



<原著>

単糖類過剰餌の摂取が急性大腸炎モデルラットの病態に与える影響

岡田光貴^{1,2)}、佐々木流空²⁾、登尾慎太郎²⁾

Effects of excess dietary monosaccharide on the pathogenesis of acute colitis in rats

Kohki Okada¹⁾, Ruku Sasaki²⁾, Shintaro Noborio²⁾

Summary We here assessed the severity of acute colitis in rat models fed a diet containing an excess of monosaccharides. Rats were administered of 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid rectally to induce colitis, then fed either a normal diet or special diet containing a 62.95% calorie ratio of glucose, fructose, or galactose (N, Glu, Fru, and Gal groups) for 10 days. Rats in the N and Gal groups showed decreased body weight and atrophied colon length. In the colons of rats in the N and Gal groups, goblet cells were shed and a high degree of immune cell infiltration was observed. Mucosal structure was relatively preserved in the colons of rats in the Glu and Fru groups. Cytokines were measured in colons and serum, and increases in interleukin-6 and tumor necrosis factor- α were especially marked in Gal group rats. Galactose intake may be a particular risk factor for exacerbating the pathogenesis of colitis.

Key words: fructose, galactose, glucose, inflammatory bowel disease, 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid

I. 緒言

潰瘍性大腸炎やクローン病といった炎症性腸疾患 (IBD) は慢性的な腹痛、下痢、下血を繰り返す難病である¹⁾。IBDの患者数は特に米国とヨーロッパで年々増加しているが、日本でも人口当たりの発症率が極めて高いことが指摘されている²⁾。IBDの発症機序は現在でも不明で

あるが、腸内細菌叢の変化に伴う免疫機能異常が原因の一端と考えられている³⁾。実際、欧米諸国における高炭水化物かつ高脂質の食事習慣は腸内細菌の分布を乱すことが示されており⁴⁾、これがIBD患者数の増加に寄与している可能性は高い。反対に、乳酸菌に代表されるプロバイオテックスの摂取は腸内細菌叢のバランスを改善し、IBDの病態を効果的に改善することが報告

¹⁾ 京都橘大学 健康科学部 臨床検査学科
〒607-8175 京都府京都市山科区大宅山田町34

²⁾ 京都橘大学大学院 健康科学研究科
〒607-8175 京都府京都市山科区大宅山田町34

連絡先：岡田 光貴
京都橘大学健康科学部臨床検査学科
Tel:+81-755-74-4486 (ex.4942)
E-mail : okada-ko@tachibana-u.ac.jp

¹⁾ Department of Medical Technology and Sciences, Faculty of Health Sciences, Kyoto Tachibana University, 34 Yamada-cho Oyake, Yamashina-ku, Kyoto-shi, Kyoto, 607-8175, Japan

²⁾ Graduate School of Health Sciences, Kyoto Tachibana University, 34 Yamada-cho Oyake, Yamashina-ku, Kyoto-shi, Kyoto, 607-8175, Japan

されている⁵⁾。日常的な食事習慣においても、ビタミンやミネラルを豊富に含む果物や野菜を食べることがIBDの症状を改善することが示されている⁶⁾。以上の背景から、日常の食事に含まれる栄養成分がIBDの病態に大きな影響を及ぼすことは明らかである。実際、動物性脂肪とタンパク質の摂取を制限する新しい食事療法により、IBDの寛解導入を早めることに成功した例もある⁷⁾。このようにIBDを悪化あるいは寛解に導く食事成分の選定は重要であり、更なる探求が望まれている。

グルコース、フルクトース、ガラクトースといった単糖類は、極めて一般的な栄養成分である。グルコースは米やパンなどの炭水化物が消化吸収された後に生成し、フルクトースは野菜や果物に多く含まれる⁸⁾。ガラクトースは、それがグルコースと結合した二糖類である乳糖と共に、牛乳および乳製品に多く含まれている⁹⁾。これら糖類は重要な栄養成分であるが、その過剰摂取は、肥満、2型糖尿病、メタボリックシンドローム、心血管疾患の発症と強く関連している¹⁰⁾。近年では、これら糖類を含む甘味飲料の過剰摂取が、関節リウマチなどの自己免疫疾患の発症や悪化に関連していることが判明している¹¹⁾。また、フルクトースの大量摂取はリンパ球の総数を減少させること、グルコースの大量摂取はインターロイキン(IL)-6の活性化とTヘルパー17細胞の分化を促進すること、など単糖類の摂取が免疫機能に影響を及ぼす可能性が示されている^{12,13)}。我々は以前、硫酸化デキストラン(DSS)誘導性大腸炎を発症させたラットに、グルコースあるいはフルクトースを過剰に含む特殊飼料を与え、経過を観察した。結果、通常の飼料を摂取した場合と比較して、糖類を過剰に含む餌を摂取した場合には更に大腸炎が悪化することを確認した¹⁴⁾。しかし、この研究では飲用水を3%DSSに置き換えることで大腸炎を誘導しているため、実験日数の経過に伴い病態が悪化する。ヒトのIBD治療では、病態の悪化時には絶食や食事制限が実施されることから、この研究は実際のIBD患者を想定した実験モデルとは言い難い。また、この研究内ではガラクトース過剰飼料がIBDの病態に与える影響について検討できていなかった。した

がって、これらの弱点を改善した、新たな研究が必要である。以上の背景を踏まえ、本研究では、ラットに2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸(TNBS)誘導性大腸炎を発症させた後の寛解過程において、グルコース、フルクトース、あるいはガラクトースを過剰に含む飼料を与え、それらが病態に与える影響を精査する。TNBS誘導性大腸炎は、IBDの中でもクローン病の病態に酷似することが知られている¹⁵⁾。特にクローン病の食事療法では厳密な栄養管理を必要とするため、本研究の成果は有益な情報提供となりうる。

II. 材料と方法

1. 対象動物

本研究は京都橋大学動物実験委員会に承認を受け実施した(承認番号: 23-04)。野生型Slc: Wistarラット(WT、オス、9週齢、220-250 g)は、清水実験材料株式会社(京都)から入手した。実験に先立ち固形飼料(MF、オリエンタル酵母工業株式会社、東京)と蒸留水を自由に摂取できるようにして、1週間飼育した。実験期間中は温度(22℃)と湿度(60%)を制御し、昼夜のサイクルが12時間おきに切り換わるよう人工光で調整した。ラットは金網を敷いたプラスチックケージで飼育した。

