

微量栄養素の栄養状態が耐糖能に及ぼす影響

池田涼子・林 裕子・清水瑠美子・谷 政八・糸川嘉則

(2008年1月29日受理)

Micronutrient status effects on glucose tolerance in rats.

Ryouko Ikeda, Yuko Hayashi, Rumiko Shimizu, Masahachi Tani, Yoshinori Itokawa

Decrease in bioavailability of micronutrients including retinol occurred frequently in patients with diabetes mellitus. We supposed that iron status might relate to glucose metabolism, because vitamin A utilization is inhibited in iron deficiency. To clarify the mechanism of these relationships, following experiment was carried out. Rats were divided into four groups: male wistar-strain rats, which fed the normal diet (N), the iron-deficient diet (ID), the retinol-deficient diet (RD), and Goto-Kakizaki rat (diabetic model rats, GK) fed the normal diet. Every rat was trained to daily meal feeding (9:00-18:00) to measure serum glucose. After 4 weeks of these dietary regiments, serum glucose was higher in iron-deficient rats than the N-group and the RD-group. Hepatic retinol was higher in the ID-group than the GK-group and the N-group. Serum retinol was lower in the ID-group than the GK-group and the N-group. These results suggested that iron deficiency induced glucose intolerance in rats. In conclusion, micronutrients status effect on a diabetic condition.

キーワード (key words)

鉄 Iron、ビタミンA vitamin A、糖尿病 diabetes、耐糖能 glucose tolerance

緒 言

糖尿病とは血清中グルコース（血糖）を生体にとって至適な量に維持する機能、すなわち耐糖能に異常をきたす疾患であり、血糖降下に作用する生体内唯一のホルモンであるインスリンの絶対的不足によるI型（インスリン依存型糖尿病 Insulin-dependent diabetes mellitus: IDDM）と、エネルギーの過剰摂取や運動不足など環境因子が要因の一つとなるII型（インスリン非依存型糖尿病 Non Insulin-dependent diabetes mellitus: NIDDM）に分類される。NIDDMは生活習慣病としての側面を持ち、食習慣などの改善により発症や病態の進行を制御できることから、クロムやビタミンB₁など糖代謝に直接に関与するものをはじめとして様々な栄養素との関連が指摘されて

きた。近年では、インスリンを合成、分泌する膵β-細胞の分化やインスリンの機能に障害が生じる「インスリン抵抗性」へのビタミンAの関与が報告され、糖尿病の一次予防や病態改善に対する微量栄養素の効果が一層注目されているが、糖尿病と脂溶性ビタミンの因果関係についての研究は端緒についたばかりである。また、糖尿病では三大合併症の一つである糖尿病性腎症により腎臓で合成される造血ホルモンの分泌が低下し貧血を呈することが知られており、臨床現場では糖尿病患者の生体内鉄利用の指標となる幾つかの項目が変動する現象も報告されているが、鉄の栄養状態の変動に伴う両者の関連性についての検討は乏しく、その詳細は未だ解明されていない¹⁾。

