

蔗糖の生化学的研究

I 蔗糖投与白ねずみの尿および組織コレステロール

青木みか・谷 由美子・宮川幸子

Studies on the Biochemistry of Sucrose

I. On the Cholesterol in the Tissues and Urine of the Rat feeding with Sucrose.

M. AOKI, Y. TANI and Y. MIYAGAWA

砂糖は甘味料として食品の加工，調理上必要なものであり，また熱量源としても重要視されている。その消費量は年々増加の傾向をみ欧米諸国においては一人一日当たり100gをこえる国が多く，わが国においても数年前50gであったが昨年80gを突破した。しかし一方において砂糖を比較的多量摂取する人体や，蔗糖またはその構成成分である果糖を総熱量の60~70%投与した動物において，血清脂質の増加や血管障害を誘起することが報告されている。例えば五島¹⁾，平沢²⁾，中村³⁾，Kaufmann⁴⁾，Hill⁵⁾の諸氏は血清トリグリセライドの増加を認め，竹越⁶⁾，小池⁷⁾，Yadkin⁸⁾，Cohen⁹⁾，Bullock¹⁰⁾の諸氏は動脈硬化や心筋梗塞などの血管障害をまねくことを報告している。また Bender¹¹⁾は蔗糖投与白ねずみにおいて肝機能の低下を認め，Baron¹²⁾，Crossley¹³⁾，Aller¹⁴⁾は血液の果糖又は血清コレステロールの増加について報告している。

わが国では動脈硬化を誘発し易い高コレステロール血症が高脂血症の約50%をしめているが，中村¹⁵⁾氏は日本人の血清トリグリセライドの上限を110~130mg%とする場合，1日の蔗糖摂取量を60gに制限すべきだと述べている。血管障害による疾病は増加しつつあるが，蔗糖は果してその誘因の1因子であろうか，また摂取の適量はどの位であろうか。これらの点を明確にたく今回はまず予備実験として，白ねずみに蔗糖を投与して発育状況をしらべるとともに，内蔵諸組織および血清のコレステロールを測定した。また蔗糖の影響により何らかの代謝異常を誘起した場合，尿成分にも変化を及ぼすものと推定し，尿の一般検査を行うとともに，ステロールを定量しさらに薄層クロマトグラフによって尿中のステロールの同定を試みた。

実験方法ならびに結果

1. 動物飼育方法と成育曲線

供試動物：

生後3週間の Wister 系♂ラット（白ねずみ）13頭使用し，標準固定飼料（日本クレア K. K製 CE-2）と水を任意に摂取できるよう充分量与えて2週間飼育した。環境に慣れ体重の順調な増加を示すことを確めた上，試験区7頭，対照区6頭と区分し，前者に糖投与の実験を始めた。実験開始時の体重は 30g±3g であった。

糖投与方法および実験の概要：

試験区に対して、まず市販上白糖の10%水溶液を給水器に入れて水の代りに自由に摂取せしめて10日間飼育した処、水投与の対照区同様順調な生育を行ったため糖濃度を20%にしてさらに3週間飼育したが、この場合も順調な生育を示した。しかし糖濃度を30%にあげると体重は減少した。また水と同時に10, 20, 30%の蔗糖液を与えると10%, 20%糖液、水の順に摂取量は減少するためラットは水道水より10~20%の蔗糖液を好むことを認めた。今回の実験は動物が好んで摂取する糖量を比較的長期間与えた場合の生体におよぼす慢性効果を見ることを目的としたため20%蔗糖液を水の代りに与え、固形飼料も対照区同様自由に摂取させて32週間飼育した。

飼育期間中は週2回体重の測定を行い、また飼料、水、蔗糖の摂取量を毎日測定した。生化学的実験として10週間経過した時、尿の一般検査、15~17週間経過した時尿および糞中ステロールの定量を行うとともに、20週間以後は経時的に屠殺解剖して内臓諸組織と血清コレステロールの定量を行った。さらに組織標本を作成し病理学的変化を検索し又、尿中のステロールは薄層クロマトグラフィによって同定を行った。

