

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：32636

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870740

研究課題名(和文) 低糖質食の短期および長期的摂取が動脈硬化発症に与える影響

研究課題名(英文) The effects of a low-carbohydrate diet intake on short and long-term in the development of arteriosclerosis

研究代表者

蕪木 智子 (Kaburagi, Tomoko)

大東文化大学・スポーツ健康科学部・准教授

研究者番号：40339479

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：低糖質食(LC食)の影響を肥満マウスまたは非肥満マウスを用いて検討した。非肥満マウスでは、若齢時のみ体重増加や内臓脂肪の蓄積が抑制された。肥満マウスでは、LC食により体重増加が抑制されたが、内臓脂肪量は変化を認めなかった。肥満・非肥満マウス共にLC食により血清中遊離脂肪酸が有意に低下、HDLコレステロールが有意に増加し、動脈硬化抑制に有効である可能性が示された。肝臓のmRNA発現量の解析では、肥満マウスでのみLC食により代謝関連遺伝子SIRT1が変化した。以上の結果より、実施時の肥満状態や年齢により、LC食の影響が異なる事が示された。

研究成果の概要(英文)：This study analyzed the effects of a low-carbohydrate diet intake on short and long-term in obese and non-obese mice. In non-obese mice, body weight gain and visceral fat was suppressed by LC diet only in young mice (6w). In obese mice, the body weight gain was inhibited by LC diet, but the visceral fat was not changed. In both of obese and non-obese mice, the LC diet reduced free fatty acid, and increased the HDL cholesterol in sera, shown to be effective for arteriosclerosis inhibition. In the mRNA expression of liver, metabolic gene SIRT1 was changed only in obese mice. These results suggest that the effects of LC diet are different depending on obese condition and age.

研究分野：食生活学, 応用健康科学

キーワード：低糖質食 肥満マウス 副睾丸周囲脂肪 SOD SIR1

## 1. 研究開始当初の背景

低糖質食 (Low carbohydrate diet ; LC 食) は、血糖値・血中脂質の調節や減量効果が広く認知され、生活習慣病予防・改善の食事療法として注目されている<sup>1-2)</sup>。しかし、LC 食の効果については、肥満者または肥満モデル動物を用いた報告が多く、非肥満状態における LC 食の効果や安全性については十分な検討がされていない。さらに近年は、LC 食が心血管疾患を増加させることが大規模コホート研究等により報告され<sup>3)</sup>、長期的実施についての安全性が危惧されている。

## 2. 研究の目的

本研究では、LC 食が生体機能に与える短期的・長期的影響について、非肥満および肥満マウスを用いて解析を行った。LC 食の安全性と動脈硬化発症との関連を明らかにすると共に、生活習慣病予防に向けた食事療法の開発を目指すものである。

## 3. 研究の方法

### 1) 実験動物および実験飼料

【実験 1】非肥満マウスとして C57BL/6j 雄マウス (6 週齢) を用い、普通食 (PFC 比率 20:16:64) を与えた C 群または LC 食 (PFC 比率 40:16:44) を与えた LC 群に分け、各実験飼料を 2 週間 (2w) または 13 週間 (13w) 自由摂取させ解剖を行った。

【実験 2】肥満および非肥満マウスにおける低糖質食の長期的影響を検討するため、6 週齢 C57BL/6J 雄マウスに高脂肪食 (脂肪エネルギー比率 56%) を 8 週間与え、肥満マウスを作製した。非肥満マウスは 8 週間普通食を与えた。その後、各マウスに実験 1 と同様の普通食または LC 食を 12 週間 (12w) 自由摂取させ解剖を行った。解剖時に採取した血清は生化学検査および酸化 LDL の指標とされる Lox1-ligand ApoB の測定を行った。

なお、本実験は大東文化大学スポーツ・健

康科学部動物実験委員会の承認を受け実施した研究である (承認番号 ASH13-004)。

### 2) 副睾丸周囲脂肪の組織学的観察

副睾丸周囲脂肪は重量測定後、パラフィン切片を作製し HE 染色を行い、画像解析ソフトウェア Image J を用いて一検体あたり 160 個の脂肪細胞面積および  $1\text{mm}^2$  中の細胞数を測定した。