ラットを用いた基礎研究や公衆疫学的検討により、重度の鉄欠乏では肝臓から血清へのレチ

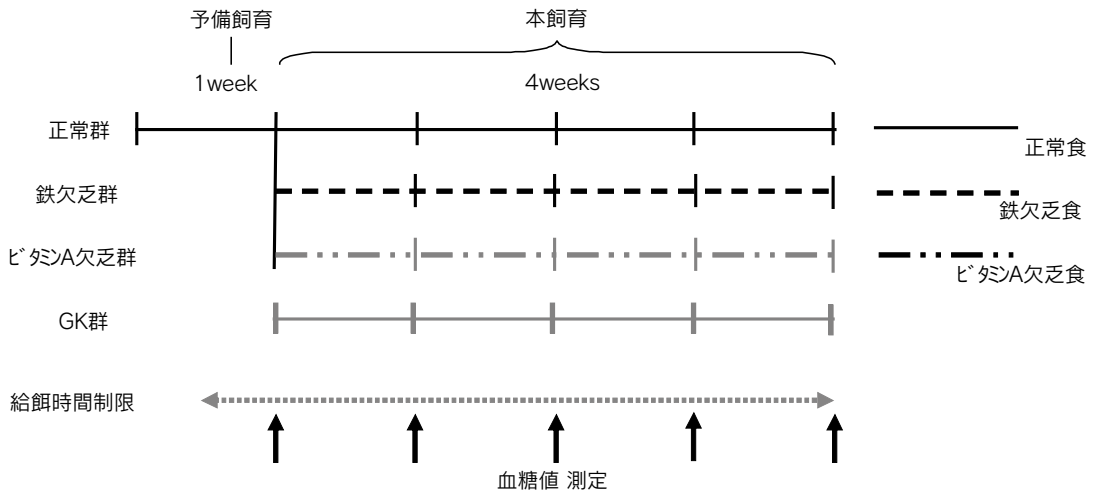


Fig.1 飼育計画

ノールの放出機構の障害による生体内のビタミンA利用効率の低下がおこることが知られている^{2), 3), 4)}。以上より、これらの微量栄養素の栄養状態の変動が生活習慣病としての糖尿病の病態進行に関与する可能性があると考え、微量栄養素間の生体内相互作用を背景にした鉄の栄養状態と糖尿病の病態の関係について検討を行った。

方 法

1. 動物および飼育条件

日本クレア社(大阪)より購入した3週齢のWistar系雄性ラット19匹を3日間予備飼育した後、各群の平均体重が近似となるよう3群に分け、それぞれ正常群(N群、n=7)、鉄欠乏群(ID群、n=6)、ビタミンA欠乏群(RD群、n=6)とした。また、II型糖尿病モデル動物として、日本クレア社より購入したGKラット(GK群、n=6)を用いた。GKラットとは、Wistar系由来の非近交系ラットから経口グルコース負荷試験で耐糖能が低いものを選抜交配して近交化された種であり、日本人に多く見られる肥満を伴わないインスリン非依存性糖尿病(NIDDM)のモデルとして多用されている。

上記の試験動物のうち、N群とGK群にはAIN-93G組成に基づき調整した理想配合食、ID群にはAIN-93G組成に基づく飼料配合鉄を除去した鉄欠乏食、RD群には同様にAIN-93G組成に基づく飼料配合からビタミンAレチノールを除去したビ

タミンA欠乏食を投与し、本飼育開始より4週間にわたり飼育観察を行った(Fig.1)。

	N/GK	ID	RD
コーンスターチ	529.5	529.5	529.5
ミルクカゼイン*	200	200	200
スクロース	100	100	100
大豆油	70	70	70
ミネラルミックス**	35	-	35
ミネラルミックス(Fe除去)**	-	35	-
ビタミンミックス**	10	10	-
ビタミンミックス(VA除去)**	-	-	10
L-シスチン	3	3	3
酒石酸コリン	2.5	2.5	2.5
BHQ	0.014	0.014	0.014
セルロース	50	50	50
Total	1000.01	1000.01	1000.01

*ビタミンA 除去カゼイン

**AIN-93G組成

Table 1 飼料組成表

AIN-93G組成は1993年にアメリカ国立栄養研究所から発表されたマウス・ラット対象の成長・一般栄養試験用標準精製飼料である。本実験ではそれぞれID群には鉄除去のミネラル混合、RD群にはビタミンA除去ビタミン混合を用いて調整した飼料を給与した。

飼料中のタンパク質給源であるカゼインには脂溶性ビタミンが豊富に含まれることから、本実験では全群について日本クレア社で高度精製されたビタミンA除去カゼインを用いた(Table 1)。空腹時の血清中グルコース濃度(血糖値)測定に際し各ラットの摂食時間を一定に近づける必要があ