表1 ラット1日1頭当り平均摂取量

区 分		対 照 区	試 験 区
摂取飼料			
標 準 固 形 飼 料(g)		15.3	7.4
内 容	可溶性無窒素物(g)	8.6	4.1
	粗 蛋 白(g)	3.7	1.8
	粗 脂 肪(g)	0.5	0.3
	蔗 糖(g)	0.0	6.2
総 熱 量(Cal)	53.7	50.1 (中蔗糖分23.8)	
水 摂 取 量(ml)	22.6	31.2	

蔗糖および飼料摂取量：

飼育期間を通じて1日1頭当りの飼料と蔗糖ならびに飼料中に含有される栄養素の摂取量は表1に示すとおりである。試験区は1日平均6.2gの蔗糖を摂取し総熱量の47.6%を蔗糖で補給する結果となった。

体重の消長。

飼育期間中における対照区および試験区の平均体重の消長を図1に示した。飼育18週間経過の時いづれも体重の減少を認めたが、とくに試験区のラットに2頭の死亡をみた。これは室温飼育により温度が急に10℃以下に降下したためと推察したが試験区は気温の影響に鋭敏であり抵抗力も低下しているものと思われる。各個体の最終体重は表4に記したが、個体差が大きく対照区と試験区の間には有意差を認め得ないが、両区間の平均体重の成育曲線は常に試験区が約10%下廻っている。

2. 尿の一般検査

蔗糖投与10週間経過した時、ラットを1頭ずつ代謝ケージに移し、トルエン0.5ml入れた受器に尿を24時間蓄積し、一般臨床検査法¹⁶⁾に基づいて尿中の蛋白、還元糖、アセトン体、ウロ