### 3) 肝臓ホモジネート上清中 SOD 活性および TBARS の測定

肝臓をプロテアーゼインヒビター含有 0.1% Tween リン酸緩衝液でホモジナイズした上清を用いて、SOD 活性を測定した。SOD 活性は、SOD 標準液から算出された SOD 活性 (U/mL) を用いて、タンパク質 1mg あたりの SOD 比活性値 (U/mL/mg protein) を測定した。TBARS は Kikugawa ら<sup>4)</sup>法を用いた。

### 4) 肝臓中の mRNA 発現量

RT-PCR 法を用いて、肝臓中の糖・脂質代謝関連 mRNA として SIRT1、FABP4、PGC-1、FOXO1 の発現量を測定した。

### 5) 統計解析

本研究で得られたデータの解析には SPSS ver.21 (日本 IBM (株)) を使用し、検定の有意差の基準は  $p < 0.05$  とし、正規性を確認した後、以下の検定を行った。実験飼料 (Diet) および飼育期間 (Term) または肥満 (obese) による 2 元配置分散分析 (2-way ANOVA, 自由度  $1 \times 1$ ) の後、交互作用が認められたものについては、Sheffe の多重比較により 4 群間の検定を行った。

## 4. 研究成果

### 【実験 1】非肥満マウスにおける LC 食の短期・長期的影響

体重は LC 食により低値傾向を示したものの、C 群と LC 群の間に有意な差は認められなかった。副睾丸周囲脂肪重量は LC 食により有意に低値を示した (Table 1)。腎臓重量は LC 食により有意に高値を示し、13w は 2w に比べ有意に高値を示した。副睾丸周囲脂肪の組織

学的観察においても、脂肪細胞面積は13wでLC群がC群に比し有意に低値となることが示された。

Table 1. Final body weight, kidney and Epididymal fat weights

	Final body weight g	Epididymal adipose tissue mg/BW(g)	Kidney mg/BW(g)
2 w			
C	23.85 ± 0.41	24.20 ± 1.07	10.50 ± 0.23
LC	23.56 ± 0.27	17.31 ± 1.87 *	13.59 ± 0.34 *
13 w			
C	28.72 ± 1.31	29.50 ± 3.64	11.75 ± 0.53
LC	26.84 ± 0.64	22.16 ± 2.46	15.29 ± 1.12 *

\*: p < 0.05 vs. C.

血清中アディポネクチン、レプチン、インスリンは、LC食による有意な変化は認められなかった。

肝臓ホモジネート上清中 SOD 比活性は、2wLC 群が 2wC 群に比し著しく低値を示した。また 12w では両群ともに SOD 比活性は低下していた (Figure 1)。TBARS 値および血清中 LAB 値は各群間に変化を認めなかった。

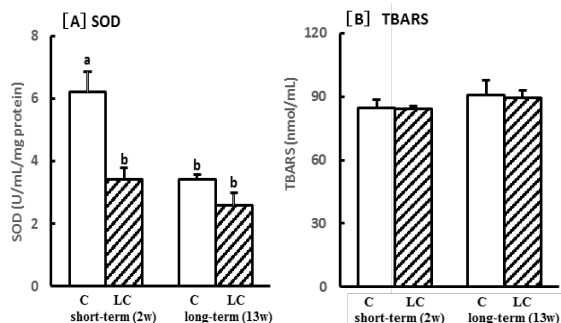


Figure 1. Hepatic SOD and TBARS in non-obese mice. p < 0.05: a vs. b

### 【実験 2】肥満および非肥満マウスにおける LC 食の長期的影響

肥満マウスでは LC 食により体重増加が抑制されたが、非肥満マウスでは LC 食の影響は認められなかった (Figure 2)。副睾丸周囲脂肪重量は、肥満マウスで有意に高値であったが、両マウスともに LC 食の影響は見られなかった。血清中総ケトン体は肥満マウスが有意に低値を示し、両マウスとも LC 食により低下した。その他血清中バイオマーカーに、有意な変化は認めなかった。

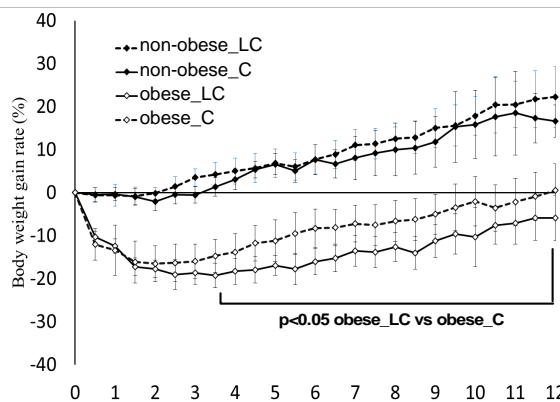


Figure 2. Rate of body weight gain in obese and non-obese mice.

