

[島根県立大学短期大学部松江キャンパス研究紀要 Vol. 54 149~155 (2016)]

脂質栄養のコントロールが耐糖能異常改善および糖尿病性腎症発症 予防に及ぼす影響について 第1報

籠橋 有紀子¹ 大谷 浩²

(¹島根県立大学短期大学部 健康栄養学科 ²島根大学医学部 解剖学講座)

The effect of dietary fatty acid control for the improvement of glucose tolerance and prevention of diabetic nephropathy (Part 1)

Yukiko KAGOHASHI, Hiroki OTANI

キーワード：脂質栄養 耐糖能 糖尿病性腎症
dietary fatty acid glucose tolerance diabetic nephropathy

要約

ヒト2型糖尿病は、遺伝的素因と環境要因により発症し、インスリン受容体の感受性低下に伴い高血糖状態が持続することで、深刻な合併症を引き起こすことが知られている。近年、ドコサヘキサエン酸(DHA)やエイコサペンタエン酸(EPA)などのn-3系脂肪酸が、血中中性脂肪値の低下・血管内皮細胞の機能改善・血栓生成防止作用などの生理作用により、糖尿病を含む生活習慣病の進行抑制に効果があることが報告されている。本研究では、ヒト2型糖尿病モデル動物NSY (Nagoya Shibata Yasuda) マウスに、必須脂肪酸比率 (n-6/n-3) の異なる3種類の食餌 (n-6/n-3 = 0.5, 3, 6) を摂取させ、耐糖能異常の改善および糖尿病性腎症の病態進行に対する食餌中の必須脂肪酸比率 (n-6/n-3) の影響について検討した。その結果、離乳した後の生後4週齢から腎臓糸球体メサンギウム基質の増加が認められ始める28週齢までn-3食 (n-6/n-3 = 3) 摂取群においては、通常食 (n-6/n-3 = 6) 摂取群と比較してブドウ糖負荷試験後の血糖値上昇が抑制されたため、耐糖能異常の改善に食事でのn-6/n-3が関与する可能性が示唆された。

1. はじめに

糖尿病は、インスリン作用低下により発症する全身性糖代謝機能不全であり、治療しないまま放置した場合には、高血糖状態が持続することで血管障害を引き起こす^{1, 2)}。この血管障害が生じやすいのが、細動脈が集中する神経、眼底、腎臓の糸球体である^{1, 2)}。糖尿病性腎症、網膜症、神経障害は、糖尿病の三大合併症といわれ、その発症予防は治療の目

標の一つである。糖尿病の三大合併症のうちの一つである糖尿病性腎症は、腎臓糸球体を支持し糸球体ろ過量を調節するメサンギウム基質が高血糖の影響での増殖することから端を発し、それによる糸球体ろ過量の調節障害により原尿が作れなくなり、透析にいたるといえるものである。初期は痛みを伴わず知らず知らずのうちに進行し、長期間 (15年程度) かかり発症すると報告されている¹⁾。したがって、耐

糖能異常の改善、メサングウム基質の増殖を抑制することにより、糖尿病性腎症の予防につながると考えられる。

糖尿病のうちヒト2型糖尿病は、日本やアジアで近年急激に増加しており、遺伝的素因に環境要因が作用して発症する^{1, 2)}。環境要因の中でも糖質および脂質摂取量増加や消費熱量減少は注目されている要因であり、糖尿病発症予防戦略の標的となっている。近年は、それらの摂取量のみならず質や摂取するタイミングなどの影響について多数報告がある^{3, 4)}。

脂質については、ドコサヘキサエン酸 (DHA) やエイコサペンタエン酸 (EPA) などの脂質を構成するn-3系脂肪酸が、血中中性脂肪値の低下・血管内皮細胞の機能改善・血栓生成防止作用などの生理作用により、糖尿病を含む生活習慣病の進行抑制効果が期待されることが報告されている^{3, 4)}。また、著者の先行研究においても、食餌中の必須脂肪酸比率や組成が1型糖尿病の発症前後の病態、すなわち、膵島炎や顕性糖尿病発症および糖尿病性腎症進行に影響を及ぼす可能性が示唆されている⁵⁻¹¹⁾。

