

宮 崎 大 学 大 学 院

博 士 学 位 論 文

食品中遊離糖類によるメタボリックシンドロームの予防と  
診断のためのバイオマーカー探索

2023 年 9 月

宮崎大学大学院農学工学総合研究科

生物機能応用科学専攻

鈴木 優典

# 目次

略語一覧 .....	4
序論.....	7
第 1 章 マルトースと高脂肪食の併用摂取はマウスの過体重および 関連パラメーターを悪化さ せる.....	11
1.1 緒 論.....	12
1.2 実 験 方 法.....	15
1.2.1 試験試料.....	15
1.2.2 実験動物, 飼料および方法.....	15
1.2.3 血液生化学的検査 .....	20
1.2.4 肝臓中脂肪酸分析 .....	20
1.2.5 統計解析.....	21
1.3 結 果 および 考 察.....	22
第 2 章 ラットモデルを用いたフルクトース過剰摂取状態を評価可能な 新規バイオマーカーの 確立.....	31
2.1 緒 論.....	32
2.2 実 験 方 法.....	35
2.2.1 実験動物, 飼料および方法.....	35
2.2.2 血液生化学的検査 .....	37
2.2.3 血漿中 ALP アイソザイム活性測定.....	38
2.2.4 剖検および肝臓重量測定 .....	38
2.2.5 病理組織学的検査 .....	39
2.2.6 RNA の抽出 .....	39
2.2.7 定量的逆転写 PCR (RT-qPCR) .....	40
2.2.8 統計解析.....	41
2.3 結 果 および 考 察.....	42

第 3 章 活動期のアルカリホスファターゼアイソザイム活性解析は フルクトース過剰摂取モデルラットにおける 高感度バイオマーカーとなる .....	56
3.1 緒 論.....	57
3.2 実 験 方 法.....	60
3.2.1 実験動物, 飼料および方法.....	60
3.2.2 血液生化学的検査 .....	62
3.2.3 血漿中 ALP アイソザイム活性測定 .....	63
3.2.4 統計解析.....	63
3.3 結 果 および 考 察.....	64
総 括.....	72
謝 辞.....	75
参考文献 .....	76

## 略語一覧

BMI	: body mass index, 体格指数
WHO	: world health organization, 世界保健機関
AIN	: american institute of nutrition, 米国立栄養研究所
FCD	: 7% fat control diet, 通常食
CCD	: 63% cornstarch control diet, 通常食
HFD	: 30% high-fat diet, 高脂肪食
HFD+Mal	: HFD with 7.0% maltose, マルトース添加高脂肪食
HFrD	: 63% high-fructose diet, 63%高フルクトース食
HFCS	: high fructose corn syrup, 高フルクトースコーンシロップ
GI	: glycemic index, グリセミック指数
TGL	: triglyceride, トリグリセリド
T-CL	: total cholesterol, 総コレステロール
HDL-chol	: high density lipoprotein-cholesterol, 高比重リポタンパク質コレステ ロール
PL	: phospholipid, リン脂質
GLU	: glucose, 血糖

TP	: total protein, 総タンパク質
ALB	: albumin, アルブミン
AST	: aspartate aminotransferase, アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ
ALT	: alanine aminotransferase, アラニンアミノトランスフェラーゼ
ALP	: alkaline phosphatase, アルカリホスファターゼ
GLDH	: glutamate dehydrogenase, グルタミン酸脱水素酵素
$\gamma$ -GTP	: gamma glutamyl transferase, $\gamma$ -グルタミルトランスフェラーゼ
LAP	: leucine aminopeptidase, ロイシンアミノペプチダーゼ
5'-NT	: 5'-nucleotidase, 5'-ヌクレオチダーゼ
L-ALP	: liver-type alkaline phosphatase isozyme, 肝臓型アルカリホスファターゼ アイソザイム
I-ALP	: small intestinal-type alkaline phosphatase isozyme, 小腸型アルカリホスフ ァターゼアイソザイム
B-ALP	: bone-type alkaline phosphatase isozyme, 骨型アルカリホスファターゼア イソザイム
NAFLD	: non-alcoholic fatty liver disease, 非アルコール性脂肪性肝疾患
NASH	: non-alcoholic steatohepatitis, 非アルコール性脂肪性肝炎
HCC	: hepatocellular carcinoma, 肝細胞癌

LPS	: lipopolysaccharide, リポ多糖
<i>Cl-1</i>	: claudin-1, クローディン 1
<i>Cl-4</i>	: claudin-4, クローディン 4
<i>Zo-1</i>	: zonula occludens-1, ゾーンナル オクルディン 1
<i>Oc</i>	: occluding, オクルディン 1
C14:0	: myristic acid, ミリスチン酸
C16:0	: palmitic acid, パルミチン酸
C18:0	: stearic acid, ステアリン酸
C18:1 ( $\omega$ 9)	: oleic acid, オレイン酸
C18:2 ( $\omega$ 6)	: linoleic acid, リノレン酸
C18:3 ( $\omega$ 3)	: $\alpha$ -linolenic acid, $\alpha$ -リノレン酸
ZT	: zeitgeber time, ツァイトゲーバー時刻

## 序論

遊離糖類とは、世界保健機関（WHO）が発表した「食事と非感染性疾患予防のための財政政策報告書」（2016年）によると、食品製造業者、調理人あるいは消費者が食品や飲料に添加した単糖類（フルクトース、グルコース等）および二糖類（マルトース、スクロース等）、ハチミツ、シロップ、果汁および濃縮果汁中に含まれる糖類の総称を指す。遊離糖類の習慣的な過剰摂取は、メタボリックシンドロームの発症並びに進行の重要な因子であることが報告されている[1, 2]。メタボリックシンドロームとは、肥満、高脂血症、非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）、酸化ストレスの増加、インスリン抵抗性の亢進、高尿酸血症、高血圧、全身性炎症反応、腸内細菌の異常増殖と多様性の低下による小腸のバリア機能低下等、複数の疾患から構成される病態である[3-7]。

近年、先進国のみならず開発途上国においても、経済発展に伴う生活および労働環境の変化が、食卓に占める伝統的な家庭料理の割合の低下と、遊離糖類や脂質を豊富に含んだ加工食品の割合の増加を引き起こし、食生活の過栄養化が進んでいる[8, 9]。これにより、肥満患者は世界中で急速に増えており、世界肥満連合の報告（2021年）によると、2016年時点の調査において、全世界で肥満（体格指数（BMI）が30以上）の成人数は6億7,100万人、肥満の前段階である過体重（BMIが25以上30未満）の成人数は13億700万人に上り、有効な対策を施さなければ2025年までに世界の成人の5人に1人が肥満になると予測

されている。

肥満患者は治療や生活習慣の改善を怠ると高確率で NAFLD を発症する [4, 10, 11]。1989 年から 2015 年までの 26 年間を対象とした疫学調査によると、世界人口の約 3 分の 1 が NAFLD に罹患しており、現在、最も患者数の多い慢性肝疾患とされている [12-15]。NAFLD とは病態が比較的安定している非アルコール性脂肪肝と、より病態の進行した壊死性炎症を伴う非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) の二つの病態の総称である [16]。NAFLD の発症メカニズムは複雑で、様々な説が提唱されているが、最も一般的に認知されている原因として、主要なエネルギー基質である炭水化物および脂質の過剰摂取、すなわち過栄養状態が挙げられる。炭水化物や脂肪酸が過剰かつ恒常的に供給されると肝臓での処理能力が低下し、有害な脂肪酸代謝物が肝臓内に蓄積する [17-21]。これらの代謝物は肝細胞機能障害および細胞死を誘発し、肝硬変や肝細胞癌 (HCC) の原因となる線維形成を活性化させる。この過程はほとんど無自覚・無症状で進行し、NAFLD 患者の約 30% は線維化を伴う NASH を発症し、HCC の発症リスクが大きく高まる [15, 23]。Estes らの報告によると、NAFLD に起因した HCC の発生率は世界的に増加傾向にあり、増加率は日本の 47% (2016 年の 2,200 症例が 2030 年には 3,240 症例に増加) からアメリカ合衆国の 130% (2016 年の 10,820 症例が 24,860 症例に増加) に及ぶとされている。このことから、遊離糖類の過剰摂取によって引き起こされる様々な疾患に対する予防戦略の構築の必要性が強調されている [22, 23]。



近年、多くの研究グループが、遊離糖類や脂質の過剰摂取に起因した NAFLD 発症を予防するための栄養療法および食事療法について調査している。例えば紅麹米酒の投与は高フルクトース高脂肪食誘発メタボリックシンドロームモデルラットの体重増加および脂肪蓄積の抑制並びに炎症性サイトカインの放出を緩和する[24]。黒米アントシアニン抽出物の投与は、高フルクトース食誘発高脂血症およびインスリン抵抗性モデルラットの高脂血症と耐糖能異常を改善する[25]。食物繊維の積極的な摂取は NAFLD の発症および症状の改善と増悪を予防する[26-28]。また、サツマイモ由来の化合物であるルテオリンは、肥満および結腸癌の原因因子と指摘されているプロテインチロシンホスファターゼ 1B を阻害する等[29]、有効な予防および治療戦略に繋がる結果が報告されている。一方で、遊離糖類でありながらオリゴ糖は整腸作用を示し、腸内細菌によるオリゴ糖の代謝産物は抗炎症作用や免疫調節作用を示す[32]。D-プシコースの投与は高脂肪食誘発肥満モデルラットの内臓脂肪量を減少させる[30]、D-アロースを 2 型糖尿病モデルラットに投与すると、抗高血糖作用を示す[31] 等、生体にとって有益な作用を発揮する遊離糖類も存在する。遊離糖類が生体へ及ぼす影響は現在でも不明な部分が多く、その過剰摂取による生理的変動を捉えるバイオマーカーの情報不足している。

本論文では遊離糖であるマルトースおよびフルクトースに着目し、第 1 章では、マルトースと高脂肪食の併用摂取が過体重および関連パラメーターに与える影響について、第 2 章ではフルクトースの過剰摂取による初期の生理的変動を捉えることが可能なバイオマーカー

について、さらに第3章では第2章で検討を行ったバイオマーカーの特性や感度について、  
それぞれ動物モデルを用いて評価・探索・精査を行った。

## 第 1 章

マルトースと高脂肪食の併用摂取はマウスの過体重および  
関連パラメーターを悪化させる

This chapter is based mainly on:

Shibazaki N., Tanaka W., Suzuki Y., Matsuyama H., Kubota H., Ogawa K., Yokoyama D., Sakakibara H., Maltose Consumption Exacerbates High-fat Diet-induced Overweight and Related Parameters in Mice, *Functional Foods in Health and Disease*, 2022, 12, 680-691.

## 1.1 緒論

前述の通り、一般的に遊離糖類の日常的かつ過剰な摂取は肥満、高脂血症、NAFLD、酸化ストレスの増加、インスリン抵抗性の亢進、高尿酸血症、高血圧、全身性炎症反応並びに腸内細菌の異常増殖や多様性の低下と言った、メタボリックシンドロームを構成する諸々の疾患の発症並びに進行の重要な因子とされているが[1, 2]、一部の遊離糖類、例えば希少糖と呼ばれるD-プシコースやD-アロースには内臓脂肪量の減少や、抗高血糖作用[30, 31]等、生体にとって有益な作用を発揮するものもある。また、遊離糖類の中で二糖類に分類されるマルトースは、同じく二糖類のスクロースに比較して血糖値の上昇が緩やかであることから、糖尿病患者の食事療法や術中および術後の非経口的な水分およびエネルギー補液に使用されている[32, 33]。日常生活におけるマルトースの供給源としては、主にトウモロコシやジャガイモのデンプンを原料として、酵素糖化法によって得られた水飴を使用した食品を介するのが一般的であるが、本研究では世界的に重要な農作物であるサツマイモ (*Ipomoea batatas*L.) に含まれるマルトースに着目した。サツマイモは栄養価(ビタミン、ミネラル、食物繊維およびデンプン)に優れており、近年、多くの研究グループがサツマイモの摂取による抗肥満、抗高血糖効果について報告している[36-40]。興味深いことに、サツマイモの健康効果は調理方法によって著しく異なり、Bahado-Singhらは複数の健常人を対象とした

臨床研究で、茹で（皮を剥いてスライスしたサツマイモを沸騰した湯で 20 分間加熱）、ロースト（皮を剥かずに炭火で 45 分間加熱）あるいは焼き（皮を剥かずに 175°C のオーブンで、45 分間加熱）サツマイモ（焼き芋）を摂取した被験者のグリセミック指数（GI）を測定した結果、茹でサツマイモ（GI 値：41～50）に比較して、ロースト（GI 値：79～93）あるいは焼き芋（GI 値：82～94）を摂取した被験者グループの GI 値が著しく高かったと報告している[41]。サツマイモを加熱調理すると、サツマイモに含まれるデンプンが分解されマルトースが生成されるが、GI 値に差が認められた原因として、調理方法によって生成されるマルトースの量が異なる可能性が考えられる。この仮説を裏付ける報告として、Chan らはサツマイモのマルトース含量が焼き芋では著しく増加し、結果としてマルトースが焼き芋の主成分になると報告した[42]。新鮮な生のサツマイモに含まれるマルトース量は 0.01～0.13% であるが、焼き芋にすると 40 倍以上（2.86～5.43%）に増加し、これは乾燥重量の 9.1～18.2% に相当する。一方、ローストで生成されるマルトースの量は、焼き芋の約 70% に過ぎない[43]。したがって、焼き芋の摂取は他の調理方法と比較すると、はるかに多くのマルトースを摂取することになる。マルトースはグルコース二分子が  $\alpha$ -1,4-グリコシド結合した二糖類である。マルトースはグルコースやフルクトースと同様に還元糖であり、小腸の刷子縁から分泌されるマルターゼによってグルコースに分解され[34, 35]、グルコースは刷子縁の膜輸送体によって Na<sup>+</sup> と共に細胞に運ばれる[44]。in vivo のラットモデルを用いた Luo らの報告によると、60 分間の小腸灌流で約 63% のマルトースがグルコースに分解された

[45]。興味深いことに、小腸からのグルコース吸収量は、マルトースの方が同量のグルコースよりも著しく高かった[46]。この結果は、グルコース2分子が結合したマルトースの日常的な過剰摂取は、グルコース単体やデンプンを摂取するのとは、異なる生理学的効果を発揮する可能性があることを示唆しているが、現在の所、マルトースの過剰摂取がヒトの健康に与える影響についての報告は限られている。本研究では、マルトースを7%含む高脂肪食(焼き芋を20%含む食餌に相当)をマウスに13週間摂取させた場合の生理的影響について検討した。

## 1.2 実験方法

### 1.2.1 試験試料

本研究で使用したセルロース、 $\alpha$ -コーンスターチ、 $\beta$ -コーンスターチおよびスクロースはオリエンタル酵母工業株式会社（東京都，日本）から入手した。カゼイン、*t*-ブチルヒドロキノン、L-システイン、D (+)-マルトース一水和物 (> 98%)および大豆油は富士フィルム和光純薬株式会社（大阪府，日本）から入手した。ビタミン類（AIN-93-VX）およびミネラル類（AIN 93G-Mix および AIN-93M-Mix）用の米国栄養学会（AIN）製剤およびラードは、MP Biomedicals, LLC（カリフォルニア州，アメリカ合衆国）より入手した。その他の試薬はすべて試薬特級グレードを使用した。

### 1.2.2 実験動物，飼料および方法

本研究は3Rの原則を考慮し，科学上の利用のために動物を使用する事を動物実験と定義した，「動物の愛護および管理に関する法律」（1973年10月1日法律第105号）に従って実施された研究であり，国立大学法人宮崎大学の実験動物規則に従って行われた（実験番号2019-016-2，2020年3月24日承認済み）。本研究は以下のプロトコールに従って実施された。

#### 【プロトコール】

4週齢の雄性 C57BL/6J マウス（体重範囲:  $18.9 \pm 0.7$ ）を日本 SLC 株式会社（静岡県，日本）から入手した。入荷した動物は空調管理された動物飼育室（温度  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ，湿度  $55 \pm 5\%$ ，点灯午前 9 時～午後 9 時）で，床敷（アルファドライプラス，EP トレーディング株式会社，東京都，日本）を敷いたケージ（W235 mm × L165 mm × H125mm）に 3 匹ずつ収容し，水および粉末状 AIN-93G を自由摂取させた。飼料の組成を表 1-1 に示す。



表 1-1. 各群における粉末 AIN-93 ベースの実験用飼料の組成 (%)

成分	AIN-93G ベース <sup>1</sup>			AIN-93M ベース <sup>1</sup>		
	FCD	HFD	HFD+Mal	FCD	HFD	HFD+Mal
$\beta$ -コーンスターチ	39.8	16.8	9.8	46.6	20.6	13.6
$\alpha$ -コーンスターチ	13.2	13.2	13.2	15.5	15.5	15.5
カゼイン	20.0	20.0	20.0	14.0	14.0	14.0
大豆油	7.0	7.0	7.0	4.0	4.0	4.0
ラード	0.0	23.0	23.0	0.0	26.0	26.0
スクロース	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
マルトース	0.0	0.0	7.0	0.0	0.0	7.0
セルロース	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
ビタミン混合物	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
ミネラル混合物	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
L-システイン	0.3	0.3	0.3	0.18	0.18	0.18
重酒石酸コリン	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
<i>t</i> -ブチルヒドロキノン	0.0014	0.0014	0.0014	0.0008	0.0008	0.0008
エネルギー(kcal/g)	3.95	5.10	5.10	3.80	5.10	5.10
蛋白質 (%)	20.0	20.0	20.0	14.0	14.0	14.0
炭水化物(%) <sup>2</sup>	63.0	40.0	40.0	72.1	46.1	46.1
脂質 (%)	7.0	30.0	30.0	4.0	30.0	30.0
食物繊維	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0

<sup>1</sup>マウスには 11 週齢まで AIN-93G ベースの飼料を、以降は AIN-93M ベースの飼料を与えた。

<sup>2</sup>炭水化物： $\beta$ -コーンスターチ， $\alpha$ -コーンスターチ，スクロースおよびマルトースの合計値。

FCD：通常食，HFD：高脂肪食，HFD+Mal：マルトース添加高脂肪食。

1 週間の馴化後、マウスを 3 群に分けた。第 1 群には AIN-93G (通常食, FCD), 第 2 群には AIN-93G に 30%の脂肪を加えた高脂肪食 (HFD), 第 3 群にはマルトースを 7%加えた HFD (HFD+Mal) をそれぞれ 13 週間自由摂取させた。HFD+Mal のマルトースの添加量を 7%とした根拠として、水分を除いた焼き芋に含まれるマルトース量は 34.8%であることから[43], 焼き芋 20%に相当する飼料には 7%のマルトースが含まれると算出した。飼育 7 週目 (12 週齢) に、全ての群について AIN が推奨するマウス・ラットの成長期および維持期の栄養要求に対応するため[47], 飼料を表 1-1 に示す AIN-93G ベースから AIN-93M ベースに変更した。総利用可能炭水化物 ( $\beta$ -コーンスターチ,  $\alpha$ -コーンスターチ, スクロースおよびマルトースの合計) は, AIN-93G ベースの HFD 群は 40.0%, AIN-93M ベースの HFD 群は 46.1%とした。

マウスは解剖前日から 12 時間絶食させ、解剖直前に測定した体重および体長 (尾根から鼻まで) を元に、以下の式 (1) を用いて BMI を測定した。なお、体長は各動物が摂取した飼料を知らない実験者が、先行研究[48]に記載された方法に従い測定した。

$$\text{BMI} = \text{体重 (g)} / \text{体長 (cm)}^2 \quad (1)$$

イソフルラン (1.5%) 麻酔下で開腹し、腹部大動脈から注射針付シリンジを用いて血液を採取し、放血致死させた。得られた血液の一部を用いて血糖測定器メディセーフフィット (テルモ株式会社, 東京都, 日本) で血糖 (GLU) 濃度を測定した。残余の血液は EDTA-2K コート採血管 (微量採血管 BD マイクロガード, 日本ベクトン・ディッキンソン株式会社, 東

京都, 日本) に分注して, 2,000×g, 90 秒, 15°Cで遠心分離し血漿を採取した。得られた血漿は血液生化学的検査で使用するために, 測定まで-80°Cの超低温冷凍庫で保存した。臓器重量測定は肝臓, 腎臓, 脾臓, 胸腺, 肺, 心臓および内臓脂肪(副睾丸脂肪+腎臓周囲脂肪)について実施した。肝臓中脂肪酸分析用に肝臓の一切片を液体窒素で凍結した後, 測定まで-80°Cの超低温冷凍庫で保存した。

