平成 21 年度厚生労働科学研究費補助金（循環器疾患等生活習慣病対策総合研究事業）

日本人の食事摂取基準を改定するためのエビデンスの構築に関する研究

－微量栄養素と多量栄養素摂取量のバランスの解明－

主任研究者　　柴田　克己　　滋賀県立大学　　教授

主任研究者の報告書

11．ラットを用いたグルコース必要量の検討

主任研究者　　柴田　克己　　滋賀県立大学　　教授

研究要旨

一部の臓器において，グルコースは唯一の栄養源となることから，グルコースは他の栄養素に比べ重要度が高く，摂取不足によって何らかの悪影響が現れることが想定される．一方で，食事摂取基準における目標量設定のエビデンスは不十分なものといえる．本研究では，グルコース必要量策定におけるエビデンスの構築を目的に，グルコースを段階的に制限したときの生体の変化を調べ，グルコース不足の指標，その指標を用いたときの必要量について検討した．3 週齢のラットにタンパク食 （20%カゼイン食） ，グルコースの代替栄養素をフルクトースとして，グルコースのエネルギー比を 60～0%まで段階的に制限し，21 日間飼育した．体重，臓器重量，血液指標等を測定したところ，グルコース制限群で脂質代謝が亢進していた．Ctrl 群と比べて，グルコース 23%以下の群において脂肪重量が，グルコース 0%群において腎臓重量，精巣重量，トリグリセリド，ケトン体，遊離脂肪酸，筋グリコーゲン低値を示した．これらのことから，本研究のラットを用いたグルコース必要量の検討において，グルコース必要量は，脂肪重量を指標として 30%エネルギー比と設定できた．

A．目的

生体のエネルギー源として，糖質，タンパク質，脂質が挙げられる．この中で，脳や神経組織，赤血球，腎尿細管，精巣，酸素不足の骨格筋などにおいては，通常，グルコースしかエネルギー源として利用できない．そのため，グルコースは他の栄養素に比べ重要度が高く，摂取不足によって何らかの悪影響が表れることが想定される．

日本人の食事摂取基準 [2010 年版] においては，炭水化物について，目標量のみがエネルギー%で定められている．この目標量は，グルコースをエネルギー源として利用する体内組織のグルコース要求量の推定値と，タンパク質と脂質の目標量とを合わせて出されたものであり，直接的に糖質摂取量が生体に与える影響を調べたものではない．そのため，この目標量設定のエビデンスは不十分なものといえる．

これまで，炭水化物，グルコース制限について様々な報告があるが，方法，結果ともに一様ではない．Renner らは，雛鳥において，適量のタンパク質下では糖質の代わりに脂肪（グリセロールあり）を与えても体重に影響が見られず，脂肪酸（グリセロールなし）の使用では体重減少が見られた，と報告している[1)]．また， Niewoehner らによると，ラットにグルコース制限食（高タンパク質，高脂質食）を与えると，体重に影響はなかったものの，飼料摂取量が低下，心臓グリコーゲンが低下，インスリン抵抗性が増加したと報告されており[2)]， Gordon らによると，ヒトにおける炭水化物制限によって，体重減少，尿中，血中ケトン体上昇，血中遊離脂肪酸，総コレステロール値の上昇，疲労感が起こったと報告した[3)]．

これらの報告はグルコース制限食を用いているものの，炭水化物以外の主要栄養素（タンパク質，脂質）の比率は様々であり，グルコース制限の影響を調べる指標，その結果ともに一様ではない．

本研究では，グルコース必要量策定におけるエビデンスの構築を目的に，まず，グルコースを制限した時のグルコース以外の栄養素の比率，種類について検討し（実験 1），さらに，一定の栄養条件化で，グルコースを段階的に制限したときの生体の変化を調べ，グルコース不足の指標，その指標を用いたときの必要量について検討した（実験 2）．

B．実験方法

1．動物飼育

本実験は滋賀県立大学動物実験委員会の承認を受けた．飼育室の温度は 22℃前後，湿度は 50%前後，午前 6 時～午後 6 時を明，午後 6 時～午前 6 時を暗とした．3 週齢の Wistar 系雄ラットを日本クレア（株）より購入し，各群，平均体重がほぼ等しくなるように下記のように分け，ラット用の代謝ケージに入れ，飼育した．飼料と水は自由摂取とし，1～2 日ごとに午前9時～10時に新しいものと交換した．また，その際に体重と飼料摂取量を測定した．