NSY (Nagoya Shibata Yasuda) マウス (NSY/Hos) はブドウ糖負荷試験 (Glucose Tolerance Test: GTT) を耐糖能障害の指標としてJcl:ICRマウスを選択交配し、近交系化した自然発症2型糖尿病モデルマウスである¹²⁾。発症に関与する遺伝子の解析が進んでいる他、耐糖能異常が環境負荷や肥満の程度に依存し、2型糖尿病の病因・病態の解明や予防法・治療法の開発に有用である¹³⁾。また、NSYマウスの肥満・耐糖能は餌の成分などの環境因子により大きく変化することから、環境因子と遺伝子因子の相互作用を解明する上でも有用なマウスである¹⁴⁾。また、NSYマウスは、糖尿病性腎症の進行が長期的であり、雌よりも雄の耐糖能異常および腎症発症率が高く、28週でメサングウム基質の増加が見られ、40週で糸球体硬化症がみられる¹⁵⁾。50週齢までに雄はおよそ全例 (雌は約30%) で糖尿病を発症し、軽度の肥満と内臓脂肪蓄積が認められるため、日本人の2型糖尿病に酷似しているといわれている¹²⁻¹⁴⁾。

本研究は、ヒト2型糖尿病モデル動物NSY/Hosマウスを用い、ライフステージの早期から認められ

る耐糖能異常の改善および糖尿病性腎症の予防を目的として、食餌中の必須脂肪酸比率 (n-6/n-3) を一定期間コントロールすることによりその効果について検討を行った。

2. 方法

1) 実験動物

自然発症2型糖尿病モデルマウスであるNSYマウス (NSY/Hos) (星野試験動物飼育所/日本エスエルシー株式会社) およびJcl:ICRマウス (日本クレア株式会社) の雄を用いた。本研究では、病態発症時期に合わせて、食餌の種類を変えて飼育した。耐糖能異常を持たないICRマウスに通常食を摂取させ比較検討の対照として用いた。なお、実験動物は日本エスエルシー株式会社および日本クレア株式会社から購入後、鳥根県立大学短期大学部実験動物施設の規則に基づき、飼育した。

2) 実験に用いた食餌および実験デザイン

マウス用通常食を参考に作成した、必須脂肪酸比率の異なる3種類の食餌、タンパク質 (20.3%)、炭水化物 (66.0%)、脂肪 (5.0%)、カロリー (3.9 kcal/g) (リサーチダイエツト社製) を作成し、実験に用いた¹⁶⁾。なお、n-6/n-3比以外の成分・カロリーは同じである。マウス用通常食 (n-6/n-3=6)、高n-3食 (n-6/n-3の極めて低い食餌 (n-6/n-3=0.5))、n-3食 (n-6/n-3比の低い食餌 (n-6/n-3=3)) を作成した。離乳後の耐糖能異常が出現し始める生後4週齢より、糖尿病発症率が50%¹²⁾を示す生後20週齢をはさみ、腎臓糸球体メサングウム基質の増加が認められ始める生後28週齢まで、作成した食餌を摂取させた。生後28週齢においてブドウ糖負荷試験を行い、耐糖能の比較検討および腎臓の組織学的観察を行い、食餌の違いによる病態の違いの有無について検討した。

2) 食餌摂取量、飲水量および体重の計測

週に一度、測定した。

3) ブドウ糖負荷試験

摂取期間終了時 (生後28週齢) に12時間絶食し、空腹時血糖を測定した後、通常食、n-3食、高n-3食群にブドウ糖負荷試験 (GTT) を施した。糖負荷量は、既報の通り2g glucose/kg body weight とし¹²⁻¹⁴⁾、35%ブドウ糖液を腹腔内投与した。空腹