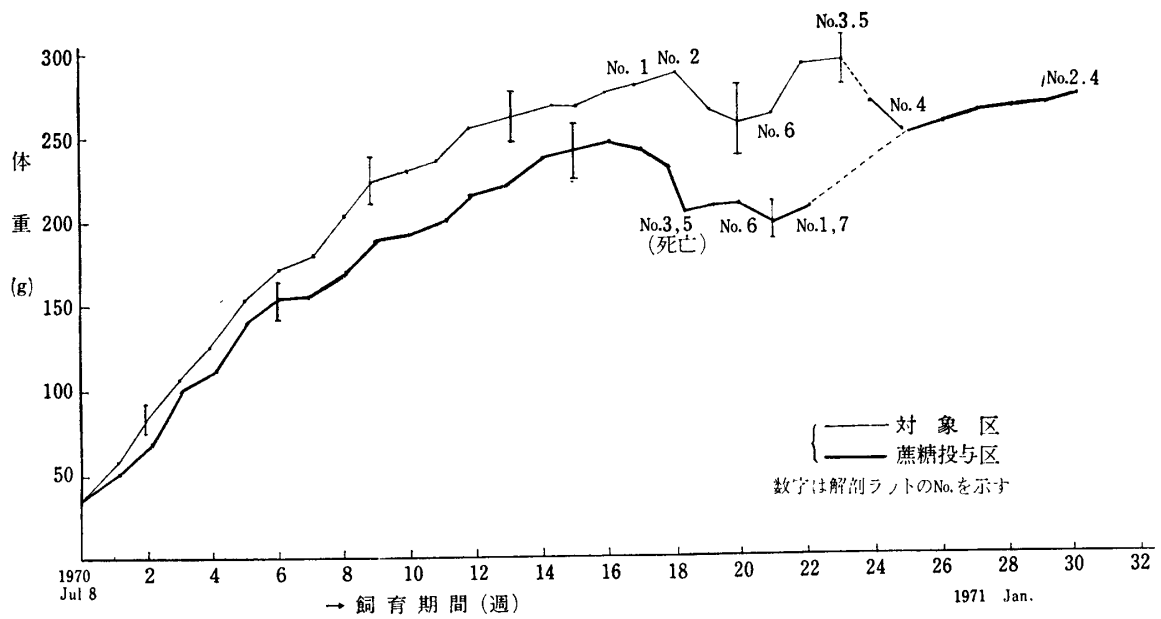


図1 ラットの生育曲線

表2 尿の一般検査

区分	ラット No.	還元糖		蛋白質	アセトン体	ウロビリノーゲン	1日尿量 (ml)
		ベネジクト反応	ニーランデル反応				
対照区	1	(-)	(-)	(±)	(-)	(+)	1.5
	2	(-)	(-)	(-)	(-)	(±)	1.8
	3	(-)	(-)	(-)	(-)	(±)	3.6
	4	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	6.9
	5	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	5.3
	6	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	4.1
試験区	1	(-)	(-)	(+)	(±)	(+)	19.2
	2	(+)	(±)	(-)	(±)	(+)	10.8
	3	(±)	(±)	(+)	(-)	(+)	17.3
	4	(±)	(-)	(-)	(-)	(±)	18.6
	5	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	29.5
	6	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	15.8
	7	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	27.8

ビリノーゲンの検出を行った。実験結果は表2に示すとおりであり、試験区に糖、蛋白弱陽性のものを若干認めたが、アセトン体、ウロビリノーゲンについてはとくに異常を認めなかった。

なお P.P.C. 法で尿中の糖の検出を行ったところ、試験区に蔗糖の存在を認めた。

3. ステロールの排泄量

飼育期間15~17週間の時、上記(2)と同様の方法で24時間の蓄積尿を採取し 3,000r.p.m, 10分間遠心分離にかけ上清 10ml を供試し、糞は新鮮物 2.0g を試料としてステロールを定量した。試料はアルコール性苛性カリを加えて30分間加熱鹼化した後、不鹼化物を石油エーテルで抽出して一定量採取し、溶媒を蒸発させた後、クロロホルムに溶かして Liebermann-Burchard 反応で発色させ 610m μ における吸光度を測定して、検量線から試料中の総コレステロールを算出した。1日1頭当りの尿および糞中コレステロール量ならびにコレステロール濃度は表3に示すとおりである。試験区は対照区に比べ尿中コレステロール濃度に大差はないが尿量が多いため、1日の尿中コレステロール量は頭著に多くなり、1%の危険率で有意差を認めた。尚糞中コレステロールは両区間に有意差を認めなかった。

表3 コレステロール排泄量

測定事項 区分	ラット No	尿中コレステロール		糞中コレステロール		1日1頭当り コレステロ ール排泄量 〔A〕+〔B〕
		コレステ ロール濃度 (mg%)	1日1頭当りコ レステロール 量〔A〕(mg)	コレステ ロール濃度 (mg%)	1日1頭当りコ レステロール 量〔B〕(mg)	
対 照 区	1	6.05	0.14	470.	9.4	9.54
	2	5.02	0.09	290	15.8	15.89
	3	3.12	0.11	390	27.3	27.41
	4	1.95	0.10	310	31.0	31.10
	5	2.00	0.11	500	20.9	21.01
	6	2.20	0.11	235	5.4	5.51
$\bar{x} \pm \sigma$		3.39 \pm 1.75	0.11 \pm 0.02	365.8 \pm 105.3	18.3 \pm 10.0	18.41 \pm 10.00
試 験 区	1	3.00	1.29	590	32.45	33.74
	2	2.10	0.40	350	20.30	20.70
	3	5.30	0.87	355	7.10	7.97
	4	2.94	0.48	410	20.10	20.58
	5	2.90	0.27	430	19.30	19.57
	6	8.87	1.14	397	11.04	12.18
	7	3.16	1.17	425	21.50	22.67
$\bar{x} \pm \sigma$		4.04 \pm 2.35	0.80 \pm 0.27 $t_0=6.21^{**}$	422.4 \pm 80.4	18.83 \pm 8.11	19.63 \pm 8.18