< 実験 1 > グルコース制限時の栄養条件

グルコース制限時の栄養条件として，グルコースと重量あたりのエネルギー量がほぼ同等であるタンパク質に注目した．これまでの研究[4)]において，高タンパク質食下ではグルコース制限の影響はなかったことから，今回は通常タンパク質食（20%カゼイン食），低タンパク質食 （10%カゼイン食） 条件下におけるグルコース制限について検討した．

また，これらの条件下で，グルコース制限の代替栄養素として，それぞれフルクトース，ガラクトースを用いた．フルクトース，ガラクトースはどちらも，糖新生の経路を経てグルコースになる．

通常タンパク食群（タンパク質 20%，糖質 70.3% ）で，糖質内容がそれぞれ全てグルコースまたはフルクトースまたはガラクトースの 3 群と，低タンパク食群（タンパク質 10%，糖質 80.3% ）で，糖質内容がそれぞれ全てグルコースまたはフルクトース，ガラクトースの 3 群の計 6 群に分け，22 日間飼育し，体重を測定した ．飼料組成は表 1 に示した．

< 実験 2 > グルコースの必要量，指標の検討

グルコース以外の栄養素の条件として，以前の研究[4] と本研究の実験 1 の結果より，適度にグルコース制限の影響が出た，20% カゼイン，フルクトース食を用いた．

コントロール群（糖質源がコーンスターチとスクロースで，この中のグルコースのエネルギー%は 60%），テスト群 （糖質源をグルコースもしくはフルクトースとし，グルコースのエネルギー% が高いものから，35%，30%，23%，14%，0%） の 6 群それぞれ，表 2 に示した組成の飼料で 21 日間飼育した．

飼育最終日の採尿後にラットを断頭屠殺し，採血，及び脳，肝臓，腎臓，精巣，筋肉（ヒラメ筋，腓腹筋），脂肪組織（白色脂肪組織，褐色脂肪組織）を摘出し，各臓器重量を測定し，肝臓，腓腹筋についてはグリコーゲン，ピルビン酸も測定した．また，血清中グルコース，総タンパク，アルブミン，クレアチニン，尿素窒素，アラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT），アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST），トリグリセリド，総コレステロール，遊離脂肪酸，ケトン体，ピルビン酸を測定した．

2．統計学的解析

数値はすべて平均値±標準誤差（SEM）で表した．GraphPad Prism（Graph Pad Software,inc.,San Diego,California,USA） の One-way ANOVA（Dunnett posttest）を用いた．

C．結果

< 実験 1 > グルコース制限時の栄養条件

グルコース群，フルクトース群は試料摂取量，体重増加量ともに， 20%カゼイン群よりも 10%カゼイン群が低い値となり，それぞれのタンパク食群で比較すると，グルコース群よりもフルクトース群が低くなった．体重増加量において，グルコース群に対するフルクトース群の割合は通常タンパク食群で約 75%，低タンパク食群で約 35%となり，低タンパク食群の方がグルコース制限の影響は大きくなった．ガラクトース群については，低タンパク食群で 9 日目に死亡する個体があり，通常タンパク食群では試料摂取量がどの群よりも多いが体重増加量は最も低く，白内障，多尿といったガラクトース血症の症状が見られ，グルコース制限よりもガラクトース投与の影響が出る結果となった．

これらの結果より，タンパク栄養状態が悪いことで，グルコース摂取不足の影響が大きく現れること，ガラクトースはそれ自体の毒性が出てしまい，グルコースの代替栄養素としては不適であることが示された．

< 実験 2 > グルコース必要量，指標の検討

実験 1 の結果，以前の研究[4] で高タンパク（60%カゼイン食）条件下においてはグルコース制限の影響はなかったことから，タンパク量は，グルコース制限の影響があり通常食と同量の 20%カゼイン食，グルコースの代替

栄養素を，際立った毒性がなかったフルクトースとした条件下で，段階的にグルコース制限を行った．

1．グルコース制限が体重，体組成におよぼす影響

図 2 に最終日の体重, 飼料効率, 脂肪重量, 筋重量を示した．体重は各群，コントロール群よりも低い値となったが，飼料の体重増加量への寄与度を示す飼料効率には各群差がなかった．