時、糖負荷後30、60、120、180分後の血中グルコース濃度（以下、血糖値）を一群につき10個体測定した。エーテル麻酔ののち、マウスの尾静脈から1 μ lの血液を採取し、血糖値を測定した。生化学的検討のために-80℃で保存した。

4) 食餌・血液中の脂肪酸測定

各群5匹のマウスを安楽死させた後、血液採取した。血漿および血球膜の脂肪酸測定は、one-step法¹⁷⁾により脂肪酸を直接メチルエステル化したのち、ガスクロマトグラフ (Hewlett Packard model 5890; Avondate, PA, USA) により分離定量した。一群につき、5個体採取して計測した。測定した脂肪酸は次の9種類である。パルミチン酸 (PLA)、ステアリン酸 (STA)、オレイン酸 (OLA)、リノール酸 (LLA)、LnA、アラキドン酸 (AA)、EPA、ドコサペンタエン酸 (DPA)、DHA。測定値は、mean \pm SDで示した。ガスクロマトグラフ分析条件ガスクロマトグラフ：横河アナリテカルシステムズ社5890シリーズ・検出器：FID ワークステーション：同社製HP3365ケミステーション オートサンプラー：同社製HP7673 カラム：J&W 社製 DB-W AX、P/N122-7032 (30 m \times 0.25 mm) カラム昇温

条件：100℃ (1 min) \rightarrow 20℃/min \rightarrow 180℃ \rightarrow 2℃/min \rightarrow 240℃ (30min) \rightarrow 4℃/min \rightarrow 260℃ (5 min) 注入口温度：260℃ 検出口温度：260℃ キャリアガス：He (2.0 ml/min) 注入量：1 μ lとした。

5) 組織学的検討

右腎をホルマリン固定したのち、定法に従って薄切切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン染色およびSchiff (PAS) 染色をおこない、光学顕微鏡で観察した。

メサンギウム基質の増加は、糖尿病性腎症の組織変化として知られており、尿蛋白量、糸球体ろ過値などの臨床所見ともよく相関するため¹²⁻¹⁵⁾、染色後メサンギウム基質を観察した。糸球体を1個体につき20個ランダムに抽出し、メサンギウム基質の増加が認められた糸球体の数を計測し割合を求めた。

6) 統計処理

統計処理ソフト SPSS(ver.15.0、SPSS Japan Inc、東京)を用いてt検定および分散分析を行った。データは平均値 \pm 標準誤差で示し、群間での有意差の検定は、有意水準 P<0.05とした。

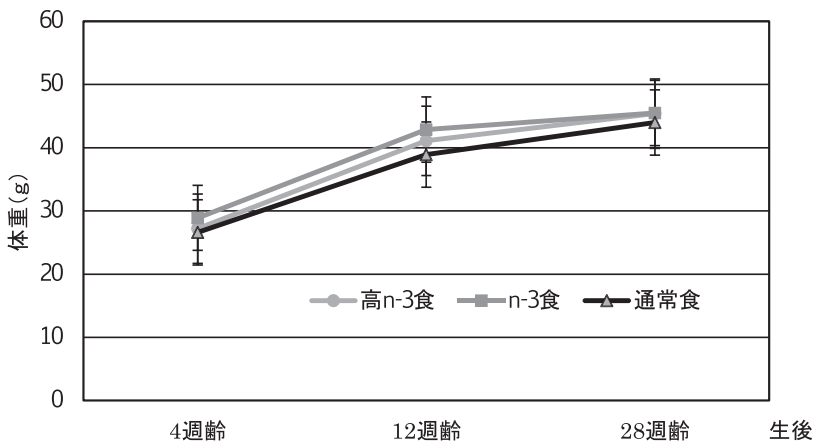


図1 体重の推移

NSYマウスのライフステージごとの体重の推移を示した。離乳後の生後4週齢より、腎臓糸球体メサンギウム基質の増加が認められ始める生後28週齢まで特別食をそれぞれ摂取させた。