### 1.2.3 血液生化学的検査

血漿中トリグリセリド (TGL), 総コレステロール (T-CH) および高比重リポタンパク質コレステロール (HDL-chol) 濃度測定は, 乾式臨床化学分析装置 富士ドライケム 4000v (富士フイルム株式会社, 東京都, 日本) および各パラメーター個別のカートリッジスライドを用いて実施した。肝臓中脂肪酸分析は先行研究[49]に記載されている方法に従って実施した。

### 1.2.4 肝臓中脂肪酸分析

肝臓中ミリスチン酸 (C14:0), パルミチン酸 (C16:0), ステアリン酸 (C18:0), オレイン酸 C18:1 ( $\omega$  9), リノレン酸 (C18:2 ( $\omega$  6)) および  $\alpha$ -リノレン酸 (C18:3 ( $\omega$  3)) の各脂肪酸は, 解剖時に採取した肝臓の凍結切片 (200 mg) を 1 mL の 50 mM 酢酸ナトリウムと共にホモジナイズし, クロロホルム-メタノール混合液 (2:1 [vol/vol]) を用いて抽出した。抽出液 (試料 20 mg 相当) 中の脂肪酸を, 脂肪酸メチル化キット (ナカライテスク株式会社, 京都府, 日本) を用いて, 添付文書の指示に従いメチルエステル誘導体化した。メチルエステル誘導体化された脂肪酸は 200  $\mu$ L のヘキサンで処理した。脂肪酸はガスクロマトグラフ-水素炎イオン化型検出器 (GC-2010, 株式会社島津製作所, 京都府, 日本) で測定した。脂肪酸の分離には SUPELCOWAX™ 10 キャピラリー-GC カラム (長さ 30m  $\times$  内径 0.32mm  $\times$  膜厚 0.25  $\mu$ m ; Sigma-Aldrich Co. LLC, ミズーリ州, アメリカ合衆国) を使用した。カラムオープン温度を 170°C から 225°C に昇温させ, 分離した脂肪酸メチルエステルを

水素炎イオン化型検出器で検出した。脂肪酸メチルエステルの標準混合物 (Supelco 37 Component FAME Mix) は, Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Co. LLC, ミズーリ州, アメリカ合衆国) から入手した。

#### 1.2.5 統計解析

データは平均値±標準偏差で示した。統計解析は StatView for Windows (Version 5.0, SAS Institute, アメリカ合衆国)を用いて行った。群間の統計学的有意差は二元配置分散分析 (ANOVA) に続いて, Fisher PLSD post-hoc test を行うことで判定した。群内の比較は有意差水準を 5%に設定した。

### 1.3 結果 および 考察

サツマイモは品種によって根茎の色が異なり、アントシアニン、 $\beta$ -カロテン、ビタミン、ミネラル、食物繊維およびデンプン等の多彩な栄養素を含み[50]、世界中で栽培されている重要な食用作物である。一般的にサツマイモの摂取は抗肥満効果や抗糖尿病効果等、生活習慣病に対して様々な予防効果があるとされている[37-40]。

しかし、これらの有益な効果はサツマイモの炭水化物組成、マルトース含量、カロテノイドおよびアスコルビン酸含量の顕著な変化が示す様に[42, 51, 52]、調理法や加工法によって減少すると報告されている[41]。サツマイモのマルトース含量は焼き芋にすると生の時よりも約 40 倍と顕著に増加することから、本研究ではマルトースの高脂肪食誘発性肥満に及ぼす影響に注目した。

雄性 C57BL/6J マウスに AIN-93G (通常食, FCD 群), AIN-93G に 30%の脂肪を加えた高脂肪食 (HFD 群), マルトースを 7%加えた HFD (HFD+Mal 群) をそれぞれ 13 週間自由摂取させた結果, HFD+Mal 群は実験期間中, 安定した体重増加を示し, HFD 群よりも高値を示したが (図 1-1), 給餌開始 13 週目の両者の体重に有意差は認められなかった (表 1-2)。HFD+Mal 群では HFD 群と比較して BMI および肝臓重量が有意に増加した (表 1-2)。

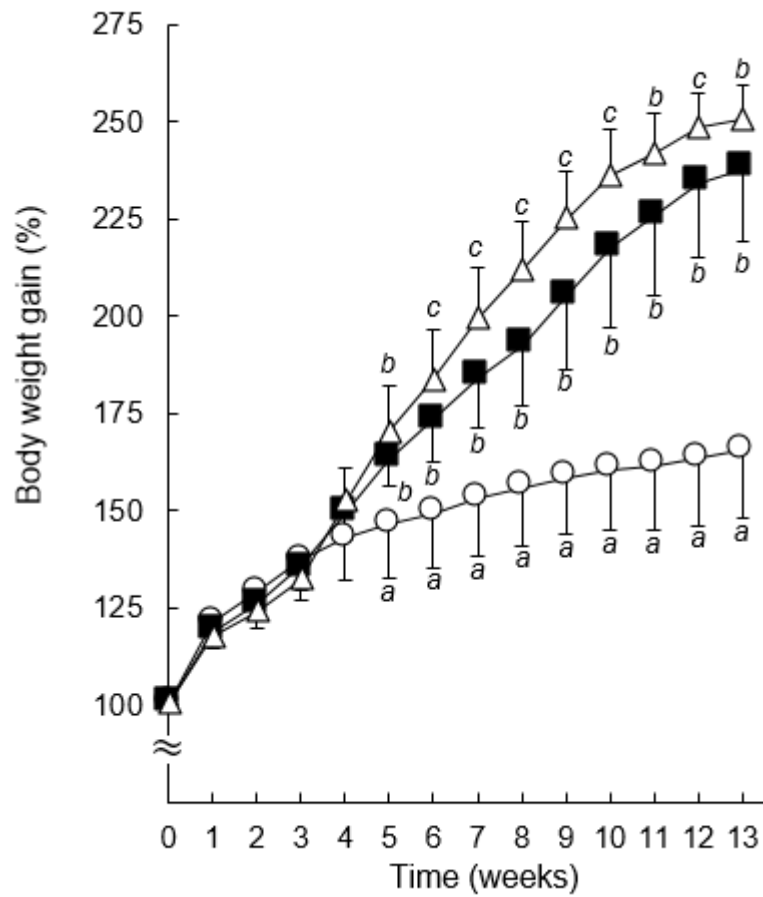


図 1-1. 高脂肪食 (HFD) とマルトースの併用摂取がマウスの体重増加に及ぼす影響  
 ○ : FCD, ■ : HFD, △ : HFD+Mal  
 異なるアルファベット間で有意差を示す ( $p < 0.05$  in Fisher's PLSD test)。

表 1-2. マルトース摂取が成長パラメーターおよび臓器重量に与える影響

項目	FCD	HFD	HFD+Mal
体重 (g)			
初期 (week 0)	19.9 ± 1.1	19.8 ± 0.8	20.1 ± 0.7
終期 (week 13)	31.1 ± 3.7 <sup>a</sup>	45.1 ± 4.6 <sup>b</sup>	47.8 ± 1.8 <sup>b</sup>
摂餌量 (g/day)	3.28 ± 0.2 <sup>ab</sup>	3.53 ± 0.4 <sup>a</sup>	2.86 ± 0.1 <sup>b</sup>
摂取エネルギー量 (kcal/day)	12.2 ± 0.9 <sup>a</sup>	18.0 ± 2.2 <sup>b</sup>	14.6 ± 0.6 <sup>a</sup>
体長 (cm)	9.42 ± 0.26	9.71 ± 0.23	9.59 ± 0.19
体格指数 (g/cm <sup>2</sup> )	3.32 ± 0.30 <sup>a</sup>	4.57 ± 0.40 <sup>b</sup>	5.03 ± 0.22 <sup>c</sup>
相対臓器重量 ((g/100 g body weight)			
肝臓	3.33 ± 0.22 <sup>a</sup>	3.29 ± 0.60 <sup>a</sup>	4.11 ± 0.35 <sup>b</sup>
腎臓	1.18 ± 0.20 <sup>a</sup>	0.86 ± 0.10 <sup>b</sup>	0.81 ± 0.06 <sup>b</sup>
脾臓	0.29 ± 0.03	0.25 ± 0.06	0.22 ± 0.01
胸腺	0.15 ± 0.03	0.15 ± 0.05	0.14 ± 0.03
心臓	0.53 ± 0.10 <sup>a</sup>	0.37 ± 0.05 <sup>b</sup>	0.34 ± 0.03 <sup>b</sup>
肺	0.57 ± 0.06 <sup>a</sup>	0.39 ± 0.06 <sup>b</sup>	0.37 ± 0.03 <sup>b</sup>
内臓脂肪	3.07 ± 1.66 <sup>a</sup>	7.22 ± 0.81 <sup>b</sup>	6.74 ± 0.78 <sup>b</sup>

FCD：通常食，HFD：30%高脂肪食，HFD+Mal：マルトース添加高脂肪食。  
 値は平均値±標準偏差で表した (n = 9)。

異なるアルファベット間で有意差を示す (p < 0.05 in Fisher's PLSD test)。



グルコース、スクロースおよびフルクトースを含む遊離糖類が HFD 誘発性過体重に及ぼす影響については多くの報告がある[53-59]。例えば、Lozano らはラットモデルを用いて、HFD と高フルクトース水溶液の併用摂取は HFD によって誘発される過体重を悪化させるが、高フルクトース水溶液の単独摂取では過体重は起きないと報告している[53]。興味深いことに、グルコースの摂取はフルクトースよりも HFD によって誘発される過体重を大きく増悪させると報告されている[56]。また、スクロースは C57BL/6J マウスの HFD 誘発性過体重を悪化させると報告されている[59]。さらにマルトース（グルコース 2 分子から構成）由来のグルコースの吸収は、同量のグルコースからの吸収よりも高いことが報告されており[46]、マルトースの摂取が体重に及ぼす影響は、そのグルコース組成を超えて広がっている可能性を示している。HFD+Mal 群の血中 GLU および血漿中 T-CH 濃度は HFD 群に比較して有意に高く（図 1-2）、HFD 群では FCD 群に比較して 5 種類の肝臓中脂肪酸（C14:0, C16:0, C18:0, C18:1 [ $\omega$  9] および C18:3 [ $\omega$  6]）濃度も著しく増加した(図 1-3)。

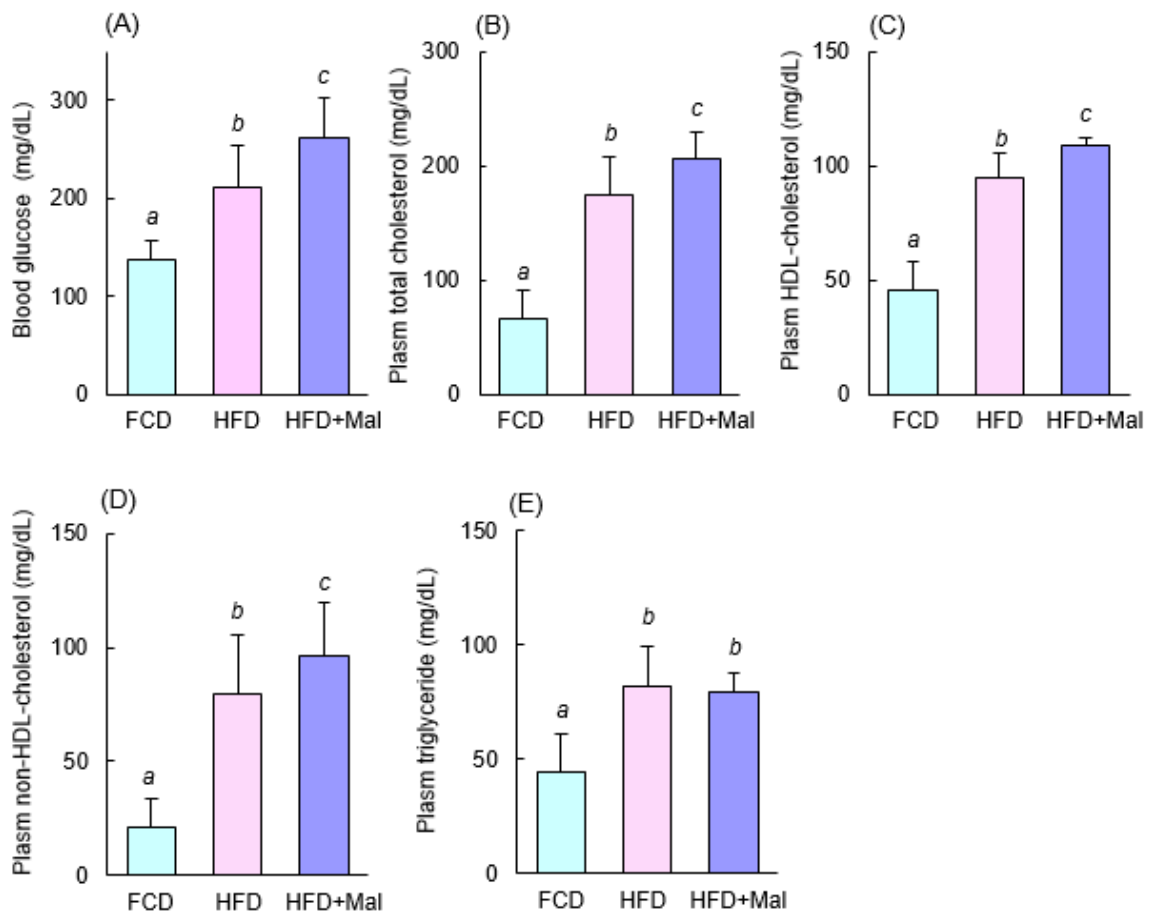


図 1-2. マルトース摂取が血液生化学的パラメーターに与える影響

(A) : グルコース, (B) : 総コレステロール, (C) : 高比重リポタンパク質コレステロール, (D) : 非高比重リポタンパク質コレステロール, (E) トリグリセリド。値は平均値±標準偏差で表した (n = 9)。

異なるアルファベット間で有意差を示す ( $p < 0.05$  in Fisher's PLSD test)。

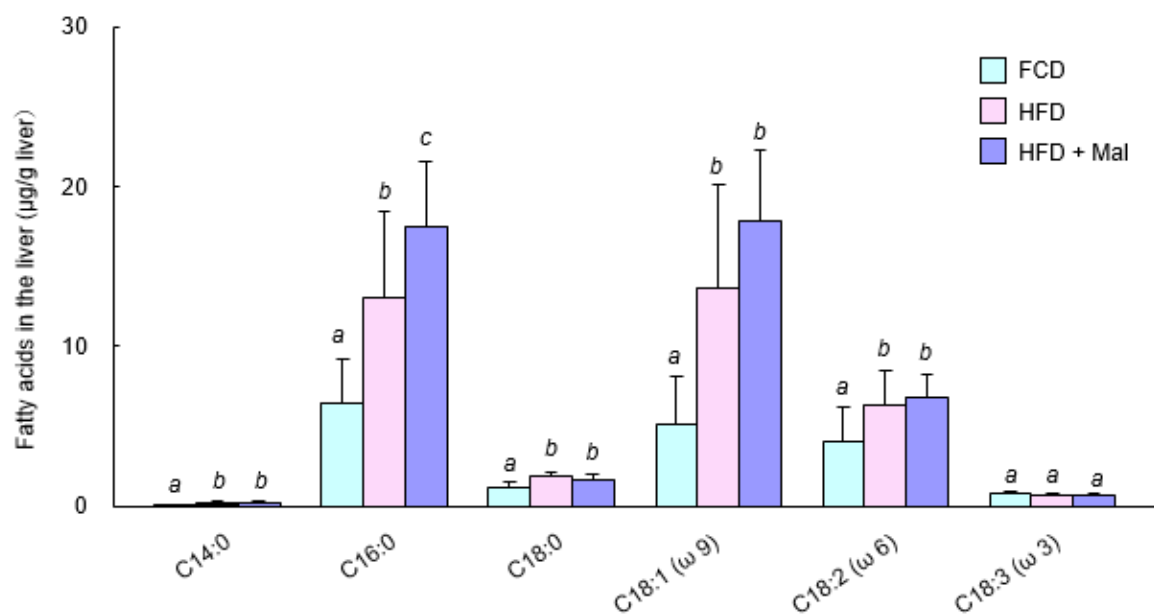


図 1-3 マルトース摂取が肝臓中脂肪酸濃度に与える影響

(C14:0:ミリスチン酸, C16:0:パルミチン酸, C18:0:ステアリン酸, C18:1( $\omega$  9):オレイン酸, C18:2( $\omega$  6):リノレン酸, C18:3( $\omega$  3): $\alpha$ -リノレン酸。値は平均値 $\pm$ 標準偏差で表した (n = 9)。

異なるアルファベット間で有意差を示す ( $p < 0.05$  in Fisher's PLSD test)。

本研究では、FCD 群に大豆油含有 AIN-93 飼料を、HFD 群には脂質含量をラードで 30% 増加させた AIN-93 飼料をそれぞれ 13 週間自由摂取させた。HFD 群で認められた肝臓中脂肪酸濃度の増加理由は、表 1-3 で示したラードの脂肪酸組成で説明出来る。興味深いことに、HFD+Mal 群では肝臓中 C16:0 および C18 ( $\omega$ 9) 濃度が増加し、特に C16:0 濃度は顕著な増加を示した。いくつかの研究グループは、フルクトースあるいはスクロースの摂取は、メタボリックシンドロームの発症に関連する生理的な脂肪酸組成の変化を誘発する可能性があることを指摘している [60, 61]。

表 1-3. 大豆油およびラードの脂肪酸組成 (%)

	C14:0	C16:0	C18:0	C18:1 ( $\omega$ 9)	C18:2 ( $\omega$ 6)	C18:3 ( $\omega$ 3)
大豆油	0.04	10.10	3.00	24.10	57.20	5.60
ラード	1.60	25.60	13.70	42.60	16.10	0.30

本試験で使用した大豆油およびラードの個々の脂肪酸含有量は、GC-FID で測定した。C14:0：ミリスチン酸，C16:0：パルミチン酸，C18:0：ステアリン酸，C18:1( $\omega$  9)：オレイン酸，C18:2( $\omega$  6)：リノレン酸，C18:3 ( $\omega$  3)： $\alpha$ -リノレン酸

本研究の結果は、マルトースの摂取が脂質代謝に影響を与え、その結果として食事誘発性過体重を悪化させる可能性を示唆している。一方で、肝臓中 T-CH および TGL 濃度には 3 群間で有意な変化は認められなかった (図 1-4)。

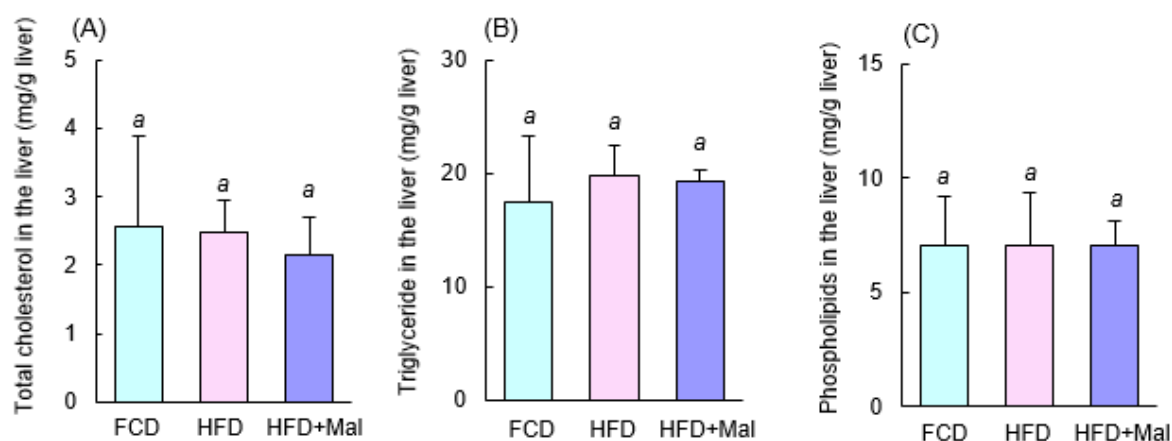


図 1-4. マルトース摂取が肝臓中脂質組成に与える影響

(A)：総コレステロール，(B)：トリグリセリド，(C)：リン脂質。値は平均値±標準偏差で表した (n = 9)。

異なるアルファベット間で有意差を示す (p < 0.05 in Fisher's PLSD test)。

本研究では、雄性 C57BL/6J マウスを 12 時間絶食後、イソフルラン（1.5%）麻酔下で開腹し、肝臓を採取した。肝臓中の T-CH および TGL 含量は絶食中に減少する。西川らは C57BL/6J および BALB/cA マウスを用いて肝臓の脂質蓄積に対する絶食の影響を検討した [62]。その結果、C57BL/6J および BALB/cA マウスのいずれも HFD 摂取後、中程度の肝脂肪症を示したが、24 時間絶食を行った後に肝臓中脂質含量を測定し、両マウスを比較した結果、C57BL/6J では肝臓中の脂質蓄積量が著しく減少したが、BALB/cA マウスでは減少しなかったと報告している。さらに、C57BL/6J マウスでは絶食中に脂肪酸合成が減少することで TGL 合成の減少が誘導され、結果として肝臓への脂質蓄積が少なくなると考察している。本研究における HFD 群の肝臓中 T-CH および TGL 含量が FCD 群と同等であった理由は、解剖前に実施した絶食の影響であると考えられる。

## 第2章

### ラットモデルを用いたフルクトース過剰摂取状態を評価可能な 新規バイオマーカーの確立

This chapter is based mainly on:

Suzuki Y., Kondo K., Toyoda K., Tanaka Y., Kobayashi A., Yokoyama D., Sakakibara H., Novel Biomarker Establishment for Evaluation of Excessive Fructose Consumption Using a Rat Model, *In Vivo*, 2023, 37(1), 173-181.