体重あたりの筋重量については，各群差はなく，脂肪重量については，グルコース 23%以下の群で低値を示した．

2．グルコース制限が臓器重量，肝機能指標におよぼす影響

脳，精巣，腎臓尿細管は通常，エネルギー源がグルコースに限られており，肝臓は主な糖新生の場であることから，グルコースと関係のある臓器として，脳，肝臓，腎臓，精巣の重量を測定した（図 3）．コントロール群と比べて，脳，肝臓に各群差は無かったが，腎臓重量は 0%群で低値を示し，精巣については 23%と 0%群で低値を示した．

3．グルコース制限がタンパク質代謝，肝機能指標におよぼす影響

タンパク代謝の指標として，血清中の総タンパク質，アルブミン，尿素窒素，クレアチンを測定した．また，肝機能の指標として血清中 ALT，AST を測定した（図 4）．それぞれ，各群に明らかな違いはなかった．

4．グルコース制限が脂質代謝におよぼす影響

脂質代謝への影響を調べるために，血清中の総コレステロール，トリグリセリド，遊離脂肪酸，ケトン体を測定した（図 5）．総コレステロールでは，各群間で有意な差は認められなかったが，トリグリセリド, 遊離脂肪酸, ケトン体においてはコントロール群に比べて 0%群がそれぞれ高値を示し，脂肪代謝が亢進していることが示唆された．

5．グルコース制限が糖質代謝におよぼす影響

糖質代謝への影響を調べるために，血糖値, 肝臓中，筋肉中（腓腹筋）グリコーゲンを測定した．血糖値は， コントロール群と比較すると，すべての群で低値を示したが，一番低かった 0%群においても 78±6.3（mg/dl）であり，生命維持に危険をきたすほどの低さではなっかった．

グリコーゲンについては，肝臓において各群差はなかったが，筋肉においては 0%群がコントロール群よりも低値を示した．

D．考察

実験 1 において，タンパク質状態によってグルコース制限の影響が異なり，低タンパク質状態において，グルコース制限の影響がより大きく表れることが確認された。これは，低タンパク質状態では糖原生アミノ酸量が少なく，糖新生によりグルコース不足を補うことができなくなるためと考えられる．また，糖質におけるグルコースの代替栄養素について，ガラクトースではこれ自身の毒性が現れ，グルコースの代わりに用いることができなかった．フルクトースにおいては，これ自身による顕著な毒性は確認されず，グルコース群と比べて、飼料摂取量，体重増加量ともに低値を示し，グルコース制限の影響が確認された．

実験 2 において，実験 1 の結果より，通常タンパク食 （20%カゼイン食） ，グルコースの代替栄養素をフルクトースとする条件

下で段階的なグルコース制限を行った．

このとき，グルコース制限群において，タンパク質代謝への影響はなかったが，遊離脂肪酸，トリグリセリド，ケトン体が高値，脂肪重量が低値となり，脂質代謝の亢進が示された．これは，グルコース供給量の不足を補うために脂質代謝が亢進したためと考えられる．体重について，コントロール群と比べて全ての群で低い値となったが，飼料効率を見ると差がない．これは，体重の違いが飼料摂取量に影響されていることを示す．このことから，体重への影響は，各群の飼料に対する嗜好性などグルコース栄養以外の影響も考えられ，今回の必要量の検討は体重以外の生体指標によって検討することとした．脂肪重量については，グルコース 23%以下の群で，コントロール群よりも低値になった．また，腎臓重量，精巣重量，トリグリセリド，ケトン体，遊離脂肪酸，筋グリコーゲンについては，0%群でコントロール群と差がみられた．これらのことより，指標に影響が現れる（コントロールと差が出る）のは，グルコース濃度 23%～30%間，0%～14%間の大きく 2 箇所に分かれるようである．グルコースの必要量を生体指標へグルコース制限の影響が現われない最低量であると考えると，ここでは 23%エネルギー濃度と設定できる．