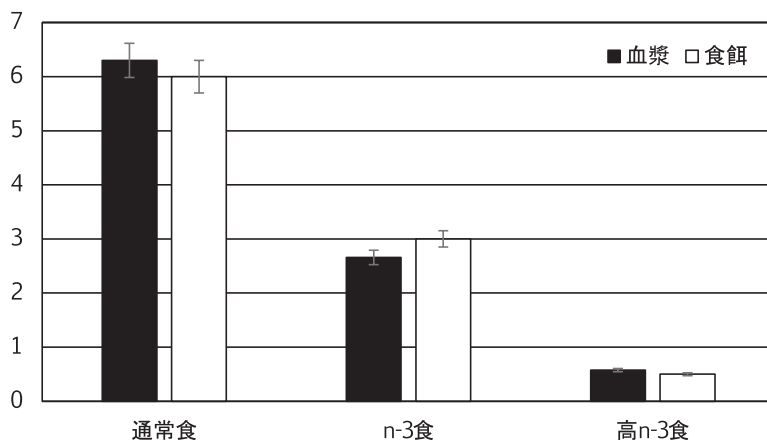


図2 血漿および食餌中のn-6系およびn-3系多価不飽和脂肪酸比 (n-6/n-3比)

NSYマウスにマウス用通常飼料を参考に作成した3種類の食餌をそれぞれ離乳後から生後28週齢まで摂取させた。血漿および食餌中の脂質を分析し、n-6系多価不飽和脂肪酸およびn-3系多価不飽和脂肪酸の割合を求めた (n=5/群)。

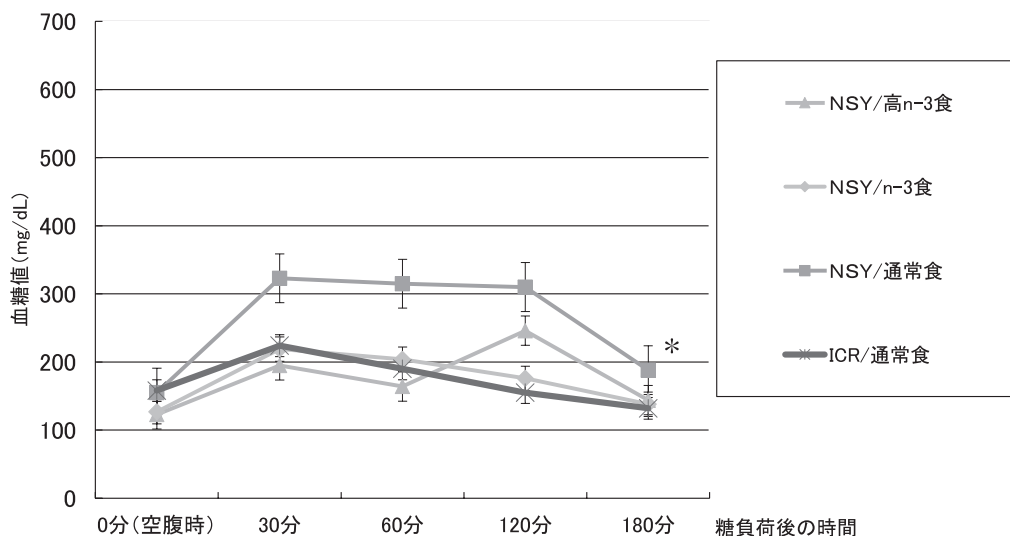


図3 糖負荷試験後の血糖値の変化

NSYマウスにおける離乳後から28週齢まで通常食、n-3食、高n-3食を摂取させた後、0分(空腹時)および糖負荷後30、60、120、180分における血糖値を測定した (n=10/群)。空腹時血糖値は、28週齢において食餌の違いによる有意差は無かった。メサンギウム基質の増殖が認められ始める28週齢での血糖値の変化を検討したところ、NSYマウスのn-3食摂取群では、耐糖能異常を示さないICRマウス(通常食摂取群)と同様の血糖値の推移を示した。一方、NSYマウスの通常食摂取群は負荷後30、60、120分の血糖値が高い値を示し、血糖値の推移に有意な差が認められた (P<0.05 *)。高n-3食は糖負荷後120分で血糖値がやや高く推移し、安定しない傾向を示した。