## 2.1 緒論

生活活動量の低下と慢性的な運動不足が定着した近年、疾病の疫学は栄養不足から栄養過多へと変化している[63]。過栄養によって誘発される最も重要な疾患の一つは脂肪肝、高血圧、血清中 TGL 濃度の上昇および HDL-chol 濃度の減少、インスリン感受性の低下と血清中 GLU 濃度の上昇を含む血糖異常および全身性の炎症を伴う脂質異常等、複数の疾患で構成されるメタボリックシンドロームである[64]。

近年、先進国のみならず開発途上国においても、経済発展に伴う生活および労働環境の変化が、食卓に占める伝統的な家庭料理の割合の低下と、遊離糖類や脂質を豊富に含んだ加工食品の割合の増加を引き起こし、食生活の過栄養化が進んでいる事は前章でも述べたが[8, 9]、中でも飲料や加工食品に多用される高フルクトース・コーンシロップ (HFCS) の使用が健康上の危険因子として問題視されている[65]。Marriott らの報告によると、加工食品に使用される甘味料に占める HFCS の割合は、1978 年の 16%から 1998 年には 42%に増加し、その後安定して推移している[66]。同時に、エネルギーに占めるフルクトースの総消費量は 1%増加し、エネルギー摂取量はこれらの期間に 18%増加した。HFCS の消費量の増加と肥満の流行には時間的な関係があり、HFCS を多用した飲料や加工食品の過剰摂取と肥満の流行との関係性が、複数の報告によって指摘されている[67, 68]。



HFCS は 1970 年代に食品・飲料業界に初めて導入された、フルクトースとグルコースで構成された液体甘味料で、使用用途に応じてフルクトースとグルコースを 42%~55%含んでいる [69, 70]。フルクトースとグルコースの異なる生理作用については多くの報告がある。例えば、Köseler らはラットモデルを用いて、高フルクトースおよび高グルコース摂取が体重および血液生化学的パラメーターに及ぼす影響について検討した結果、高フルクトース摂取群の体重は、高グルコース摂取群よりも高かったと報告している [71]。高脂肪食摂取マウスにフルクトースあるいはグルコース添加水を与えた結果を比較すると、フルクトース添加水摂取マウスは、カロリー摂取量が同等であったにも関わらず、グルコース添加水摂取マウスより顕著な肥満および肝肥大を示した [72]。

また、フルクトースを摂取したラットはグルコースを摂取したラットとは異なり、耐糖能異常を示した [73]。さらに、フルクトースの過剰摂取は、肥満や糖尿病モデルをはじめとするメタボリックシンドロームモデル動物の作製に広く用いられている [74-77]。これらの報告によると、高フルクトース食を毎日摂取することで、メタボリックシンドロームの主な特徴を、全てかつ速やかに生じさせることが可能である [78]。

フルクトースによるメタボリックシンドローム発症メカニズムについては、多くの仮説が提唱されている。体内に摂取されたフルクトースの約 50~70%は小腸の刷子縁にあるグルコーストランスポーター5 を介して体内に吸収され、そのうちの約 70%が肝臓で代謝される [79, 80]。フルクトースの過剰摂取は肝臓における脂肪酸の *de novo* 合成や TGL の蓄積

を誘導し、その結果として高脂血症、NAFLD および慢性炎症の発症に繋がることが報告されている[80-82]。NAFLD はその後続く肝疾患の主要な原因であるが、ほとんど無自覚・無症状であるため診断が難しく、世界人口の約3分の1が罹患していると言われており[83, 84]。治療や生活習慣の改善を怠ると、NAFLD 患者の約30%は時間の経過と共に線維化を伴うNASHを発症し、HCCの発症リスクが大きく高まる[15, 23]。したがって、フルクトースの過剰摂取によって引き起こされる様々な疾患に対する予防策を立てることは非常に重要な課題である。そのためにはフルクトースの日常的な過剰摂取を避けることに加え、フルクトースの過剰摂取状態を適切に評価可能なバイオマーカーが必要である。しかし調査を行った限り、NAFLD 発症前におけるフルクトースの過剰摂取状態を評価する、最適な方法は一つもないのが現状である。

本研究では、ラットにフルクトース過剰食あるいは通常食（飼料中の炭水化物をコーンスターチおよびマルトデキストリンに置換）を4週間自由摂食させた際に生じる生理的変化について、血漿中肝毒性バイオマーカーを中心に比較検討した。さらに、血漿中肝毒性バイオマーカーの中からアルカリホスファターゼ（ALP）を選択し、そのアイソザイム活性を経時的に追跡した。

## 2.2 実験方法

### 2.2.1 実験動物，飼料および方法

本研究は 3R の原則を考慮し，科学上の利用のために動物を使用する事を動物実験と定義した，「動物の愛護および管理に関する法律」（1973 年 10 月 1 日 法律第 105 号）に従って実施された研究であり，日本たばこ産業株式会社 医薬総合研究所 横浜リサーチセンター 安全性研究所の動物管理委員会によって，全ての動物実験が承認された（実験番号 21012，2021 年 2 月 8 日承認済み）。本研究は以下のプロトコールに従って実施された。

#### 【プロトコール】

本研究では，飼料中の炭水化物をコーンスターチおよびマルトデキストリンに置換した，改良型 AIN-93G 通常食（D21012002：CCD），同飼料の炭水化物を全てフルクトース置換した 63%高フルクトース食（D21012001：HFrd）を，Research Diets, Inc（ニュージャージー州，アメリカ合衆国）から入手した。各飼料の組成を表 2-1 に示す。

表 2-1 各 AIN-93G ベース飼料の組成

成分	CCD	HFrD
	(g/100 g)	
カゼイン	20.0	20.0
コーンスターチ	49.7486	—
マルトデキストリン	13.2	—
フルクトース	—	62.9486
セルロース	5.0	5.0
大豆油	7.0	7.0
ミネラル混合物	3.5	3.5
ミネラル混合物	1.0	1.0
L-システイン	0.3	0.3
重酒石酸コリン	0.014	0.014
t-ブチルヒドロキノン	0.25	0.25
エネルギー (kcal/g)	4.00	4.00

5 週齢の雄性 Crl:CD (SD) ラット 12 匹をジャクソン・ラボラトリー・ジャパン株式会社 (神奈川県, 日本) から購入した。入荷したラットは空調管理された動物飼育室 (温度  $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ , 湿度  $55 \pm 5\%$ , 換気 10~20 回/時間, 点灯午前 7 時~午後 7 時) で, 床敷 (アルファドライプラス, EP トレーディング株式会社, 東京都, 日本) を敷いたケージ (W380 mm  $\times$  D290 mm  $\times$  H180 mm) に 3 匹ずつ収容し, 1 週間の検疫・順化を行った。この期間中, ラットには水および CCD を自由摂取させた。検疫・順化終了後, ラットを CCD 群と HFrD 群の 2 群に分け, 2 匹 1 組でケージに収容した。4 週間の実験期間中, ラットにはそれぞれの餌および水を自由摂取させた。体重および摂餌量を給餌開始後 1 週間は毎日, その後は週 2 回測定した。

採血は摂餌開始前, 摂餌開始後 1, 2 および 3 週目に無麻酔下で鎖骨下静脈から, 4 週目にイソフルラン麻酔 (5%) 下で開腹し, 腹部大動脈から行った。採血はいずれも非絶食下で午前 9 時~午前 11 時の間に実施した。得られた血液はヘパリンリチウムコーティング採血管 (BD バキュティナ採血管 ヘパリンリチウムコーティング, 日本ベクトン・ディッキンソン株式会社, 東京都, 日本) へ分注し, 遠心分離まで氷冷した。血液は  $1,750 \times \text{g}$ ,  $4^{\circ}\text{C}$  で 30 分間遠心分離して血漿を採取した。血漿は測定まで  $-80^{\circ}\text{C}$  の超低温冷凍庫で保存した。

### 2.2.2 血液生化学的検査

得られた血漿を用いて, 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), ALP, グルタミン酸脱水素酵素 (GLDH), ソルビトール脱水素酵素, グアナーゼ, 乳酸脱水素酵素,  $\gamma$ -グルタミルトランスフェラーゼ ( $\gamma$ -GTP), ロイシンアミノペプチダーゼ (LAP) および 5'-ヌクレオチダーゼ (5'-NT) 活性並びに GLU, T-CH, 総蛋白質 (TP), TGL および PL 濃度を, 自動分析装置 (TBA-120FR, キヤノンメディカルシステムズ株式会社, 栃木県, 日本) で, 各パラメーター個別の標準試薬を用いて 37°C で測定した。

### 2.2.3 血漿中 ALP アイソザイム活性測定

血漿中肝臓型 ALP アイソザイム (L-ALP), 小腸型 ALP アイソザイム (I-ALP) および骨型 ALP アイソザイム (B-ALP) 活性を, 全自動電気泳動装置 (エパライザ 2, ヘレナ研究所, 埼玉県, 日本) で標準試薬を用いて測定した。B-ALP 活性の測定には畠山らの方法に従い[86], 室温下で血漿に B-ALP 分離剤であるノイラミニダーゼ (セパレーター, ヘレナ研究所) を添加して前処理を行った。

### 2.2.4 剖検および肝臓重量測定

剖検は各ラットに行われた実験内容を知らされていない病理検査担当者が, 肉眼的病変の有無について詳細に観察を行った。解剖時に採取した肝臓の重量を測定し, 最終体重に対する相対重量を算出した。また, タイトジャンクション関連遺伝子発現解析用に, 小腸 (十二

指腸)の一切片を組織保存試薬(RNAlater®, Sigma-Aldrich Co. LLC, ミズーリ州, アメリカ合衆国)で5°C, 24時間浸漬固定した後, 測定まで-80°Cの超低温冷凍庫で保存した。

e

### 2.2.5 病理組織学的検査

全てのラットから肝臓, 十二指腸, 空腸および回腸を採取し, 10%中性緩衝ホルマリンで固定した後, パラフィンワックスに包埋, スライド切片作製およびヘマトキシリン・エオジン染色を行い, 病理組織学的検査用標本を作製した。また, 肝臓については脂肪沈着の有無を確認するため, 脂肪特異的染色剤であるオイルレッド O で染色した標本も作製した。作製した標本の観察および評価は, 病理検査担当者が光学顕微鏡を用いて行った。

### 2.2.6 RNA の抽出

組織保存試薬で浸漬固定済みの小腸切片を, 一定量 Tissue Lyser (QIAGEN N.V., Hulsterweg, オランダ)でホモジナイズし, RNeasy Mini kit (QIAGEN N.V.)を用いて Total RNA を抽出した。NanoQuant Plate およびプレートリーダー (Infinite 200 PRO M nano, Tecan Group Ltd., 神奈川県, 日本)を用いて 260 nm の吸光度を測定し, Total RNA 濃度を算出した。SuperScript VILO Mastermix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, マサチューセッツ州, アメリカ合衆国)を用いて, 抽出した Total RNA 2  $\mu$ g から cDNA を合成した。

### 2.2.7 定量的逆転写 PCR (RT-qPCR)

合成した cDNA 溶液を Tris-EDTA buffer (pH8.0, 株式会社ニッポン・ジーン 東京都, 日本) で 5 倍希釈した。5 倍希釈 cDNA 溶液を MILLI-Q 水 (Merck Millipore, マサチューセッツ州, アメリカ合衆国) でさらに 10 倍希釈し, TaqMan probe-based semi quantitative-real time PCR により測定した。mRNA 発現量は QuantStudio™3 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, マサチューセッツ州, アメリカ合衆国) および TaqMan Gene Expression Master Mix (Thermo Fisher Scientific) を用いて, 1 サンプルにつき 2 回測定した。データ解析にはソフトウェアディファインドストレージシステム (Thermo Fisher Scientific) による検量線法を用いた。各遺伝子発現量は  $\beta$ -actin の mRNA 発現量により補正した。以下のプライマーおよび TaqMan プローブの混合液を Thermo Fisher Scientific から購入した。クローデイン 1 (*Cl-1*, Rn00581740\_m1), クローデイン 4 (*Cl-4*, Rn01196224\_s1), zonula occludens-1 (*Zo-1*, Rn07315717\_m1), オクルデイン (*Oc*, Rn00580064\_m1) および  $\beta$ -actin (Rn00667869\_m1)。サーマルサイクリングの条件は, 逆転写を 50°C で 2 分間, 初期活性化を 95°C で 10 分間, 変性を 95°C で 15 秒, アニーリングと伸長を 60°C で 60 秒のサイクルを 40 回行った。



### 2.2.8 統計解析

データは平均値±標準偏差で示した。統計解析は JMP (SAS Institute Inc., ノースカロライナ州, アメリカ合衆国) を用いて行った。CCD 群と HFrD 群のデータを比較するために、対応なし Student's t 検定を用いて実施した。有意水準は 5%(両側)に設定した。

## 2.3 結果 および 考察

メタボリックシンドロームは世界的に罹患者数の多い重要な慢性疾患であり、生活習慣の改善や治療を怠ると NAFLD を発症、その後 NASH や肝硬変に進行し、将来的に HCC の発症リスクが高まるとされている[12, 13, 86]。NAFLD を誘発する主な食事要因として、高脂肪食の日常的な摂取がよく知られており、多くの研究グループが高脂肪食動物モデルを用いて、NAFLD 様症状を予防可能な食品や食品成分の探索研究を行っている[87, 88]。さらに、フルクトースを豊富に含む食品の日常的な摂取も NAFLD、ひいてはメタボリックシンドロームの危険因子であることが知られているが[89-92]、フルクトースの生体への影響はほとんど無自覚・無症状であると言われている。フルクトースの過剰摂取に起因する NAFLD を予防するためには、自覚症状が現れる前に生じる生理的変化を検出することが重要である。本研究では、ラットに HFrD あるいは CCD を 4 週間自由摂食させた際に生じる生理的変化について、肝毒性バイオマーカーに焦点を当てて検討し、フルクトース過剰摂取の影響を早期かつ簡便にモニタリング可能なバイオマーカーを探索した。

CCD には AIN-93G をベースに炭水化物をコーンスターチ及びマルトデキストリンに置き換えた改良型精製飼料を使用した(表 2-1)。HFrD はフルクトース過剰摂取の影響を明確にするため、CCD の炭水化物を全てフルクトースに置換した。4 週間の摂食期間中の摂餌

量は CCD 群と HFrD 群でほぼ同様に推移した (図 2-1B)。この結果は摂食期間中、炭水化物を除く栄養素の摂取量が CCD 群と HFrD 群で同等であったことを示している。さらに、栄養失調のマーカーとして用いられる血漿中 TP 濃度には、両群間で差は認められなかったことから (表 2-2)、摂食期間中の両食餌群間の栄養状態も同等であったことが示された。一方で、CCD および HFrD 群間で体重に差が認められなかったにも関わらず (図 2-1A)、HFrD 群では肝臓重量の増加に加え、肝細胞への脂肪蓄積を示す病理組織学的所見の重症度が増加した (表 2-3)、(写真 2-1A~D)。

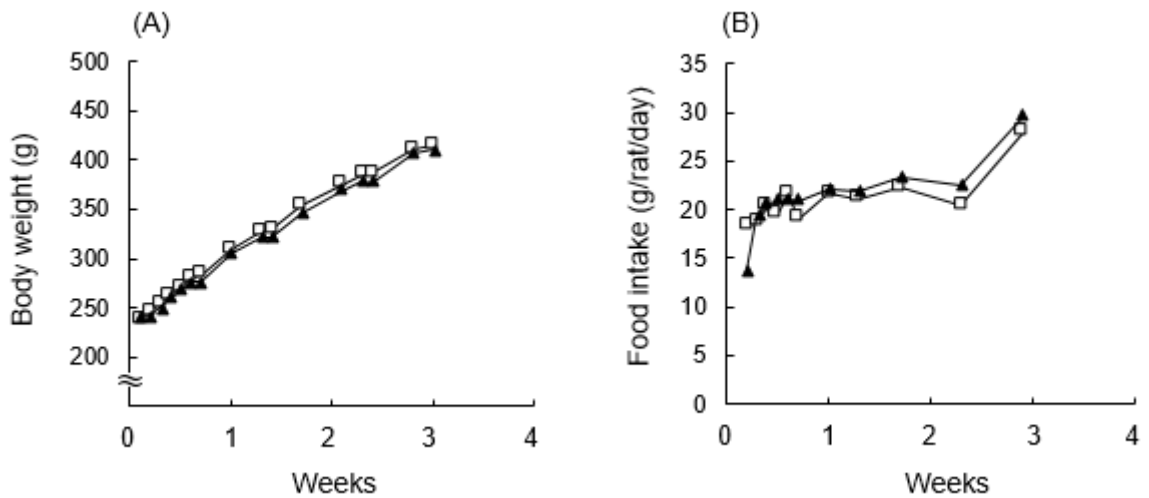


図 2-1. フルクトース摂取が (A) 体重および (B) 摂餌量に及ぼす影響

雄性 SD ラットを通常食 (CCD, □) 群および高フルクトース食 (HFrd, ▲) 群に割り当て、それぞれの餌を 4 週間自由摂食させた。データは平均値±標準偏差を示す (n=6)。CCD 群と HFrd 群の間に有意差はなかった。

表 2-2. フルクトースの摂取が血漿中生化学パラメーターに及ぼす影響

パラメーター	CCD	HFrd
トリグリセリド (mg/dL)	128.7 ± 29.0	235.8 ± 68.3*
リン脂質 (mg/dL)	158.3 ± 2.2	184.5 ± 10.4*
総コレステロール (mg/dL)	87.2 ± 6.6	91.8 ± 9.1
血糖 (mg/dL)	162.7 ± 17.3	173.7 ± 12.3
総タンパク質 (g/L)	5.97 ± 0.20	5.95 ± 0.27

雄性 SD ラットを通常食 (CCD) 群および高フルクトース食 (HFrd) 群に割り当て、それぞれの餌を 4 週間自由摂食させた。採血は非絶食下で行った。データは平均値±標準偏差 (n=6)で示す。

\*CCD 群と比較し、統計学的に有意差がある (p<0.05)。

表 2-3 フルクトースの摂取が肝臓の重量，剖検および病理組織学的所見に及ぼす影響

パラメーター	CCD	HFrD
肝臓重量		
絶対重量 (g)	15.1 ± 2.3	17.9 ± 1.1*
相対重量 (mg/100 g body weight)	3.6 ± 0.1	4.4 ± 0.2*
剖検所見		
褪色	-	P (1)
病理組織学的所見		
小葉辺縁性 肝細胞脂肪変性	± (3)	± (1); + (1)
小葉辺縁性 肝細胞空胞化	-	± (3); + (3)

雄性 SD ラットを通常食 (CCD) 群および高フルクトース食 (HFrD) 群に割り当て、それぞれの餌を 4 週間自由摂食させた。摂食開始後 4 週目に非絶食下で解剖して肝臓を採取した後、剖検および病理組織学的検査を行った。肝重量は平均値 ± 標準偏差で示した (n=6)。相対重量は解剖直前に行われた体重測定の結果を元に算出した。剖検所見は以下のように表示した。- : 変化なし, P : 非等級所見。病理組織学的所見は以下の様に表示した。- : 変化なし, ± : 極僅かな変化、+ : 僅かな変化。括弧内の数字は所見が認められた動物の数を示す。

