

令和元年6月17日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K18034

研究課題名(和文) 日常的なフルクトース摂取はNAFLD発症を促進するか？

研究課題名(英文) Dose fructose intake promote the development of NAFLD?

研究代表者

山元 涼子 (Ryoko, Yamamoto)

弘前大学・農学生命科学部・助教

研究者番号：50580429

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：マウスに10%および30%のフルクトースを24週間飲水させ、NAFLD発症の評価を行った。その結果、フルクトースが直接的にNAFLDを促進するといった結果は得られなかった。一方で、30%フルクトース摂取で肝臓重量の増加や肝臓中のAGEsは増加していたことから、さらに長期間にわたって摂取した場合のリスクについては検討の余地がある。しかしながら本研究の結果からは、総エネルギー摂取量に差がない条件では、フルクトースが直接的なNAFLDの誘発要因にはならないと考えられ、NAFLD予防にはフルクトースのような特定の食品成分よりもまずはエネルギー摂取量を考慮する必要があることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NAFLD患者は世界的にも増加が問題となっており、急速な病態解明と予防・治療法の確立が求められている。現在、NAFLDの有効な治療薬は見つかっておらず、治療方針の第一選択は食生活の改善である。このように食生活との関連が深いNAFLDにおいて、フルクトースと病態発症に着目した本研究は学術的にも社会的にも重要な研究である。本研究では、ヒトの日常的な摂取量を想定してマウスへの投与量を決定しており、疾患に対する食品のリスクを過大評価することなく、ヒト食生活の実践に即した科学的根拠の蓄積への貢献することを目的としており社会的意義は高いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：To clarify the relationship between fructose intake and the onset of NAFLD (non-alcoholic fatty liver disease), 10% or 30% fructose water were administered in mice for 24 weeks. As a result, fructose did not directly promote the onset of NAFLD in mice, because that of NAFLD was also confirmed in the control group. However, 30% fructose drank mice were increased liver weight and liver AGEs (advanced glycation end products). Hence, fructose intake for a long time might promote the onset of NAFLD.

The results of this study suggested that fructose dose not directly trigger NAFLD under conditions where there is no difference in total energy intake between the control group and fructose drank group. It might be necessary to first consider energy intake for prevention of NAFLD rather than specific food ingredients as fructose.

研究分野：食生活学，食品科学

キーワード：NAFLD NASH フルクトース

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

### 1. 研究開始当初の背景

世界保健機関 (WHO) は、肥満や生活習慣病などの予防のために単純糖質の摂取量を 1 日の総エネルギー摂取量の 10% 以下にすることを推奨し、さらに厳しい目標値として 5% 以下を示している。単純糖質の一種であるフルクトースは、果物や野菜など食品中に広く存在している。また、フルクトース含量の高い果糖ブドウ糖液糖は甘味料として清涼飲料水などに広く利用されており、日常的に摂取が容易な糖質である。フルクトースは肝臓中に速やかに取り込まれ、グリセルアルデヒドに代謝された後、脂肪合成を促進する。また、フルクトースやグリセルアルデヒドはタンパク質中の遊離のアミノ基と反応し、生活習慣病との関連が示唆されているような終末糖化産物 (Advanced Glycation End-products: AGEs) を産生することも知られている。このような背景から、単純糖質の中でもフルクトースは特に生活習慣病発症との関連が懸念されている。

生活習慣病の肝臓における表現型として知られている非アルコール性脂肪性肝疾患 (Non-alcoholic fatty liver disease: NAFLD) は世界中で増加しており、軽視できない疾患の 1 つである。NAFLD の中でも、特に非アルコール性脂肪肝炎 (Non-alcoholic steatohepatitis: NASH) は肝硬変、肝がんの発症率が高まることが知られている。病態発症と食事との関連が多数報告されているが、未だ病態解明には至っておらず、食事と病態との関連を明らかにすることが早急に求められている。これまでに、NASH や肝繊維化を伴う重症型の NAFLD 患者はフルクトース摂取が多いことが報告されている一方で、エネルギー摂取量を調整するとフルクトースのような特定の成分が病態発症のリスクとならないとの報告もある。また、動物実験によるフルクトース誘発 NAFLD/NASH モデルの作製が試みられているが、フルクトース誘発 NAFLD/NASH モデルの多くは、ヒトの食生活では考えられない量で実験が行われているといった問題を抱えている。すなわち、日常的なフルクトースの摂取が本当に NAFLD 発症のリスク因子となっているかは未だ解明に至っていない。また、近年、NAFLD/NASH 発症とフルクトース由来の AGEs が病態発症に及ぼす影響についても注目が集まっているが、病態発症との関連は十分に解明されていない。