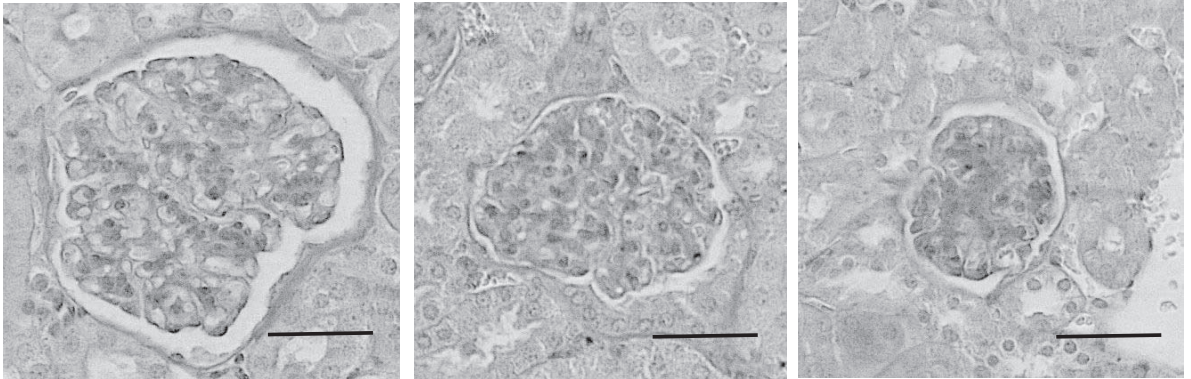


図4 腎臓糸球体（左図：n-3食 中央図：高n-3食 右図：通常食）（Bar：50 μ m）

NSYマウスにおける離乳後から28週齢まで通常食、n-3食、高n-3食を摂取させた後のPAS染色した腎臓糸球体組織の観察を行った。その結果、通常食摂取群では糸球体のメサンギウム基質の増加が認められた一方でn-3食、高n-3食摂取群では、メサンギウム基質の増加が抑制されている傾向が認められた。

3. 結果

1) 体重と摂取量

NSYマウスに3種類の食餌を摂取させた後の摂取量、飲水量、体重変化については、通常食、n-3食、高n-3食群の間に有意な差は無かった（図1）。

2) 食餌および血中脂質の変化

血漿中脂肪酸の n-6/n-3 は、各々の食餌を摂食開始後、変化し、それぞれの食餌の値を反映した（図2）。

3) 血糖値の変化

空腹時血糖値は生後28週齢において実験群間の差は無かった（図3）。

ブドウ糖負荷試験後の血糖値は、NSYマウスの全ての群で糖負荷後30分において高い結果となった。しかしながら、耐糖能異常を持たないICRマウスと比較すると、通常食摂取群においては30分後著しい血糖値の上昇を認め、60分後、120分後まで継続して血糖値が高く、血糖値の推移に有意な差が認められた（図3）。n-3食摂取群は、時間経過とともに血糖値は下降し、ICRマウスと同様の経過を示した（図3）。また、高n-3食摂取群は、糖負荷後120分において血糖値がやや高く推移し、安定しない傾向を示した（図3）。

4) 組織学的変化

糖負荷後の血糖値の推移に差が認められた28週齢

のNSYマウスの通常食摂取群は、図4の右図に認められるようなメサンギウム基質の増加が認められる糸球体が70%を占め最も多かった。n-3食摂取群においては、図4の右図に認められるような糸球体は20%と割合は低く、図4の左図のようなメサンギウム基質の増加が抑えられている糸球体が最も多く認められた。高n-3食摂取群では、図4の右図に認められるようなメサンギウム基質の増加が認められる糸球体が50%あり、通常食摂取群よりメサンギウム基質の増加が抑えられている様子が観察された（図4）。