\*CCD 群と比較して統計的に異なる ( $p < 0.05$ )。

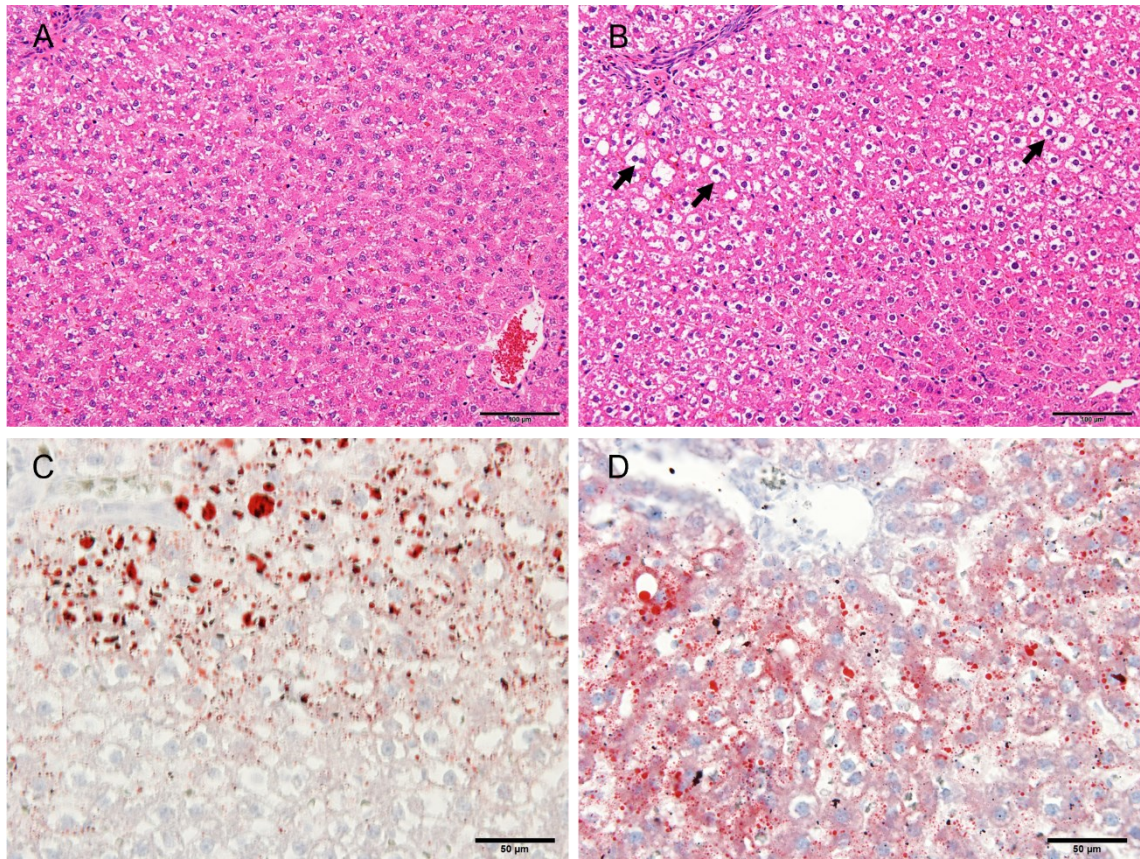


写真 2-1. CCD および HFrD 群の肝臓切片の光学顕微鏡写真

CCD (A) あるいは HFrD (B) を 4 週間自由摂取させたラットの、ヘマトキシリン・エオジン染色した肝臓切片の光学顕微鏡写真。HFrD 群では肝細胞の空胞化 (黒矢印) が CCD 群よりも顕著に認められた。

CCD (C) あるいは HFrD (D) を 4 週間自由摂取させたラットの、オイルレッド O 染色した肝臓切片の光学顕微鏡写真。肝細胞への脂肪蓄積領域 (オイルレッド O 陽性領域: 赤) は CCD 群よりも HFrD 群で顕著かつ広範囲であった。

フルクトースの過剰摂取は、肝臓における脂肪酸の *de novo* 合成を活性化させ、その結果として高脂血症や肝臓への TGL 蓄積を誘発させることが、多くの研究グループによって報告されている [76, 80, 93]。本研究では、HFrD 群で血漿中 TGL および PL 濃度の有意な増加が認められた (表 2-2)。さらに、血漿中 TGL 濃度と肝重量の間には正の相関が見られた ( $r=0.50$  以上)。これらの結果は HFrD 群における肝臓重量の増加は、肝臓への脂肪蓄積に起因していることを示唆している。すなわち、本研究で実施した 4 週間にわたる過剰なフルクトース摂取は、他の報告 [74, 94, 95] と同様、ラットに典型的な NAFLD 様症状を誘発した。

本研究では 4 週間の摂取後、HFrD 群で脂肪蓄積による肝細胞の空胞化が観察されると共に (表 2-3 および写真 2-1B)、血漿中 ALT および GLDH 活性も上昇傾向あるいは有意な上昇を示した (図 2-2A および 2B)。さらに、肝・胆道系障害を示すパラメーターである血漿 LAP 活性が、給餌開始 1 週間目から HFrD 群で有意に上昇した (図 2-2C)。興味深いことに、血漿 LAP 活性と同様に肝・胆道系障害を示すパラメーターである血漿中 ALP,  $\gamma$ -GTP および 5'-NT 活性に変化は認められなかった (図 2-2D~2F)。摂取されたフルクトースの 50~70% は小腸の刷子縁に存在するグルコーストランスポーター 5 を介して体内に吸収され、そのうちの約 70% が肝臓で代謝される [79, 80]。簡単に説明すると、肝臓に取り込まれたフルクトースは、まずケトヘキソキナーゼ C によってフルクトースリン酸に変換され、さらに TGL および超低密度リポ蛋白の合成基質となるグリセルアルデヒド三リン

酸に変換される[96-98]。この過程で ATP クエン酸シンターゼの発現が増加し、細胞内小器官やミトコンドリアに障害を与えて炎症や肝細胞壊死を誘発する。したがって、本研究において、HFrD 群で認められた肝細胞への脂肪蓄積像や空胞化、血漿中 ALT および GLDH 活性の上昇は、上記のメカニズムによって引き起こされた肝細胞壊死に起因した変化だと説明が出来る。



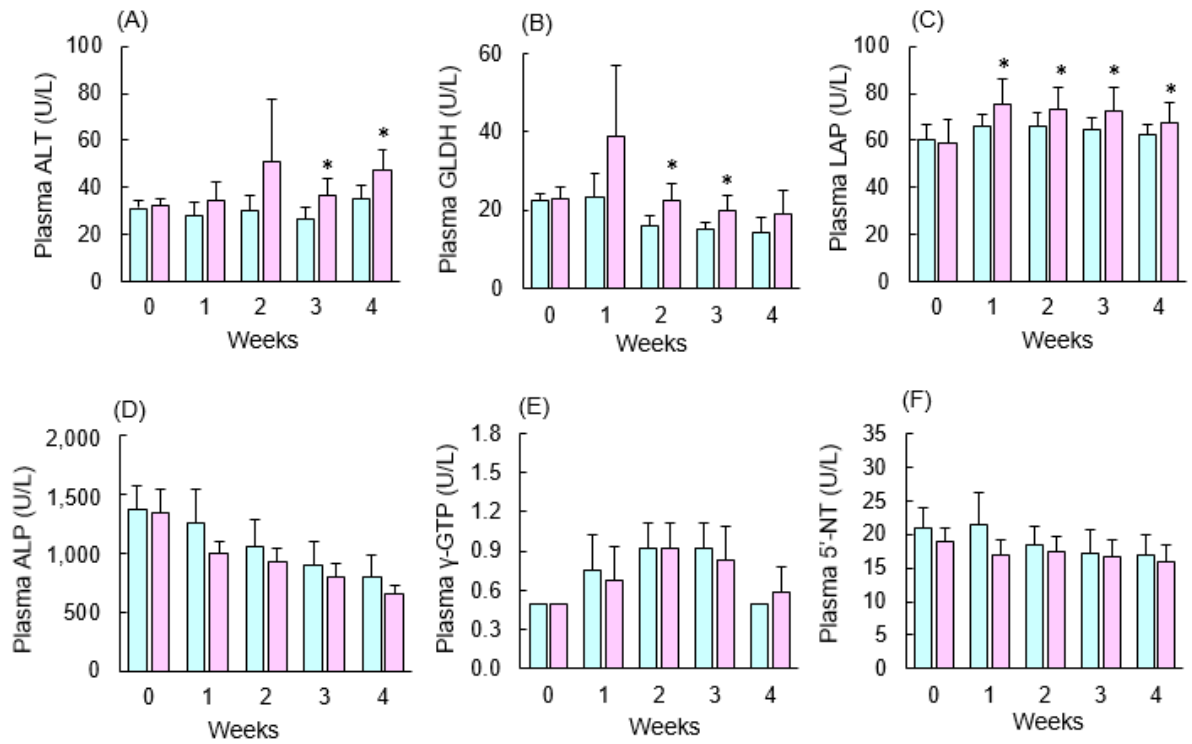


図 2-2. 血漿中肝毒性パラメーターに対するフルクトース摂取の影響

雄性 SD ラットを通常食 (CCD) 群および高フルクトース食 (HFrD) 群に割り当て、それぞれの餌を 4 週間自由摂食させた。採血は群分け前および摂餌開始後 1、2 および 3 週目に鎖骨下静脈から、4 週目に腹部大動脈からいずれも非絶食下で実施した。(A) ALT；アミノアミノトランスフェラーゼ、(B) GLDH；グルタミン酸脱水素酵素、(C) LAP；ロイシンアミノペプチダーゼ、(D) ALP；アルカリホスファターゼ、(E)  $\gamma$ -GTP； $\gamma$  グルタミルトランスフェラーゼ、(F) 5'-NT；5'-ヌクレオチダーゼ。データは平均値±標準偏差で示す (n=6)。\*CCD 群と比較して統計的に異なる (p<0.05)。

血液生化学的検査および病理組織学的検査の結果、フルクトースの肝・胆道系への影響が明らかとなった。本研究の目的は、フルクトースの過剰摂取の影響を早期にかつ簡便にモニタリング可能なバイオマーカーを、肝毒性マーカーに焦点を当てて探索することにある。そこで、HFrD 摂取開始前から開始後 1~4 週目までの肝・胆道系マーカーの変動を経時的に追跡した結果、血漿中 ALT, GLDH および LAP 活性は給餌開始それぞれ 3 週目, 2 週目および 1 週目から上昇したが、その他の肝毒性マーカーに変化は認められなかった (図 2-2)。これらの結果から、血漿中 ALT, GLDH および LAP 活性は、フルクトースの過剰摂取状態を評価するバイオマーカー候補となる可能性が示唆された。

フルクトースの過剰摂取が肝臓へ及ぼす影響について、より詳細な解析を行うため、血漿中 ALP アイソザイム活性についても検討を行った結果、血漿中から検出可能な 3 種類の ALP アイソザイムのうち、L-ALP 活性が HFrD 摂取 2 週目から有意に増加し、I-ALP 活性は 1 週目から有意に減少した (図 2-3A および 3B)。

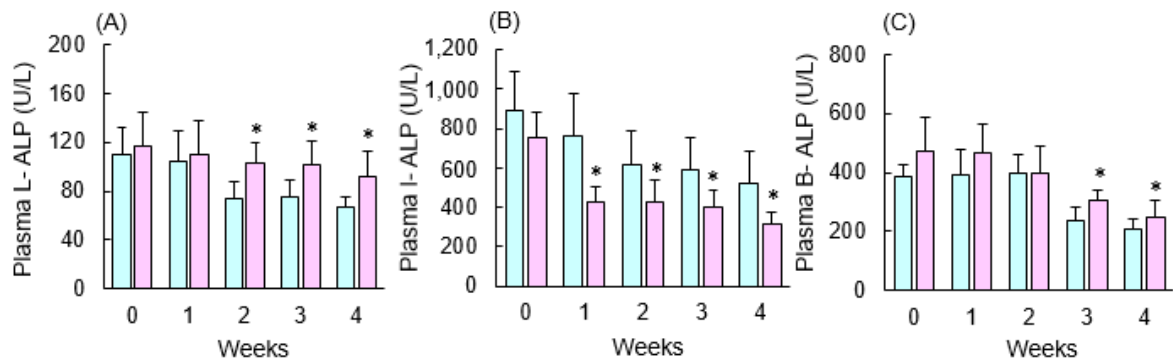


図 2-3. 血漿中アルカリホスファターゼ (ALP) アイソザイムに対するフルクトース摂取の影響

雄性 SD ラットを通常食 (CCD) 群および高フルクトース食 (HFrD) 群に割り当て、それぞれの餌を 4 週間自由摂食させた。採血は摂餌開始前および摂餌開始後 1、2 および 3 週目に鎖骨下静脈から、4 週目に腹部大動脈からいずれも非絶食下で実施した。(A) L-ALP；肝臓型アルカリホスファターゼアイソザイム、(B) I-ALP；小腸型アルカリホスファターゼアイソザイム (C) B-ALP；骨型アルカリホスファターゼアイソザイム。データは平均値±標準偏差で示す (n=6)。\*CCD 群と比較して統計的に異なる (p<0.05)。

フルクトースの過剰摂取は腸内の炎症性サイトカイン濃度を上昇させることが報告されていることから[99-101]、これらの変化の原因として、フルクトースの腸内細菌叢への影響が考えられる。また、フルクトースの過剰摂取は腸のタイトジャンクションタンパク質の発現低下を誘発し、これにより小胞体ストレスが増加、腸管膜透過性が亢進することが複数の研究グループにより報告されている[99, 102, 103]。さらに、フルクトースの過剰摂取は腸内細菌叢の異常増殖と多様性の低下を引き起こし[99, 102]、腸内細菌が産生する大量のリポ多糖類（LPS）が腸管内腔から門脈に放出される[75, 103-105]。肝臓は胆管に流入したLPSを含むエンドトキシンを認識し、その結果、エンドトキシンを無毒化するために肝臓におけるL-ALPの産生が亢進したと考えられる[106-108]。これらの仮説を裏付ける結果として、本研究では、小腸のタイトジャンクション関連遺伝子である*Cl-1*の発現が有意に減少していた（図2-4A）。

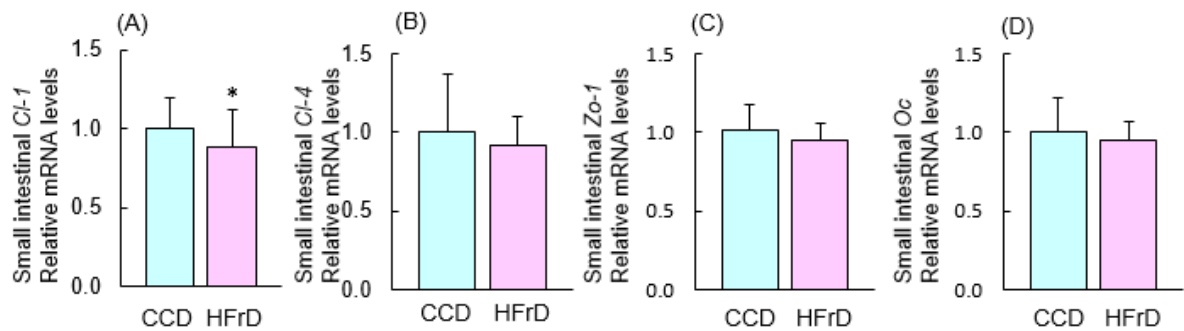


図 2-4. 小腸のタイトジャンクション関連遺伝子発現に対するフルクトース摂取の影響  
 雄性 SD ラットを通常食 (CCD) 群および高フルクトース食 (HFrD) 群に割り当て、それぞれの餌を 4 週間自由摂食させた。小腸は非絶食下で採取した。(A) *Cl-1*; クローディン-1, (B) *Cl-4*; クローディン-4, (C) *Zo-1*; zonula occludens-1, (D) *Oc*; オクルディン。データは平均値±標準偏差で示す (n=6)。\*CCD 群と比較して統計的に異なる (p<0.05)。

また、フルクトースの過剰摂取は炎症性サイトカインであるインターロイキン-1 $\beta$  およびインターロイキン-6、免疫グロブリン G の腸内濃度の増加、腸管組織への炎症性細胞の浸潤を誘発させることが報告されている[109-111]。I-ALP は強力な抗炎症作用および解毒作用を有していることから[112-114]、本研究で認められた血漿中 I-ALP 活性の低下は、フルクトースの過剰摂取によって誘導された炎症性変化並びに腸内細菌由来のエンドトキシンに対して、強力な抗炎症作用および解毒作用を持つ I-ALP の小腸管腔内における消費が加速したことに由来する可能性があるが[112-114, 148-150]、この変化のメカニズムを明らかにするためにはさらなる研究が必要である。血漿中のもう一つの ALP アイソザイムである血漿中 B-ALP 活性が、摂食開始 3 週目から上昇した (図 2-3C)。血漿中 B-ALP 活性は骨粗鬆症や骨折等の骨破壊時に鋭敏に上昇し、これらの疾患の重症度の評価や治療方針の決定に用いられているバイオマーカーである[115, 116]。加えて、フルクトースは小腸におけるカルシウム輸送を阻害すると共に、破骨細胞の増加による骨破壊の亢進、骨細胞の減少による骨密度の低下を誘発することが報告されていることから[117, 118]、本研究で認められた血漿中 B-ALP 活性の上昇は、フルクトースの過剰摂取によって誘発された変化と考えられた。

以上より、血漿中 L-ALP, I-ALP および B-ALP の各 ALP アイソザイム活性と血漿中 GLDH, ALT および LAP 活性の組み合わせ解析は、NAFLD, ひいてはメタボリックシンドローム

ドローム発症の初期段階における，フルクトースの過剰摂取による生理変化の検出に有用であることが示唆された。

## 第3章

活動期のアルカリホスファターゼアイソザイム活性解析は

フルクトース過剰摂取モデルラットにおける

高感度バイオマーカーとなる

This chapter is based mainly on:

Suzuki Y., Yokoyama D., Matsuura C., Kondo K., Shimazaki T., Ryoke K., Kobayashi A., Sakakibara H., Active-phase plasma alkaline phosphatase isozyme activity is a sensitive biomarker for excessive fructose intake, *In Vivo*, 2023, 37(5), 1967-1974.