### 2. 研究の目的

研究代表者は、これまでに 10% フルクトースの飲水実験において、フルクトースと NASH との関連について研究を進めてきた。その結果、フルクトースは NASH の直接的な要因にはならないだけでなく脂肪肝発症に対しても疑問を残す結果となった。しかしながら、肝臓の組織学的検査でフルクトース摂取による炎症細胞の浸潤が確認されていたことから、引き続き日常的なフルクトースの摂取と肝臓病変について検討を行う必要があると考えた。そこで、本研究では、フルクトースの摂取が肝臓における脂肪蓄積に及ぼす影響について再検討を行うとともに、肝臓の炎症所見と AGEs 蓄積に着目し、日常的なフルクトースの摂取が NAFLD 発症に及ぼす影響について検討することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 動物実験の概要

雌性 C57BL/6J マウスに 10% または 30% フルクトースを自由飲水させ、投与開始から 24 週間後に解剖し、採血および臓器 (肝臓、脂肪組織) の摘出を行った。摘出した肝臓は、重量測定後直ちに切り分け、一部は RNAlater または 10% 中性ホルマリンに浸漬し、それぞれ totalRNA の抽出または組織切片の作製に用いた。残りは液体窒素で急速凍結し、使用まで -80°C で保存した。飼育期間中の飼料は AIN93M スクロース無添加試料を自由摂食させた。飼育期間中は飲水量、摂食量および体重測定を行った。

#### (2) ヒト NAFLD 診断項目を考慮した血液生化学検査および肝臓組織学的検査

「NASH・NAFLD の診療ガイド (日本肝臓学会 編)」を参考に、血漿を用いて次の項目について測定を行った: アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST), アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT), トリグリセリド (TG), 総コレステロール (TC), グルコース (Glc) および C 反応性タンパク (CRP)。肝臓は、組織切片を作製し、NAFLD activity score (NAS) を用いて評価した。また、Folch 法を用いて肝臓からの脂質抽出を行い、肝臓中の総脂質量、TG、TC 量の測定を行った。

#### (3) 脂肪肝関連遺伝子発現への影響評価

マウスの肝臓より total RNA を抽出し、PCR array を用いて脂肪肝関連遺伝子の遺伝子発現解析を行った。

#### (4) 血漿および肝臓中の AGEs 蓄積への影響評価

ELISA 法を用いて、血漿および肝臓中の AGEs 量の測定を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 日常的なフルクトースの摂取がエネルギー摂取量および体重、臓器重量に及ぼす影響

本研究では、一般的な清涼飲料水の濃度である 10% (10% フルクトース群) と既報の論文を参考に 30% (30% フルクトース群) の濃度のフルクトースを 24 週間飲水させた。飼育期間中の平均的な摂食量はコントロール群と比較して 10%、30% フルクトース群ともに有意に低下したが、

飲水量は増加していた。食餌，飲水量に差は認められたものの，総エネルギー量については，コントロール群と 10%，30%フルクトース群との間に有意な差は認められなかった。フルクトースが 1 日のエネルギー総量に占める割合を算出した結果，いずれにおいても WHO が推奨している総エネルギーに対して 10% 以下といった値よりも高い値となった。24 週間飼育終了時の肝臓重量においては，コントロール群と比較して 30%フルクトース群で有意に増加していたが，体重および脂肪重量は 3 群間で有意な差は認められなかった。今回の飼育条件では，エネルギー摂取量に差がない場合，フルクトースは直接的に体重増加には影響しないことが示唆された。