2. 材料

TNBS二水和物は、富士フィルム和光純薬工業株式会社(東京)から購入した。マイヤーヘマトキシリン液とピュア・エオシン液は武藤化学株式会社(東京)から入手した。IL-6、IL-1 β 、およびTumor necrosis factor- α (TNF- α)の酵素結合免疫吸着法(ELISA)測定キット、Anti-Neutrophil Elastase(NE) IgG、タンパク抽出液PRO-PREP™はコスモ・バイオ株式会社(東京)から入手した。遺伝子抽出液TRIzol™ reagent、SuperScript™ II Reverse Transcriptase、PowerUp SYBR Green Master Mix、およびIL-6、IL-1 β 、TNF- α 、IL-10、Transforming growth factor(TGF)- β のプライマーはThermo Fisher Scientific, Inc.(Waltham, MA, USA)から入手した。設計したプライマーの配列は過去に使用したものと同様に、Table 1の通りである¹⁶⁾。Peroxidase(HRP)

-labeled anti-rabbit IgG (H+L) goat-poly IgGはフナコシ株式会社（東京）から入手した。その他の試薬は全て和研薬株式会社（京都）あるいはナカライテスク株式会社（京都）から購入した。

3. 方法

1) 動物実験のプロトコル

動物実験に先立ち、TNBS二水和物を100 mg/mLの濃度になるよう50%エタノールに溶解した。全てのWT (N=24) に3種混合麻酔（塩酸メドミジン0.375 mg/kg+ミダゾラム2.0 mg/kg+酒石酸ブトルファノール2.5 mg/kg）を腹腔内注射し、深麻酔下で100 mg/kgのTNBS溶液を外径1cmのテフロン製動物用経口投与チューブで肛門部から大腸内へ投与、深麻酔が切れるまで数時間は肛門部を上向きにして飼育ケージに

静置し、大腸炎を誘導した。過去の文献に基づき、TNBS溶液はラットに急性大腸炎を発症させるための充分量に設定した¹⁷⁾。その後、N=6ずつ以下の①-④のグループに分類した。① N群 - 実験期間の10日間、通常の粉末飼料（AIN-93G、オリエンタル酵母工業株式会社）を摂食した群。② Glu群 - 実験期間の10日間、グルコースを過剰（カロリー比62.95%）に含む粉末飼料を摂食した群。③ Fru群 - 実験期間の10日間、フルクトースを過剰（カロリー比62.95%）に含む粉末飼料を摂食した群。④ Gal群 - 実験期間の10日間、ガラクトースを過剰（カロリー比62.95%）に含む粉末飼料を摂食した群。各粉末飼料の構成成分と含有量はTable 2の通りである。実験期間中、各ラットの体重を毎朝測定し、臨床的重症度（DAI）スコアをTable 3に示す基

Table 1 List of primers used in this study.

	Gene	Forward	Reverse	Size (bp)
For Real-Time PCR	β-Actin	5'-TGTGTTGTCCCTGTATGCCCTCTG-3'	5'-ATAGATGGGCACAGTGTGGTG-3'	85
	IL-1β	5'-CACCTCTCAAGGAGAGCACAGA-3'	5'-ACGGGTTCATGTTGAAGTC-3'	81
	IL-6	5'-ATATGTTCTCAGGGAGATCTGGAA-3'	5'-GTGCATCATCGCTGTTCATACA-3'	80
	IL-10	5'-CCCTCTGGATACAGCTGCG-3'	5'-GCTCCACTGCCTTGCTTTTATT-3'	69
	TNF-α	5'-GTGATCGGTCCCAACAAGGA-3'	5'-AGGGTCTGGGCCATGGAA-3'	71
	TGF-β	5'-ACCTGCAAGACCATCGACATG-3'	5'-CGAGCCTTAGTTGGACAGGAT-3'	85

Table 2 Content and composition of experimental diets.

Ingredient	Unit	AIN-93G	Glucose diet	Fructose diet	Galactose diet
Casein	%	20	20	20	20
Cystine	%	0.3	0.3	0.3	0.3
alpha cornstarch	%	39.75	-	-	-
beta cornstarch	%	13.2	-	-	-
Sucrose	%	10	-	-	-
Glucose	%	-	62.95	-	-
Fructose	%	-	-	62.95	-
Galactose					62.95
Soybean oil	%	7	7	7	7
Cellulose powder	%	5	5	5	5
Minerals	%	3.5	3.5	3.5	3.5
Vitamins	%	1	1	1	1
Choline bitartrate	%	0.25	0.25	0.25	0.25
T-Butylhydroquinone	%	0.0014	0.0014	0.0014	0.0014
Total	%	100	100	100	100
Components	Unit	AIN-93G	Glucose diet	Fructose diet	Galactose diet
Water	g	9	9	9	9
Crude protein	g	18.1	16.9	16.9	16.9
Crude fat	g	7.3	6.6	6.6	6.6
Crude ash	g	3.1	2.8	2.8	2.8
Crude fiber	g	5	4.7	4.7	4.7
Nitrogen free extract (NFE)	g	57.6	60	60	60
Calorie	kcal	368	366.6	366.6	366.6
Protein calorie ratio	%kcal	19.6	18.4	18.4	18.4
Fat calorie ratio	%kcal	17.8	16.1	16.1	16.1
NFE calorie ratio	%kcal	62.6	65.5	65.5	65.5

per 100g diet

準に基づいて0-4の数値で評価した¹⁸⁾。実験の10日目に深麻酔下で解剖を実施し、心臓からの採血を実施した。さらに、大腸をすばやく摘出し、その長さを測定した。

2) 検体の採取と調製

血液検体 (3 mL/ラット) は凝固を確認した後で遠心分離 (3,500 rpm、10分) し、得られた血清をチューブに移し、使用するまで-80℃で保存した。

大腸検体は摘出した後で均等に3分割し、直腸に近い側から直腸部、中間部、近位部と名付けた。組織学的評価のために大腸各部位を10%ホルマリン/0.1Mリン酸緩衝液 (pH7.4) で固定し、その後パラフィンに包埋した。未固定の残存組織中のmRNAは以下の要領で抽出した。

大腸各部位 (直腸部、中間部、近位部) 300 mgをそれぞれ1.0 mLのTRIzol™ 試薬中で10分間インキュベートし、本試薬のプロトコルに従って大腸組織のmRNAを抽出した。SuperScript™ II Reverse Transcriptaseを用いて本試薬のプロトコルに従いmRNAからcDNAを合成、それらをチューブ内にて-20℃で保存した。

3) 大腸組織の病理組織学的解析

全ラットの大腸組織から3μm厚の組織切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン (H&E) 染色を実施した。ラットの大腸各部位 (直腸部、中間部、近位部) 全てを鏡検し、最も炎症所見を強く認めた直腸部の写真を、本論文に掲載した。さらに、Anti-NE IgGを用いて、直腸部における好中球浸潤の程度 (NEの発現) を、ジアミノベンチジン (DAB) を用いた免疫染色により確認した¹⁹⁾。画像はBIOREVO BZ-9000顕微鏡 (株式会社キーエンス、大阪) を用いて撮影した。

