

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月24日現在

機関番号：32707

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K07425

研究課題名(和文) 乱れた食習慣による肝臓の炎症促進と機能不全：糖尿病・感染症への関与

研究課題名(英文) Effects of unhealthy eating behaviors on the inflammatory response and liver dysfunction in mice

研究代表者

大荒田 素子 (oarada, motoko)

相模女子大学・栄養科学部・准教授

研究者番号：40211784

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：インスタント食品や加工食品には様々な添加物が使用されているが、生体への影響については意見がわかれている。そこで食品添加物の健康影響について新たな知見を得ることを試みた。中華麺に添加されるかんすいを長期間摂取したマウスで摂餌量が減少し、体重増加が抑制された。腎臓および脾臓で、がん原遺伝子やストレス応答遺伝子、腎臓・尿関連たんぱく質遺伝子、炎症関連遺伝子の発現量が増加した。また亜硝酸ナトリウム(加工肉の発色剤)を摂取したマウスの脾臓で、炎症関連遺伝子の発現量が顕著に変動した。これらの食品に含まれる食塩や油脂に加えて添加物も腎臓や脾臓の遺伝子発現の変動を介して生活習慣病に関与している可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現代人の乱れた食生活は、生活習慣病の大きな要因である。現代の食生活の特徴として、朝食抜きや過食、偏食などと共に、インスタント食品や加工食品の多用があげられる。これらの食品には、過剰な塩分や油分に加え、実に様々な食品添加物が含まれている。現在、日本では1,500種類以上の食品添加物の使用が許可されている。添加物は食品衛生法にしたがって安全性の評価がおこなわれているが、種類の多さや使用頻度の増加を考えると、添加物の健康影響についてはさらに検討が必要であると考えられる。研究途中ではあるが今回の結果はそれを裏付けるものとなった。

研究成果の概要(英文)：Higher consumption of fast-foods and processed foods is characteristic of modern dietary habits. The objective of our present study was to address the effects of food additives, which are frequently used in these foods, on human health. Oral intake of Kansui (Alkaline preparations for Chinese noodles) for 224 days caused decreases in food consumption and weight gain in mice. It also modestly but significantly altered the kidney expression of proto-oncogenes, stress response genes and genes related to the kidney and urine. Kansui also resulted in modulated expression of proto-oncogenes and inflammation-related genes in the spleen. Oral intake of sodium nitrite, coloring agent for processing meat, for 60 days led to a remarkable modulation of gene expression of immunocompetent cells and inflammatory mediators in the mouse spleen. These results suggest that food additives may be important contributors to physiologic derangement.

研究分野：食品学

キーワード：食品添加物 かんすい 亜硝酸塩 腎臓 脾臓 炎症関連遺伝子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現代人は多忙から、食事抜きやインスタント食品を利用しがちである。加えて近年の自然災害の増加や大規模化は、日持ちの良い加工食品の利用頻度を高めている。前回の研究で食事抜きの実験モデルとして、実験動物に絶食-復食を施した。その結果、様々な疾病に關与する炎症反応が肝臓で誘導されること、その原因成分が炭水化物であることが判明した。一方、インスタント食品や加工食品の多用は、塩分・油脂の過剰摂取やビタミン・ミネラル類の摂取不足に加えて、食品添加物の問題をはらんでいる。食品添加物の健康影響を明らかにすることは、現代の食生活の問題点を指摘し改善する上で重要である。

2. 研究の目的

現在、日本では保存料、甘味料、着色料などの目的で 1,500 種類以上の食品添加物の使用が許可されている。食品添加物は、食品衛生法にしたがって安全性の評価がおこなわれている。しかし、食品添加物の種類の多さや使用頻度の増加を考えると、食品添加物の健康影響についてさらなる検討を進める必要がある。本研究では、(1) pH 調整剤や発色剤として中華麺に含まれるかんすいの長期間摂取および、(2) 発色剤や酸化防止剤として加工肉に使用されている亜硝酸ナトリウム摂取の影響について調べた。さらに前回の研究から、不規則な食事(欠食やまとめ食い)が肝臓で炎症反応を誘導することが判明したので、引き続き、生活習慣病との関連が指摘されている白色脂肪組織の炎症状態に及ぼす不規則な食事の影響について調べた。実験結果より、乱れた食生活の健康影響について新たな知見を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) かんすい(日本食品添加物協会確認済:八宝商会) 0.5 g を熱湯 100ml に溶解した後、粉末の精製飼料(AIN-76 配合を一部改変) 50 g に混ぜ、冷却したものを実験食とした。かんすいの組成は、炭酸カリウム(無水) 47.0%、炭酸ナトリウム(結晶) 31.0%、炭酸ナトリウム(無水) 16.0%、ピロリン酸四ナトリウム(無水) 2.0%、ヘキサメタン酸ナトリウム 2.0%、トリポリリン酸ナトリウム 2.0%であった。調整した実験食は pH 7.0 であることを確認した。かんすいを含まない粉末の精製飼料を熱湯 100ml に溶解した後、冷却したものを対照食とした。実験食もしくは対照食をそれぞれ Balb/c マウス(メス, 5 週齢, n=16/群) に 224 日間自由摂取させた。餌は毎日交換し、摂取量を測定した。飼料摂取量として 1 週間の平均値を算出した(g/mouse/day)。飼育終了後、血液、肝臓、腎臓、脾臓、筋肉を採取し、各臓器から mRNA を抽出し、目的遺伝子の発現量をリアルタイム PCR 法により調べた。肝臓の遺伝子発現については、次世代シーケンサー法も用いて調べた。