以上より，本研究のラットを用いたグルコース必要量の検討において，グルコース必要量は脂肪重量を指標として 30%エネルギー比と設定できる．

今後，さらなるヒトへの応用を考えることで，炭水化物必要量策定のエビデンス構築に寄与することが期待される．

E．健康危機情報

特記する情報なし

F．研究発表

1．発表論文

なし

2．学会発表

なし

G．知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1．特許予定

なし

2．実用新案登録

なし

3．その他

なし

H．引用文献

1. Renner R，Elecombe　AM．Factor affectiong the utilization of carbohydrate-free diets by the chick.*J Nutr*（1964）　84 327-330.
2. Gannon MC, Niewoehner CB, Nuttall FQ. Effect of Insulin Administration on glycogen synthase ynthetase and　Activity in rats fed diets high in protein ， fat or carbohydrate。*J Nutr*（1985）115, 243-251.
3. Walter L, Bloom MD, Gordon J. Similarities of carbohydrate deficiency and fasting. *Arch Intern Med.*（1963）　333-343
4. 柴田克己．平成 19 年度厚生労働科学研究費補助金，循環器疾患等生活習慣病対策総合研究事業．日本人の食事摂取基準を改定するためのエビデンスの構築に関する研究―微量栄養素と多量栄養素のバランスの解明―，平成 19 年度総括・分担研究報告書．2008.

表 1. ＜実験 1＞ 飼料組成（重量%）

	通常タンパク質群			低タンパク質群		
	Glucose	Fructose	Galactose	Glucose	Fructose	Galactose
Vitamin-free milk casein	20	20	20	10	10	10
L-Methionine	0.2	0.2	0.2	0.1	0.1	0.1
Sugar						
Glucose	70.3	0	0	80.4	0	0
Fructose	0	70.3	0	0	80.4	0
Galactose	0	0	70.3	0	0	80.4
Corn oil	5	5	5	5	5	5
Mineral mixture	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
Vitamin mixture	1	1	1	1	1	1

表 2 ＜実験 2＞ 飼料組成 （重量%）

グルコース　エネルギー比（%）	60	35	30	23	14	0
Vitamin-free milk casein	20	20	20	20	20	20
L-methionine	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Gelatinized cornstarch	46.9					
Sugar						
Sucrose	23.4					
Glucose		35.2	30.1	23.4	14.1	0.0
Fructose		35.2	40.2	46.9	56.2	70.3
Corn oil	5	5	5	5	5	5
Mineral mixture	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
Vitamin mixture	1	1	1	1	1	1

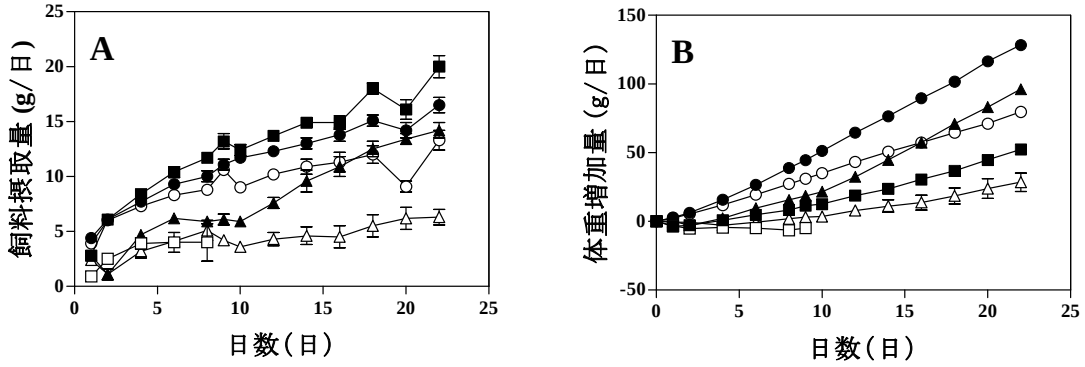

図 1. ＜実験 1＞グルコース制限が飼料摂取量（A），および体重増加量（B）におよぼす影響
値は平均値 ± 標準誤差として示した.