### 3.1 緒論

過去数十年の間世界的に、特に先進国における食生活は劇的に変化した。中でも過栄養、すなわち高カロリー食への移行が著しく進行している[119-121]。過栄養が引き起こす重要な病態の一つは、内臓脂肪量の増加や脂肪肝、血圧上昇、インスリン抵抗性の亢進や空腹時血中 GLU 濃度の上昇等の糖代謝異常、全身性の炎症等の複数の疾患によって構成されるメタボリックシンドロームである[64]。近年、多くの先進国の家庭料理が高カロリーの加工食品に取って代わられており、この食生活の大きな変化は、甘い清涼飲料水や加工食品に含まれる HFCS の使用量の増加に象徴される[65]。フルクトースの過剰摂取は肝臓における脂肪酸の *de novo* 合成や TGL の蓄積を誘導し、高脂血症、NAFLD、慢性炎症の発症に繋がることが報告されている[80-82]。NAFLD は肝疾患の主要な原因であり、発症から進行までほとんど無自覚・無症状であることから診断が困難で、世界人口の約 3 分の 1 が罹患していると言われている[12, 13]。NAFLD 患者の約 30%は肝臓の壊死性炎症と線維化を伴う NASH を発症し、将来的に HCC の発症リスクが大きく高まる[15, 23]。したがって、フルクトースの過剰摂取によって引き起こされる様々な疾患の予防は、健康的な生活を維持する上で重要な課題である。そのためには、フルクトースの過剰摂取を避けることに加えて、フルクトースの過剰摂取状態を適切に診断可能なバイオマーカーが必要となる。これまで NAFLD 発症前のフルクトースの過剰摂取状態を示す最適なバイオマーカーは存在しな

った。そこで、HFrD をラットに 4 週間自由摂取させた際に生じる生理的变化を、CCD を 4 週間自由摂取させたラットと、肝毒性バイオマーカーに着目して比較・評価した第 2 章の研究において[122]、血漿中で検出可能な 3 種類の ALP アイソザイムのうち、L-ALP および I-ALP 活性が NAFLD、ひいてはメタボリックシンドローム発症の初期段階における、フルクトースの過剰摂取による生理的变化を検出可能なバイオマーカーとして有用である可能性を示した。一方で、第 2 章の研究では HFrD 摂取 4 週目には、既にラットが肝肥大を発症していたことから、ALP アイソザイム活性がフルクトースの過剰摂取状態を評価可能なバイオマーカーであることを結論づけるためには、より早期の、肝肥大発症前の段階における ALP アイソザイム活性を調査する必要がある。

もう一つの重要な点は、評価を行う時間帯である。ラットやマウス等の夜行性げっ歯類を用いた研究の多くは、飼育室内の照明が点灯されている時間帯、つまり動物の睡眠時間帯にサンプリングが行われている。これは消灯時間帯よりも点灯時間帯の方が、研究者にとって作業効率が良いという理由が大きい。しかし近年、同じ実験処置を行っているにも関わらず、試料のサンプリング時間帯によって、結果が著しく異なることが報告されている[123]。これはヒトやげっ歯類を含むほとんどの生物に、Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator like 1 (BMAL1) や circadian locomotor output cycles kaput (CLOCK) 等の体内時計が備わっているためである。そのため、ほとんどの生命現象には日内変動が観察される。例えばトランスポーターを介して体内に吸収されるアントシアニン等のポリフェノール

類には、摂取時間によって体内への吸収パターンが異なる物がある[124]。化学発癌物質であるエチルニトロソウレアは、投与時間帯によって毒性発現頻度に変化する[125]。また、血中 ALP 活性は典型的な日内変動を示し、活動期開始時よりも睡眠期開始時の方が高くなる[126]。これらの背景から、フルクトースの過剰摂取により影響を受ける血漿中 ALP アイソザイム活性も、評価する時間帯によって異なるパターンを示す可能性がある。

本研究では、第 2 章と同じラットモデルを用いて、HFrD 1 週間摂取後の睡眠期および活動期に採取した血液について生化学的パラメーターを解析・比較した。

## 3.2 実験方法

### 3.2.1 実験動物、飼料および方法

本研究は 3R の原則を考慮し、科学上の利用のために動物を使用する事を動物実験と定義した、「動物の愛護および管理に関する法律」(1973 年 10 月 1 日 法律第 105 号)に従って実施された研究であり、日本たばこ産業株式会社 医薬総合研究所 横浜リサーチセンター 安全性研究所の動物管理委員会によって、全ての動物実験が承認された(実験番号 21075, 2021 年 12 月 7 日承認済み)。本研究は以下のプロトコールに従って実施された。

#### 【プロトコール】

第 2 章の研究では、6 週齢の雄性ラットを入手し、4 週間の摂食後、明期(睡眠期)に採取した血中 ALP アイソザイムの活性を含む肝毒性マーカーに焦点を当てて解析・評価を行った[122]。本研究の目的は、HFrD をラットに 1 週間摂取させた後、暗期(活動期)に採取した血液を用いてこれらのバイオマーカーを測定し、睡眠期と活動期の間に関内変動が認められるかを評価することにあるが、活動期の動物は非常に活発であり、その時期に初めて実験者に触れられると様々な生体内変動が起こることが報告されている[127]。これらの生体内変動を可能な限り減弱させるためには、活動期に毎日ハンドリングを行い、実

験者に慣らすことが重要である。この馴化に必要な期間は約 4 週間であるとも報告されている[127]。そこで、第 2 章の研究と同じ 6 週齢から実験を開始するため、授乳中のラットを入手した。簡単に説明すると、18 週齢の雌性母 Crl:CD (SD) ラット 4 匹に併せて 2 週齢の雄性仔 Crl:CD (SD) ラット 24 匹をジャクソン・ラボラトリー・ジャパン株式会社 (神奈川県, 日本) から購入した。入荷したラットは空調管理された動物飼育室 (温度  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ , 湿度  $55 \pm 5\%$ , 換気 10~20 回/時間, 点灯午前 7 時~午後 7 時) で、床敷 (アルファドライプラス, EP トレーディング株式会社, 東京都, 日本) を敷いたプラスチックケージ (W380 mm × D290 mm × H180 mm) に母ラット 1 匹に対し仔ラット 6 匹ずつ収容し、1 週間順化を行った。この期間中、母ラットには水および CCD を自由摂取させた。馴化 1 週間後、離乳した雄ラットを母ラットから引き離して、プラスチックケージ (W380 mm × D290 mm × H180 mm) に 2 匹 1 組で収容し、さらに CCD と水による馴化を 3 週間継続した。日々のハンドリングは、睡眠期群はツァイトゲバー時刻 (ZT) 2-4 の間、活動期群は ZT14-16 の間にそれぞれ実施した。ZT について簡単に説明すると、ZT0 は明期開始時の照明点灯時を表す。したがって、明期 (睡眠期) は ZT0 から ZT12 まで、暗期 (活動期) は ZT12 から ZT24 までを指す。マウスやラットを含む夜行性げっ歯類は赤色光 (650nm 以上) に対してほとんど感受性がない[128, 129]。したがって、活動期群のケージ交換等の日常的な作業は先行研究[123]に従い、赤色フィルムを貼った懐中電灯を光源として実施した。

4週間の順化後、ZT2-4あるいはZT14-16に毎日ハンドリングしていた6週齢の雄性ラット2群を、第2章の研究[122]に従い、さらに無作為に2群に分けた。第1群には順化期間に引き続いてCCDを与え、第2群の餌はHFrDに切り替えた。各飼料の詳細な組成は第2章の表2-1に示す。各群の動物には水と割り当てられた飼料を1週間自由摂取させた。なお、体重および摂餌量は毎日測定した。

1週間の摂取後、ZT2-4またはZT14-16に非絶食条件下で、イソフルラン麻酔（5%）下で開腹し、腹部大動脈から採血を行った。得られた血液はヘパリンリチウムコーティング採血管（BDバキュティナ採血管ヘパリンリチウムコーティング，日本ベクトン・ディッキンソン株式会社，東京都，日本）へ分注し，遠心分離まで氷冷した。血液は1,750×g，4°Cで30分間遠心分離して血漿を採取した。血漿は測定まで-80°Cの超低温冷凍庫で保存した。剖検は各ラットに行われた実験内容を知らされていない病理検査担当者が肉眼的病変の有無について，詳細に観察を行った。解剖時に採取した肝臓の重量を測定し，最終体重に対する相対重量を算出した。

### 3.2.2 血液生化学的検査

得られた血漿を用いて，AST，ALT，ALP，GLDHおよびLAP活性，GLU，T-CH，TGL，PLおよびTP濃度を，自動分析装置（TBA-120FR，キャノンメディカルシステム

ズ株式会社，栃木県，日本）で，各パラメーター個別の標準試薬を用いて 37°C で測定した。

### 3.2.3 血漿中 ALP アイソザイム活性測定

得られた血漿を用いて，L-ALP，I-ALP および B-ALP 活性を，全自動電気泳動装置（エパライザ 2，ヘレナ研究所，埼玉県，日本）で標準試薬を用いて測定した。B-ALP 活性の測定には畠山らの方法に従い[86]，室温下で血漿に B-ALP 分離剤であるノイラミニダーゼ（セパレーター，ヘレナ研究所）を添加して前処理を行った。

### 3.2.4 統計解析

データは平均値±標準偏差で示した。統計解析は JMP (SAS Institute Inc., ノースカロライナ州，アメリカ合衆国)を用いて行った。群間の統計学的有意差は二元配置分散分析 (ANOVA) に続いて，Tukey-kramer post-hoc test を行い判定した。結果は，誤差の可能性が 5%未満の場合に有意とみなした。

### 3.3 結果 および 考察

フルクトースの過剰摂取は NAFLD, 高脂血症および慢性炎症の発症因子であることが複数の研究グループにより報告されている[130, 131]。NAFLD は無自覚・無症状で進行することを考慮すると[132], フルクトースの日常的な過剰摂取を避けるだけでなく, その過剰摂取状態を適切に診断可能なバイオマーカーが必要となる。そこで第 2 章の研究では, HFrD を 4 週間摂取すると脂質の蓄積を伴う肝肥大が起こると共に, 血中の L-ALP 活性が摂取開始 2 週目から有意に上昇し, I-ALP 活性が摂取開始 1 週目から有意に低下したことから, 血中 ALP アイソザイム活性はフルクトースの過剰摂取による NAFLD 発症前の特異的バイオマーカーとなる可能性が示唆された[122]。しかし, 第 2 章の研究では, フルクトースの過剰摂取初期段階での肝障害と ALP アイソザイム活性を詳細に比較することは出来なかった。本研究では, さらに評価時期を考慮し, フルクトース過剰摂取 1 週間目の血中 ALP アイソザイム活性を含めた肝毒性マーカーの解析を行った。

HFrD 摂取 1 週間後のラットの体重および肝臓重量は, CD 群とほぼ同等であった (表 3-1)。



表 3-1 フルクトースの摂取が体重，摂餌量，肝臓重量および剖検に及ぼす影響

パラメーター	睡眠期		活動期	
	CD	HFrD	CD	HFrD
体重 (g)				
初期 (day 1)	326.2 ± 23.0	333.9 ± 3.0	331.6 ± 6.2	338.8 ± 7.9
終期 (day 7)	362.0 ± 22.6	360.4 ± 9.5	372.8 ± 31.7	369.0 ± 35.2
摂餌量 (g/day)	24.1 ± 2.8	24.3 ± 1.7	24.4 ± 1.1	24.3 ± 0.7
Day 6~7				
肝臓重量				
絶対重量 (g)	7.4 ± 0.9	7.6 ± 0.2	7.2 ± 0.9	7.4 ± 0.6
相対重量 (mg/100 g body weight)	2.0 ± 0.2	2.1 ± 0.1	1.9 ± 0.2	2.0 ± 0.2
剖検所見	—	—	—	—

雄性 SD ラットに通常食 (CCD) または高フルクトース食 (HFrD) を 1 週間自由摂取させた。1 週間の摂取後，ラットを睡眠期 (ZT2-4) 又は活動期 (ZT14-16) に非絶食，イソフルラン麻酔 (5%) 下で開腹し，放血致死させた後，肝臓を摘出して重量測定および剖検行った。肝臓重量は平均値 ± 標準偏差で示した (n=6)。相対重量は解剖直前に行われた体重測定の結果を元に算出した。剖検所見は以下のように表示した。 - : 変化なし。各群間で有意差は認められなかった。

Castro らは、フルクトースの摂取は肝組織における脂質生成能を活性化させるが、NAFLD の慢性モデルを誘導するためには、45 日以上の摂取が必要であると報告している [133]。実際に、フルクトース誘発性 NAFLD あるいは NASH モデルを用いた研究では、およそ 6~16 週間の摂餌期間が設定されている [134-136]。したがって、1 週間の HFrD 摂取で実施された本研究では、他の長期研究で認められている脂肪蓄積による肝肥大は生じなかったと考えられる。

緒論で述べた通り、多くの生命現象は体内時計によって調節されているため、日内のある時間帯では高い、あるいは低くなる様な変動を示す [123]。そのため、動物モデルを用いて生体现象を評価する場合、評価タイミングや投与タイミングが重要であることが広く認知されている [137-139]。本研究の解剖は、睡眠期群は睡眠期開始初期 (ZT2-4)、活動期群は活動期開始初期 (ZT14-16) のそれぞれ 2 つの時間帯に実施した。この 2 つのサンプリング時間帯では、それぞれの CD 群の体重と肝臓重量に明らかな差は見られなかった (表 3-1)。一方で、血漿中 TGL, T-CH および PL 濃度, ALT 活性は、睡眠期初期よりも活動期初期の CD 群で有意に低下していた (図 3-1)。また、血漿中 ALP 活性も CD 群で有意差は無いものの、活動期で有意に低下していた。これらの明らかな日内変動は、いくつかの先行研究で報告された結果と同様であり [126, 140]、本研究で使用したラットも同様に、2 つのサンプリング時間帯で明確な日内変動を示していた。

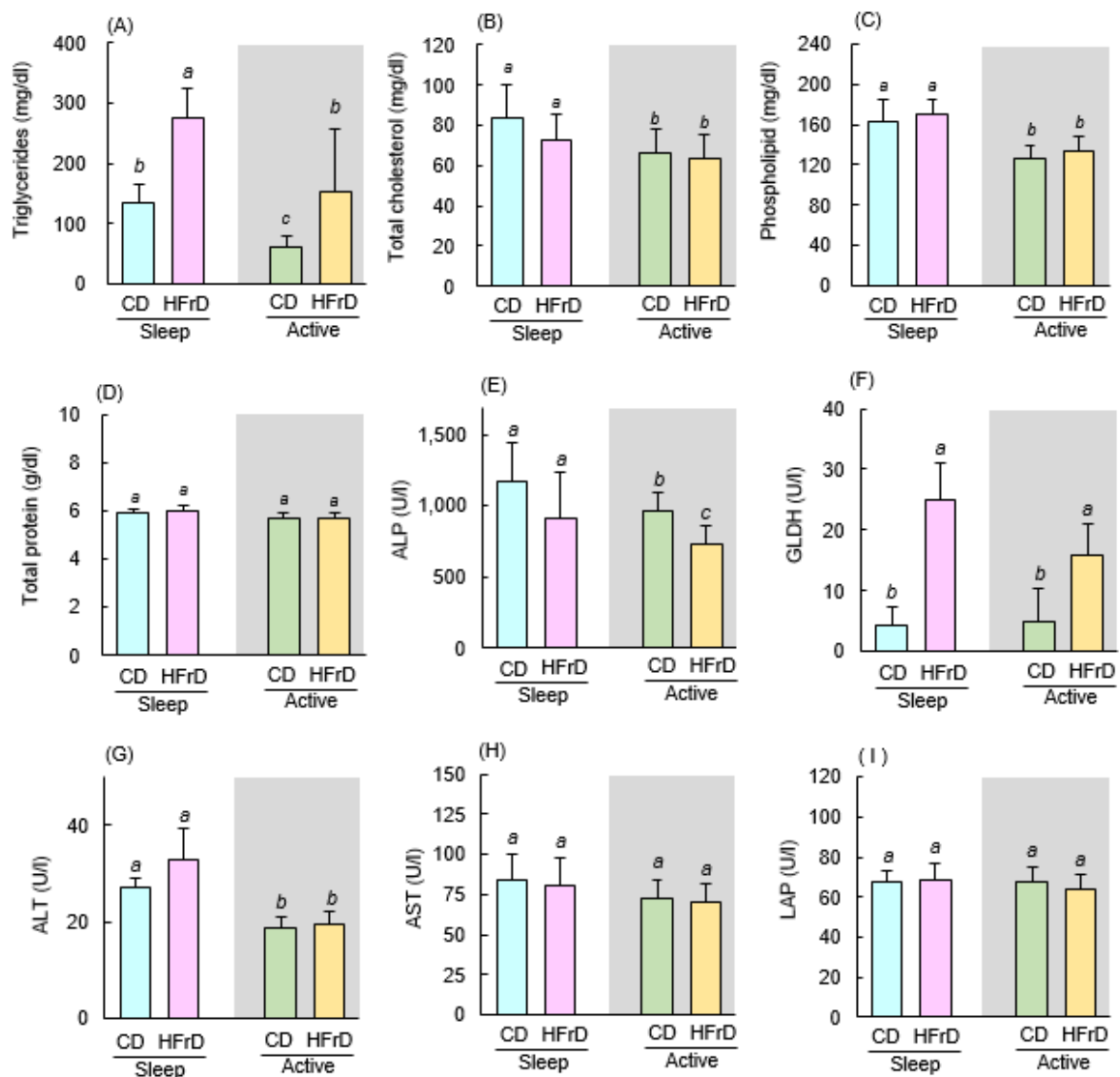


図 3-1. 血漿生化学パラメータレベルに対するフルクトース摂取の影響

雄性 SD ラットに通常食 (CCD) または高フルクトース食 (HFrD) を 1 週間自由摂取させた。1 週間の摂取後、ラットを睡眠期 (ZT2-4) 又は活動期 (ZT14-16) に非絶食、イソフルラン麻酔 (5%) 下で開腹し、腹部大動脈から採血した。(A) TGL; トリグリセリド, (B) T-CH; 総コレステロール, (C) PL; リン脂質, (D) TP; 総蛋白, (E) ALP; アルカリホスファターゼ, (F) GLDH; グルタミン酸脱水素酵素, (G) ALT; アラニンアミノトランスフェラーゼ, (H) AST; アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ, (I) LAP; ロイシンアミノペプチターゼ。異なるアルファベット間で有意差を示す ( $p < 0.05$ )。

興味深いことに、血漿中総 ALP 活性は活動期の初期に低くなる傾向があるが、血漿中 L-ALP 活性は活動期の初期に有意かつ劇的に低くなった（図 3-1E および図 3-2A）。一方で、血漿中 I-ALP 活性および B-ALP 活性については 2 つのサンプリング時間帯で明らかな差は見られなかった（図 3-2B, 3-2C）。これは、血漿中 L-ALP 活性（約 80 U/L）の血漿中総 ALP 活性に占める割合が、血漿中 I-ALP 活性（約 700 U/L）や血漿中 B-ALP 活性（約 350 U/L）に比較して低いことが起因している可能性がある。

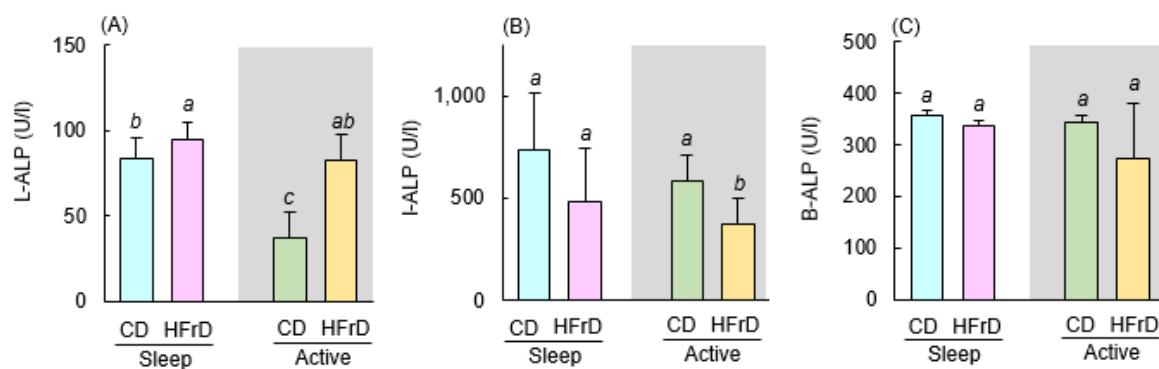


図 3-2. 血漿中アルカリホスファターゼアイソザイム活性に対するフルクトース摂取の影響

雄性 SD ラットに通常食 (CCD) または高フルクトース食 (HFrD) を 1 週間自由摂取させた。1 週間の摂取後、ラットを睡眠期 (ZT2-4) 又は活動期 (ZT14-16) に非絶食、イソフルラン麻酔 (5%) 下で開腹し、腹部大動脈から採血した。(A) L-ALP; 肝臓型アルカリホスファターゼアイソザイム, (B) I-ALP; 小腸型アルカリホスファターゼアイソザイム, (C) B-ALP; 骨型アルカリホスファターゼアイソザイム。異なるアルファベット間で有意差を示す ( $p < 0.05$ )。

本研究の結果から、血中 L-ALP 活性に明確な日内変動があることが初めて明らかとなったが、血中 ALP アイソザイムが日内変動を有していることをさらに明らかにするためには、1日のうち複数の時点、例えば2時間ごとに採血を行ってその活性を比較する必要がある。詳細な検討については今後の課題である。

今回解析を行った9つの血液生化学的パラメーターのうち、血漿中 TGL 濃度および血漿中 GLDH 活性は、HFrD 摂取1週間で上昇した(図 3-2A, 3-2F)。これらの変化については、活動期と睡眠期の間には明らかな差は見られなかったものの、同様の変化は第2章の研究における HFrD 摂取4週間後にも認められていることから[122]、血漿中 TGL 濃度および GLDH 活性の上昇は、NAFLD 発症前のフルクトース過剰摂取の初期変化と考えられる。血漿中 TGL 濃度に関しては、Castro らが報告したように[133]、フルクトースは高い脂質生成能を持つが、NAFLD を誘発するためには1週間以上の長期摂取を必要とするという知見と一致する。また、血漿中 GLDH 活性は血漿中 AST および ALT 活性よりも、肝障害に対する特異性の高いマーカーである事が知られており[141, 142]、本研究において、フルクトースの過剰摂取による肝肥大の発症よりも早い時点から、既に血中 GLDH 活性が上昇していたことが明らかになった。したがってこれらの結果から、血漿中 TGL 濃度および GLDH 活性は、フルクトース過剰摂取の初期状態を評価可能なバイオマーカーとして有用なパラメーターとなり得ることが示唆された。