4. 考察

離乳後4週齢から3種類の食餌を摂取させ、28週齢までの体重の推移および28週齢における空腹時血糖の測定およびブドウ糖負荷試験による耐糖能測定、および腎臓糸球体の組織観察を行った。その結果、摂取量、飲水量に差が無く、体重にも有意差は認められなかった。また、空腹時血糖に実験群間の差は認められなかった。しかしながら、ブドウ糖負荷後は通常食摂取群において耐糖能異常を認め、n-3食摂取群（n-6/n-3 = 3）は、ICRマウスと同様の耐糖能を示し、通常食摂取群と比較して有意に耐糖能の改善が認められた。また、高n-3食摂取群は通常食摂取群と比較して血糖値に変動する傾向が認め

られた。

日本人の食事摂取基準においては、n-6系多価不飽和脂肪酸およびn-3系多価不飽和脂肪酸の推奨量の比をとると3.6~7.1となりライフステージの各時期で異なっている^{18, 19)}。先行研究では、炎症性疾患や1型糖尿病発症前後の病態において、必須脂肪酸比やn-3系多価不飽和脂肪酸の摂取により疾患発症予防や病態改善に有効であることが示唆されている^{8~11)}。また、n-6系脂肪酸とn-3系脂肪酸から産生されるエイコサノイドには、血圧調節に関与しているPGI₂などを含むプロスタグランジン類と血管収縮作用を有するTXA₂などを含むトロンボキサン類と血管炎症作用を有するLTB₄などを含むロイコトリエン類の3種があり、これらの産生にn-6/n-3比が関与しているとされている²⁰⁾。エイコサノイドの産生バランスは、n-6系脂肪酸であるリノール酸およびアラキドン酸とn-3系脂肪酸の α -リノレン酸・EPA・DHAにより保たれている²⁰⁾。n-6系脂肪酸であるリノール酸が過剰になると炎症系や血小板凝集や血球変形などの血液流動性低下に作用するエイコサノイドが多く産生され、また、n-3系脂肪酸のEPA・DHAから作られるエイコサノイドの多くは血小板の凝集・粘着性の抑制、血管拡張、抗血栓作用に関与する²⁰⁾。本研究において、n-3食(n-6/n-3 = 3)を摂取した群の腎臓を観察すると、糸球体メサンギウム基質の増加が少なく、腎症の進行が抑制されている可能性が考えられる。通常食(n-6/n-3 = 6)を摂取した群については、耐糖能異常を生じ、糸球体メサンギウム基質の増加が著しい傾向が観察された。これは、n-6系脂肪酸のリノール酸が、炎症を惹起するプロスタグランジンE₂やロイコトリエン等を生成する量、割合が高いことによるものと考えられ²⁰⁾、リノール酸が比較的多いn-6/n-3 = 6を摂取した群は、腎症の発症および進行が抑制されず、リノール酸が少ない食餌(n-6/n-3 = 0.5)を摂取した群は、n-3食(n-6/n-3 = 3)ほどではないが、糖尿病性腎症が抑えられている可能性が考えられるため、腎臓組織の詳細な解析を行う必要がある。

以上より、本実験で使用した食餌中の必須脂肪酸

の中でn-6/n-3比 = 3の食餌が2型糖尿病モデル動物であるNSYマウスの耐糖能異常改善および糖尿病性腎症の初期段階であるメサンギウム基質の増加を抑えるのに有効であることが示唆された。NSYマウスは、ヒト2型糖尿病に酷似しており、モデル動物としての有用性が高いとされている^{12~14, 21)}。耐糖能異常が出現し始めるライフステージの早期の離乳期から摂取する必須脂肪酸比率をコントロールすることにより耐糖能異常が改善され、糖尿病腎症の予防につながる可能性および、そのために適正なn-6/n-3比率が存在する可能性が考えられる。