るため、飼育中は毎日9:00～18:00の時間的な給餌制限（ミールフィーディング）を行った。飲用水は自由摂取とした。

全てのラットは仁愛短期大学倫理委員会の承認にもとづき、恒温（18～25℃）、恒湿（40～60%）、直射日光を避けた12時間の昼夜交替照明の静かな環境で丁寧に飼育された。

解剖前日は絶食を行い、飼育終了後に全血を採取しヘモグロビン（Hb）濃度を測定した。また、血清、肝臓、膵臓を採取し、-40℃で保存した後、それぞれのレチノール濃度および血清中インスリン濃度を測定した。

2. Hbの定量

シアンメトヘモグロビン法（国際標準法）に従い、「ヘモグロビンB-テストワコー」（和光純薬工業株式会社）を用いて行った。血液にフェリシアン化カリウムとシアン化カリウムを加えるとHbのうちスルファメトヘモグロビン以外の全てがシアンメトヘモグロビンとなり、暗赤色を呈する。この呈色物質はアルカリ性で576nm、及び541nmに吸光を持つことからこのシアンメトヘモグロビンを541nmにて比色定量した。

試料はラットの尾静脈から直接ザーリーピペットにて20 μ lの血液を採取し、キットの操作方法に従い測定を行った。

3. 肝臓中レチノールの定量

臓器中ビタミン濃度の測定は、Thompsonらの方法に準じて定量した⁵⁾。肝臓中レチノールの大部分は主にパルミチン酸などの飽和脂肪酸とエステル結合し、星状細胞中に貯蔵される。このエステル化合物を強アルカリ下でエタノール（特級HPLC用 関東化学株式会社）とともに加熱し、加水分解する鹼化法を用いてレチノールを遊離させた。さらにn-ヘキサン（特級HPLC用 関東化学）に抽出し、硫酸ナトリウム（特級 関東化学）で脱水したものを窒素気流下で蒸発乾固し、2-プロパノール（特級 関東化学）200 μ Lで溶媒置換した。レチノールは蛍光を有することから、0.2mMレチノール標準液（all-trans retinol, SIGMA INC.）を対照に高速液体クロマトグラフ

イー（High-Pressure Liquid Chromatography ; HPLC）で定量した。

4. 血清中レチノールの定量

本実験では、血漿中 β -カロテンおよびレチノールを安部・勝井らの方法に準じてn-ヘキサンに直接抽出し、精製と濃縮を経てHPLCで検出した⁶⁾。操作の詳細は肝臓中レチノールの定量法に準じる。

5. HPLC条件

移動層はメタノール（特級HPLC用、関東化学）/蒸留水；95/5 v/vを用いた。HPLCはカラム；Wako sil-II 5C 18（4.6mm \times 250mm）（和光純薬工業）、ポンプ；LC-9A（株式会社 島津製作所）、蛍光検出器；RF-535（島津製作所）、カラムオープン；CTO-10AC（島津製作所）を用い、流速1.0mL/min.、Injection量は20 μ Lで波長Ex325nm、Em 450nmの蛍光で測定した。測定中のカラムオープンの温度は40℃に設定した。

6. 血糖値の定量

血糖値の測定は簡易型血糖値測定器（プレジジョンエクシード Medi Sense INC.）を用い、本飼育を含め1週ごとの16:00に全群の血糖を測定した。前回の給餌より7時間経過したラットの尾部静脈から0.05mL程度の静脈血を測定器付属の電極に採取し、これをただちに測定値に挿入してラットの空腹時血糖値を測定した。

7. インスリンの定量

インスリン測定キット（森永生科学研究所）を用い、ELIZA法にてラット血清中インスリン濃度を測定した。ELIZA法は抗原抗体反応を利用したペプチドホルモン等の基質依存的な特異的定量法である。本キットを用い一次抗体を接着させたプレートに抗原であるインスリンを加えて複合体を形成させた後、二次抗体を結合させ、これを発色させたものについて主波長450nm、副波長630nmの多波長測定で比色定量した。比色定量にはマイクロプレートリーダー（Model 550 BIO RAD INC.）を用いた。