4) ELISA

血清中の炎症性サイトカイン濃度をELISAにて測定した。IL-6、IL-1β、およびTNF-α濃度を、それぞれのELISAキットを用いて、製品プロトコルに従って測定した。発色反応の吸光度はBio-Rad Laboratories, Inc (Hercules, CA, USA) のiMark™ マイクロプレートリーダーを用いて波長450 nmで測定した。

5) Real-Time PCR

Real-Time PCRは、StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific社製) を用いて、過去の報告と同様の手法でサイトカイン5種類 (IL-6、IL-1β、TNF-α、IL-10、TGF-β) を測定した^{14, 16)}。分析試料には、各ラット群の直腸部から抽出したmRNAに由来するcDNAを採用した。ハウスキーピング遺伝子はβ-actinとし、N群の直腸部における各種サイトカインmRNA発現量を「1」とした相対定量値を算出した (ΔΔCT法)。

6) ラット血清に対する生化学検査

オリエンタル酵母工業株式会社、長浜工場、長浜ライフサイエンスラボラトリー (滋賀) に外注し、ラット血清の生化学検査19項目を分析した。試料として、各群N=6のラット血清を等量混合し、試料間の個体差を平均化した。この試料調製では個体間のばらつきが計測できず、有意差検定も不可である。一方で、この調製法によって19項目の測定に十分な血清量が確保でき、ELISAに使用するための各ラット血清を残すことが可能である。測定機器はJCA-BM6050 (日本電子株式会社、東京) であり、測定項目は次の通りである。総蛋白 (TP)、アルブミン (ALB)、グルコース (GLU)、尿素窒素 (BUN)、クレアチニン (CRE)、尿酸 (UA)、鉄 (Fe)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、アルカリホスファターゼ (ALP)、乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH)、

Table 3 Criteria used for DAI scoring.

Scores	Weight loss (%)	Stool consistency	Occult/gross bleeding
0	None	Normal	Normal
1	1-5	(Completely solid stool)	(Stool that does not contain any blood)
2	6-10	Loose stool	Occult bleeding
3	11-20	(Soft, but not watery stool)	(Blood on stool surface)
4	>20	Diarrhea (Completely watery stool)	Gross bleeding (Mucous and bloody stool)

アミラーゼ (AMY)、クレアチンキナーゼ (CK)、 γ -グルタミルトランスペプチダーゼ (γ -GT)、コリンエステラーゼ (ChE)、リパーゼ (Lip)、総コレステロール (T-CHO)、LDL-コレステロール (LDL-C)、HDL-コレステロール (HDL-C)。

7) 統計解析

各群間の有意差は統計解析ソフトウェアEasy R 4.3.1を用いて、Mann-Whitney U検定により評価した²⁰⁾。数値データはグラフ内に平均値±標準

偏差 (SD) で示した。P値<0.05を統計的に有意とした。

Ⅲ. 結果

1. 体重の変動と飼料の消費量

N群は4日目まで体重が減少し、それ以降は徐々に増加した (Fig. 1A)。Glu群は体重減少が早期に改善し、以降はむしろ増加する傾向に

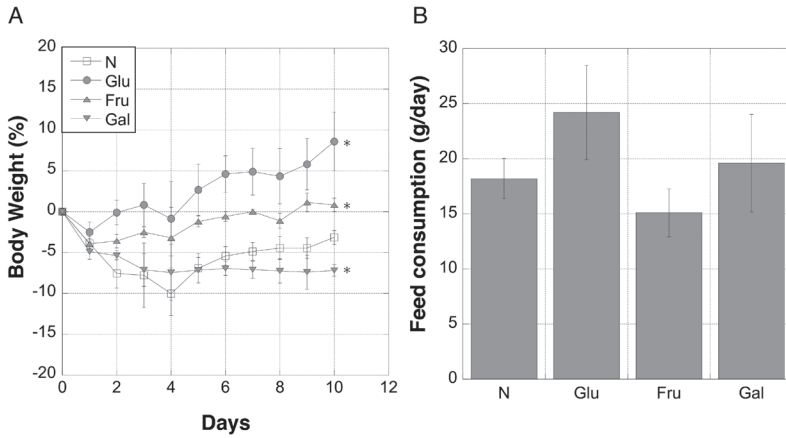


Fig. 1 Changes in rat body weights and feed consumption. (A) The y-axis represents the percent fluctuation in body weight in N (white square), Glu (gray circle), Fru (gray triangle), and Gal (gray inverted triangle) rat groups. The x-axis shows days after initiating the experiment. (B) The y-axis shows amount of food consumed per day. On the x-axis N, Glu, Fru, and Gal rat groups are arranged in order from left to right. All data values are presented as means \pm standard deviations (\pm SD). *P < 0.05 (N vs other groups); N=6.

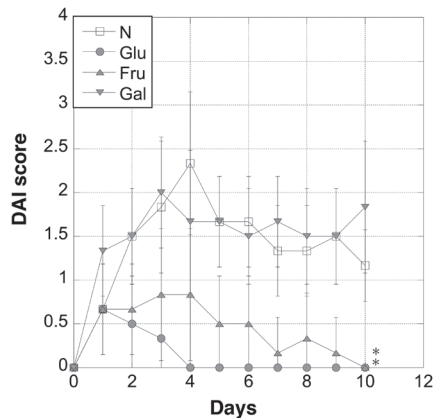


Fig. 2 Changes in rat DAI scores. DAI scores were assessed based on established criteria¹⁷⁾. The y-axis represents fluctuations in DAI scores for N (white squares), Glu (gray circles), Fru (gray triangles), and Gal (gray inverted triangles) rat groups. The x-axis shows days after initiating the experiment. All data values are presented as means \pm standard deviations (\pm SD). *P < 0.05 (N vs other groups); N=6.