5. 謝辞

本稿作成にあたり、お世話になった鳥根県立大学短期大学部健康栄養学科卒業研究生および鳥根大学医学部発生物学教室の皆様にご感謝の意を表す。

6. 引用文献

1. 吉川隆一, 糖尿病と合併症. 医歯薬出版, 1995.
2. 西崎 統, 図解 知っておきたい病態生理, 2002.
3. Bratman S, Kroll D. Natural Health Bible 2nd edition. Prima Publishing, p282-283, 2000.
4. Simopoulos AP. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. Biomed Pharmacother 56, 365-379, 2002.
5. Norris JM, Yin X, Lamb MM et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acid intake and islet autoimmunity in children at increased risk for type 1 diabetes. The Journal of the American Medical Association, vol.298, no.12, 1420-1428, 2007.
6. Norris JM, "Infant and childhood diet and type 1 diabetes risk: recent advances and prospects," Current Diabetes Reports, vol.10, no. 5, pp. 345-349, 2010.
7. Miller MR, Yin X, Seifert J et al. Erythrocyte membrane omega-3 fatty acid levels and omega-3 fatty acid intake are not

- associated with conversion to type 1 diabetes in children with islet autoimmunity: the Diabetes Autoimmunity Study in the Young (DAISY). *Pediatric Diabetes*, vol 12, no 8, 669-675, 2011.
8. Kagohashi Y, Otani H. Dietary EFA ratio of the gestation period affects type 1 diabetes development in the offspring. *Experimental Animals*, vol.60, S122, 2011.
 9. Kagohashi Y, Kameyama H, Fujihara Y et al. The effect of dietary EFA ratio and composition on the development of type 1 diabetes in the offspring of NOD mice. *Congenital Anomalies*, vol.51, no. 4, p A18, 2011.
 10. Kagohashi Y, Otani H, Maternal intake of essential fatty acid affects development of type 1 diabetes in the offspring. *Journal of Lipid Nutrition*, vol.22, no 1, pp35-43, 2013.
 11. Kagohashi Y, Otani H. Role of nutritional factors at the early life stages in the pathogenesis and clinical course of type 1 diabetes. *Biomed Res Int*, doi: 10.1155/2015/382165. Epub 2015 Mar 26.
 12. Ueda H et al. The NSY mouse: a new animal model of spontaneous NIDDM with moderate obesity. *Diabetologia* 38, 503-508, 1995.
 13. Ueda H et al. Genetic analysis of late-onset type 2 diabetes in a mouse model of human complex trait. *Diabetes* 48, 1168-74, 1999.
 14. Ueda H et al. Age-dependent changes in phenotypes and candidate gene analysis in a polygenic animal model of Type II Diabetes mellitus; NSY mouse. *Diabetologia*, 43:932-938, 2000
 15. Hamada Y et al. Insulin secretion to glucose as well as nonglucose stimuli is impaired in spontaneously diabetic Nagoya-Shibata-Yasuda mice. *Metabolism*, 50, 1282-5, 2001.
 16. Subcommittee on Laboratory Animal Nutrition Committee on Animal Nutrition, Board on Agriculture, National Research Council 1995 Nutrient Requirements of Laboratory Animals, 4th Edn. National Academy Press, Washington.
 17. Lepage G, Roy CC. Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction. *J Lipid res* 27:114-120, 1986.
 18. 第一出版編集部. 厚生労働省策定 日本人の食事摂取基準, 2015.
 19. 瀬木(西田)恵理, 成宮周. 生体内におけるエコサノイドの新しい機能. *実験医学, 脂質研究* 23: 894-901, 2005.
 20. Sugano M et al. Polyunsaturated fatty acid in the food chain in Japan. *Am J Clin Nutr*, 71: 189S-96S, 2000.
 21. メディカルレビュー社, 特集 糖尿病モデル動物の特徴と知見-臨床に何を教えているか- : *Diabetes Frontier* no. 4 vol. 9 糖尿病の学術専門誌, 1998.

(受稿 平成27年11月9日, 受理 平成27年12月24日)