(2) 亜硝酸ナトリウム 0.2 g を熱湯 100ml に溶解した後、粉末の精製飼料(AIN-76 配合を一部改変) 50g に混ぜ、冷却したものを実験食とした。亜硝酸ナトリウムを含まない粉末の精製飼料を熱湯 100ml に溶解し、冷却したものを対照食とした。Balb/c 系マウス(メス, 5 週齢, n=7/群) に亜硝酸ナトリウム添加食もしくは対照食をそれぞれ 11g/マウス/日の条件で与え、60 日間飼育した。餌は毎日交換し、摂取量を測定した。飼料摂取量として 1 週間の平均値を算出した(g/mouse/day)。飼育終了後、血液、肝臓、脾臓を採取し、各臓器から mRNA を抽出し、目的遺伝子の発現量をリアルタイム PCR 法により調べた。

(3) Balb/c 系マウス(メス, 5 週齢, n=27/群) に標準食(5%大豆油, 15%カゼイン食)もしくは高脂肪食(5%大豆油, 19.5%ラード, 15%カゼイン食)を 90 日間自由摂取させた。マウスを 48 時間絶食させた後、標準食で復食させた。その後、経時的に血液および白色脂肪組織(卵巣

周辺)を採取した。白色脂肪組織から mRNA を抽出し、炎症関連遺伝子の発現量をリアルタイム PCR 法により調べた。

4. 研究成果

(1) かんすいの長期間摂取の影響

飼料摂取量、体重および臓器重量に及ぼすかんすいの影響：実験食投与期間中の飼料摂取量は 5,7,22,24,29,32 週目に、実験群で対照群より少なかった(データは省略)。体重は 7~13、15、18、25~32 週目に対照群と比べて実験群で有意に低値を示した〔32 週目：29.40 ± 1.98 vs 27.64 ± 2.04g, (P=0.021)〕。臓器(肝臓、腎臓、脾臓)重量は両群間で有意差はみられなかった。血清アルブミン値と遊離脂肪酸値は、対照群と比較して実験群でわずかではあるが有意に増加した〔アルブミン値：3.06 ± 0.11 vs 3.15 ± 0.08 g/dL serum (P=0.023)。遊離脂肪酸値：0.61 ± 0.12 vs 0.70 ± 0.11 mEq/L serum (P=0.049)〕。血清グルコース濃度、総たんぱく質濃度、ALT 値および AST 値は 2 群間で有意差はみられなかった(データは省略)。

腎臓の遺伝子発現に及ぼすかんすいの影響：がん原遺伝子である Fos、Jun、Junb、Myc および Fosb の発現量と、ストレス応答遺伝子 Hspa1a と Mt2 の発現量が実験群で対照群の 135%以上に増加した。腎臓・尿関連たんぱく質遺伝子の Adipoq、Fabp1、Vnn1、Retn、Il11、Tnfrsf12a、B2m、Il1rn および Plau の発現量も実験群で対照群の 135%以上に増加した(図 1)。