あった (Fig. 1A)。Fru群では早期に体重が減少した後、実験期間を通じて緩やかに回復した (Fig. 1A)。Gal群は体重が減少した後の回復を認めず、最終的には最も減少率が大きかった (Fig. 1A)。なお、各飼料の1日当たりの消費量には有意差を認めなかったが、Glu群 (24.20 ± 4.28 g/day) で消費が多く、Fru群 (15.10 ± 2.18 g/day) で消費が少ない傾向を認めた (Fig. 1B)。

2. DAI スコアの変動

特にN群とGal群で、実験期間を通じてDAIスコアの増加を認めた (Fig. 2)。一方、Glu群とFru群では一時的にDAIスコアは上昇したものの、最終的には両群とも0となった (Fig. 2)。

の、最終的には両群とも0となった (Fig. 2)。

3. 大腸の長さの違い

大腸の長さはGlu群 (16.70 ± 2.10 cm) とFru群 (17.10 ± 1.67 cm) に対して、N群 (14.90 ± 1.27 cm) とGal群 (14.70 ± 1.11 cm) では短縮傾向にあった。(Fig. 3A and B)。

4. 大腸組織の病理組織解析

Glu群とFru群の大腸では杯細胞の消失が軽度であり粘膜上皮の構造がある程度保たれ、免疫細胞の浸潤も少なかった (Fig. 4A)。一方、N群とGal群では粘膜上皮や杯細胞の脱落が顕著

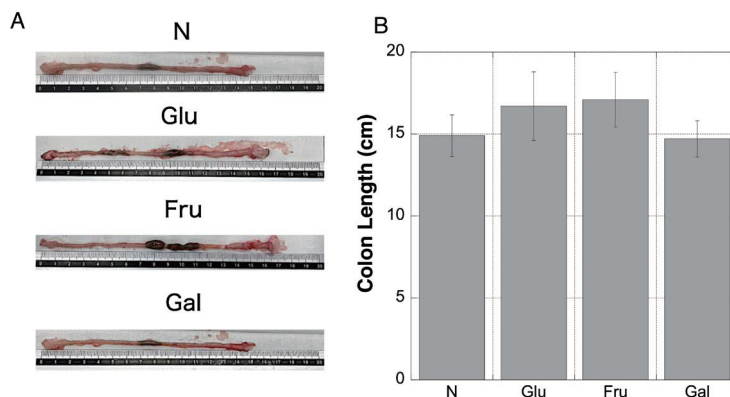


Fig. 3 Changes in rat colon lengths. (A) Images of representative colon tissues from N, Glu, Fru, and Gal rat groups from top to bottom. (B) Rat groups are displayed in the order N, Glu, Fru, and Gal (left to right) on the x-axis. Values are presented as means \pm standard deviations (\pm SD); N=6.

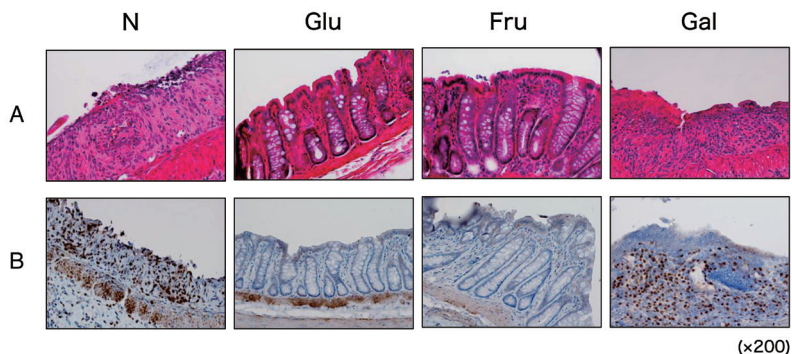


Fig. 4 Evaluation of histological severity in rat colonic tissues. (A) Microscopic H&E stained images of colon tissues from N, Glu, Fru, and Gal rat groups from left to right. (B) Results of immunohistochemistry staining with DAB to visualize neutrophil elastase (dark brown) in colon tissues from N, Glu, Fru, and Gal rat groups (left to right). Nuclei were stained blue with hematoxylin. All microscopic images were captured using a BIOREVO BZ-9000 microscope (Keyence Co. Ltd., Osaka, Japan). High power magnification (\times 200) was used for all panels.

であり、大腸全体的に免疫細胞の浸潤が高度であった (Fig. 4A)。好中球の浸潤を確認したところ、やはりN群とGal群で多くの陽性部位 (茶褐色) を確認した (Fig. 4B)。

5. 血清中炎症性サイトカインの測定結果

血清中のIL-1 β はN群 (21.56 \pm 6.67 pg/mL) とFru群 (20.89 \pm 7.80 pg/mL) でやや高い傾向となったが、有意差は認めなかった (Fig. 5A)。血清中IL-6に関しては他群よりも、Gal群 (96.82 \pm 19.80 pg/mL) でやや高値であった (Fig. 5B)。血清中TNF- α に関しては、N群 (21.03 \pm 5.20 pg/mL) と比較して他3群はいずれも有意に高値であった (Fig. 5C)。

6. 大腸組織中炎症性サイトカインの測定結果

大腸組織中のIL-1 β はFru群 (192.0 \pm 38.50 pg/mL \cdot g) が最も高い傾向となったが、有意差は認めなかった (Fig. 6A)。大腸組織中IL-6に関してはN群 (228.2 \pm 29.10 pg/mL \cdot g) と比較してFru群 (152.70 \pm 14.70 pg/mL \cdot g) で有意に低値であり、逆にGal群 (279.10 \pm 18.80 pg/mL \cdot g) で有意に高値であった (Fig. 6B)。大腸組織中TNF- α に関しては、N群 (175.80 \pm 17.20 pg/mL \cdot g) と比較してGal群 (218.0 \pm 15.20 pg/mL \cdot g) が有意に高値であった (Fig. 6C)。

7. 大腸組織におけるサイトカイン5種類の

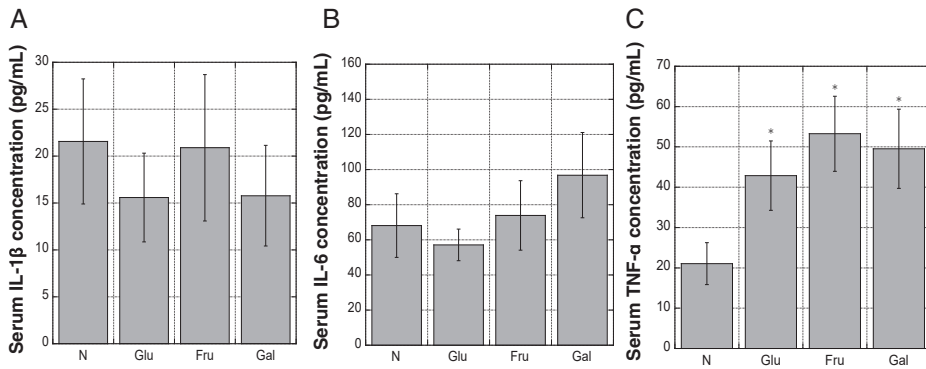


Fig. 5 Analysis of serum inflammatory cytokines. The y-axis indicates IL-1 β (A), IL-6 (B), and TNF- α (C) concentrations (pg/mL) in the sera of N, Glu, Fru, and Gal rat groups from left to right in each graph. Values are presented as means \pm standard deviations (\pm SD). *P < 0.05 (N vs other groups); N=6.

