

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 10 月 20 日現在

機関番号：16201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25560053

研究課題名(和文) 遺伝性糖尿病ラットにおける糖質制限食長期摂取の有効性と安全性に関する基礎的研究

研究課題名(英文) The basic study on effects of long-term feeding of very low-carbohydrate diet on glucose tolerance and safety in the genetic diabetic rats.

研究代表者

松尾 達博 (Matsuo, Tatsuhiro)

香川大学・農学部・教授

研究者番号：20270019

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝性糖尿病ラットであるGoto-Kakizaki (GK) ラットを用いて、糖質制限食の長期摂取による有効性と安全性を調べた。3週齢のGK雄ラット48匹を用い、16匹ずつ高糖質食群、高脂肪食群、糖質制限食群に分け、全匹死亡するまで飼育した。その結果、糖質制限食摂取により一時的に耐糖能の悪化が確認されたが、長期摂取により改善した。また、各群ラットの平均寿命には有意な差は見られなかった。これらのことから、糖質制限食の長期摂取による寿命延長効果は得られなかったが、糖質制限食の長期摂取による有効性と安全性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The effects of long-term feeding of very low-carbohydrate diet on glucose tolerance and safety were studied in the genetic diabetic rats, Goto-Kakizaki (GK) rats. Forty-eight male GK rats (3 weeks of age) were divided by 16 into high-carbohydrate (HC) diet group, high-fat (HF) diet group, and very low-carbohydrate (LC) diet group and bred until all the rats died. The glucose tolerance was confirmed by feeding of LC diet temporarily, but was improved by a long-term feeding. In addition, the mean life span did not differ among the three groups. These results suggest that long-term feeding of LC diet improve glucose tolerance compared with HC and HF diets, but did not influence life span in GK rats.

研究分野：栄養学

キーワード：糖質制限食 糖尿病 耐糖能 寿命 安全性 遺伝性糖尿病ラット

## 1. 研究開始当初の背景

昨今、日本では生活習慣と社会環境の変化に伴い、糖尿病患者数が急速に増加している。糖尿病はひとたび発症すると完治が難しい疾患である。糖尿病を放置すると網膜症、腎症、および神経障害などの合併症が起こり、失明や透析治療が必要となることもある。

現在、糖尿病の治療法は食事療法および薬物療法の併用が一般的であり、日本の医療機関で糖尿病治療食として一般的に指導されているのは、カロリー制限食である。しかし、食後高血糖が血管障害を引き起こすことが報告され、糖質を多く含む現在の糖尿病治療食では不適切である可能性が示唆されている。そこで食後高血糖を抑制することを目的とした糖質制限食が近年話題になっている<sup>1)</sup>。

糖質制限食は糖尿病患者の高血糖状態を短期間で劇的に改善することが報告されているが<sup>2)</sup>、長期(数年~生涯)にわたる有効性と安全性については疑問視されており、実験動物を用いた糖質制限食の長期摂取による有効性についても、ほとんど報告されていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、日本人に多い痩せの2型糖尿病に対する長期間の効果に着目し、非肥満性の2型糖尿病モデルラットでありインスリン分泌不全を有することが知られるGoto-Kakizaki (GK) ラットを用いて、糖質制限食の生涯にわたる摂取がラットに及ぼす影響を検討し、長期間の2型糖尿病に対する有効性および安全性の有無を調べた。

## 3. 研究の方法

### (1) 実験動物および飼育条件

本研究は、香川大学動物実験委員会の承認を得て「香川大学動物実験規則」に従って実施した。実験動物には、5週齢のGK雄ラット(日本エスエルシー株式会社、静岡)48匹を用い、高糖質食(HC)群(n=16)、高脂肪食(HF)群(n=16)、糖質制限食(LC)群(n=16)に分けた。各実験食のタンパク質、脂質、炭水化物のエネルギー比については、それぞれHC:21/24/55、HF:21/56/23、LC:31/56/13とした。本飼育期間については一生涯とし、体重および食餌摂取量については2日おきに記録した。

### (2) 経口グルコース負荷試験(OGTT)

本飼育開始後、17、33、49および65週目に12時間絶食下で各群7-8匹ずつ実施した。投与前の採血直後に、ゾンデを取り付けた5mLシリンジを用いて、グルコース溶液を2g/kg経口投与した。経口投与後30、60および120分に採血を行った。得られた血漿のグルコースおよびインスリン濃度を市販キットを用いて測定した。