4. 薄層クロマトグラフィによる尿中コレステロールの同定

上記(3)の Liebermann-Burchard 反応で陽性を示す物質を同定するため、尿の鹼化物について薄層クロマトグラフィ (T.L.C.) を行い、コレステロール標準品と比較を行った。T.L.C. は常法¹⁷⁾によりシリカゲル G 15g に水 35ml 加え、0.25mm の厚さにした薄層を100 $^{\circ}$ C, 1時間加熱し活性化したものを使用した。展開溶媒にはベンゼン, エチルエーテル 1:1 の混液を使用し、26 $^{\circ}$ Cの室温で10cm (30分間) 展開した。展開後薄層を風乾し、10%リンモリブデン

表4 ラット内臓諸組織ならびに血清中のコレステロール量

供区 試体分	ラット No.	体重 (g)	供試糖投与 期 間 年月日 (週間)	肝 臓		腎 臓		心 臓		体 脂 肪		血 清 コレステ ロール (mg%)					
				コレステ ロール濃 度(mg%)	コレステ ロール含 量(mg/頭)	コレステ ロール濃 度(mg%)	コレステ ロール含 量(mg/頭)	コレステ ロール濃 度(mg%)	コレステ ロール含 量(mg/頭)	コレステ ロール濃 度(mg%)	コレステ ロール含 量(mg/頭)						
対 照 区	1	204.0	1970. 10.3	0	6.50	180	16.65	1.60	456	7.30	0.92	201	1.85	3.02	171	5.19	164
	2	222.8	11.2	0	6.40	418	26.79	1.00	984	9.84	0.94	175	1.65	2.81	168	4.71	191
	6	250.5	11.26	0	11.81	370	43.69	1.96	546	10.74	0.92	228	2.10	5.07	204	10.36	134
	5	288.6	12.8	0	11.19	300	33.55	1.03	1114	11.50	0.98	102	2.20	9.85	173	17.05	127
	3	309.4	12.10	0	12.06	300	36.00	2.15	568	12.20	1.40	71	2.05	11.52	132	15.16	125
試 験 区	4	249.6	12.15	0	12.21	500	60.83	2.42	484	11.70	1.27	135	1.75	7.21	113	8.15	138
	$\bar{x} \pm \sigma$	254.5 ± 39.39				344.7 ± 110	36.25 ± 15.11		692.0 ± 282	10.55 ± 1.79		152.3 ± 60	1.93 ± 0.22		160.2 ± 32	10.10 ± 5.12	146.5 ± 25.91
	6	169.5	1970. 11.17	20	5.39	319	17.17	1.30	720	9.37	0.88	308	2.70	3.40	124	4.22	256
	7	207.6	12.1	22	7.83	500	39.14	1.55	616	9.54	0.93	248	2.30	4.35	140	6.07	156
	1	208.5	12.3	22	10.09	597	60.21	1.63	458	7.48	0.83	154	1.30	5.57	134	7.51	155
試 験 区	2	263.2	1971. 2.4	31	7.77	348	27.02	1.60	486	7.78	0.95	147	1.40	16.28	66	10.75	175
	4	303.8	2.6	32	12.56	300	37.68	2.28	528	12.06	1.35	296	4.00	6.71	72	4.83	163
	$\bar{x} \pm \sigma$	230.5 ± 52.85				412.8 ± 127	36.24 ± 16.08		561.6 ± 106	9.25 ± 1.82		230.6 ± 76	2.34 ± 1.10		107.2 ± 35	6.67 ± 2.60	181 ± 42.67
	3	128															
	5	195															

11月4日死亡

11月6日死亡

酸アルコール溶液又は50%硫酸を噴霧して120°, 3分間加熱し呈色させた。試験区, 対照区いづれの尿にも Rf 0.73 に明確なスポットを認め, これは同時に展開した標準 コレステロールの Rf と一致したため尿中にコレステロールの存在を確認した。未ケン化の尿ではコレステロールの他数個の脂質のスポットがみられた。