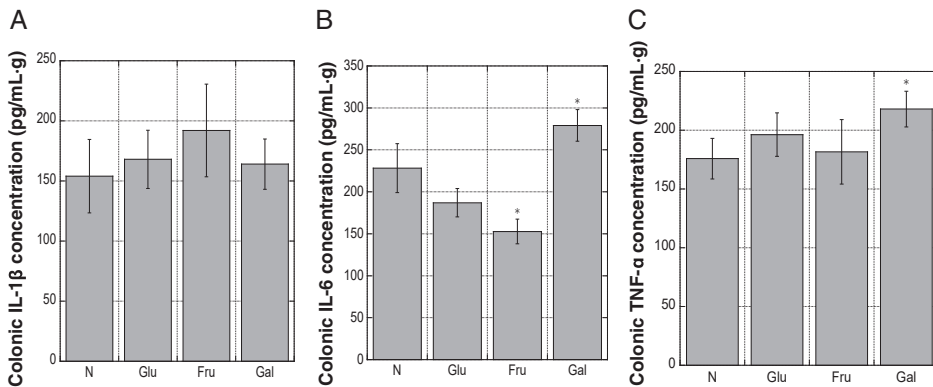


Fig. 6 Analysis of colonic inflammatory cytokines. The y-axis indicates IL-1 β (A), IL-6 (B), and TNF- α (C) concentrations per gram of colon tissue (pg/mL \cdot g) from N, Glu, Fru, and Gal rat groups (left to right) in each graph. Values are presented as means \pm standard deviations (\pm SD). *P < 0.05 (N vs other groups); N=6.

mRNA発現結果

炎症性サイトカイン3種類の内、IL-6とTNF- α に関して、Fru群とGal群でmRNAの発現量が上昇した (Fig. 7)。ただし、抗炎症性サイトカインであるIL-10とTGF- β に関しても同様にFru群とGal群でやや増加傾向にあった (Fig. 7)

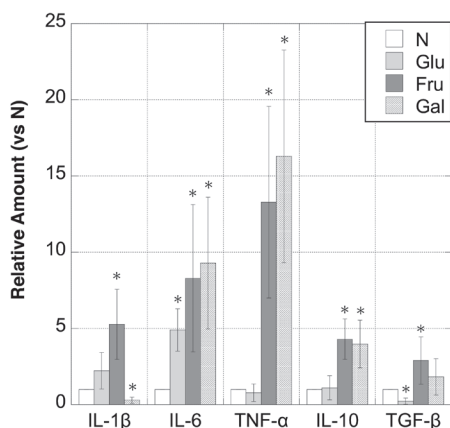


Fig. 7 Alterations in colonic mRNA rat cytokine levels. The y-axis represents IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-10, and TGF- β mRNA expression levels in colon tissues from N, Glu, Fru, and Gal rat groups (left to right) relative to the N rat group. Values are presented as means \pm standard deviations (\pm SD). *P < 0.05 (N vs other groups); N=6.

8. 生化学項目の測定結果

血清TPおよびALBはGal群でやや低値を示した (Table 4)。肝機能の指標に関しては、特にGlu群のASTとLDHが増加を認めた (Table 4)。一方、腎機能の指標に関しては、特にFru群のBUNとCREが増加を認めた (Table 4)。脂質系の項目 (T-CHO、LDL-C、HDL-C) は、Fru群とGal群でやや増加傾向であった (Table 4)。

IV. 考察

本研究では、単糖類を過剰に含む飼料がラットの急性大腸炎の病態に及ぼす影響を検討した。本研究の結果をまとめると、ほぼ全ての検討項目で、グルコースあるいはフルクトースの過剰摂食が、ラットの大腸炎を緩和することが示された。この結果は、大腸炎と糖類に係る過去の報告とは明確に異なっている。以前の報告によると、大腸炎モデルマウスにグルコースまたはフルクトースを多く含む餌を与えた基礎実験にて、特にフルクトースが有害であることが示されている²¹⁾。この研究ではIL-10がノックアウトされたマウスが使用されており、成長過程で慢性大腸炎が自然と発生するモデルとなっている²¹⁾。そのため、慢性大腸炎に対して糖類過剰食の長期的な摂食が与える影響を追跡可能で

Table 4 Assay items of clinical chemistry in rat serum.

	N	Glu	Fru	Gal
TP (g/dL)	7.3	7.2	7.0	6.5
ALB (g/dL)	5.2	4.5	4.2	4.2
GLU (mg/dL)	246	361	299	291
BUN (mg/dL)	16.5	21.4	47.7	19.9
CRE (mg/dL)	0.29	0.32	0.67	0.21
UA (mg/dL)	0.7	1.3	1.0	1.1
Fe (μ g/dL)	160	181	197	127
AST (IU/L)	102	130	82	98
ALT (IU/L)	45	31	32	41
ALP (IU/L)	97	133	119	606
LDH (IU/L)	773	2492	397	564
AMY (IU/L)	1697	1507	1545	1455
CK (IU/L)	627	1731	331	373
r-GT (IU/L)	<3	<3	<3	<3
ChE (IU/L)	10	12	6	10
Lip (U/L)	13	9	16	17
T-CHO (mg/dL)	89	59	159	133
LDL-C (mg/dL)	5	4	15	10
HDL-C (mg/dL)	29	21	39	46

ある。一方で、我々の研究はTNBSを投与して短期的に大腸炎を引き起こし、その後すぐに寛解へ向かうラットモデルを使用している。我々の研究は簡易的であるが、他に類例がない独自性が高い研究モデルとなっている。本研究において、グルコースあるいはフルクトースの過剰飼料を摂食した大腸炎ラットの回復が早い理由は注目すべきである。グルコースは生体に必要なエネルギー源であり、フルクトースも急速に肝臓へ取り込まれた後は一部がグルコースに変換され、同様の代謝経路をたどる²²⁾。本研究では、大腸炎を寛解に導くために必要な生体活動のエネルギー源として、グルコースとフルクトースが飼料から十分に補われたため、回復が早まったのではないかと予想する。腸粘膜の再生不良が高度の場合、大腸の長さは短縮する傾向にある。一方、グルコースおよびフルクトースを過剰摂取したラットでは大腸の短縮を認めず、これは腸粘膜の再生に十分なエネルギーが補われている可能性が考えられた。あるいは、これら即時性が高いエネルギー源である単糖類の補給が、過度な体重減少を食い止めることも重要と思われる。体重減少は大腸炎に伴うエネルギー源の吸収不良に加え、蓄えられたエネルギー源の消費亢進が反映されていると思われる。この状態では大腸炎の回復に必要な免疫機能の維持が困難であるため、グルコースやフルクトースの補給が体重維持に貢献し、結果として免疫機能の恒常性が保たれたと予想する。ただし、本研究は大腸炎発症後に寛解へ向かう実験プロトコルを採用したが、大腸炎の悪化時にはやはり糖類の過剰摂取は危険と思われる。炎症性疾患の病態を把握するうえで、生体内サイトカイン濃度の測定は重要である。本研究の場合は、大腸組織中と血中における炎症悪化性のサイトカイン3種類を測定している。この時、大腸組織にて産生されたサイトカインは大腸炎の増悪に関与し、その後サイトカインが代謝される過程で血中に移行するものと考えられる。したがって、大腸中サイトカイン濃度が高値の場合は病態の悪化を反映するが、血中サイトカイン濃度が高値の場合は単純に炎症が重症とは限らず、代謝が進行し寛解に向かっている可能性もある。本研究では、グルコースやフルクトースの過剰摂取により、血清中TNF- α の