### (3) 血中脂質濃度測定

本飼育開始後、17、33、49および65週目の血漿総コレステロール、HDL-コレステロールおよび中性脂肪濃度を、市販キットを用いて測定した。

### (4) 血圧測定

本飼育開始後、19、35、51および67週目の収縮期および拡張期血圧を、血圧測定器(非観血式自動血圧測定装置(マウス、ラット)BP-98A、株式会社ソフトロン、東京)を用いたテールカフ法により測定した。

### (5) 統計方法

統計解析には、エクセル統計(エクセル統計2008 for Windows、株式会社社会情報サービス)を用いた。FisherのPLSD法にて各群間で有意差の有無を検定した。 $p < 0.05$ で有意差ありと判定した。

## 4. 研究成果

### (1) 体重、摂食量、および食餌効率

初期体重、本飼育後16、32、および48週の体重および体重増加量には各群間で有意な差は見られなかった(初期体重:HC,  $108 \pm 2$ g; HF,  $109 \pm 2$ g; LC,  $108 \pm 2$ g、16週:HC,  $362 \pm 8$ g; HF,  $370 \pm 8$ g; LC,  $365 \pm 7$ g、32週:HC,  $398 \pm 8$ g; HF,  $413 \pm 9$ g; LC,  $396 \pm 7$ g、48週:HC,  $431 \pm 9$ g; HF,  $447 \pm 10$ g; LC,  $424 \pm 8$ g)。64週後の体重および体重増加量は、HF群と比較してLC群で有意に低値を示した(HC,  $468 \pm 10$ g; HF,  $482 \pm 11$ g; LC,  $450 \pm 9$ g)。

平均食餌摂取量は、いずれの週においてもHC群と比較してHFおよびLC群で低値を示した(16週:HC,  $15.5 \pm 0.4$  g/d; HF,  $12.4 \pm 0.3$ g/d; LC,  $12.3 \pm 0.2$ g/d、32週:HC,  $15.8 \pm 0.3$  g/d; HF,  $12.6 \pm 0.2$ g/d; LC,  $12.7 \pm 0.2$ g/d、48週:HC,  $16.0 \pm 0.4$ g/d; HF,  $12.8 \pm 0.2$ g/d; LC,  $12.7 \pm 0.2$ g/d、64週:HC,  $16.8 \pm 0.3$  g/d; HF,  $13.6 \pm 0.2$ g/d; LC,  $13.5 \pm 0.2$ g/d)。

また食餌効率は、16、32、および64週においてHC群と比較してHFおよびLC群で有意に高値を示し、本飼育後32週においてHC、HF、およびLC群の順で有意に高値を示した(16週:HC,  $146.8 \pm 2.3$  g/kg; HF,  $188.0 \pm 3.2$ g/kg; LC,  $186.5 \pm 2.6$ g/kg、32週:HC,  $82.2 \pm 1.4$ g/kg; HF,  $107.3 \pm 2.0$ g/kg; LC,  $103.1 \pm 1.4$ g/kg、48週:HC,  $60.0 \pm 1.0$ g/kg; HF,  $78.2 \pm 1.6$ g/kg; LC,  $73.9 \pm 0.9$ g/kg、64週:HC,  $47.8 \pm 0.8$  g/kg; HF,  $61.0 \pm 1.3$ g/kg; LC,  $56.6 \pm 0.9$ g/kg)。

### (2) OGTTにおける血漿グルコース濃度

OGTTにおける血漿グルコース濃度は、本飼育後17週においてHC群と比較してLC群で高値を示したが、本飼育後65週の投与後60分においてHC群と比較してLC群で有意に低値を示した。17週目の各群の血漿グルコース