5. 組織および血清コレステロールの定量

蔗糖投与期間 20, 22, 31, 32 週間経過したラットを各々エーテル麻酔の後, 屠殺解剖し, 肝, 腎, 心臓, 体脂および血清コレステロールの定量を行った。測定法は前記(3)のとおりで組織 2g 前後を精秤し, 乳鉢で磨砕後, 鹼化して総コレステロールとして定量した。血清コレステロールは Bloor, Allen の改法¹⁸ に基づき, 血清 0.2ml 中のコレステロールをアルコール, エーテル 3:1 混液 9.8ml で1時間抽出し, 遠心分離の上清 8.0ml を蒸発乾固させクロロホルムに溶かして前記(3)と同様に比色定量した。

測定結果は表 4 に示すとおりで, 1頭当りのコレステロール平均含有量は肝および腎組織においては試験区, 対照区間に大差なく, 血清および心臓は試験区に多く, 体脂組織では対照区に若干多いがいづれも個体差が多く統計処理の結果有意差を認め得ない。表 5 は体重 1 kg 当りの内臓の重量であるが, 試験区, 対照区間に有意差はなく, 試験区の腎臓が若干重い傾向を示した。

表 5 内臓諸組織の重量比 (g/体重kg)

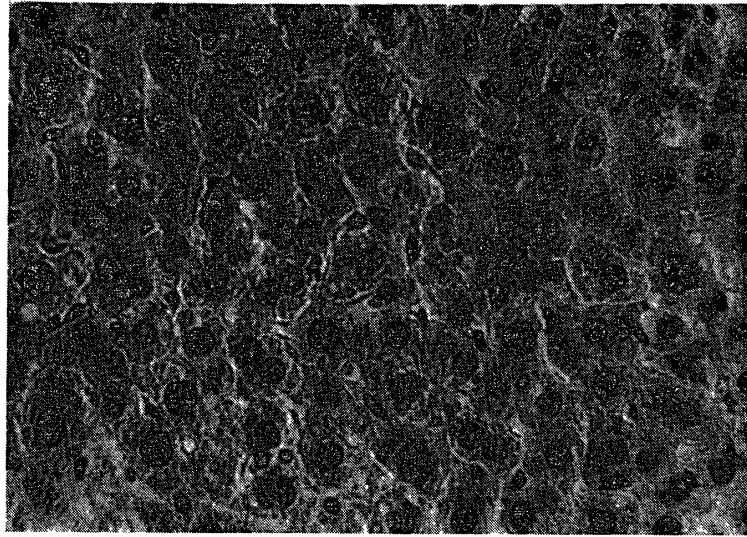
区分	ラット No.	組 織				
		肝 臓	腎 臓	心 臓	体 脂 肪	
対 照 区	1	31.86	7.84	4.50	14.80	
	2	28.72	4.48	4.21	12.61	
	3	38.97	6.94	4.52	48.99	
	4	48.91	6.69	5.08	32.65	
	5	38.77	3.56	3.39	59.07	
	6	47.14	7.82	3.69	41.35	
	$\bar{x} \pm \sigma$		39.06 ± 8.01	6.22 ± 1.74	4.22 ± 0.61	34.91 ± 18.60
試 験 区	1	48.39	7.81	3.98	26.71	
	2	29.59	6.07	3.60	61.85	
	4	41.34	7.05	4.41	22.08	
	6	31.79	7.66	5.19	20.05	
	7	37.71	7.46	4.47	20.95	
	$\bar{x} \pm \sigma$		37.76 ± 7.55	7.21 ± 0.69	4.33 ± 0.59	30.32 ± 17.80

