *J Health Sci* **22**: 137 (2000)
- 20) M Fields, RJ Ferretti, JC Smith, Jr. and S Reiser: *Life Sciences* **34**: 763 (1983)
- 21) 岩田多子, 稲山貴代, 加藤敏光：日本栄養食糧学会誌 **40**: 463 (1987)

Abstract

The effect of combinatorially administered L-arginine or citric acid on fructose intake in rats was investigated. When various sugar solutions with 5% density were used, the amount of drinking water freely taken increased in the order of glucose, sucrose, and fructose. The amount of food ingested was controlled in all the groups, and the animals in each group derived energy only from the drinking water. The blood pressure tended to increase with the addition of 10% fructose fluid, and the rise was restrained by the citric acid combination dosage. In addition, kidney angiotensin I-converting enzyme (ACE) activity decreased significantly, and serum and aorta ACE activity also exhibited a tendency to decline. Moreover, the blood sugar level and the liver and abdominal adipose tissue weight also decreased significantly with the administration of a combination dosage of citric acid. Further investigation is necessary to elucidate the physiological functions of citric acid.