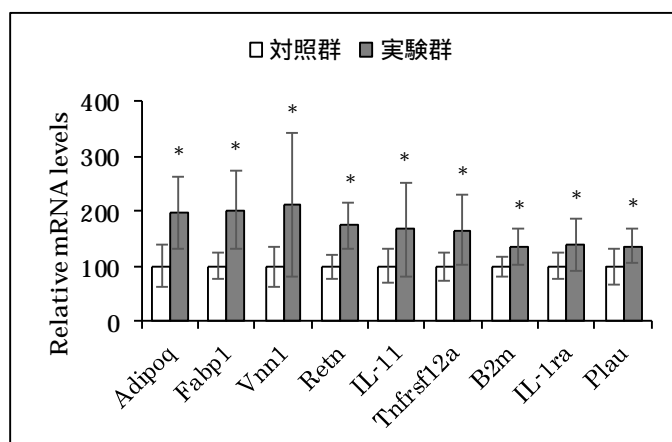


図 1 かんすい摂取に伴う腎臓での遺伝子発現量

脾臓の遺伝子発現に及ぼすかんすいの影響：Fos および Junb の発現量が、実験群で対照群の 135%以上に増加した。Jun や Fosb の発現量の増加は 132%であった。Mt2 の発現量は対照群の 150%に増加したが、腎臓と異なり Hspa1a の発現量は増加しなかった。炎症関連遺伝子である Il10、Il6、Ccl2、Il1b、Il11、Adgre1、Ccl5、Spp1、Cd14、Mpo、Cxcl1、S100a8 および S100a9 の発現量が、実験群で対照群の 135%以上に増加した(図 2, データの一部省略)。同じ炎症関連遺伝子である COX2、Msr1 および Tlr4 の発現量が実験群で対照群の 133%に増加した。

肝臓の遺伝子発現に及ぼすかんすいの影響：Mt1 および Mt2 の発現量は、それぞれ対照群の 285%および 440%に増加した。また Fos、Junb および Fosb の発現量が、実験群で対照群の 135%以上に増加した。腎臓でみられた Jun、Myc および Hspa1a の増加は肝臓ではみられなかった。炎症関連遺伝子では IL1rn が実験群で対照群の 164%に増加したが、それ以外の遺伝子で有意な増加は認められなかった。

筋肉の遺伝子発現に及ぼすかんすいの影響：Junb の発現量が実験群で対照群の 145%に

増加したが、他のがん原遺伝子や Hspa1a、Mt1 および Mt2 の発現量の実験群での増加はみられなかった（データは省略）。

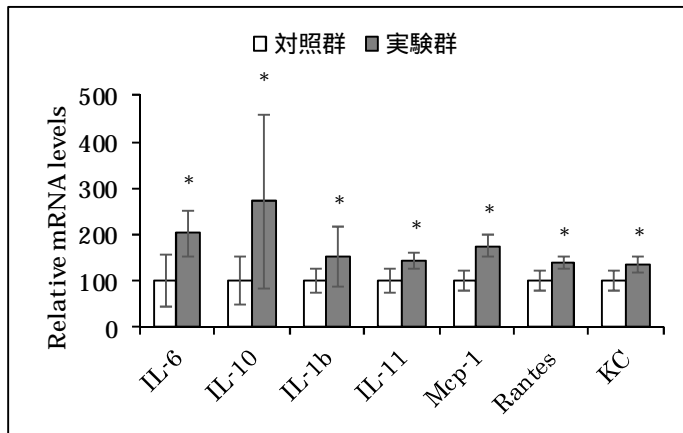


図2 かんすい摂取に伴う脾臓での遺伝子発現量

(2) 亜硝酸ナトリウム摂取の影響

飼料摂取量、体重および臓器重量に及ぼす亜硝酸ナトリウムの影響：実験食投与期間中の飼料摂取量、実験食投与後の体重および肝臓と腎臓の各重量は、対照群と実験群の間で有意差は生じなかった〔飼料摂取量： 9.59 ± 1.19 vs 9.23 ± 1.18 g/mouse/day；体重： 23.85 ± 1.13 vs 23.75 ± 0.70 g；肝臓重量： 1.128 ± 0.069 vs 1.145 ± 0.072 g；腎臓（左右）重量： 280.7 ± 10.4 vs 285.9 ± 11.2 mg〕。脾臓重量は対照群と比べて実験群で有意に増大した〔 109.3 ± 6.6 vs 165.9 ± 19.8 mg ($P=0.000$)〕。2群間の血清ALT値に有意差はみられなかった（データは省略）。

脾臓の遺伝子発現に及ぼす亜硝酸ナトリウムの影響：Hspa1a、Mt2 および Myc の発現量が対照群と比べて実験群で増加した。好中球発現遺伝子である Mpo、Ly6g、S100a8 および S100a9 の発現量も実験群で増加した。一方、マクロファージ関連遺伝子である Adgre1 と Cd14、ヘルパーT細胞マーカーである Cd4、NK細胞マーカーの Cd56 および成熟樹状細胞マーカー Cd83 の発現量は実験群で減少した。さらに炎症関連遺伝子の Tnf、Il6、Ifng、Il1a、Il1b、Il10、Il18、Tgfb、Tlr2、COX2、Icam1、Vcam1、Il1rn および Il10ra の発現量が対照群と比べて実験群で低下した（図3、データの一部省略）。