濃度は、投与前：HC, 150.9±2.7mg/dL；HF, 167.5±12.4mg/dL；LC, 158.6±4.1mg/dL、投与後 30 分：HC, 229.7±10.9mg/dL；HF, 283.1±13.5mg/dL；LC, 253.7±12.5mg/dL、投与後 60 分：HC, 325.3±23.3mg/dL；HF, 353.5±10.9mg/dL；LC, 346.2±28.0mg/dL、投与後 90 分：HC, 294.7±14.6mg/dL；HF, 344.7±11.3mg/dL；LC, 300.7±12.6mg/dL、投与後 120 分：HC, 275.0±11.2mg/dL；HF, 308.2±22.4mg/dL；LC, 304.5±17.2mg/dL であった。33 週目の各群の血漿グルコース濃度は、投与前：HC, 139.8±2.5mg/dL；HF, 136.8±5.1mg/dL；LC, 138.3±4.1mg/dL、投与後 30 分：HC, 245.3±11.5mg/dL；HF, 263.9±10.8mg/dL；LC, 248.3±10.5mg/dL、投与後 60 分：HC, 283.1±11.3mg/dL；HF, 298.6±25.9mg/dL；LC, 272.8±13.3mg/dL、投与後 90 分：HC, 306.6±14.4mg/dL；HF, 309.2±23.0mg/dL；LC, 297.5±11.7mg/dL、投与後 120 分：HC, 227.4±14.8mg/dL；HF, 264.8±29.7mg/dL；LC, 255.0±30.0mg/dL であった。49 週目の各群の血漿グルコース濃度は、投与前：HC, 148.7±7.1mg/dL；HF, 135.5±4.1mg/dL；LC, 144.9±2.3mg/dL、投与後 30 分：HC, 247.9±18.2mg/dL；HF, 240.9±3.9mg/dL；LC, 238.2±11.9mg/dL、投与後 60 分：HC, 261.7±14.8mg/dL；HF, 251.9±6.8mg/dL；LC, 276.9±15.1mg/dL、投与後 90 分：HC, 300.6±12.6mg/dL；HF, 276.9±11.0mg/dL；LC, 188.0±15.3mg/dL、投与後 120 分：HC, 269.9±14.5mg/dL；HF, 253.8±6.6mg/dL；LC, 248.1±16.6mg/dL であった。65 週目の各群の血漿グルコース濃度は、投与前：HC, 145.0±5.9mg/dL；HF, 141.4±3.9mg/dL；LC, 139.2±2.6mg/dL、投与後 30 分：HC, 271.7±10.6mg/dL；HF, 241.2±13.3mg/dL；LC, 258.6±16.7mg/dL、投与後 60 分：HC, 301.7±12.9mg/dL；HF, 272.4±11.6mg/dL；LC, 258.6±11.5mg/dL、投与後 90 分：HC, 289.3±11.6mg/dL；HF, 279.3±11.5mg/dL；LC, 247.4±16.4mg/dL、投与後 120 分：HC, 279.3±11.5mg/dL；HF, 141.4±3.9mg/dL；LC, 139.2±2.6mg/dL であった。

#### (3) OGTT における血漿インスリン濃度

OGTT における血漿インスリン濃度は、本飼育 17 週目の投与後 60 分において HC 群と比較して LC 群で有意に低値を、投与後 90 分において HC および HF 群と比較して LC 群で有意に高値を示し、投与後 120 分においては HC 群と比較して HF 群で有意に低値を示した。また、本飼育後 33 週の投与後 120 分においては HC および HF 群と比較して LC 群で有意に低値を示した。さらに本飼育後 65 週の投与後 30 分において HF 群と比較して HC および LC 群で有意に低値を示した。17 週目の各群の血漿インスリン濃度は、投与前：HC, 2.5±0.3ng/mL；HF, 3.0±0.2 ng/mL；LC, 2.7±0.2 ng/mL、投与後 30 分：HC, 3.5±0.4ng/mL；HF, 3.5±0.5 ng/mL；LC, 3.5±