6. 組織の病理学的所見

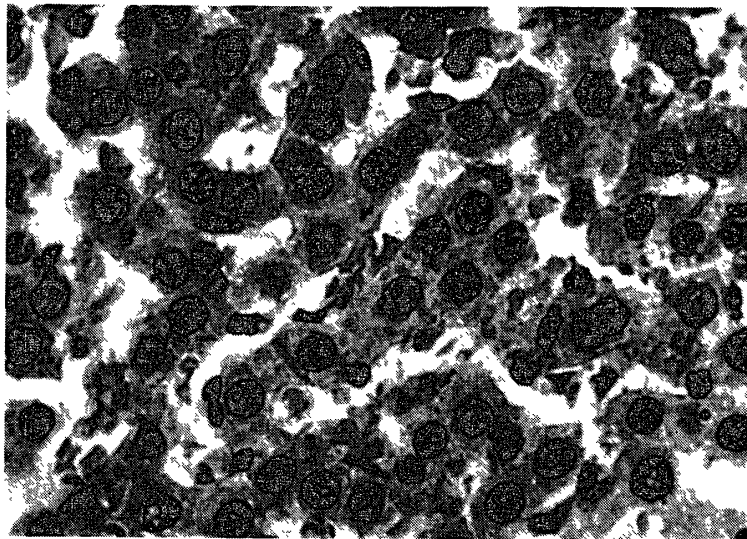
屠殺解剖した上記(5)の内臓諸組織の一部を直ちにホルマリンで固定し, 常法により厚さ 6 μ の標本を作成しヘマトキシリン, エオシンで二重染色を行った後, 組織の病理学的変化を検索した。

標本鑑識の結果, 蔗糖投与22週間経過の肝組織に軽度, 32週間経過の肝組織に中等度の水腫

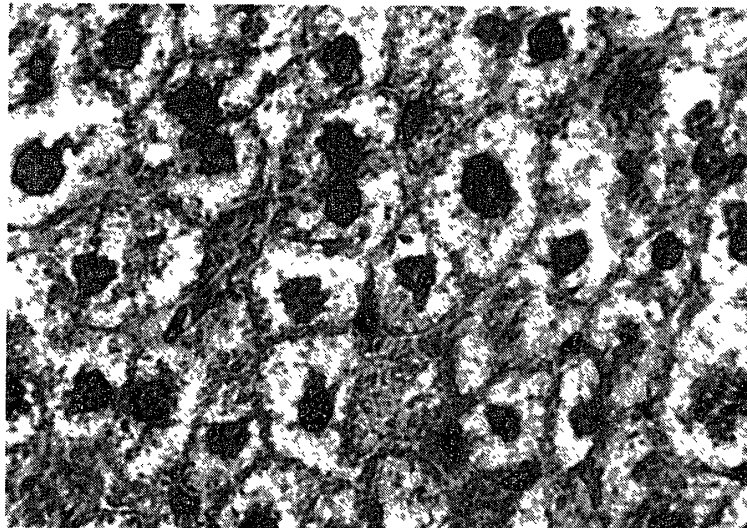
瘍変性を認めた（図版 a~c 参照）。しかし脾，腎，心臓動脈に著変を認めず，肝組織はスタン染色によっても脂肪の存在を認めなかった。



a. 対照区ラット肝組織像 (10×40)



b. 蔗糖投与（カロリー比率48%）22週間経過ラット肝組織像 (10×40)



c. 蔗糖投与（カロリー比率48%）32週間経過ラット肝組織像 (10×40)

考 察

1) ラットに蔗糖水溶液と固形飼料を任意に摂取させて飼育した場合、1日1頭当りの平均摂取量は蔗糖 6.2g, 飼料 7.4g となり固形飼料は対照区の48%, 総熱量は対照区の93%となり、成育曲線は試験区が終始10~13%下廻り、飼育期間中7頭中2頭が死亡した。今回のラットの糖摂取量はカロリー比率47.6%で従来の諸氏のカロリー比率60%以上の糖投与実験に比べると糖量は少ないが、長期間飼育したため体重の消長にも顕著な差が出たものと思われる。

2) 尿の一般検査では10週間飼育時においては蛋白弱陽性のものが2頭出現した程度であるが、32週間飼育した場合、肝組織に病理学的変化が現れ Bender¹¹⁾ 氏の肝機能低下の報告が裏づけられるように思う。また尿の糖類を P.P.C. 法で検出したところ試験区に顕著な蔗糖を認めしたが、多量の蔗糖を摂取した場合それが血行移行して尿に排泄されるのか、ブドウ糖と果糖に分解した後再び蔗糖に合成されるのか不明であるが、Gorodeckij¹⁰⁾ 氏は正常人の尿中に17~67mg%, 蔗糖100g 与えた尿に 80mg%の蔗糖を認めており興味深く思う。