肝臓の遺伝子発現に及ぼす亜硝酸ナトリウムの影響：S100a9 と Tnf の発現量が対照群に比べて実験群でそれぞれ 164%および 136%に増加した（ $P<0.05$ ）。しかし、脾臓でみられた様な多数の遺伝子の顕著な発現量の変動は、肝臓ではみられなかった（データは省略）。

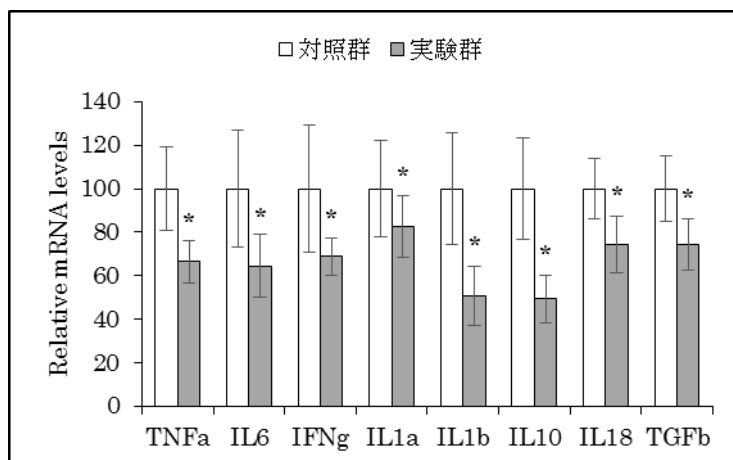


図3 亜硝酸ナトリウム摂取に伴う脾臓での遺伝子発現量

(3) 絶食-復食が白色脂肪組織の炎症状態に及ぼす影響

体重、白色脂肪重量に及ぼす絶食 - 復食の影響：絶食前の体重および白色脂肪組織（卵巣周辺）の重量は、標準食摂取マウス（以下、標準体重マウス）と比べて高脂肪食摂取マウス（以下、過体重マウス）で有意に高値を示した（体重：24.35 ± 1.24 vs 31.98 ± 2.40g、白色脂肪重量：71.75 ± 12.79 vs 305.00 ± 44.57mg）。絶食により標準体重マウス、過体重マウス共に体重が有意に低下したが、復食 10 時間後には絶食前の値まで回復した（絶食直後：21.17 ± 1.34 vs 27.92 ± 2.32g、復食 10 時間後：25.11 ± 1.08 vs 30.33 ± 2.06g）。絶食により標準体重マウスで白色脂肪重量が低下したが、過体重マウスでは有意な低下は生じなかった（29.50 ± 22.49 vs 260.60 ± 52.83mg）。復食 10 時間および 20 時間の摂餌量は標準体重マウスと過体重マウス間で有意差は生じなかった（10 時間：3.4 ± 0.1 vs 3.4 ± 0.8g/mouse、20 時間：4.8 ± 0.2 vs 5.2 ± 0.5g/mouse）。復食に伴う血清 ALT 値の増加は、標準体重マウスに比べて過体重マウスで軽減された（絶食直前：10.45 ± 2.69 vs 6.84 ± 2.01 IU/L、復食 10 時間後：58.22 ± 19.99 vs 14.52 ± 3.69 IU/L）。

白色脂肪組織の炎症関連遺伝子発現に及ぼす絶食 - 復食の影響：絶食前では標準体重マウスと比べて過体重マウスで炎症関連遺伝子 Enpp3、Emr1、Adipoq、Il10、Ccl2、KC、Cxcr2、Il1a および Il1ra の発現量が高値を示した（データは省略）。絶食 - 復食により標準体重マウス、過体重マウス共に、Il1b、Il6、Ccl2、KC、Cxcl2、Il1a、TLR4、Il10、Adipoq、Cxcr2、Enpp3 の発現量が増加した（図 4、データの一部省略）。