●：通常タンパク質グルコース食群，○：低タンパク質グルコース食群

▲：通常タンパク質フルクトース食群，△：低タンパク質フルクトース食群

■20P-Gal：通常タンパク質ガラクトース食群，□：低タンパク質ガラクトース食群

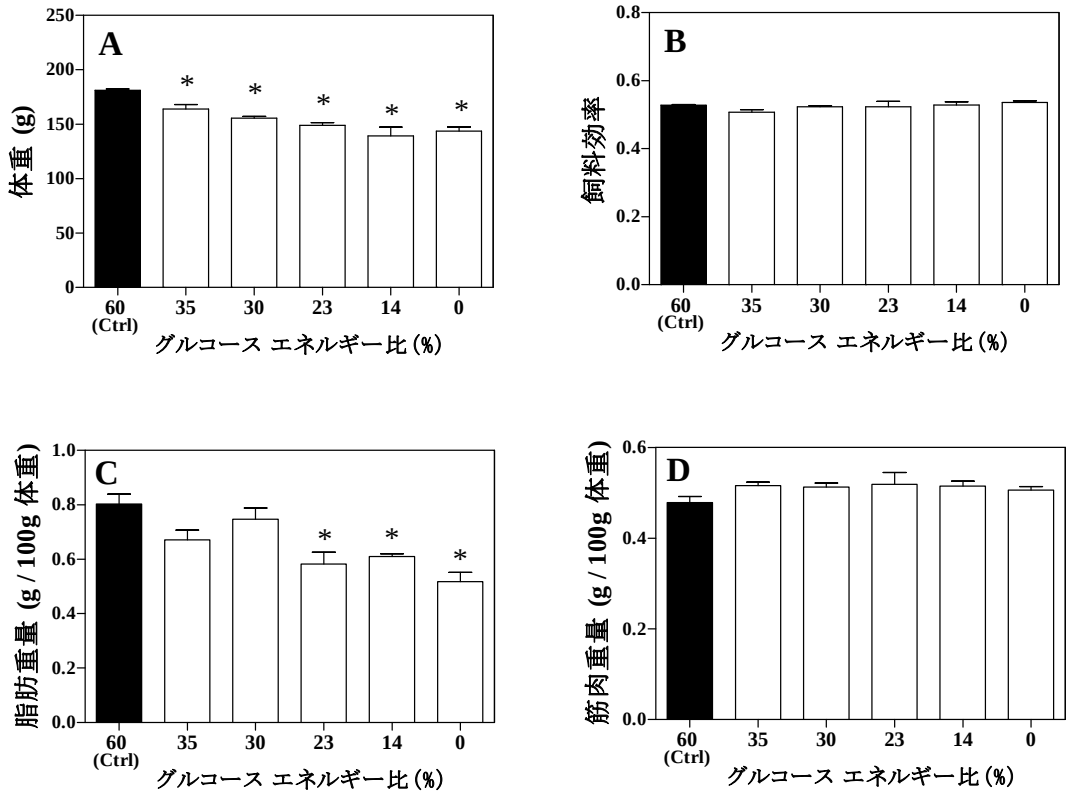

図 2. ＜実験 2＞ グルコース制限が体重（A），飼料効率（B），脂肪重量（C），筋重量（D）におよぼす影響

値は平均値 ± 標準誤差として示した．＊はコントロール（Ctrl）との有意差を示す（$p < 0.05$）．