	N 群	ID 群	RD 群	GK 群
体重増加量 (g)	153.3 ± 3.5	75.2 ± 3.6 **	150.9 ± 2.6	114.7 ± 3.0
飼料効率 (%)	34.8 ± 1.4	23.1 ± 2.3 **	34.2 ± 3.8	30.1 ± 1.7
ヘモグロビン濃度 (mg/dL)	13.8 ± 2.6	3.6 ± 0.4 **	14.9 ± 1.3	14.8 ± 2.0

Table.2 体重増加量、飼料効率、ヘモグロビン濃度

N群:正常食群、ID群:鉄欠乏食群、RD群:レチノール (ビタミンA) 欠乏食群、GK群:II型糖尿病モデルラット
表中の数値は各群の平均値±標準偏差を表し、有意差は** $p<0.01$ で示した。

	N 群	ID 群	RD 群	GK 群
血清中レチノール濃度 (mol/mL)	0.93 ± 0.1	0.35 ± 0.08 **	0.12 ± 0.05 **	1.23 ± 0.1 *
肝臓中レチノール濃度 (mol/g)	34.1 ± 7.1	42.15 ± 3.6	2.42 ± 2.6 **	31.8 ± 8.5
脾臓中レチノール濃度 (mol/g)	0.4 ± 0.1	2.7 ± 1.5 **	0.3 ± 0.2	0.2 ± 0.1

Table.3 肝臓中レチノール濃度、血清中レチノール濃度

N群:正常食群、ID群:鉄欠乏食群、RD群:レチノール (ビタミンA) 欠乏食群、GK群:II型糖尿病モデルラット
表中の数値は各群の平均値±標準偏差を表し、有意差は** $p<0.01$ で示した。

8. 統計処理

データは全群について棄却検定を行った後、一元配置分散分析を行い有意差があった項目についてScheffeの多重比較を行った。母平均の差については、 $p<0.05$ の場合に有意差ありとした。以上の統計解析はSPSS (SPSS Japan INC.)を用いた。

結 果

1. 体重増加量、飼料効率、ヘモグロビン濃度

体重増加量、飼料効率およびヘモグロビン濃度は鉄欠乏食投与により有意に低値を示したが、その他の因子による変動はみられなかった。鉄は末梢組織に酸素を運搬するHbのほか、生体エネルギー産生に関与する酸化還元酵素の構成成分となることから、幼弱ラットにおいては食事の鉄濃度の低下に伴う栄養性貧血と成長遅延が見られたものと考えられる (Table 2)。

2. レチノール濃度

血清中レチノール濃度はN群に比しID群、RD群で有意に低値を示し、GK群では有意に高値を示した。肝臓中レチノール濃度はN群ID群、GK群で有意差はみられなかったが、RD群では他の三群に比べ有意に低下した。脾臓中レチノール濃度はN群、RD群、GK群で有意差はみられなかつ

たが、ID群では他の三群に比べ有意に上昇した (Table 3)。

ビタミンAは化学的構造からレチノール、レチノール、レチノイン酸の3つに分類されるが、生体内に最も多量かつ安定した状態で存在するレチノールが、ビタミンAの主体と見なされている。摂取された、ビタミンAは吸収後、他の脂溶性成分と同様にリンパ系を介して胸腺から血中に移行し、肝臓に貯蔵された後に脾臓などの末梢器官に輸送され、生理作用を発揮する。輸送系貯蔵臓器、末梢臓器の全てのレチノール濃度が他の群に比べ有意に低下したことからRD群が食餌性のビタミンA欠乏状態にあったことが確認された。

3. 血清中グルコース濃度

血清中グルコース濃度は飼育開始時には全群間で差がみられなかったが、飼育2週目にはGK群で他の3群に比し有意な上昇が観察され、遺伝的要因によるGKラットの耐糖能異常性の異常が確認された。また、飼育3週目以降ではID群もGK群と同程度まで上昇し、鉄欠乏による代謝変動が血清グルコース濃度上昇に関与する可能性が示された (Fig. 2)。