HFrD の 1 週間摂取により、睡眠期および活動期のいずれも血漿中 L-ALP 活性が有意に上昇した。しかしその増加比率は、睡眠期の 12.7%に対し活動期で 124.3%と顕著な差が認められた (図 3-2A)。フルクトースの過剰摂取は腸内細菌叢の多様性を低下させ、腸管内の LPS 等のエンドトキシン濃度を上昇させる [99, 143]。産生されたエンドトキシンは腸管バリア機能を破壊することで膜透過性を高め [99, 143]、その結果エンドトキシンが門脈に漏出し、脂肪肝や炎症、肝細胞死を引き起こすと考えられている [144]。本研究で認められた血漿中 L-ALP 活性の上昇は、血中に流入したエンドトキシンを無毒化するために、肝臓での産生が増加した結果であると考えられる [107, 108, 145]。腸内細菌叢とその代謝産物は、脳の視床下部交叉上核にある主時計や末梢時計など、宿主のサーカディアンリズムの正常な代謝に反応する [146]。したがって、活動期には過剰なフルクトース摂取等の外的刺激に対する腸内細菌叢の感受性が高まっている可能性がある。また、自由摂食下でもラットは活動期の最初と最後に摂食し、睡眠期にはほとんど摂食しないというパターンを示す [147]。したがって、本研究で認められた、活動期の始まりに採取した血液中の L-ALP 活性の上昇率が、睡眠期の始まりのそれよりも大きかったという結果を、通常の生体現象の視点から捉えると、当然の変化と考えられる。血漿中 I-ALP 活性は睡眠期で減少傾向を示し、活動期で有意な減少を示した (図 3-2B)。フルクトースの過剰摂取は炎症性サイトカインであるインターロイキン-1 $\beta$  およびインターロイキン-6、免疫グロブリン G の腸内濃度の増加、腸管組織への炎症性細胞の浸潤を誘発させることが報告されている [109-

111]。活動期に認められた血漿中 I-ALP 活性の低下は、フルクトースの過剰摂取によって引き起こされた、これらの炎症性変化や腸内細菌が産生するエンドトキシンに対して、強力な抗炎症・解毒作用を有する I-ALP の小腸管腔内における消費が加速したことに由来する可能性が考えられたが[112-114, 148-150]、この変化の詳細なメカニズム解析にはさらなる研究が必要である。

## 総括

過去数十年以来、先進国のみならず開発途上国においても、生活の近代化と経済発展によって、人々の食生活は栄養バランスが取れた伝統的な家庭料理から、高カロリーな外食・加工食品依存へと急速に推移している。この食の過栄養化は肥満と言う形で国際的な健康問題を引き起こし、世界肥満連合の報告（2021年）によると、今後、有効な対策を施さなければ2025年までに世界の成人の5人に1人が肥満になると予測されている。肥満患者数の増加の重要な要因の一つとして、加工食品に添加される遊離糖類の増加が指摘されている。WHOが発表（2015年）した「成人および児童の糖類摂取量ガイドライン」においても、「総エネルギー摂取量に占める遊離糖類の割合を10%未満に抑えれば、過体重、肥満および虫歯のリスクを減らせる明確な証拠がある」と報告されている。故に、多くの研究グループによって、遊離糖類の生体へ及ぼす影響についての解明、予防的食品や食品成分の探索、遊離糖類の過剰摂取による生理的変動を捉えるバイオマーカーの探索研究が広く行われている。その中でサツマイモが持つ抗肥満、抗高血糖効果について複数の報告があるが、加熱調理されることでサツマイモの主要成分となるマルトースの過剰摂取が、ヒトの健康に与える影響についての報告は限られている。また、甘い清涼飲料水や加工食品に多用されるフルクトースの過剰摂取は、肝臓における脂肪酸の *de novo* 合成や TGL の蓄積を誘導し、その結果 NAFLD の発症に繋がることが知られているが、NAFLD 発症前のフルクトースの過剰摂取状態を適切に評価可能なバイオマーカーはこれまで報告



が無かった。本研究ではマルトースおよびフルクトースと言う二種類の遊離糖に焦点を当て、マルトースについては高脂肪食との併用摂取が過体重と関連パラメーターに与える影響を、フルクトースについてはその過剰摂取状態を NAFLD 発症前に診断可能なバイオマーカーについてそれぞれ評価・探索を行った。

第1章では、マルトースを毎日摂取すると、高脂肪食摂取下での過体重の発生と肥満度や血漿中 T-CH 濃度などの関連パラメーターが増悪することが初めて明らかになった。

第2章では、血漿中 GLDH, ALT および LAP 活性に加え、L-ALP, I-ALP 及び B-ALP を含む ALP アイソザイム活性の組み合わせ解析が、NAFLD ひいてはメタボリックシンドローム発症の初期段階における、フルクトースの過剰摂取状態による生理変化の検出に有用であることを初めて実証した。

第3章では、第2章で得られた結果をさらに精査することで、血漿中 ALP アイソザイム, GLDH 活性および TGL 濃度は、フルクトース過剰摂取初期のバイオマーカーとして有用であること、特に血漿中 L-ALP および I-ALP の活性は、生体の睡眠期よりも活動期において、フルクトースの過剰摂取状態をより高感度に検出可能であることを初めて明らかにした。

これらの研究結果から、食品中遊離糖類によって引き起こされる肥満を含む、メタボリックシンドロームの予防並びに治療戦略を構築する上で有用な知見が得られた。しかしながら、これらのより詳細な機序解明にはさらなる研究が必要である。

## 謝 辞

本論文は筆者が宮崎大学大学院農学工学総合研究科博士後期課程に在籍中の研究成果をまとめたものです。榊原啓之教授には主指導教員として、山崎正夫教授並びに仲西友紀准教授、菅本和寛准教授には副指導教員として本研究の実施の機会を与えて戴き、その遂行にあたって終始、ご指導をいただきました。ここに深謝の意を表します。河原聡教授には副査としてご助言を戴くとともに本論文の細部にわたりご指導をいただきました。ここに深謝の意を表します。最後に、宮崎大学栄養化学研究室並びに日本たばこ産業株式会社安全性研究所の各位には研究遂行にあたり日頃より有益なご討論ご助言をいただきました。ここに感謝の意を表します。

2023年 9月吉日

## 参考文献

- [1] L Paglia., “The sweet danger of added sugars.,” *Eur J Paediatr Dent.*, vol. 20 (2), p. 89, 2019. PMID: 31246081. DOI: 10.23804/ejpd.2019.20.02.01
- [2] Sebastian Stricker, Silvia Rudloff, Andreas Geier, Antje Steveling, Elke Roeb, Klaus-Peter Zimmer., “Fructose Consumption-Free Sugars and Their Health Effects.,” *Dtsch Arztebl Int.*, vol. 5;118 (5) pp. 71-78, 2021. PMID: 33785129. PMCID: PMC8188419. DOI: 10.3238/arztebl.m2021.0010
- [3] Paul L Huang., “A comprehensive definition for metabolic syndrome.,” *Dis Model Mech.*, vol. 2 (5-6), pp. 231-237. PMID: 19407331. PMCID: PMC2675814. DOI: 10.1242/dmm.001180
- [4] Mohammad G. Saklayen., “The Global Epidemic of the Metabolic Syndrome.,” *Curr Hypertens Rep.*, vol. 20 (2) p. 12, 2018. PMID, DOI: 10.1007/s11906-018-0812-z.
- [5] Filippa Juul, Georgeta Vaidean, and Niyati Parekh., “Ultra-processed Foods and Cardiovascular Diseases: Potential Mechanisms of Action.,” *Adv Nutr.*, vol. 12 (5), pp. 1673-1680, 2021. PMID, DOI: 10.1093/advances/nmab049
- [6] Kataria I, Chadha R and Pathak R., “Dietary and lifestyle modification in metabolic syndrome: A review of randomized control trials in different population groups.,” *Rev*

*Health Care.*, vol. 4(4), pp. 209–230, 2013. PMID DOI: 10.7175/rhc.v4i4.667

- [7] Gracia Fahed, Laurence Aoun, Morgan Bou Zerdan, Sabine Allam, Maroun Bou Zerdan, Youssef Bouferraa., “Hazem I Assi: Metabolic Syndrome: Updates on Pathophysiology and Management in 2021.,” *Int J Mol Sci.*, vol. 23(2), p.786, 2021. PMID: 35054972, PMCID: PMC8775991, DOI: 10.3390/ijms23020786
- [8] Wioletta Żukiewicz-Sobczak, Paula Wróblewska, Jacek Zwoliński, Jolanta Chmielewska-Badora, Piotr Adamczuk, Ewelina Krasowska, Jerzy Zagórski, Anna Oniszczyk, Jacek Piątek, Wojciech Silny., “Obesity and poverty paradox in developed countries.,” *Ann Agric Environ Med.*, vol. 21(3) pp. 590-594, 2014. PMID: 25292135. DOI: 10.5604/12321966.1120608
- [9] Anoop Misra, Lokesh Khurana., “Obesity and the metabolic syndrome in developing countries.,” *J Clin Endocrinol Metab.*, vol. 93(11 Suppl 1), S9-30, 2008. PMID: 18987276. DOI: 10.1210/jc.2008-1595
- [10] Saleh A Alqahtani, Jörn M Schattenberg., “NAFLD in the Elderly.,” *Clin Interv Aging.*, vol. 16, pp. 1633-1649, 2021
- [11] Daniel Jahn, Stefan Kircher, Heike M Hermanns., “Andreas Geier: Animal models of NAFLD from a hepatologist's point of view.,” *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.*, vol. 1865(5). pp. 943-953, 2018

- [12] Wong VW, Wong GL, Woo J, Abrigo JM, Chan CK, Shu SS, Leung JK, Chim AM, Kong AP, Lui GC, Chan HL and Chu WC., “Impact of the new definition of metabolic associated fatty liver disease on the epidemiology of the disease.,” *Clin Gastroenterol Hepatol.*, vol. 19(10), pp. 2161-2171.e5, 2021. PMID: 33137486. DOI: 10.1016/j.cgh.2020.10.046
- [13] Yki-Järvinen H., “Non-alcoholic fatty liver disease as a cause and a consequence of metabolic syndrome.,” *Lancet Diabetes Endocrinol.*, vol. 2(11), pp. 901-910, 2014. PMID: 24731669. DOI: 10.1016/S2213-8587(14)70032-4
- [14] Zobair M Younossi, Aaron B Koenig, Dinan Abdelatif, Yousef Fazel, Linda Henry, Mark Wymer., “Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes.,” *Hepatology.*, vol. 64(1), pp. 73-84, 2016. PMID: 26707365. DOI: 10.1002/hep.28431
- [15] Lorenzo A Orci, Marco Sanduzzi-Zamparelli, Berta Caballol, Victor Sapena, Nicola Colucci, Ferran Torres, Jordi Bruix, María Reig, Christian Toso., “Incidence of Hepatocellular Carcinoma in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Systematic Review, Meta-analysis, and Meta-regression.,” *Clin Gastroenterol Hepatol.*, vol. 20(2), pp. 283-292, 2021. PMID: 33965578. DOI: 10.1016/j.cgh.2021.05.002
- [16] Scott L Friedman, Brent A Neuschwander-Tetri, Mary Rinella, Arun J Sanyal.,

“Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies.,” *Nat Med.*, vol. 24 (7), pp. 908-922, 2018. PMID: 29967350. PMCID: PMC6553468. DOI: 10.1038/s41591-018-0104-9

[17] Brent A Neuschwander-Tetri., “Hepatic lipotoxicity and the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis: the central role of nontriglyceride fatty acid metabolites.,” *Hepatology.*, vol. 52 (2), pp. 774-788, 2010. PMID: 20683968. DOI: 10.1002/hep.23719

[18] Kenneth Cusi., “Role of obesity and lipotoxicity in the development of nonalcoholic steatohepatitis: pathophysiology and clinical implications.,” *Gastroenterology.*, vol. 142 (4), pp. 711-725, e6, 2012. PMID: 22326434. DOI: 10.1053/j.gastro.2012.02.003

[19] Jérôme Boursier, Olaf Mueller, Matthieu Barret, Mariana Machado, Lionel Fizanne, Felix Araujo-Perez, Cynthia D Guy, Patrick C Seed, John F Rawls, Lawrence A David, Gilles Hunault, Frédéric Oberti, Paul Calès, Anna Mae Diehl., “The severity of nonalcoholic fatty liver disease is associated with gut dysbiosis and shift in the metabolic function of the gut microbiota.,” *Hepatology.*, vol. 63 (3), pp. 764-75, 2016. PMID: 26600078. PMCID: PMC4975935. DOI: 10.1002/hep.28356

[20] Petra Hirsova, Samar H Ibrabim, Gregory J Gores, Harmeet Malhi., “Lipotoxic lethal and sublethal stress signaling in hepatocytes: relevance to NASH pathogenesis.,” *J Lipid Res.*, vol. 57 (10), pp. 1758-1770, 2016. PMID: 27049024. PMCID: PMC5036373. DOI:

10.1194/jlr.R066357

- [21] Manoela Mota, Bubu A Banini, Sophie C Cazanave, Arun J Sanyal., “Molecular mechanisms of lipotoxicity and glucotoxicity in nonalcoholic fatty liver disease.,” *Metabolism.*, vol. 65 (8), pp. 1049-1061, 2016. PMID: 26997538. PMCID: PMC4931958. DOI: 10.1016/j.metabol.2016.02.014
- [22] Chris Estes, Quentin M Anstee, Maria Teresa Arias-Loste, Heike Bantel, Stefano Bellentani, Joan Caballeria, Massimo Colombo, Antonio Craxi, Javier Crespo, Christopher P Day, Yuichiro Eguchi, Andreas Geier, Loreta A Kondili, Daniela C Kroy, Jeffrey V Lazarus, Rohit Loomba, Michael P Manns, Giulio Marchesini, Atsushi Nakajima, Francesco Negro, Salvatore Petta, Vlad Ratziu, Manuel Romero-Gomez, Arun Sanyal, Jörn M Schattenberg, Frank Tacke, Junko Tanaka, Christian Trautwein, Lai Wei, Stefan Zeuzem, Homie Razavi., “Modeling NAFLD disease burden in China, France, Germany, Italy, Japan, Spain, United Kingdom, and United States for the period 2016-2030.,” *J Hepatol.*, vol. 69 (4). pp. 896-904, 2018. PMID: 29886156. DOI: 10.1016/j.jhep.2018.05.036
- [23] Frank Tacke, Ralf Weiskirchen., “Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)/non-alcoholic steatohepatitis (NASH)-related liver fibrosis: mechanisms, treatment and prevention.,” *Ann Transl Med.*, vol. 9 (8), p. 729, 2021. PMID: 33987427. PMCID:



PMC8106094. DOI: 10.21037/atm-20-4354

- [24] Nanhai Zhang, Fang Kong, Xiaoxuan Jing, Jingxuan Zhou, Liang Zhao, Mohamed Mohamed Soliman, Liebing Zhang, Feng Zhou., “Hongqu Rice Wines Ameliorate High-Fat/High-Fructose Diet-Induced Metabolic Syndrome in Rats.,” *Alcohol Alcohol*, vol. 57(6), pp. 776-787, 2022. PMID: 35922962. DOI: 10.1093/alcalc/agac033
- [25] Honghui Guo, Wenhua Ling, Qing Wang, Chi Liu, Yan Hu, Min Xia, Xiang Feng, Xiaodong Xia., “Effect of anthocyanin-rich extract from black rice (*Oryza sativa* L. indica) on hyperlipidemia and insulin resistance in fructose-fed rats.,” *Plant Foods Hum Nutr.*, vol. 62(1), pp. 1-6, 2007. PMID: 17187297. DOI: 10.1007/s11130-006-0031-7
- [26] Jie Chen, Yiqin Huang, Hua Xie, Huijing Bai, Guangwu Lin, Ying Dong, Dongmei Shi, Jiaofeng Wang, Qichen Zhang, Yuting Zhang, Jianqin Sun., “Impact of a low-carbohydrate and high-fiber diet on nonalcoholic fatty liver disease.,” *Asia Pac J Clin Nutr.*, vol. 29(3), pp. 483-490, 2020. PMID: 32990607. DOI: 10.6133/apjcn.202009\_29(3).0006
- [27] Alejandra Pérez-Montes de Oca, María Teresa Julián, Analía Ramos, Manel Puig-Domingo, Nuria Alonso., “Microbiota, Fiber, and NAFLD: Is There Any Connection?.,” *Nutrients.*, vol. 12(10), p. 3100, 2020. PMID: 33053631. PMCID: PMC7600472. DOI: 10.3390/nu12103100
- [28] Dominika Maciejewska-Markiewicz, Arleta Drozd, Joanna Palma, Karina Ryterska, Viktoria

Hawryłkiewicz, Patrycja Załęska, Ewa Wunsh, Katarzyna Kozłowska-Petriczko, Ewa Stachowska., “Fatty Acids and Eicosanoids Change during High-Fiber Diet in NAFLD Patients-Randomized Control Trials (RCT).,” *Nutrients.*, vol. 14 (20), p. 4310, 2022. PMID: 36296994. PMCID: PMC9608825. DOI: 10.3390/nu14204310

[29] Arindam Sain, Dipshikha Khamrai, Thirukumaran Kandasamy, Debdut Naskar., “Targeting protein tyrosine phosphatase 1B in obesity-associated colon cancer: Possible role of sweet potato (*Ipomoea batatas*).,” *Proteins.*, vol. 90 (6), pp. 1346-1362, 2022

[30] Young-Mee Chung, Joo Hyun Lee, Deuk Youl Kim, Se-Hee Hwang, Young-Ho Hong, Seong-Bo Kim, Song Jin Lee, Chi Hye Park., “Dietary D-psicose reduced visceral fat mass in high-fat diet-induced obese rats.,” *J Food Sci.*, vol. 77 (2), pp. 53-58, 2012. PMID: 22339545. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2011.02571.x

[31] Misato Niibo, Akane Kanasaki, Tetsuo Iida, Keisuke Ohnishi, Taro Ozaki, Kazuya Akimitsu, Tetsuo Minamino., “d-allulose protects against diabetic nephropathy progression in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats with type 2 diabetes.,” *PLoS One.*, vol. 17 (1), p. e0263300, 2022. PMID: 35100325. PMCID: PMC8803202. DOI: 10.1371/journal.pone.0263300

[32] Michele Pier Luca Guarino, Annamaria Altomare, Sara Emerenziani, Claudia Di Rosa, Mentore Ribolsi, Paola Balestrieri, Paola Iovino, Giulia Rocchi, Michele Cicala.,

- “Mechanisms of Action of Prebiotics and Their Effects on Gastro-Intestinal Disorders in Adults.,” *Nutrients.*, vol. 12(4), p. 1037, 2020. PMID: 32283802. PMCID: PMC7231265. DOI: 10.3390/nu12041037
- [33] E Weser, M H Sleisenger., “Metabolism of circulating disaccharides in man and the rat.,” *J Clin Invest.*, vol. 46(4), pp. 499-505, 1967. PMID: 6021203. PMCID: PMC442034. DOI: 10.1172/JCI105552
- [34] Katrin Viigand, Triinu Visnapuu, Karin Mardo, Anneli Aasamets, Tiina Alamäe., “Maltase protein of *Ogataea (Hansenula) polymorpha* is a counterpart to the resurrected ancestor protein ancMALS of yeast maltases and isomaltases.,” *Yeast.*, vol. 33(8), pp. 415-432, 2016. PMID: 26919272. PMCID: PMC5074314. DOI: 10.1002/yea.3157
- [35] Mandy M Lam, Timothy P O'Connor, Jared Diamond., “Loads, capacities and safety factors of maltase and the glucose transporter SGLT1 in mouse intestinal brush border.,” *J Physiol.*, vol. 542(Pt 2), pp. 493-500, 2002. PMID: 12122147. PMCID: PMC2290422. DOI: 10.1113/jphysiol.2002.023275
- [36] Kays S J., “SWEETPOTATO PRODUCTION WORLDWIDE: ASSESSMENT, TRENDS AND THE FUTURE.,” *Acta Hortic.*, vol. 670, pp. 19-25, 2005. DOI: 10.17660/ActaHortic.2005.670.2
- [37] Ruth Naomi, Hasnah Bahari, Muhammad Dain Yazid, Fezah Othman, Zainul

Amiruddin Zakaria, Mohd Khairi Hussain., “Potential Effects of Sweet Potato ( Ipomoea batatas) in Hyperglycemia and Dyslipidemia-A Systematic Review in Diabetic Retinopathy Context.,” *Int J Mol Sci.*, vol. 6;22 (19), p. 10816. PMID: 34639164. PMCID: PMC8509747. DOI: 10.3390/ijms221910816

[38] Chun-Kuang Shih, Chiao-Ming Chen, Tun-Jen Hsiao, Ching-Wen Liu, Sing-Chung Li., “White Sweet Potato as Meal Replacement for Overweight White-Collar Workers: A Randomized Controlled Trial.,” *Nutrients.*, vol. 11(1), p. 165, 2019. PMID: 30646532. PMCID: PMC6356856. DOI: 10.3390/nu11010165

[39] Chun-Kuang Shih, Chiao-Ming Chen, Viola Varga, Liang-Chen Shih, Peng-Ru Chen, Shu-Fang Lo, Lie-Fen Shyur, Sing-Chung Li., “White sweet potato ameliorates hyperglycemia and regenerates pancreatic islets in diabetic mice.,” *Food Nutr Res.*, vol. 64, 2020. PMID: 32425738. PMCID: PMC7217293. DOI: 10.29219/fnr.v64.3609