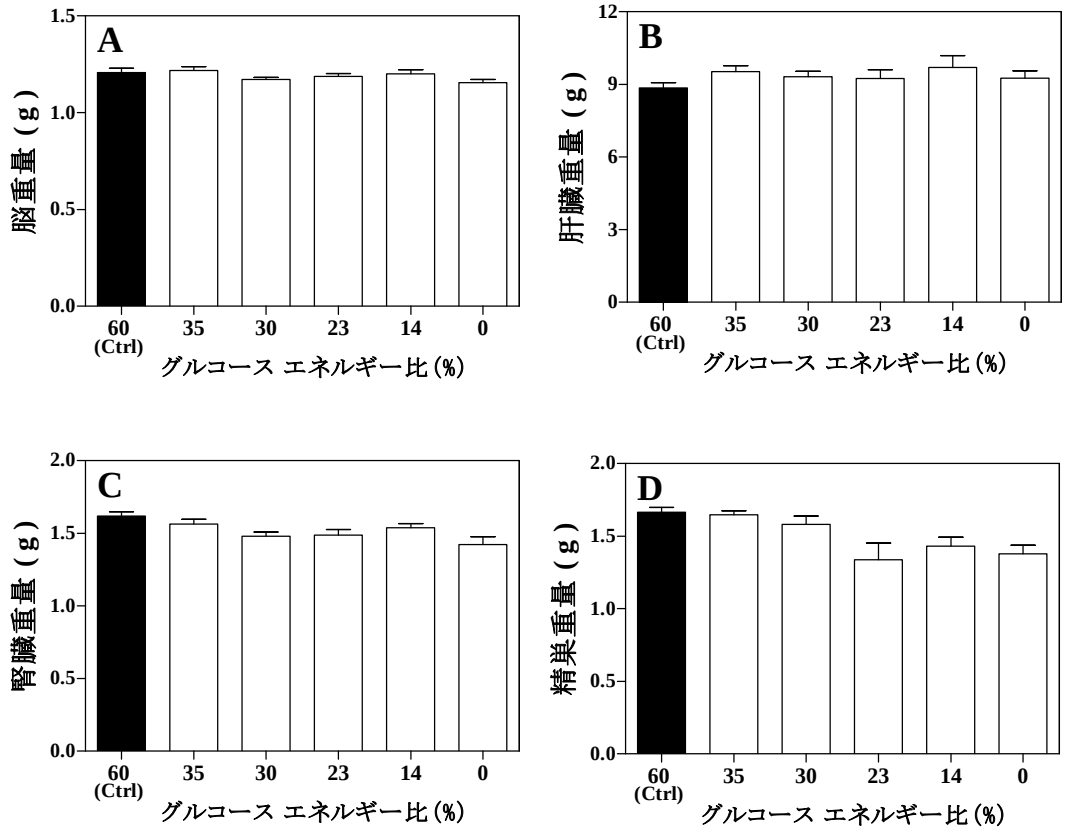

図 3. ＜実験 2＞ グルコース制限が脳重量（A），肝重量（B），腎重量（C），精巣重量（D）におよぼす影響

値は平均値 ± 標準誤差として示した．＊はコントロール（Ctrl）との有意差を示す（$p < 0.05$ ）．

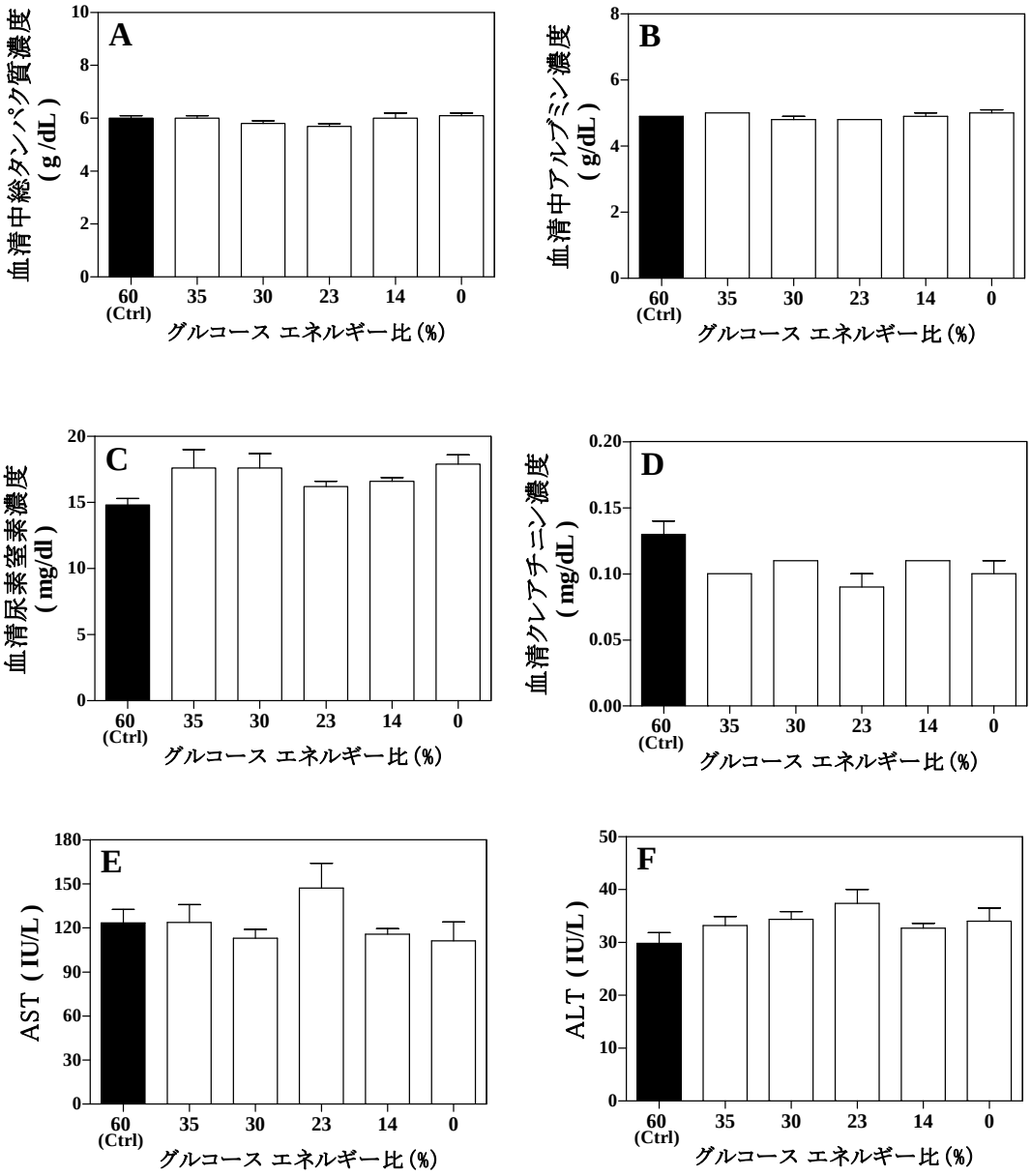

図 4. ＜実験 2＞ グルコース制限が血清中総タンパク質（A），アルブミン（B），尿素意窒素（C），クレアチニン（D），アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