4. 血清中インスリン濃度

血清中インスリン濃度はN群、ID群、RD

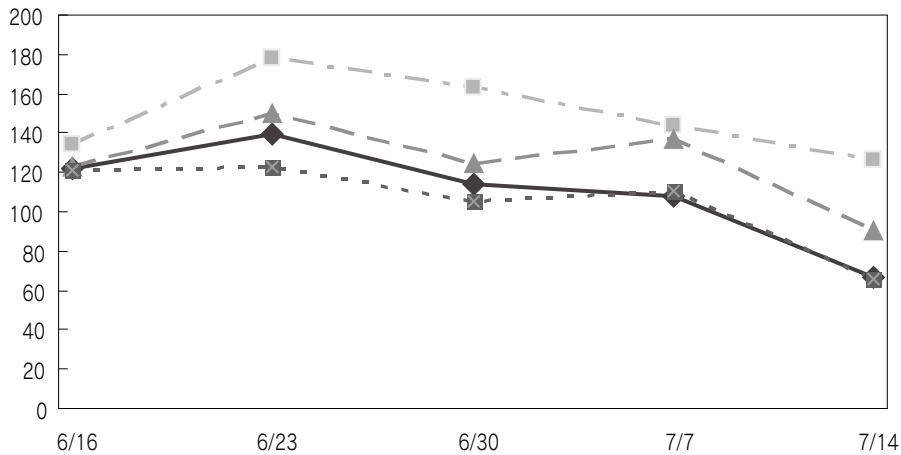
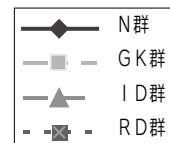


Fig.2 血清中グルコース濃度の経時的変動

N群：正常食群、ID群：鉄欠乏食群、RD群：レチノール(ビタミンA)欠乏食群、GK群：II型糖尿病モデルラット
表中の数値は各群の平均値 ± 標準偏差で示した。



群、で有意差はみられなかったが、GK群では他の三群に比べ有意に上昇した (Table 3)。GKラットは加齢とともにインスリン抵抗性が増大し、飽食時にはしばしばインスリン分泌量の増加が観察されることが知られている⁷⁾。本実験では解剖前に絶食を行った上で血清を採取し、インスリン定量の試料としたが、血清グルコースが高値を示していることから飽食時と同様の現象が観察されたものと考えられた。

考 察

本研究より、食餌性鉄欠乏ラットの血清中グルコース濃度がGKラットと同程度まで上昇することが観察された。本実験で用いたGKラットはNIDDMモデルであり、その特徴としてインスリン抵抗性がみられる。糖尿病全体の90～95%を占めており、標的細胞でのインスリン抵抗性と膵β-細胞での不十分な代償性インスリン生成が基礎病態となっている。

一般にホルモンは標的細胞に存在する受容体を介してその生理作用を発揮するが、インスリンの場合にはこの受容体が細胞内に存在している。インスリン自体は細胞膜を通過できないため、その

生理作用は特異的な細胞内伝達物質 (セカンドメッセンジャー) を介して発揮される。このセカンドメッセンジャーの発現低下もしくは障害によるインスリンの作用低下がインスリン抵抗性の原因であり、NIDDMの初期段階ではインスリンの随時分泌量には問題がなく、飽食時には血清中グルコース、インスリンの双方が増加することが知られている⁸⁾。

一方、鉄は必須微量栄養素のひとつであり、遷移元素としての性質ゆえに多様な生理作用を有する。特に生理活性の高い2価鉄はヘモグロビン、チトクロム、フラビン酵素群など様々な生体内活性物質の構成成分や補因子として酸素運搬やエネルギー代謝などに関与している⁹⁾。鉄をはじめとするミネラルやビタミン類といった微量栄養素はそれぞれが特徴的な生体調節機能を持ち、幾つかの微量栄養素間の相互作用が知られている。鉄代謝は銅や亜鉛などのほか、ビタミンAと影響しあうことが報告されており^{10),11)}、このビタミンAはIDDMとの関連性も指摘されている^{12),13)}。ビタミンAは肝臓に貯蔵されており、必要に応じてレチノール結合タンパク質 (retinol-binding protein: RBP) と結合し、血中を移動して末梢