肝臓の代謝関連遺伝子である SIRT1、PGC1- $\alpha$ 、FABP4 の mRNA 発現量は肥満マウスで有意に高く、SIRT1 は肥満マウスでのみ LC 食により有意に高値であった (Figure 3)。

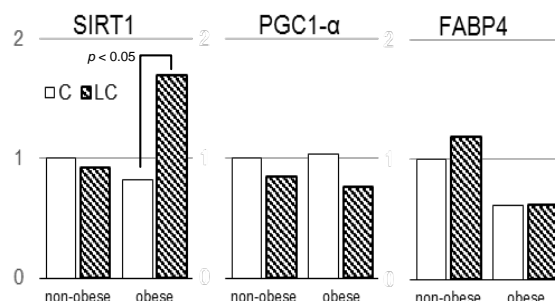


Figure 3. mRNA expression / rRNA in liver of obese and non-obese mice

酸化ストレス関連の肝臓 mRNA 発現量では、SOD1 は肥満マウスでのみ LC 食で有意に低下していた。

肥満・非肥満マウス共に、LC 食により血清中遊離脂肪酸、コレステロールエステルは有意に低下、HDL コレステロールは有意に増加したことから、動脈硬化抑制に有効である可能性が示された。

以上の結果より、実施時の肥満状態や年齢により、LC 食の影響が異なることが示された。非肥満状態では短期的に、肥満状態では長期的に LC 食が酸化ストレスを増加させる可能性が示された。酸化ストレスの増加は先行研究における心血管疾患と関与している可能

性も考えられることから、LC食の安全性については更なる検討が必要である。

#### <引用文献>

1. Layman DK, Boileau RA, Erickson DJ, Painter JE, Shiue H, Sather C, Christou DD (2003) A reduced ratio of dietary carbohydrate to protein improves body composition and blood lipid profiles during weight loss in adult women. *J. Nutr.* **133**: 411-17.
2. Ellenbroek JH1, van Dijck L, Töns HA et al. (2014) Long-term ketogenic diet causes glucose intolerance and reduced  $\beta$ - and  $\alpha$ -cell mass but no weight loss in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **306**: E552-8.
3. Lagiou P, Sandin S, Lof M, Trichopoulos D, Adami HO, Weiderpass E. (2012) Low carbohydrate-high protein diet and incidence of cardiovascular diseases in Swedish women : prospective cohort study. *BMJ* **344**: e4026.
4. Kikugawa K, Yasuhara Y, Ando K, Koyama K, Hiramoto K, Suzuki M. (2003) Protective effect of supplementation of fish oil with high n-3 polyunsaturated fatty acids against oxidative stress-induced DNA damage of rat liver in vivo. *J. Agric. Food Chem.* **24**; 51(20): 6073-9.

#### 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計1件)

Shibuya T, Kaburagi T, Nagai R, Oshiro S. The effects of moderate exercise on secretory IgA production in mice depends on dietary carbohydrate intake. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition. J Clin Biochem Nutr*, 査読有、Vol.56、2015 (in press).

[学会発表](計3件)

Kadowaki S, Kaburagi T, 低糖質食の長期的摂取が肥満マウスおよび非肥満マウスに与える影響, 第62回日本栄養改善学会学術総会、2015年9月25日、福岡(福岡国際会議場・福岡サンパレスホテル)

Kadowaki S, Kaburagi T, Low carbohydrate diet effects on the metabolic regulation system in obese and non-obese mice. 12<sup>th</sup> Asia Congress of Nutrition, 2015年5月16日、横浜(パシフィコ横浜)

蕪木智子、澁谷巧. 長期的低糖質食における有酸素運動がアディポカイン産生に与える影響, 第68回体力医学会大会, 2013年9月21日, 東京(日本教育会館)

#### 6 . 研究組織

##### (1)研究代表者

蕪木 智子 (KABURAGI, Tomoko)

大東文化大学・スポーツ・健康科学部・准教授

研究者番号 : 40339479