0.5ng/mL、投与後 60 分：HC, 3.4±0.3ng/mL；HF, 2.4±0.6 ng/mL；LC, 1.7±0.3 ng/mL、投与後 90 分：HC, 1.8±0.2ng/mL；HF, 1.5±0.3 ng/mL；LC, 4.2±0.5 ng/mL、投与後 120 分：HC, 4.2±0.5ng/mL；HF, 2.5±0.5 ng/mL；LC, 3.8±0.4 ng/mL、であった。33 週目の各群の血漿インスリン濃度は、投与前：HC, 3.9±0.3ng/mL；HF, 3.9±0.3 ng/mL；LC, 3.7±0.3 ng/mL、投与後 30 分：HC, 5.3±0.3ng/mL；HF, 5.2±0.6 ng/mL；LC, 4.3±0.4ng/mL、投与後 60 分：HC, 5.2±0.3ng/mL；HF, 5.2±0.3 ng/mL；LC, 4.9±0.6ng/mL、投与後 90 分：HC, 4.7±0.3ng/mL；HF, 4.9±0.4 ng/mL；LC, 4.5±0.3 ng/mL、投与後 120 分：HC, 4.5±0.2ng/mL；HF, 4.2±0.2 ng/mL；LC, 3.4±0.2 ng/mL、であった。49 週目の各群の血漿インスリン濃度は、投与前：HC, 4.2±0.2ng/mL；HF, 4.2±0.3 ng/mL；LC, 4.0±0.3 ng/mL、投与後 30 分：HC, 4.5±0.2ng/mL；HF, 5.3±0.2 ng/mL；LC, 4.6±0.2ng/mL、投与後 60 分：HC, 4.8±0.2ng/mL；HF, 5.1±0.1 ng/mL；LC, 4.8±0.2 ng/mL、投与後 90 分：HC, 4.7±0.3ng/mL；HF, 5.2±0.3 ng/mL；LC, 4.8±0.4 ng/mL、投与後 120 分：HC, 4.7±0.5ng/mL；HF, 5.3±0.4 ng/mL；LC, 3.9±0.6 ng/mL、であった。65 週目の各群の血漿インスリン濃度は、投与前：HC, 5.2±0.2ng/mL；HF, 5.6±0.4 ng/mL；LC, 5.7±0.6 ng/mL、投与後 30 分：HC, 5.6±0.4ng/mL；HF, 6.8±0.9 ng/mL；LC, 5.4±0.2ng/mL、投与後 60 分：HC, 5.7±0.6ng/mL；HF, 6.2±0.5ng/mL；LC, 5.4±0.2 ng/mL、投与後 90 分：HC, 5.4±0.4ng/mL；HF, 6.0±0.5ng/mL；LC, 5.3±0.1 ng/mL、投与後 120 分：HC, 5.4±0.5ng/mL；HF, 5.7±0.4 ng/mL；LC, 5.1±0.2 ng/mL、であった。

#### (4) 糖尿病関連血中指標

空腹時血漿グルコースおよびインスリン濃度から、インスリン抵抗性指数である HOMA-R およびインスリン分泌指標である HOMA- $\beta$  を算出したが、いずれの期間においても各群間で有意な差は見られなかった。飼育 17 週目の HOMA-R は HC, 24.5±3.6；HF, 32.6±3.3；LC, 27.8±2.5 であり、HOMA- $\beta$  は HC, 10.0±1.2；HF, 10.6±1.1；LC, 10.3±0.8 であった。飼育 33 週目の HOMA-R は HC, 34.5±2.9；HF, 33.8±3.0；LC, 33.3±3.2 であり、HOMA- $\beta$  は HC, 18.3±1.9；HF, 19.5±1.9；LC, 17.8±1.0 であった。飼育 49 週目の HOMA-R は HC, 40.2±3.6；HF, 36.8±3.1；LC, 37.3±2.9 であり、HOMA- $\beta$  は HC, 14.2±2.1；HF, 15.0±2.2；LC, 14.1±2.0 であった。飼育 65 週目の HOMA-R は HC, 48.1±1.6；HF, 48.7±3.6；LC, 39.4±3.5 であり、HOMA- $\beta$  は HC, 23.8±2.0；HF, 24.5±1.0；LC, 20.6±1.1 であった。

#### (5) 血中脂質濃度

血漿総コレステロール濃度は、本飼育後 49 週において HC 群と比較して LC 群で有意に高値を示したが、17、33 および 65 週においては各群間に差は見られなかった。17 週目の血漿総コレステロール濃度は、HC, 104.5±3.4mg/dL ; HF, 106.5±3.4mg/dL ; LC, 107.0±4.6mg/dL であった。33 週目では、HC, 96.2±2.0mg/dL ; HF, 91.6±3.0mg/dL ; LC, 92.3±2.8mg/dL であった。49 週目では、HC, 125.0±3.3mg/dL ; HF, 130.6±4.1mg/dL ; LC, 138.0±5.0mg/dL であった。65 週目では、HC, 74.5±6.4mg/dL ; HF, 69.9±7.5mg/dL ; LC, 83.4±7.6mg/dL であった。

血漿 HDL-コレステロール濃度は、本飼育後 17 週において HC 群と比較して LC 群で有意に低値を示し、本飼育後 49 週において HC 群と比較して HF 群で有意に低値を示した。17 週目の血漿 HDL-コレステロール濃度は、HC, 58.1±2.4mg/dL ; HF, 53.0±1.2mg/dL ; LC, 51.6±2.1mg/dL であった。33 週目では、HC, 73.5±3.6mg/dL ; HF, 71.5±3.8mg/dL ; LC, 70.9±1.9mg/dL であった。49 週目では、HC, 72.6±3.5mg/dL ; HF, 62.7±2.3mg/dL ; LC, 68.8±2.8mg/dL であった。65 週目では、HC, 63.7±4.5mg/dL ; HF, 49.4±7.0mg/dL ; LC, 63.2±6.3mg/dL であった。