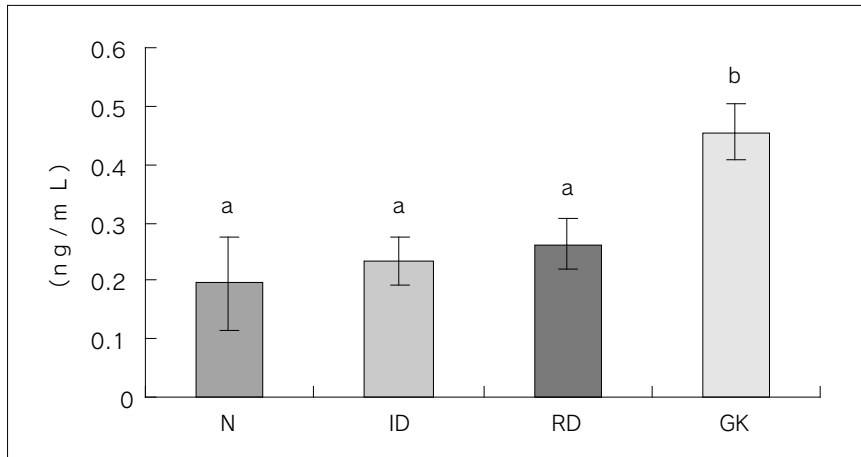


Fig. 3 血清中インスリン濃度

N 群：正常食群、ID 群：鉄欠乏食群、RD 群：レチノール（ビタミンA）欠乏食群、GK 群：II 型糖尿病モデルラット
 カラムの数値は各群の平均値 ± 標準偏差を表し、有意差（** $p < 0.01$ ）は異なるアルファベットで示した。

器官に輸送される。近年、脂肪組織で発現する RBP の一種がインスリン抵抗性に関与することが報告され、ビタミンA代謝がIDDMのみならず NIDDM にも関与する可能性が知られるようになった¹⁴⁾。

前述の通り NIDDM はインスリンの分泌よりもむしろインスリン抵抗性が主因となるが、IDDM は遺伝的素因にウイルス感染などが加わって発症する自己免疫疾患であり、膵β-細胞の機能低下によるインスリン分泌量の絶対的な不足を伴う。

本実験の鉄欠乏ラットで血糖値の上昇が観察されたが、血清中インスリン濃度については鉄欠乏食投与による影響がみられなかった。これより、鉄欠乏による血糖上昇はインスリン分泌量の不足による IDDM 類似の機序によるものではないことが推察された。また、RBP と結合する血清中レチノールは極端に低下しており、RBP を介したインスリン抵抗性の惹起も起こっていないものと考えられた。

インスリン抵抗性に関与する因子としては RBP のほかに、脂肪細胞から分泌されるアディポサイトカイン群が知られており、これらはいずれも脂質代謝の亢進により発現量が増加する。鉄欠乏状態では肥満を伴わずに脂質代謝が亢進し、生体内の脂質過酸化反応が進行することか

ら^{15),16)}、これらが背景となり鉄代謝の変動によるビタミンA代謝を介さない独自のインスリン抵抗性誘発機構による鉄欠乏ラットの血糖上昇が観察されたものと推察された。

総括

本実験より、鉄欠乏ラットの血糖値上昇が観察され、鉄の栄養状態が糖尿病の発症もしくは病態進行に関与する可能性が示唆された。しかし、この現象はインスリン濃度の変動を伴わず、その機序についてさらなる検討が必要であると考えられた。

謝辞

本実験を遂行するにあたり HPLC 操作のご指導を賜った福井大学工学研究科 三浦潤一郎先生に心より篤く御礼申し上げます。

(Endnotes)