（E），アラニンアミノトランスフェラーゼ（F）におよぼす影響

値は平均値 ± 標準誤差として示した．＊はコントロール（Ctrl）との有意差を示す（$p < 0.05$ ）．

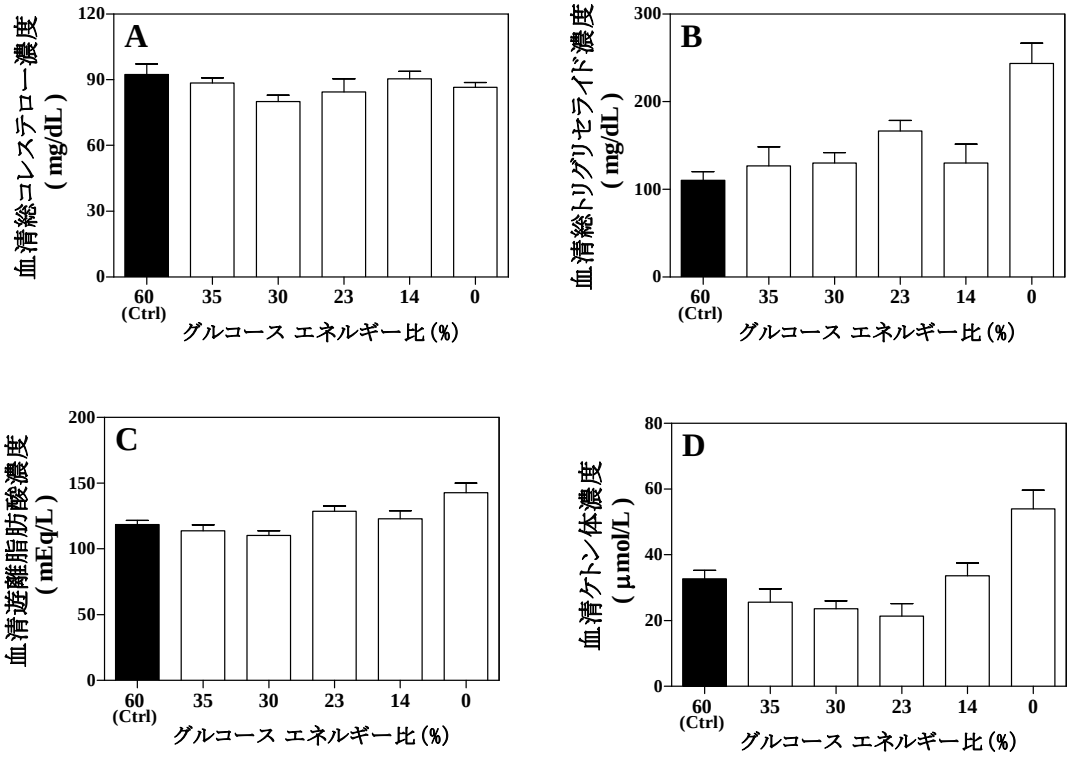

図 5. グルコース制限が血清中総コレステロール (A), トリグリセリド (B), 遊離脂肪酸 (C), ケトン体 (D) におよぼす影響

値は平均値 ± 標準誤差として示した. ＊はコントロール (Ctrl) 群との有意差を示す ($p < 0.05$).