3) 尿および内臓諸組織のコレステロール量については、肝、腎、体脂肪ではいずれも個体差大きく、試験区と対照区間に有意差を認めず、心臓組織と血清コレステロールは試験区がやや多い傾向である。尿中コレステロールは試験区、対照区とも濃度はほぼ同じであるが、試験区の尿量は平均5倍におよび、1日当りのコレステロール排泄量は試験区が顕著に多く危険率1%で有意差を認めた。摂取した水量は試験区は対照区の1.4倍(表1参照)にすぎないがなぜ尿量が5倍に及ぶのか、体内で合成された余分のコレステロールを排泄するため尿量が増加するのか、又は尿量が多くなったためにコレステロールの排泄量も増加したのか、これらの点の解明は今後の課題である。

糞中コレステロール量は両区間に差を認めないが、固形飼料は200mg%のコレステロールを含み、試験区の飼料摂取量は対照区の48%であることを考えると、糞中コレステロールは生体の内的因子に影響されることが解る。また試験区では摂取飼料中のコレステロール量以上のものが糞中にみられ、この点でも蔗糖が体内の脂質、コレステロール代謝に何らかの影響を及ぼすことが示唆されるものと考えられる。

要 約

1) ラットに20%蔗糖水溶液を任意に摂取させて32週間飼育したところ、糖平均摂取量は総熱量の47.6%となり試験区の体重は約10%対照区より低下した。

2) 尿の一般検査では試験区に蛋白陽性のものを認め、試験区の尿量は対照区の5倍に達し、尿中のコレステロール排泄量は試験区が多く顕著な有意差を認めた。内臓諸組織のコレステロール量では有意差を認めなかった。

3) 蔗糖投与32週間のラットの肝組織に病理学的変化を認めた。

本研究にあたり組織標本の作成と鑑定を賜った三重大学医学部病理学、伊豆津公作教授と瀬尾末雄氏ならびに実験に協力頂いた和泉多恵子、加藤律子、小林崇子、鈴木梅子諸氏に深く感謝いたします。

参 考 文 献

- 1) 五島雄一郎：1966, 日本老年学会誌, **3**, p. 295
- 2) 平沢美美子, 小池五郎他：1971, 栄養と食糧, **24**, p. 405
- 3) 中村治雄：1969, *Medicine*, **6**, p. 412
- 4) Kaufmann N. A. et al. :1966, *Am. J. Clin. Nutr.* **18**, p. 261
- 5) Hill P. et al. :1970, *Lipids*, **5**, p. 621
- 6) 竹越忠美：1970, 日循環誌, **34**, p. 959
- 7) 小池五郎他：1972, 栄養と食糧, **25**, p. 328
- 8) Yadkin, J. et al. :1964, *Lancet*, **2**, p. 4
- 9) Cohen, A. M. & Shoshan S. :1968, *J. Atherosclerosis Res.*, **8**, p. 371
- 10) Bullock B. et al. :1971, *Exp. mal. Pathol.*, **5**, p. 21
- 11) Bender A. E. :1970, *Nut. Proc. Int. Congs.*, **8**, p. 70
- 12) Baron P. et al. :1971, *Enzyme*, **12**, p. 481
- 13) Crossley J. N. :1970, *Nut. Metabolism*, **12**, p. 171
- 14) Aller R. T. et al. :1966, *Br. J. Nutr.*, **20**, p. 339
- 15) 中村治雄：1971, 治療, **53**, p. 1376
- 16) 上田英雄他：1964, 臨床検査法 (杏林書院)
- 17) 鈴木郁生：1967, 薄層クロマトグラフィーの実際 (広川書店)
- 18) 大島寿美子, 鈴木慎太郎：1964, 栄雑, **22**, p. 207
- 19) Gorodeckij V. K. :1971, *Nutr. abs. Rev.*, **41**, p. 1247