1. Fernandez-Real JM., Penarroja G., Castro A., Garcia-Bragado F., Lopez-Bermejo A., Ricart W. Blood letting in high-ferritin type 2 diabetes: effects on vascular reactivity. *Diabetes Care*. 2002; 25 (12) : 2249-2255

2. Rosales F.J., Jang J-T., Pinero D.J., Erikson K.M., Beard J.L. and Ross C.A. Iron deficiency in young rats alters the distribution of vitamin A between plasma and liver and between hepatic retinol and retinyle esters. *J Nutr.* 1999; 129: 1223-1228
3. Ameny M.A., Raila J. Walzel E. and Schweigert F.J. Effect of iron and/or vitamin A re-supplementaion on vitamin A and iron status of rats after a dietary deficiency of both components. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 2002; 16: 175-278
4. Zimmermann MB, Biebinger R., Rohner F., Dib A., Zeder C., Hurrell R.F. and Chaouki M. Vitamin A supplementation in children with poor vitamin A and iron status increases erythropoietin and hemoglobin concentrations without changing total body iron. *Am J Clin Nutr.* 2006; 84 (3) : 580-586.
5. Thompson JN., Erbody P. and Murray TK. Fluorometric determination of vitamin A in human blood and liver. *Biochem Med.* 1971; 5: 67-589
6. Abe K., Ishibashi K., Ohmae M., Kawabe K. and Katsui G. Determination of vitamin A in serum and Liver by High-Speed Liquid Chromatography. *Vitamins (Japan)* 1977; 51 (7) : 275-280
7. Abdel-Halim SM, Guenifi A, Efendić S, Ostenson CG. Both somatostatin and insulin responses to glucose are impaired in the perfused pancreas of the spontaneously noninsulin-dependent diabetic GK (Goto-Kakizaki) rats. *Acta Physiol Scand.* 1993; 148 (2) : 219-226.
8. American Diabetes Association Position Statement. Diagnosis and Classification of DM. *Diabetes Care.* 2006; 29:S43-49
9. Frieden E. The ferrous to ferric cycles in iron metabolism. *Nutr Rev.* 1973; 31 (2) : 41-44
10. Stube YN., Beard JL., Ross AC. Iron deficiency and marginal vitamin A deficiency affect growth, hematological indices and the regulation of iron metabolism genes in rats. *J Nutr.* 2002; 132 (12) : 3607-3615
11. Kelleher SL. and Loennerdal B. Low vitamin A intake affects milk iron level and iron transporters in rat mammary gland and liver. *J Nutr.* 2005; 135 (1) : 27-32
12. Lu J., Dixon WT., Tsin AT., Basu TK., The metaboloc availability of vitamin A is decreased at the onset of diabetes in BB rats. *J Nutr.* 2000; 130 (8) : 1958-1962
13. Matthews KA., Rhoten WB., Driscoll HK., Chertow BS. Vitamin A deficiency impaires fetal islet development and causes subsequent glucose intorelance in adult rats. *J Nutr.* 2004; 134 (8) : 1958-1963
14. Yang Q., Graham TE., Mody, N., Preintner, F., Peroni, OD., Zabolotony, JM., Kotani K., Quadro L., Kahn BB., Serum retinol-binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. 2005 *Nature*; 436: 356-362
15. Jain SK., Yip R, Pramanik AK., Dallman, PR., Shonhet, SB. Reduced plasma cholesterol esterifying activity in iron-deficient rats: its possible role in the lipidemia of iron deficiency. *J Nutr.* 1982; 112 (6) : 1230-1232
16. Ikeda R., Uehara, M., Takasaki M., Chiba H., Masuyama R., Furusho T., Suzuki K. Dose-responsive altaeration in hepatic lipid peroxidation and retinol metabolism with increasing dietary beta-carotene in iron-deficient rats. *Int J Vitami Nutr Res.* 2002; 72 (5) :321-328