増加が確認されている。TNF- α は炎症部位への好中球の動員と活性化を促進するサイトカインである²³⁾。抗TNF- α 療法がIBDの治療に用いられていることもあり、数あるサイトカインの中でも特に大腸炎の重症化に寄与する因子と考えられている²³⁾。一方で、炎症の局所である大腸組織においてはTNF- α の増加を認めていないことから、本研究の結果は炎症部位で産生されたTNF- α が循環血中に移行した変化を捉えたものと推測される。フルクトース過剰摂取ラットの大腸組織中でIL-6が有意に低下した結果も同様に、大腸から血中に移行したと解釈できる。グルコースやフルクトースの過剰摂取が大腸組織におけるTNF- α やIL-6の増加を抑制する具体的な機序は不明であるが、これら糖類により生体に十分なエネルギーが供給されたことで炎症悪化性のサイトカインの代謝、すなわち血中移行が促進された可能性がある。その結果として大腸炎の重症化が抑えられ、少なくとも他群に比べて寛解導入が早まったと推測される。ただし、mRNAレベルでは、特にフルクトースの過剰摂取で、大腸内における3種類の炎症性サイトカインの増加を認めている。mRNAを測定することで、これからタンパク質として産生され、大腸内で増加する因子を予想することが可能である。したがって、フルクトースの過剰摂取では、大腸組織中の炎症性サイトカインがこれから増産されることが示されている。このことから、フルクトース過剰摂取ラットでは大腸炎の完全寛解には至っておらず、より長期的に観察すると大腸炎が増悪する可能性も考えられる。同ラットにおいて抗炎症性サイトカインmRNA (IL-10とTGF- β)も増加を認めるが、他サイトカインと比較すると軽微な上昇に留まっている。この変化は炎症を少しでも緩和するため、代償的に抗炎症性サイトカインを産生しようとする生体機構によるものと考えられる。我々の過去の報告では、グルコースとフルクトースいずれの特殊餌の摂食でもDSS誘導性大腸炎の重症化を認めている¹⁹⁾。また、特にフルクトースの長期過剰摂取は大腸内マクロファージにおける炎症性サイトカインの分泌を促進すること、腸内細菌叢のバランスを不安定にし、腸管バリアが損なわれること、等が報告されている²⁴⁾。さらに、本研究にて、グルコー

ス過剰摂取ラットの血中CKが高い点には留意すべきである。糖尿病患者における高血糖状態の持続は糖尿病性ケトアシドーシスや高血糖高浸透圧症候群の発症に繋がり、さらに、横紋筋融解症を合併することで血中CKの上昇を認めることがある²⁵⁾。本実験の期間内においてラットが糖尿病を発症したとは考えにくい。急性なグルコースの過剰摂取と血糖値の上昇に伴い、高血糖高浸透圧症候群に近い状態になっていると思われる。そのため、他群よりも横紋筋に負荷がかかり、血中CKの上昇が生じている可能性が考えられた。また、グルコース過剰摂取ラットの血中ASTとLDHが高い点も見逃せない。これらは肝機能を反映した項目であり、グルコースの過剰摂取により肝臓に負荷がかかる可能性を示している。肝臓はグルコースからグリコーゲンを合成し貯蔵する役割があるため、処理能力を超えた多量のグルコースの摂取により肝臓の負担が大きくなっていると思われる。また、フルクトース過剰摂取ラットの血中BUNとCREが高値であり、腎臓への負担が考えられた。フルクトースはケトヘキソキナーゼにより代謝されるが、この酵素は腎臓の近位尿細管に主として存在する²⁶⁾。そのため、特にフルクトースの大量摂取では、それを代謝するための酵素を供給する腎臓の負担が大きいと思われる。さらに、脂質項目にて、フルクトースの過剰摂取が血中T-CHOの増加に繋がることが判った。フルクトースの摂取は肝臓における脂質の生合成を誘発するため、脂質異常症に繋がるリスクが懸念される²⁷⁾。したがって、糖類の過剰摂取は大腸炎に限らず推奨すべきではない。一方で、大腸炎の寛解導入に必要なエネルギーの補給源として、適量のグルコースやフルクトースは有益と思われる。

一方で、本研究を通じて、ガラクトースが大腸炎のリスクファクターである可能性が高まった。ガラクトースは通常、腸管で吸収された後に肝臓に運ばれ、酵素的作用により大部分がグルコースに変換される²⁸⁾。したがって、生体機能が正常である場合には、血液中にガラクトースはほとんど含まれない。逆に、血液中にガラクトースおよびその代謝物質が多い状態はガラクトース血症と呼ばれ、嘔吐や下痢などの消化器症状を引き起こす可能性がある²⁸⁾。通常、ガ