## (2) 血液生化学検査および肝臓中脂肪蓄積，NAFLD activity score への影響

今回，血液生化学検査の項目として AST，ALT，Glc，TG，TC および CRP の 6 項目の測定を行ったが，全ての項目においてコントロール群とフルクトース群で有意な差は認められなかった。

今回測定した項目は，NAFLD のスクリーニングに簡便で有用な検査項目とされる一方で，一部の患者の中には，これら項目が正常範囲であることも報告されている。そのため，ヒトでの確定診断は肝臓の組織学的検査が必須とされるため，本研究でも組織学的検査を行うとともに，肝臓中の脂肪蓄積について検討を行った。NAS の結果では有意差は認められないものの，フルクトースの濃度依存的に NAS は増加していた（図 1）。しかしながら今回，コントロール群でも脂肪肝を発症する個体が確認され，フルクトースが NAFLD 発症の直接的な原因とは言い難い結果となった。さらに肝臓の総脂質，TG，TC 量の定量分析を行ったが，いずれの結果においても 3 群間で有意な差は認められなかった。

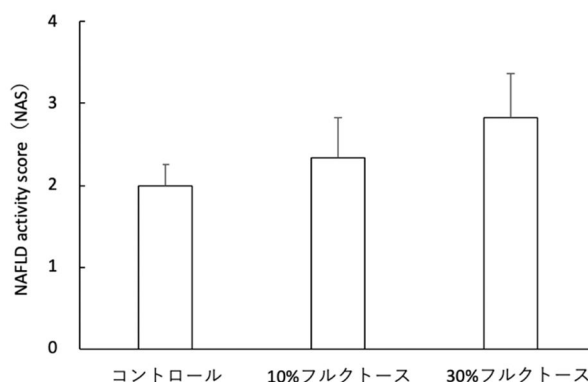


図1. NAFLD activity score (NAS) による肝臓病変の評価  
NASはフルクトース濃度依存的に高値を示したものの，3群間で有意差は認められなかった。

## (3) 脂肪肝関連遺伝子の発現解析

血液生化学検査値や肝臓の総脂質量に差がないものの，30%フルクトース群で肝臓重量の有意な増加と NAS の増加傾向が認められたことから，30%フルクトース群の脂肪肝関連遺伝子の発現解析を行った。その結果，ターゲットとした遺伝子群のうち 10 遺伝子の発現抑制と 3 遺伝子の発現誘導が確認された。しかしながら，フルクトース摂取による肝臓重量の増加が確認された原因解明には至るような遺伝子発現の挙動は見出せなかった。

## (4) 血漿および肝臓への AGEs 蓄積評価

今回，フルクトースの摂取による AGEs 蓄積を評価するため，血漿および肝臓の AGEs の定量を行った。その結果，血漿では 3 群間で有意な差は認められなかったが，肝臓では 30%フルクトース群において，コントロール群と比較して肝臓中の AGEs が増加していた。炎症との関連を調べるため，血中の CRP との相関を調べたが相関関係は認められなかった。

## (5) まとめ

今回，雌性 C57BL/6J マウスに 10%，30%フルクトースを 24 週間摂取させ，フルクトース摂取による NAFLD のリスク評価を行った。その結果，一般的な生化学検査や肝臓の組織学的検査の結果ではフルクトース摂取による NAFLD/NASH の促進作用は確認されなかった。しかしながら，肝臓重量の増加や AGEs の蓄積など，フルクトース摂取に伴う何らかの変化は確認されたため，さらに長期にわたってフルクトースを摂取した場合，肝臓病変につながる可能性は否定できない。既報のフルクトース誘発 NAFLD モデルでは，フルクトース摂取にともない総エネルギー摂取量が増加していたが，今回はコントロールとエネルギー摂取量に差が認められなかった。すなわち，今回の総エネルギー摂取量に差がない条件では，24 週間のフルクトース摂取では NAFLD 発症の直接的な要因にはならないと考えられ，NAFLD/NASH の予防にはまずはフルクトースなど特定の食品成分の摂取量制限よりはエネルギー摂取量過多を考慮することが必要であることが示唆された。

5 . 主な発表論文等

〔図書〕(計1件)

有蘭幸司、山元涼子 他、食品の安全、南江堂、2018、228-232