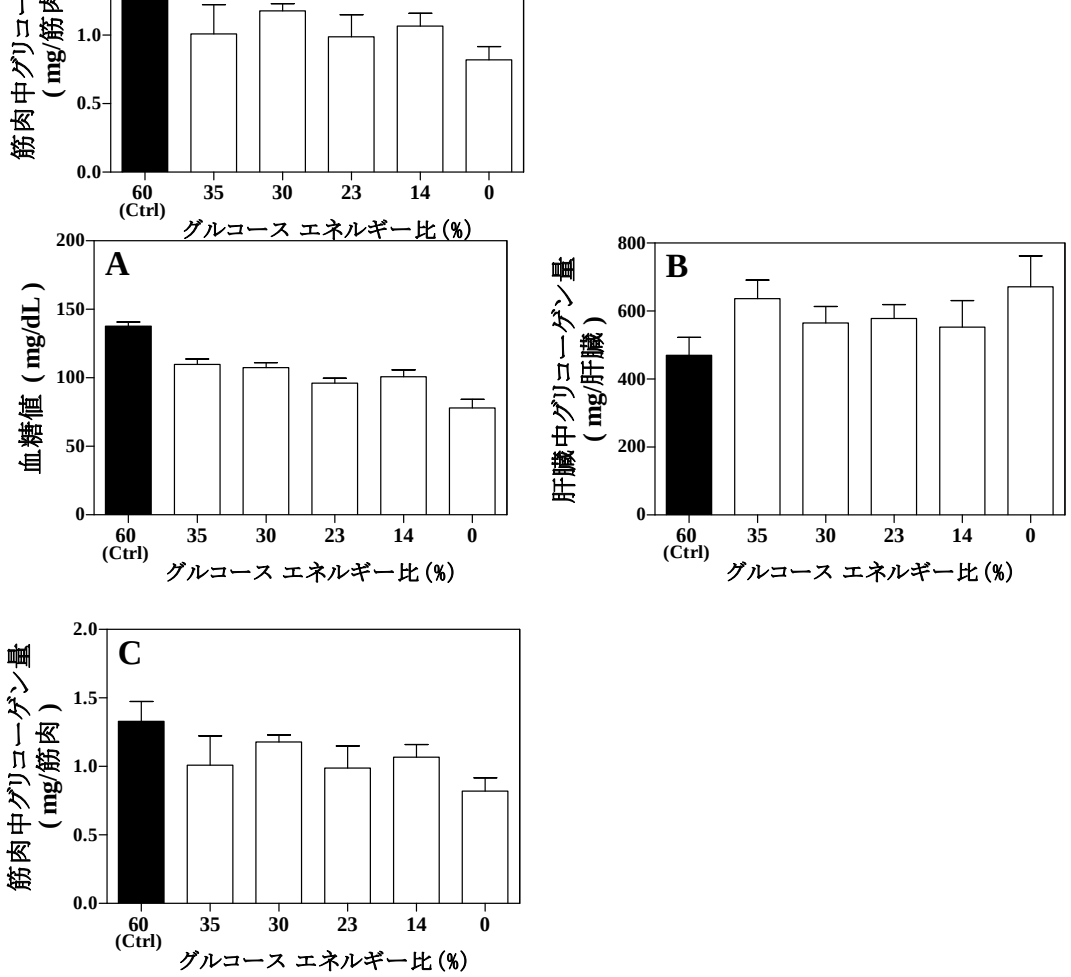

図 6. グルコース制限が血糖値（A），肝臓中グリコーゲン（B），筋肉（腓腹筋）中グリコーゲン（C）におよぼす影響

値は平均値 ± 標準誤差として示した．＊はコントロール（Ctrl）との有意差を示す（$p < 0.05$ ）．