ラクトース血症は遺伝的要因が存在するが、本研究においては正常な代謝能力を上回るガラクトースの摂取により、本症に類似する状態がラット生体内で再現された可能性が考えられる。したがって、本研究においてはガラクトースの過剰摂取が血中ガラクトース濃度の増加に伴う消化器症状や恒常性の低下を引き起こし、大腸炎の寛解導入が進まなかった可能性もある。一方で、ガラクトース過剰摂取により、大腸組織中にてIL-6とTNF- α の増加を認めたことは注目すべきである。IL-6は好中球の活性化、ヘルパーT細胞の増殖と分化などに関与しており、炎症の重症化に寄与する²⁹⁾。大腸組織においてTNF- α に加えIL-6も増加した状態では、輪をかけて過剰な免疫反応が引き起こされ、大腸炎が寛解に至らない結果となった可能性が高い。ガラクトース過剰摂取ラットの血中でもIL-6やTNF- α が増加傾向にあり、これらは大腸組織にて産生されたそれらサイトカインが循環血中に入ったと予想する。したがって、IL-6やTNF- α を循環血にのせて代謝を試みる生体機能に対して、炎症局所である大腸におけるこれらサイトカインの産生の方がより活発であったと推測される。大腸内でのこれらサイトカイン産生増加の原因として、ガラクトース過剰飼料の摂取が腸管透過性の亢進に繋がることが挙げられる³⁰⁾。腸管透過性が亢進することで腸内の抗原性物質が粘膜下に流入しやすくなり、それに対して好中球やマクロファージが免疫応答を起こすことでIL-6やTNF- α を多量に産生したと予想する。また、ガラクトース過剰摂取ラットは他群に比べて、大腸組織中における炎症性サイトカインのmRNA値が明らかに高いため、長期的にも大腸炎の増悪が収まらないと思われる。抗炎症性サイトカインmRNAも高値とは言い難いため、代償機構が十分に機能せず、さらに大腸炎の悪化が進行すると予想される。ガラクトースの過剰摂取は各種栄養成分の代謝異常を引き起こし、生体に必要なエネルギーの不足に繋がる可能性も示されている³⁰⁾。実際、ガラクトース過剰摂取のラットでは、やや大腸の長さが短縮していた。これは、腸粘膜の再生に必要なエネルギーが不足していることや、再生が阻害されるほど炎症が亢進していることが原因として考えられた。このように、ガラクトース

の過剰摂取および血中濃度増加は、全身性の異常に加えて大腸組織への悪影響が示唆されているため、単糖類の中では最も大腸炎の悪化に寄与するかもしれない。また、本研究において、ガラクトース過剰摂取のラットでは血中TPやALBの低下を認めたが、このように栄養状態が悪化している場合には、免疫機能の恒常性が保たれない可能性が高い。以上の背景や結果を踏まえ、大腸炎の病態を悪化させないためには、ガラクトースの摂取量に慎重を期すべきであると思われる。

本研究において摂取単糖類の違いにより大腸炎の病態に差を認めたが、この結果をもって安易に結論付けることは危険である。本研究に用いた特殊餌における各種単糖類は、カロリー比62.95%と極端に高い割合を占めている。これら飼料の摂食自体が各種臓器に悪影響であり、結果的に大腸炎に及ぼす影響が隠蔽されている可能性もある。一般的に、肝臓はグルコースを用いてグリコーゲンの合成と貯蔵を行う。そのため、体内でグルコースが過剰に存在すると、グリコーゲンの合成と貯蔵がより活発になり、肝臓に多大な負担がかかるであろう。また、血中グルコースは腎糸球体で濾過され、濾過されたグルコースの多くは腎尿細管から血液中に再吸収される。したがって、毎日大量のグルコースを濾過しなければならないような状況では、腎臓に多大な負担をかけることになる。また、過剰なフルクトースは肝臓に大きな負担をかけ、肝障害を引き起こす可能性も指摘されている²²⁾。さらに、フルクトースを過剰摂取すると、近位尿細管におけるナトリウム水素交換輸送体3 (NHE3) 活性が刺激され、ナトリウムイオンの再吸収が増加し、血圧が上昇することが分かっている³¹⁾。以上のように、単糖類の過剰摂取は全身性の影響が考えられる。本研究でも特殊飼料の摂食により、一部のラットで肝機能や腎機能の低下を示す結果が得られているため、特殊餌における単糖類の含有量には再考の余地がある。その他、より厳密に検証するためには、TNBS投与量や実験期間も様々に変更することが重要と思われる。

多くのIBD患者において、「食事制限がない人が羨ましい」、「食事による症状の悪化が不安」と考える傾向が示されている³²⁾。すなわち、

IBDにおいて食生活への満足度が極めて低く、それによる心的ストレスが大きいことは明らかである。以上の背景から近年は、患者のQuality of Lifeを維持し、IBDの病態改善にも貢献する食事療法の確立が求められている。この社会的要請に応えるためには、栄養面で有益な食品を特定し、IBD患者におけるその適切な摂取量を見極めることが重要である。本研究は単糖類に絞って検証し、少なくともガラクトースの過剰摂取が最も急性大腸炎の重症度を高める可能性を報告した。このように、特殊飼料を調製し、その栄養成分が病態に及ぼす影響を調べる動物実験は非常に有効であることが判った。今後も、同様の手法で探求を重ねることで、IBDの病態緩和と栄養補給に有用な食事療法の開発に繋げる予定である。

V. 結語

本研究における急性大腸炎の病態に対しては、グルコースおよびフルクトースよりも、ガラクトースの過剰摂取が高リスクと思われた。一方で、今後IBDの新たな食事療法を創出するためには、飼料中の単糖類含有量や実験期間などに改善の余地があり、更なる探究が望まれる。

VI. 謝辞

ラット血清の生化学検査を実施いただきましたオリエンタル酵母工業株式会社 長浜工場 長浜ライフサイエンスラボラトリー (滋賀) には心より御礼申し上げます。本研究は一般財団法人 田沼グリーンハウス財団 (東京) の助成を受けたものです。

本論文内容に関連する著者らの利益相反：なし

文献

- 1) Marks DJ, Segal AW: Innate immunity in inflammatory bowel disease: A disease hypothesis. *J Pathol.* 214: 260–266, 2008.
- 2) Molodecky NA, Soon IS, Rabi DM, Ghali WA, Ferris M, Chernoff G, Benchimol EI, Panaccione R, Ghosh S, Barkema HW, Kaplan GG: Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases