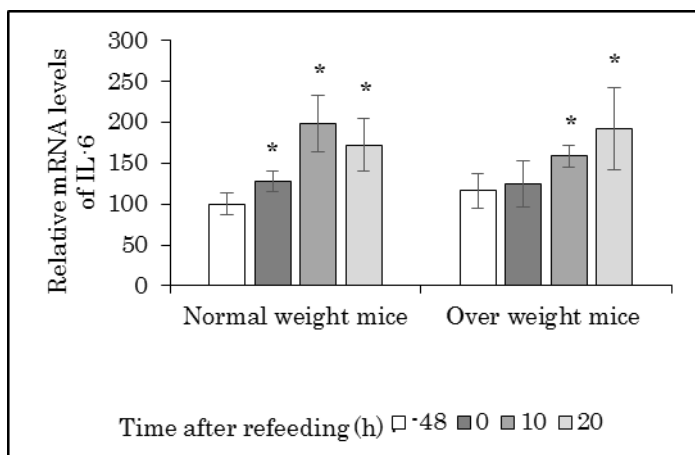


図 4 絶食-復食に伴う白色脂肪組織の IL-6 遺伝子発現量

かんすいは中華麺特有の風味やこし、色合いを引き出す。一般に中華麺を製造する場合、かんすい（粉末）は小麦粉に対して 1～1.5%の割合で使用されている。本実験でも、粉末精製飼料に対して 1%の割合でかんすいを添加した。毎食中華麺を食べることはないと思うが、今回の実験では、腎臓、脾臓および肝臓で、がん原遺伝子、ストレス応答遺伝子、炎症関連遺伝子および腎臓・尿関連たんぱく質遺伝子の発現量が変動した。中華麺の多食による塩分や油分の摂りすぎは生活習慣病につながる。今回の結果は、塩分や油分に加えて、かんすいの影響も考慮する必要があることを示唆している。かんすいの摂取により体重増加が抑制した理由の一つとして、飼料摂取量の低下が考えられる。調整したかんすい添加食はアルカリ性ではなく中性（pH7.0）であったことから、食欲低下の原因については今後検討する必要がある。

ハムやソーセージなどの食肉製品や、いくらやたらこなどの魚卵には、発色剤として硝酸カリウム（KNO₃）、硝酸ナトリウム（NaNO₃）および亜硝酸ナトリウム（NaNO₂）の使用が許

可されている。今回、亜硝酸ナトリウムの摂取により脾臓で生じた炎症関連遺伝子の発現量の低下は、マクロファージや T 細胞、NK 細胞の浸潤が減少したことによるものと考えられる。その原因や個体の免疫系に与える影響については、現在検討中である。一方、脾臓と比べると肝臓の遺伝子発現量の変動は小さく、血清 ALT 値も正常であり、予想に反して肝臓への影響は少なかった。肝臓の遺伝子発現への影響について、次世代シーケンサー法も用いて調べた。しかし実験の性質上、各群 4 匹（合計 8 匹）で解析せざるを得なかったためか、発現量に有意差が生じた遺伝子は 20 数種類にとどまった（データは省略）。現在、日本で亜硝酸塩は NO₂ として 0.07g/kg まで食肉製品に使用が認められている。本実験では、実験食（粉末の精製飼料+熱湯）に 0.13%の割合で亜硝酸ナトリウムを添加した。よって NO₂ が 0.09%の割合で含まれていたことになり、最大使用許可量（0.007%）の約 13 倍の濃度で含まれていたことになる。また実際の食生活で亜硝酸ナトリウム添加食品のみを摂ることはないので、今後、添加量を減らし長期間摂取した場合の影響について調べる必要がある。

一方、継続研究として不規則な食事が炎症状態に及ぼす影響について調べたところ、肝臓と同様に白色脂肪組織でも絶食 復食により炎症反応が促進することが明らかになった。不規則な食事が肝臓のみならず白色脂肪組織の炎症も促進することで、様々な疾病に関与することが示唆される。

人々は、その手軽さ、安さの面からインスタント食品や加工食品を利用しがちである。本研究ではこれらの食品に多量に含まれている食品添加物の健康影響を明らかにする目的で、かんすいおよび亜硝酸ナトリウムを動物に摂取させた。その結果、かんすいや亜硝酸ナトリウムの過剰摂取は、腎・尿関連たんぱく質遺伝子や炎症関連遺伝子などの発現量の変動を誘発することが明らかになった。我々は毎日の食生活で、量は少ないが非常に多種類の食品添加物を摂取している。一種類の添加物を多量に摂取した場合と、多種類の添加物を少量ずつ摂取した場合について比較はできないが、今回の結果から、食品添加物の健康影響に関しては更に研究を続ける必要があると考える。

5．主な発表論文等

現在執筆中

6．研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：五ノ井 透

ローマ字氏名：(GONOI Tohru)

所属研究機関名：千葉大学

部局名：真菌医学研究センター

職名：教授

研究者番号（8桁）：30134365

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。