血漿中性脂肪濃度には、いずれの期間においても各群間で有意な差は見られなかった。17 週目の血漿中性脂肪濃度は、HC, 66.2±3.9mg/dL ; HF, 64.0±3.5mg/dL ; LC, 69.9±3.4mg/dL であった。33 週目では、HC, 52.6±3.3mg/dL ; HF, 49.0±3.1mg/dL ; LC, 45.8±3.2mg/dL であった。49 週目では、HC, 102.8±5.7mg/dL ; HF, 112.1±4.2mg/dL ; LC, 99.8±3.4mg/dL であった。65 週目では、HC, 99.7±6.7mg/dL ; HF, 112.0±9.1mg/dL ; LC, 108.6±9.0mg/dL であった。

#### (6) 収縮期および拡張期血圧

拡張期血圧および収縮期血圧には、いずれの期間においても各群間で有意な差は見られなかった。19 週目の拡張期血圧は、HC, 124.6±1.7mmHg ; HF, 125.5±3.9 mmHg ; LC, 127.9±2.2 mmHg であった。35 週目では、HC, 130.5±2.2mmHg ; HF, 129.0±3.1mmHg ; LC, 134.7±2.7 mmHg であった。51 週目では、HC, 127.6±2.6mmHg ; HF, 117.9±3.3mmHg ; LC, 127.6±2.3 mmHg であった。67 週目では、HC, 127.2±4.0mmHg ; HF, 125.4±4.2mmHg ; LC, 122.0±2.8 mmHg であった。

一方、19 週目の収縮期血圧は、HC, 91.2±1.9mmHg ; HF, 91.1±1.5 mmHg ; LC, 89.8±4.1 mmHg であった。35 週目では、HC, 90.2±2.6mmHg ; HF, 94.6±3.3mmHg ; LC, 93.9±2.9 mmHg であった。51 週目では、HC, 90.1±1.8mmHg ; HF, 87.0±1.3mmHg ; LC, 93.8±1.6 mmHg であった。67 週目では、HC, 89.7±3.3mmHg ; HF, 90.7±2.9mmHg ; LC, 89.5±1.6 mmHg であった。

#### (7) 平均寿命

群ラットの平均寿命は、HC 群で 670±20 日、HF 群で 679±22 日、LC 群で 616±37 日であり、各群間に有意な差は見られなかった。

本研究では、糖質制限食の短期摂取による耐糖能の悪化が見られたが、長期摂取することにより改善した。このことは糖尿病ラットに糖質制限食を長期摂取させることで有効性が高まる可能性を示唆するものである。また、安全性の指標として血清脂質濃度および血圧測定を実施した。先行研究によると高血圧自然発症ラットに、ショ糖および糖質制限食を長期摂取させた場合、高ショ糖食群に比べてショ糖および糖質制限食群でより死亡率が低くなり、高血圧が抑制されることが報告されている<sup>3)</sup>。しかし、動脈硬化指標となる HDL-コレステロール濃度は、本飼育後 17 週のみ高糖質食群と比較して糖質制限食群で有意に低値を示し、拡張期血圧および収縮期血圧には、いずれの期間においても各群間で有意な差は見られなかった。さらに、平均寿命に各群間で差が見られなかったことから、糖質制限食を長期摂取した場合の安全性についても動物実験レベルでは問題ないと考えられる。

糖質制限食の摂取期間により異なる結果が得られた詳しいメカニズムについては不明であり、今後、さらなる研究が必要であると思われる。

#### <引用文献>

- 1) 山田悟 (2012) 糖質制限食のススメその医学的根拠と指針、東洋経済新聞社、22-25.
- 2) Mary CG, Frank QN (2004) Effect of a High-Protein Low-Carbohydrate Diet on Blood Glucose Control in People with Type 2 Diabetes Diabetes 53, 2375-2382.
- 3) Preuss HG, et al. (1990) Effect of Sucrose Ingestion on the Life span of Hypertensive Rats (SHR) , Geriatric Nephrology and urology, 1, 13-20.

#### 5. 主な発表論文等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

松尾 達博 (MATSUO Tatsuhiro)

香川大学・農学部・教授

研究者番号：20270019