- with time, based on systematic review. *Gastroenterology*. 142: 46–54, 2012.
- 3) Berends SE, Strik AS, Löwenberg M, D’Haens GR, Mathôt RAA: Clinical pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations in the treatment of ulcerative colitis. *Clin Pharmacokinet*. 58: 15–37, 2019.
 - 4) Bibbò S, Ianiro G, Giorgio V, Scaldaferrì F, Masucci L, Gasbarrini A, Cammarota G: The role of diet on gut microbiota composition. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 20: 4742–4749, 2016.
 - 5) Shen J, Zuo ZX, Mao AP: Effect of probiotics on inducing remission and maintaining therapy in ulcerative colitis, Crohn’s disease, and pouchitis: Meta-analysis of randomized controlled trials. *Inflamm Bowel Dis*. 20: 21–35, 2014.
 - 6) Reddavidè R, Rotolo O, Caruso MG, Stasi E, Notaricola M, Miraglia C, Nouvenne A, Meschi T, De’Angelis GL, Di Mario F, Leandro G: The role of diet in the prevention and treatment of inflammatory bowel diseases. *Acta Biomed*. 89: 60–75, 2018.
 - 7) Sarbagili-Shabat, C.; Albenberg, L.; Van Limbergen, J.; Pressman, N.; Otlej A, Yaakov M, Wine E, Weiner D, Levine A: A novel UC exclusion diet and antibiotics for treatment of mild to moderate pediatric ulcerative colitis: A prospective open-label pilot study. *Nutrients*. 13: 3736, 2021.
 - 8) Basaranoglu M, Basaranoglu G, Bugianesi E: Carbohydrate intake and nonalcoholic fatty liver disease: Fructose as a weapon of mass destruction. *Hepatobiliary Surg Nutr*. 4: 109–116, 2015.
 - 9) Alm L: Effect of fermentation on lactose, glucose, and galactose content in milk and suitability of fermented milk products for lactose intolerant individuals. *J Dairy Sci*. 65: 346-52, 1982.
 - 10) Ma X, Nan F, Liang H, Shu P, Fan X, Song X, Hou Y, Zhang D: Excessive intake of sugar: An accomplice of inflammation. *Front Immunol*. 13: 988481, 2022.
 - 11) Dey M, Cutolo M, Nikiforou E: Beverages in rheumatoid arthritis: What to prefer or to avoid. *Nutrients*. 12: 3155, 2020.
 - 12) Pasqualli T, Chaves PEE, Pereira LD, Serpa EA, de Oliveira LFS, Machado MM: The use of fructose as a sweetener. is it a safe alternative for our immune system? *J Food Biochem*. 44: e13496, 2020.
 - 13) Zhang DF, Jin WW, Wu RQ, Li J, Park SA, Tu E, Zannvit P, Xu J, Liu O, Cain A., Chen WJ: High glucose intake exacerbates autoimmunity through reactive-oxygen-species-mediated TGF-beta cytokine activation. *Immunity*. 51: 671–681, 2019.
 - 14) Okada K, Matsuo K, Amada M, Kashihara S, Kat-suragi K, Doumae M, Moriwaki M, Yamauchi R, Yoshida J: Excessive glucose and fructose intake aggravates the pathogenesis of rat experimental colitis. *Gastrointestinal Disorders*. 5: 474–486, 2023.
 - 15) Blumberg RS, Saubermann LJ, Strober W: Animal models of mucosal inflammation and their relation to human inflammatory bowel disease. *Curr Opin Immunol*, 11: 648-656, 1999.
 - 16) Okada K, Arai S, Nakase H, Kohno H, Nakamura F, Takeda M, Toda Y, Itoh H, Adachi S, Ikemoto M: Autocrine pathways involving S100A8 and/or S100A9 that are postulated to regulate the immunological functions of macrophages in rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 456: 415-20, 2015.
 - 17) 岡田光貴, 松尾佳乃, 天田実玖, 柏原紗季, 葛城古都, 堂前美晴, 森脇柁, 山内涼平, 吉田純: 大腸炎モデルラット作製法2種類の病態比較. *生物試料分析*. 46: 231-241, 2024.
 - 18) Cooper HS, Murthy SN, Shah RS, Sedergran DJ: Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Lab Invest*. 69: 238-49, 1993.
 - 19) Okada K, Matsuo K: Nicotine exerts a stronger immunosuppressive effect than its structural analogs and regulates experimental colitis in rats. *Biomedicines*. 11: 922, 2023.
 - 20) Kanda Y: Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for medical statistics. *Bone Marrow Transplant*. 48: 452-458, 2013.
 - 21) Khan S, Waliullah S, Godfrey V, Khan MAW, Ramachandran RA, Cantarel BL, Behrendt C, Peng L, Hooper LV, Zaki H: Dietary simple sugars alter microbial ecology in the gut and promote colitis in mice. *Sci Trans Med*. 12: eaay6218, 2020.
 - 22) 河崎孝弘, 山内俊一: フルクトース毒性. *糖尿病*. 48: 419-421, 2005.
 - 23) 日比紀文, 緒方晴彦, 芳沢茂雄: 炎症性腸疾患におけるTNF- α を中心としたサイトカインの動態と治療戦略. *炎症・再生*. 22: 115-121, 2002.
 - 24) Wang L, Ji T, Yuan Y, Fu H, Wang Y, Tian S, Hu J, Wang L, Wang Z: High-fructose corn syrup promotes proinflammatory macrophage activation via ROS-mediated NF- κ B signaling and exacerbates colitis in mice. *Int Immunopharmacol*. 109: 108814, 2022.
 - 25) 牛腸 直樹, 佐藤 吉隆, 近藤 智子, 平嶋 勇士, 田川 曉大, 田中 秀樹, 鈴木 奈津子, 大森 安恵: 高血糖高浸透圧症候群に横紋筋融解症, 肺塞栓症を合併した視床下部症候群の1例. *糖尿病*. 55: 614-620, 2012.
 - 26) Doke T, Ishimoto T, Hayasaki T, Ikeda S, Hasebe M,

- Hirayama A, Soga T, Kato N, Kosugi T, Tsuboi N, Lanaspá MA, Johnson RJ, Kadomatsu K, Maruyama S. Lacking ketohexokinase-A exacerbates renal injury in streptozotocin-induced diabetic mice. *Metabolism*. 85:161-170, 2018.
- 27) Zhao S, Jang C, Liu J, Uehara K, Gilbert M, Izzo L, Zeng X, Trefely S, Fernandez S, Carrer A, Miller KD, Schug ZT, Snyder NW, Gade TP, Titchenell PM, Rabinowitz JD, Wellen KE. Dietary fructose feeds hepatic lipogenesis via microbiota-derived acetate. *Nature*. 579: 586-591, 2020.
- 28) Conte F, van Buuringen N, Voermans NC, Lefeber DJ. Galactose in human metabolism, glycosylation and congenital metabolic diseases: Time for a closer look. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*. 1865: 129898, 2021.
- 29) 橋詰美里, 大杉義征: 「IL-6の多様な作用」自己免疫性疾患および炎症性疾患におけるIL-6の意義. *日薬理誌*. 144: 172-177, 2014.
- 30) Mhd Omar NA, Frank J, Kruger J, Dal Bello F, Medana C, Collino M, Zamaratskaia G, Michaelsson K, Wolk A, Landberg R: Effects of high intakes of fructose and galactose, with or without added fructooligosaccharides, on metabolic factors, inflammation, and gut integrity in a rat model. *Mol Nutr Food Res*. 65: e2001133, 2021.
- 31) Queiroz-Leite GD, Crajoinas RO, Neri EA, Bezerra CN, Girardi AC, Rebouças NA, Malnic G: Fructose acutely stimulates NHE3 activity in kidney proximal tubule. *Kidney Blood Press Res*. 36: 320-334, 2012.
- 32) 富田真佐子, 高添正和, 近藤健司, 福田能啓, 矢吹浩子, 片岡優実: 炎症性腸疾患患者のQuality of Lifeと食事に関する問題—潰瘍性大腸炎とクローン病との比較—. 20: 57-65, 2005.