[40] Amaka Odenigbo, Jamshid Rahimi, Michael Ngadi, Somaia Amer, Arif Mustafa., “Starch digestibility and predicted glycemic index of fried sweet potato cultivars.,” *Funct Foods Health Dis.*, vol.2, (7), pp. 280-289, 2012. DOI: 10.31989/ffhd.v2i7.83

[41] Perceval S Bahado-Singh, Cliff K Riley, Andrew O Wheatley, Henry I C Lowe., “Relationship between Processing Method and the Glycemic Indices of Ten Sweet Potato (Ipomoea batatas) Cultivars Commonly Consumed in Jamaica.,” *J Nutr Metab.*,

vol. 2011, p. 584832, 2011. PMID: 22132322. PMCID: PMC3205609. DOI: 10.1155/2011/584832

[42] Chin-Feng Chan, Chih-Ming Chiang Yung-Chang Lai, Che-Lun Huang, Shu-Chen Kao, Wayne C Liao., "Changes in sugar composition during baking and their effects on sensory attributes of baked sweet potatoes.," *J Food Sci Technol.*, vol. 51 (12), pp. 4072-4077, 2014. PMID: 25477683. PMCID: PMC4252450. DOI: 10.1007/s13197-012-0900-z

[43]Ministry of Education C, Ssports, Science and Technology Japan STANDARD TABLES OF FOOD COMPOSITION IN JAPAN -2015-(Seventh Revised Version).  
[https://www.mext.go.jp/en/policy/science\\_technology/policy/title01/detail01/1374030.htm](https://www.mext.go.jp/en/policy/science_technology/policy/title01/detail01/1374030.htm)

[44] G M Gray., "Starch digestion and absorption in nonruminants.," *J Nutr.*, vol. 122 (1), pp. 172-177, 1992. PMID: 1729468. DOI: 10.1093/jn/122.1.172

[45] H Luo, T Imoto, Y Hiji., "Inhibitory effect of voglibose and gymnemic acid on maltose absorption in vivo.," *World J Gastroenterol.*, vol. 7(2), pp. 270-274, 2001. PMID: 11819773. PMCID: PMC4723535. DOI: 10.3748/wjg.v7.i2.270

[46] G I Sandle, R W Loble, R Holmes., "Maltose hydrolysis and absorption in the human jejunum.," *Digestion.*, vol. 24(3), pp. 137-145, 1982. PMID: 7141132. DOI:

10.1159/000198789

- [47] P G Reeves, F H Nielsen, G C Fahey Jr., “AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet.,” *J Nutr.*, vol. 123 (11), pp. 1939-1951, 1993. PMID: 8229312. DOI: 10.1093/jn/123.11.1939
- [48] Hiroki Matsuzaka, Hiroki Matsuyama, Wataru Tanaka, Hayato Tajiri, Hiroyuki Sakakibara., “Selective Consumption of Fish Oil at End of the Day Increases the Physiological Fatty Acid Compositions of Eicosapentaenoic Acid and Docosahexaenoic Acid in Mice.,” *Molecules.*, vol. 27 (4), p. 1271, 2022. PMID: 35209062. PMCID: PMC8874613. DOI: 10.3390/molecules27041271
- [49] Daigo Yokoyama, Wataru Tanaka, Yushi Hashizume, Mahamadou Tandia, Masanobu Sakono, Kayoko Shimoi, Hiroyuki Sakakibara., “Daily consumption of monoglucosyl-rutin prevents high-fat diet-induced obesity by suppressing gastric inhibitory polypeptide secretion in mice.,” *Funct Foods Health.*, vol. 8, pp. 353–371, 2018. DOI: 10.31989/ffhd.v8i7.527
- [50] Daniele BachAna Cláudia BedinLuiz Gustavo LacerdaAlessandro NogueiraIvo Mottin Demiate., “Sweet Potato (*Ipomoea batatas* L.): a Versatile Raw Material for the Food Industry.,” *Food/Feed Science and Technology.*, vol. 64, 2021,

<https://doi.org/10.1590/1678-4324-2021200568>

- [51] Regiane Ogliari, Jaqueline Machado Soares, Flávia Teixeira, Kélin Schwarz, Kátia Aparecida da Silva, Dalton Luiz Schiessel, Daiana Novello., "Chemical, nutritional and sensory characterization of sweet potato submitted to different cooling methods.," *Int J Res Granthaalayah.*, vol. 8, pp. 147-156, 2020. DOI: <https://doi.org/10.29121/granthaalayah.v8.i10.2020.1881>
- [52] Dyah Triasih, Fitri Dwi Utami., "The effect of different processing techniques in sweet potato (*Ipomoea batatas*) of content nutrition.," E3S Web Conference 2020, 142:01007. DOI: <https://www.doi.org/10.1051/e3sconf/202014201007>
- [53] Iona Lozano Remmelt Van der Werf, William Bietiger, Elodie Seyfritz, Claude Peronet, Michel Pinget, Nathalie Jeandidier, Elisa Maillard, Eric Marchioni, Séverine Sigrist, Stéphanie Dal., "High-fructose and high-fat diet-induced disorders in rats: impact on diabetes risk, hepatic and vascular complications.," *Nutr Metab (Lond)*, vol. 13, p.15, 2016. PMID: 26918024. PMCID: PMC4766713. DOI: 10.1186/s12986-016-0074-1
- [54] Alvin Man Lung Chan, Angela Min Hwei Ng, Mohd Heikal Mohd Yunus, Ruszymah Bt Hj Idrus, Jia Xian Law, Muhammad Dain Yazid, Kok-Yong Chin, Sharen Aini Shamsuddin, Yogeswaran Lokanathan., "Recent Developments in Rodent Models of

High-Fructose Diet-Induced Metabolic Syndrome: A Systematic Review.," *Nutrients.*, vol. 13 (8), p.2497, 2021

- [55] Sok Kuan Wong Kok-Yong Chin, Farihah Hj Suhaimi, Ahmad Fairus, Soelaiman Ima-Nirwana., "Animal models of metabolic syndrome: a review.," *Nutr Metab (Lond)*, vol. 13, p.65, 2016. PMID: 27708685. PMCID: PMC5050917. DOI: 10.1186/s12986-016-0123-9
- [56] Silvia Moreno-Fernández, Marta Garcés-Rimón, Gema Vera, Julien Astier, Jean François Landrier, Marta Miguel., "High Fat/High Glucose Diet Induces Metabolic Syndrome in an Experimental Rat Model.," *Nutrients.*, vol. 10 (10), p.1502, 2018. PMID: 30322196. PMCID: PMC6213024. DOI: 10.3390/nu10101502
- [57] Zhang Zhuhua, Wang Zhiquan, Yang Zhen, Niu Yixin, Zhang Weiwei, Li Xiaoyong, Liu Yueming, Zhang Hongmei, Qin Li, Su Qing., "A novel mice model of metabolic syndrome: the high-fat-high-fructose diet-fed ICR mice.," *Exp Anim.*, vol. 64(4), pp. 435-442, 2015. PMID: 26134356. PMCID: PMC4637381. DOI: 10.1538/expanim.14-0086
- [58] Suhail Rasool, Thangiah Geetha, Tom L Broderick, Jeganathan R Babu., "High Fat With High Sucrose Diet Leads to Obesity and Induces Myodegeneration.," *Front Physiol.*, vol. 9, p.1054, 2018. PMID: 30258366. PMCID: PMC6143817. DOI:



10.3389/fphys.2018.01054

- [59] R S Surwit, M N Feinglos, J Rodin, A Sutherland, A E Petro, E C Opara, C M Kuhn, M Rebuffé-Scrive., “Differential effects of fat and sucrose on the development of obesity and diabetes in C57BL/6J and A/J mice.,” *Metabolism.*, vol. 44 (5), pp.645-651. PMID: 7752914. DOI: 10.1016/0026-0495(95)90123-x
- [60] Fabrice Tranchida, Léopold Tchiakpe, Zo Rakotoniaina, Valérie Deyris, Olivier Ravion, Abel Hiol., “Long-term high fructose and saturated fat diet affects plasma fatty acid profile in rats.,” *J Zhejiang Univ Sci B.*, vol. 13(4), pp.307-317, 2012. PMID: 22467372. PMCID: PMC3323775. DOI: 10.1631/jzus.B1100090
- [61] Rafat A Siddiqui, Zhidong Xu, Kevin A Harvey, Thomas M Pavlina, Michael J Becker, Gary P Zaloga., “Comparative study of the modulation of fructose/sucrose-induced hepatic steatosis by mixed lipid formulations varying in unsaturated fatty acid content.,” *Nutr Metab (Lond).*, vol. 12, p.41, 2015. PMID: 26583036. PMCID: PMC4650347. DOI: 10.1186/s12986-015-0038-x
- [62] Satomi Nishikawa, Kunio Doi, Hiroyuki Nakayama, Koji Uetsuka., “The effect of fasting on hepatic lipid accumulation and transcriptional regulation of lipid metabolism differs between C57BL/6J and BALB/cA mice fed a high-fat diet.,” *Toxicol Pathol.*, vol. 36(6), pp. 850-857, 2008. PMID: 18812581. DOI: 10.1177/0192623308323920

- [63] Kataria I, Chadha R and Pathak R., “Dietary and lifestyle modification in metabolic syndrome A review of randomized control trials in different population groups.,” *Rev Health Care.*, vol. 4 (4), pp. 209-230, 2013. DOI: 10.7175/rhc.v4i4.667
- [64] Grundy SM., “Overnutrition, ectopic lipid and the metabolic syndrome.,” *J Investig Med.*, vol. 64 (6), pp. 1082-1086, 2016. PMID: 27194746. DOI: 10.1136/jim-2016-000155
- [65] Strober JW and Brady MJ., “Dietary fructose consumption and triple-negative breast cancer incidence.,” *Front Endocrinol (Lausanne).*, vol. 10, p. 367, 2019. PMID: 31244777. DOI:10.3389/fendo.2019.00367
- [66] Marriott BP, Cole N and Lee E., “National estimates of dietary fructose intake increased from 1977 to 2004 in the United States.,” *J Nutr.*, vol. 139 (6) pp. 1228S-1235S, 2009. PMID: 19403716. DOI: 10.3945/jn.108.098277
- [67] Bray GA, Nielsen SJ and Popkin BM., “Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity.,” *Am J Clin Nutr.*, vol. 79 (4), pp. 537-543, 2004. PMID: 15051594. DOI: 10.1093/ajcn/79.4.537
- [68] Johnson RJ, Sánchez-Lozada LG, Andrews P and Lanaspa MA: Perspective., “A historical and scientific perspective of sugar and its relation with obesity and diabetes.,” *Adv Nutr.*, vol. 8 (3), pp. 412-422, 2017. PMID: 28507007. DOI: 10.3945/an.116.014654

- [69] White JS., “Straight talk about high-fructose corn syrup: what it is and what it ain’t.,”  
*Am J Clin Nutr.*, vol. 88(6), pp. 1716S-1721S, 2008. PMID: 19064536. DOI:  
10.3945/ajcn.2008.25825B
- [70] Sobel LL and Dalby E., “Sugar or high fructose corn syrup-what should nurses teach  
patients and families?.,” *Worldviews Evid Based Nurs.*, vol. 11(2), pp. 126-132, 2014.  
PMID: 24612636. DOI:10.1111/wvn.12027
- [71] Kösel E, Kızıltan G, Türker PF, Saka M, Ok MA, Bacanlı D, Aydos TR, Bayraktar N and  
Özdemir H., “The effects of glucose and fructose on body weight and some biochemical  
parameters in rats.,” *Prog Nutr.*, vol. 20, pp. 46-51, 2018. DOI: 10.23751/pn.v20i1.5956
- [72] Softic S, Gupta MK, Wang GX, Fujisaka S, O’Neill BT, Rao TN, Willoughby J,  
Harbison C, Fitzgerald K, Ilkayeva O, Newgard CB, Cohen DE and Kahn CR.,  
“Divergent effects of glucose and fructose on hepatic lipogenesis and insulin signaling.,”  
*J Clin Invest.*, vol. 127(11), pp. 4059-4074, 2017. PMID: 28972537. DOI:  
10.1172/JCI94585
- [73] Baena M, Sangüesa G, Dávalos A, Latasa MJ, Sala-Vila A, Sánchez RM, Roglans N,  
Laguna JC and Alegret M., “Fructose, but not glucose, impairs insulin signaling in the  
three major insulin-sensitive tissues.,” *Sci Rep.*, vol.6, p. 26149, 2016. PMID: 27194405.  
DOI: 10.1038/srep26149

- [74] Yin M, Matsuoka R, Xi Y and Wang X, "Comparison of egg yolk and soybean phospholipids on hepatic fatty acid profile and liver protection in rats fed a high-fructose diet.," *Foods*, vol. 10 (7): p. 1569, 2021. PMID: 34359438. DOI: 10.3390/foods10071569
- [75] Zhao Y, Tang Y, Liu S, Jia T, Zhou D and Xu H., "Foodborne TiO<sub>2</sub> nanoparticles induced more severe hepatotoxicity in fructose-induced metabolic syndrome mice via exacerbating oxidative stress-mediated intestinal barrier damage.," *Foods*, vol. 10 (5), p. 986, 2021. PMID: 33946424. DOI: 10.3390/foods10050986
- [76] Nakagawa T, Hu H, Zharikov S, Tuttle KR, Short RA, Glushakova O, Ouyang X, Feig DI, Block ER, Herrera-Acosta J, Patel JM and Johnson RJ., "A causal role for uric acid in fructose-induced metabolic syndrome.," *Am J Physiol Renal Physiol*, vol. 290 (3), pp. F625-F631, 2006. PMID: 16234313. DOI: 10.1152/ajprenal.00140.2005
- [77] Mukonowenzou NC, Dangarembizi R, Chivandi E, Nkomozezi P and Erlwanger KH., "Administration of ursolic acid to new-born pups prevents dietary fructose-induced non-alcoholic fatty liver disease in Sprague Dawley rats.," *J Dev Orig Health Dis*, vol. 12 (1): 101-112, 2021. PMID: 32188531. DOI: 10.1017/S2040174420000124
- [78] Hannou SA, Haslam DE, McKeown NM and Herman MA., "Fructose metabolism and metabolic disease.," *J Clin Invest*, vol. 128 (2): 545-555, 2018. PMID: 29388924. DOI: 10.1172/JCI96702

- [79] Patel C, Sugimoto K, Douard V, Shah A, Inui H, Yamanouchi T and Ferraris RP., “Effect of dietary fructose on portal and systemic serum fructose levels in rats and in KHK<sup>-/-</sup> and GLUT5<sup>-/-</sup> mice.,” *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.*, vol. 309 (9), pp. G779-G790, 2015. PMID: 26316589. DOI: 10.1152/ajpgi.00188.2015
- [80] Francey C, Cros J, Rosset R, Crézé C, Rey V, Stefanoni N, Schneiter P, Tappy L and Seyssel K., “The extra-splanchnic fructose escape after ingestion of a fructose-glucose drink: An exploratory study in healthy humans using a dual fructose isotope method.,” *Clin Nutr., ESPEN* 29, pp. 125-132, 2019. PMID: 30661675. DOI: 10.1016/j.clnesp.2018.11.008
- [81] Kovačević S, Nestorov J, Matić G and Elaković I., “Fructose-enriched diet induces inflammation and reduces antioxidative defense in visceral adipose tissue of young female rats.,” *Eur J Nutr.*, vol. 56 (1), pp. 151-160, 2017. PMID: 26433940. DOI: 10.1007/s00394-015-1065-0
- [82] Tappy L., “Fructose-containing caloric sweeteners as a cause of obesity and metabolic disorders.,” *J Exp Biol.*, 221(Pt Suppl 1): jeb164202, 2018. PMID: 29514881. DOI: 10.1242/jeb.164202
- [83] Wong VW, Wong GL, Woo J, Abrigo JM, Chan CK, Shu SS, Leung JK, Chim AM, Kong AP, Lui GC, Chan HL and Chu WC., “Impact of the new definition of metabolic associated fatty liver disease on the epidemiology of the disease.,” *Clin Gastroenterol*

*Hepatol.*, vol. 19(10) pp. 2161-2171.e5, 2021. PMID: 33137486. DOI: 10.1016/j.cgh.2020.10.046

[84] Yki-Järvinen H., “Non-alcoholic fatty liver disease as a cause and a consequence of metabolic syndrome.,” *Lancet Diabetes Endocrinol.*, vol. 2(11): pp. 901-910, 2014. PMID: 24731669. DOI: 10.1016/S2213-8587(14)70032-4

[85] Hatayama K, Ichikawa Y, Nishihara Y, Goto K, Nakamura D, Wakita A and Kobayashi J., “erum alkaline phosphatase isoenzymes in SD rats detected by polyacrylamide-gel disk electrophoresis.,” *Toxicol Mech Methods.*, vol. 22(4) pp. 289-295, 2012. PMID: 22500783. DOI: 10.3109/15376516.2011.654005

[86] Eckel RH, Alberti KG, Grundy SM and Zimmet PZ., “The metabolic syndrome.,” *Lancet.*, vol. 375(9710), pp. 181-183, 2010. PMID: 20109902. DOI: 10.1016/S0140-6736(09)61794-3

[87] Tashiro Y, Han Q, Tan Y, Sugisawa N, Yamamoto J, Nishino H, Inubushi S, Sun YU, Lim H, Aoki T, Murakami M, Takahashi Y, Bouvet M and Hoffman RM., “Oral recombinant methioninase prevents nonalcoholic fatty liver disease in mice on a high fat diet.,” *In Vivo.*, vol. 34(3), pp. 979-984, 2020. PMID: 32354883. DOI: 10.21873/invivo.11866

[88] Lim HJ, Lim TJ, Lee JH, Lee JH, Kim MO, Park JY, Kim JT, Kim MJ, Jang SH and

Choi SH., "Anti-obesity effects of dark tea extracts by down-regulation of C/EBP  $\alpha$  and PPAR  $\gamma$ .,” *In Vivo.*, vil. 36(4): 1753-1760, 2022. PMID: 35738599. DOI: 10.21873/invivo.12888

[89] Jensen T, Abdelmalek MF, Sullivan S, Nadeau KJ, Green M, Roncal C, Nakagawa T, Kuwabara M, Sato Y, Kang DH, Tolan DR, Sanchez-Lozada LG, Rosen HR, Lanasp MA, Diehl AM and Johnson RJ., "Fructose and sugar: A major mediator of non-alcoholic fatty liver disease.,” *JHepatol.*, vol. 68(5), pp. 1063-1075, 2018. PMID: 29408694. DOI: 10.1016/j.jhep.2018.01.019

[90] Kucera O and Cervinkova Z., "Experimental models of non-alcoholic fatty liver disease in rats.,” *World J Gastroenterol.*, vol 20(26), pp. 8364-8376, 2014. PMID: 25024595. DOI: 10.3748/wjg.v20.i26.8364

[91] Lim JS, Mietus-Snyder M, Valente A, Schwarz JM and Lustig RH., "The role of fructose in the pathogenesis of NAFLD and the metabolic syndrome.,” *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.*, vol 7(5), pp. 251-264, 2010. PMID: 20368739. DOI: 10.1038/nrgastro.2010.41

[92] Singh S, Sharma A, Ahmad S, Guru B, Gulzar F, Kumar P, Ahmad I and Tamrakar AK., "Convergence of Fructose-Induced NLRP3 Activation with Oxidative Stress and ER Stress Leading to Hepatic Steatosis.,” *Inflammation*, 2022. PMID: 35941320. DOI:

10.1007/s10753-022-01727-9

- [93] Kaoru Toyoda, Yusuke Suzuki, Kyotaka Muta, Taku Masuyama, Kochi Kakimoto, Akio Kobayashi, Toshiyuki Shoda, Shoichiro Sugai., “High fructose diet feeding accelerates diabetic nephropathy in Spontaneously Diabetic Torii (SDT) rats.,” *J Toxicol Sci.*, vol. 3(1), pp. 45-58, 2018. PMID: 29415951. DOI: 10.2131/jts.43.45
- [94] Hyuk-Cheol Kwon, Hyejin Sohn, Do-Hyun Kim, Chang-Hee Jeong, Dong-Wook Kim, Sung-Gu Han., “Effects of Flutriafol Fungicide on the Lipid Accumulation in Human Liver Cells and Rat Liver.,” *Foods.*, vol. 10 (6):1346, 2021. PMID: 34200939. PMCID: PMC8230498. DOI: 10.3390/foods10061346
- [95] Hui Yu, Xiangzhou Yi, Xia Gao, Jun Ji, Zhongyuan Liu, Guanghua Xia, Chuan Li, Xueying Zhang, Xuanri Shen., “Tilapia-Head Chondroitin Sulfate Protects against Nonalcoholic Fatty Liver Disease via Modulating the Gut-Liver Axis in High-Fat-Diet-Fed C57BL/6 Mice.,” *Foods.*, vol. 11 (7), p. 922, 2022. PMID: 35407014. PMCID: PMC8997817. DOI: 10.3390/foods11070922
- [96] Reyhan Nergiz-Unal, Elif Ulug, Betul Kisioglu, Funda Tamer, Mahmut Bodur, Hacer Yalcimin, Armagan Aytug Yuruk., “Hepatic cholesterol synthesis and lipoprotein levels impaired by dietary fructose and saturated fatty acids in mice: Insight on PCSK9 and CD36.,” *Nutrition.*, Nov-Dec, pp. 79-80:110954, 2020. PMID: 32862122. DOI:



10.1016/j.nut.2020.110954

[97] Jamie Bates, Archana Vijayakumar, Sarani Ghoshal, Bruno Marchand, Saili Yi, Dmytro Korneyev, Anna Zagorska, David Hollenback, Katie Walker, Kathy Liu, Swetha Pendem, David Newstrom, Robert Brockett, Igor Mikaelian, Saritha Kusam, Ricardo Ramirez, David Lopez, Li Li, Bryan C Fuchs, David G Breckenridge., "Acetyl-CoA carboxylase inhibition disrupts metabolic reprogramming during hepatic stellate cell activation.," *J Hepatol.*, vol. 73(4), pp. 896-905, 2020. PMID: 32376414. DOI: 10.1016/j.jhep.2020.04.037

[98] Fabio Marra, Gianluca Svegliati-Baroni., " Lipotoxicity and the gut-liver axis in NASH pathogenesis.," *J Hepatol.*, vol. 68(2), pp. 280-295. PMID: 29154964. DOI: 10.1016/j.jhep.2017.11.014

[99] Yong Wang, Wentao Qi, Ge Song, Shaojie Pang, Zhenzhen Peng, Yong Li, Panli Wang., "High-Fructose Diet Increases Inflammatory Cytokines and Alters Gut Microbiota Composition in Rats.," *Mediators Inflamm.*, 2020:6672636, 2020. PMID: 33312070. PMCID: PMC7721508. DOI: 10.1155/2020/6672636

[100] Lindsey Kennedy, Heather Francis, Gianfranco Alpini., "Fructose Promotion of Intestinal and Liver Injury: A Sugar by Any Other Name That Isn't So Sweet.," *Hepatology.*, vol. 73(6), pp. 2092-2094, 2021. PMID: 31273795. PMCID:

PMC9276207. DOI: 10.1002/hep.30843

[101] Herbert Tilg, Alexander R Moschen., “Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis.,” *Hepatology.*, vol. 52 (5), pp. 1836-1846, 2010. PMID: 21038418. DOI: 10.1002/hep.24001

[102] Khalidur Rahman, Chirayu Desai, Smita S Iyer, Natalie E Thorn, Pradeep Kumar, Yunshan Liu, Tekla Smith, Andrew S Neish, Hongliang Li, Shiyun Tan, Pengbo Wu, Xiaoxiong Liu, Yuanjie Yu, Alton B Farris, Asma Nusrat, Charles A Parkos, Frank A Anania., “Loss of Junctional Adhesion Molecule A Promotes Severe Steatohepatitis in Mice on a Diet High in Saturated Fat, Fructose, and Cholesterol.,” *Gastroenterology.*, vol. 151 (4), pp. 733-746.e12, 2016. PMID: 27342212. PMCID: PMC5037035. DOI: 10.1053/j.gastro.2016.06.022

[103] Young-Eun Cho, Do-Kyun Kim, Wonhyo Seo, Bin Gao, Seong-Ho Yoo, Byoung-Joon Song., “Fructose Promotes Leaky Gut, Endotoxemia, and Liver Fibrosis Through Ethanol-Inducible Cytochrome P450-2E1-Mediated Oxidative and Nitrate Stress.,” *Hepatology.*, vol. 73 (6), pp. 2180-2195, 2021. PMID: 30959577. PMCID: PMC6783321. DOI: 10.1002/hep.30652

[104] Adriana Rosas-Villegas, Mónica Sánchez-Tapia, Azalia Avila-Nava, Victoria Ramírez, Armando R Tovar, Nimbe Torres., “Differential Effect of Sucrose and Fructose in

Combination with a High Fat Diet on Intestinal Microbiota and Kidney Oxidative Stress.," *Nutrients.*, vol. 9 (4), p. 393, 2017

[105] Cholsoon Jang, Sheng Hui, Wenyun Lu, Alexis J Cowan, Raphael J Morscher, Gina Lee, Wei Liu, Gregory J Tesz, Morris J Birnbaum, Joshua D Rabinowitz., " The Small Intestine Converts Dietary Fructose into Glucose and Organic Acids.," *Cell Metab.*, vol. 27 (2), pp. 351-361.e3. PMID: 29414685. PMCID: PMC6032988. DOI: 10.1016/j.cmet.2017.12.016

[106] Adrienne F Pike, Nynke I Kramer, Bas J Blaauboer, Willem Seinen, Ruud Brands., " A novel hypothesis for an alkaline phosphatase 'rescue' mechanism in the hepatic acute phase immune response.," *Biochim Biophys Acta.*, vol. 1832 (12), pp. 2044-2056, 2013. PMID: 23899605. DOI: 10.1016/j.bbadis.2013.07.016

[107] Jesse A Davidson, Tracy Urban, Suhong Tong, Mark Twite, Alan Woodruff, Paul E Wischmeyer, Jelena Klawitter., " Alkaline Phosphatase, Soluble Extracellular Adenine Nucleotides, and Adenosine Production after Infant Cardiopulmonary Bypass.," *PLoS One.*, 11 (7), e0158981, 2016. PMID: 27384524. PMCID: PMC4934870. DOI: 10.1371/journal.pone.0158981

[108] Haoming Wu, Yang Wang, Qianqian Yao, Linlin Fan, Lu Meng, Nan Zheng, Huiying Li, Jiaqi Wang., " Alkaline phosphatase attenuates LPS-induced liver injury by regulating

- the miR-146a-related inflammatory pathway.,” *Int Immunopharmacol.*, vol. 101(Pt A):108149. PMID: 34634739. DOI: 10.1016/j.intimp.2021.108149
- [109] Rong Tan, Huiwei Dong, Zhengshan Chen, Min Jin, Jing Yin, Haibei Li, Danyang Shi, Yifan Shao, Huaran Wang, Tianjiao Chen, Dong Yang, Junwen Li., “Intestinal Microbiota Mediates High-Fructose and High-Fat Diets to Induce Chronic Intestinal Inflammation.,” *Front Cell Infect Microbiol.*, vol. 16;11:654074, 2021. PMID: 34222037. PMCID: PMC8242949. DOI: 10.3389/fcimb.2021.654074
- [110] Jiayu Yu, Tianlong Liu, Zihao Gao, Runbang Liu, Zixu Wang, Yaoxing Chen, Jing Cao, Yulan Dong., “*Akkermansia muciniphila* Colonization Alleviating High Fructose and Restraint Stress-Induced Jejunal Mucosal Barrier Disruption.,” *Nutrients.*, vol. 14(15), p. 3164, 2022. PMID: 35956340. PMCID: PMC9370786. DOI: 10.3390/nu14153164
- [111] Sunhee Jung, Hosung Bae, Won-Suk Song, and Cholsoon Jang., “Dietary Fructose and Fructose-Induced Pathologies.,” *Annu Rev Nutr.*, vol. pp. 42, pp. 45-66, 2022. PMID: 35995049. PMCID: PMC9904196. DOI: 10.1146/annurev-nutr-062220-025831
- [112] Makoto Matsushita, Sanae Harajiri, Shiori Tabata, Nobuyasu Yukimasa, Yoshimi Muramoto, Tsugikazu Komoda., “[Alkaline phosphatase activity in blood group B or O secretors is fluctuated by the dinner intake of previous night].,” *Rinsho Byori.*, vol. 61 (4),

pp. 307-312, 2013. PMID: 23855186

[113] G P Young, S Friedman, S T Yedlin, D H Allers: Effect of fat feeding on intestinal alkaline phosphatase activity in tissue and serum., “*Am J Physiol.*,” vol. 241 (6), G461-468, 1981. PMID: 7325238. DOI: 10.1152/ajpgi.1981.241.6.G461

[114] Štefan Mozeš, Zuzana Šefčíková, Ľubomír Raček., “Effect of repeated fasting/refeeding on obesity development and health complications in rats arising from reduced nest.,” *Dis Sci.*, vol. 60(2), pp. 354-361, 2015. PMID: 25150705. DOI: 10.1007/s10620-014-3340-y

[115] Dongfeng Zhao, Junsheng Wang, Yining Liu, Xinwei Liu., “Expressions and clinical significance of serum bone Gla-protein, bone alkaline phosphatase and C-terminal telopeptide of type I collagen in bone metabolism of patients with osteoporosis.,” *Pak J Med Sci.*, vol. 31 (1), pp. 91-94, 2015. PMID: 25878621. PMCID: PMC4386164. DOI: 10.12669/pjms.311.6143

[116] Wan'an Xiao, Zhenyu Hu, Tianwei Li, Jianjun Li., “Bone fracture healing is delayed in splenectomic rats.,” *Life Sci.*, vol. 173, pp. 55-61, 2017. PMID: 27956350. DOI: 10.1016/j.lfs.2016.12.005

[117] Sifat Maria, Paula A Witt-Enderby., “Melatonin effects on bone: potential use for the prevention and treatment for osteopenia, osteoporosis, and periodontal disease and for

use in bone-grafting procedures.," *J Pineal Res.*, vol. 56 (2), pp. 115-125, 2014. PMID: 24372640. DOI: 10.1111/jpi.12116

[118] P Shao, M Ohtsuka-Isoya, H Shinoda., "Circadian rhythms in serum bone markers and their relation to the effect of etidronate in rats.," *Chronobiol Int.*, vol. 20 (2), pp. 325-336, 2003. PMID: 12723888. DOI: 10.1081/cbi-120019343

[119] Barry M Popkin, Simon Barquera, Camila Corvalan, Karen J Hofman, Carlos Monteiro, Shu Wen Ng, Elizabeth C Swart, Lindsey Smith Taillie., "Towards unified and impactful policies to reduce ultra-processed food consumption and promote healthier eating.," *Lancet Diabetes Endocrinol.*, vol. 9 (7), pp. 462-470, 2021. PMID: 33865500. PMCID: PMC8217149. DOI: 10.1016/S2213-8587(21)00078-4

[120] Qin Shao, Khew-Voon Chin., "Survey of American food trends and the growing obesity epidemic.," *Nutr Res Pract.*, vol. 5 (3), pp. 253-259, 2011. PMID: 21779530. PMCID: PMC3133759. DOI: 10.4162/nrp.2011.5.3.253

[121] Walter Willett, Johan Rockström, Brent Loken, Marco Springmann, Tim Lang, Sonja Vermeulen, Tara Garnett, David Tilman, Fabrice DeClerck, Amanda Wood, Malin Jonell, Michael Clark, Line J Gordon, Jessica Fanzo, Corinna Hawkes, Rami Zurayk , Juan A Rivera, Wim De Vries, Lindiwe Majele Sibanda, Ashkan Afshin, Abhishek Chaudhary, Mario Herrero, Rina Agustina, Francesco Branca, Anna Lartey, Shenggen Fan, Beatrice

Crona, Elizabeth Fox, Victoria Bignet, Max Troell, Therese Lindahl, Sudhvir Singh, Sarah E Cornell, K Srinath Reddy, Sunita Narain, Sania Nishtar, Christopher J L Murray., "Food in the Anthropocene: the EAT-Lancet Commission on healthy diets from sustainable food systems.," *Lancet.*, vol. 393(10170), pp. 447-492, 2019. PMID: 30660336. DOI: 10.1016/S0140-6736(18)31788-4

[122] Yusuke Suzuki, Kazuma Kondo, Kaoru Toyoda, Yuki Tanaka, Akio Kobayashi, Daigo Yokoyama, Hiroyuki Sakakibara., "Novel Biomarker Establishment for Evaluation of Excessive Fructose Consumption Using a Rat Model.," *In Vivo.*, vol. 37(1), pp. 173-181, 2023. PMID: 36593010. PMCID: PMC9843779. DOI: 10.21873/invivo.13066

[123] Takashi Tsurusaki, Hiroyuki Sakakibara, Yoshiki Aoshima, Shunsuke Yamazaki, Masanobu Sakono, Kayoko Shimoi., "Diurnal rhythmicity in biological processes involved in bioavailability of functional food factors.," *J Clin Biochem Nutr.*, vol. 52(3), pp. 208-214, 2013. PMID: 23704810. PMCID: PMC3651920. DOI: 10.3164/jcbn.12-127

[124] Chiaki Nohara, Daigo Yokoyama, Wataru Tanaka, Tetsuya Sogon, Masanobu Sakono, Hiroyuki Sakakibara., "Daily Consumption of Bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) Extracts Increases the Absorption Rate of Anthocyanins in Rats.," *Agric Food Chem.*, vol. 66(30), pp. 7958-7964, 2018. PMID: 29969899. DOI: 10.1021/acs.jafc.8b02404

- [125] Keiichi Itoh, Shoji Masumori, Daisuke Mukai, Hiroyuki Sakakibara, Michiko Yasuda, Kayoko Shimoi., “Dosage time affects alkylating agents induced micronuclei in mouse peripheral blood reticulocytes through the function of erythropoietin.,” *J Toxicol Sci.*, vol. 44 (4), pp. 273-282, 2019. PMID: 30944280. DOI: 10.2131/jts.44.273
- [126] S Minematsu, M Watanabe, N Tsuchiya, M Watanabe, S Amagaya., “Diurnal variations in blood chemical items in Sprague-Dawley rats.,” *Exp Anim.*, vol. 44 (3), pp. 223-232, 1995. PMID: 7556424. DOI: 10.1538/expanim.44.223
- [127] Hiroyuki Sakakibara, Akiharu Koyanagi, Taka-aki Suzuki, Atsumi Suzuki, Lin Ling, Kayoko Shimoi., “Effects of animal care procedures on plasma corticosterone levels in group-housed mice during the nocturnal active phase.,” *Exp Anim.*, vol. 59 (5), pp. 637-642, 2010. PMID: 21030792. DOI: 10.1538/expanim.59.637
- [128] Bevil R Conway., “Color vision: mice see hue too.,” *Curr Biol.*, vol. 17 (12), R457-60, 2007. PMID: 17580074. DOI: 10.1016/j.cub.2007.04.017
- [129] Gerald H Jacobs, Gary A Williams, Hugh Cahill, Jeremy Nathans., “Emergence of novel color vision in mice engineered to express a human cone photopigment.,” *Science.*, vol. 315 (5819):1723-5, 2007. PMID: 17379811. DOI: 10.1126/science.1138838
- [130] Siyu Yu, Chunlin Li, Guang Ji, Li Zhang., “The Contribution of Dietary Fructose to Non-alcoholic Fatty Liver Disease.,” *Front Pharmacol.*, vol. 12, 783393, 2021. PMID:



34867414. PMID: PMC8637741. DOI: 10.3389/fphar.2021.783393

[131] Pablo Muriel, Pedro López-Sánchez, Erika Ramos-Tovar., “Fructose and the Liver.,”

*Int J Mol Sci.*, vol. 22 (13), 6969, 2021. PMID: 34203484. PMID: PMC8267750. DOI: 10.3390/ijms22136969

[132] Pegah Golabi, Vasily Isakov, Zobair M Younossi., “Nonalcoholic Fatty Liver Disease:

Disease Burden and Disease Awareness.,” *Clin Liver Dis.*, vol. 27(2), pp. 173-186, 2023. PMID: 37024201. DOI: 10.1016/j.cld.2023.01.001

[133] Gabriela S F Castro, João F R Cardoso, Helio Vannucchi, Sérgio Zucoloto, Alceu

Afonso Jordão., “Fructose and NAFLD: metabolic implications and models of induction in rats.,” *Acta Cir Bras.*, vol. 26 Suppl 2, pp. 45-50, 2011. PMID: 22030814. DOI: 10.1590/s0102-86502011000800009

[134] S S Loza-Medrano, L A Baiza-Gutman, L Manuel-Apolinar, R García-Macedo, L

Damasio-Santana, O A Martínez-Mar, M C Sánchez-Becerra, M Cruz-López, M A Ibáñez-Hernández, M Díaz-Flores., “High fructose-containing drinking water-induced steatohepatitis in rats is prevented by the nicotinamide-mediated modulation of redox homeostasis and NADPH-producing enzymes.,” *Mol Biol Rep.*, vol. 47 (1), pp. 337-351, 2020. PMID: 31650383. DOI: 10.1007/s11033-019-05136-4

[135] Claudia Isabel García-Berumen, Manuel Alejandro Vargas-Vargas, Omar Ortiz-Avila,

Rosa María Piña-Zentella, Minerva Ramos-Gómez, María Del Consuelo Figueroa-García, Ricardo Mejía-Zepeda, Alain Raimundo Rodríguez-Orozco, Alfredo Saavedra-Molina, Christian Cortés-Rojo., “Front Pharmacol., vol. 13:1089130, 2022. PMID: 36601051. PMCID: PMC9807168. DOI: 10.3389/fphar.2022.1089130

[136] Sirinat Pengnet, Phinsuda Sumarithum, Nuttaphong Phongnu, Sakdina Prommaouan, Napapas Kantip, Ittipon Phoungpetchara, Wachirawadee Malakul., “Naringin attenuates fructose-induced NAFLD progression in rats through reducing endogenous triglyceride synthesis and activating the Nrf2/HO-1 pathway.,” *Front Pharmacol.*, vol. 13:1049818, 2022. PMID: 36588703. PMCID: PMC9797507. DOI: 10.3389/fphar.2022.1049818

[137] Yasemin Kubra Akyel, Dilek Ozturk Civelek, Narin Ozturk Seyhan, Seref Gul, Isil Gazioglu, Zeliha Pala Kara, Francis Lévi, Ibrahim Halil Kavakli, Alper Okyar., “Diurnal Changes in Capecitabine Clock-Controlled Metabolism Enzymes Are Responsible for Its Pharmacokinetics in Male Mice.,” *J Biol Rhythms.*, vol. 38 (2), pp. 171-184, 2023. PMID: 36762608. PMCID: PMC10037547. DOI: 10.1177/07487304221148779

[138] Hiroki Yoshioka, Sarah Tominaga, Yasuro Shinohara, Gi-Wook Hwang, Tohru Maeda, Nobuhiko Miura., “Chronotoxicity of Streptomycin-Induced Renal Injury in Mice. Biol Pharm Bull., vol. 43(1), pp. 53-58, 2020. PMID: 31902932. DOI:

10.1248/bpb.b19-00539

- [139] Nobuhiko Miura, Hiroki Yoshioka, Atsushige Ashimori, Katsumi Ohtani, Tatsuya Hasegawa, Gi-Wook Hwang, Masayuki Ikeda, Tsunemasa Nonogaki., “Multidirectional analyses of hepatic chronotoxicity induced by cadmium in mice.,” *J Toxicol Sci.*, vol. 42(5), pp. 597-604, 2017. PMID: 28904295. DOI: 10.2131/jts.42.597
- [140] Kazuhiko Tsutsumi, Yasuhide Inoue, Yasunori Kondo., “The relationship between lipoprotein lipase activity and respiratory quotient of rats in circadian rhythms.,” *Biol Pharm Bull.*, vol. 25(10), pp. 1360-1363, 2002. PMID: 12392095. DOI: 10.1248/bpb.25.1360
- [141] Rachel J Church, Shelli J Schomaker, J Scott Eaddy, Germaine G Boucher, John M Kreeger, Jiri Aubrecht, Paul B Watkins., “Glutamate dehydrogenase as a biomarker for mitotoxicity; insights from furosemide hepatotoxicity in the mouse.,” *PLoS One.*, vol. 15(10):e0240562, 2020. PMID: 33035276. PMCID: PMC7546462. DOI: 10.1371/journal.pone.0240562
- [142] Akio Kobayashi, Yusuke Suzuki, Shoichiro Sugai., “Specificity of transaminase activities in the prediction of drug-induced hepatotoxicity.,” *J Toxicol Sci.*, vol. 45(9), pp. 515-537, 2020. PMID: 32879252. DOI: 10.2131/jts.45.515
- [143] Isabela Macedo Lopes Vasques-Monteiro, Flávia Maria Silva-Veiga, Carolline Santos

- Miranda, Édira Castello Branco de Andrade Gonçalves, Julio Beltrame Daleprane, Vanessa Souza-Mello., “A rise in Proteobacteria is an indicator of gut-liver axis-mediated nonalcoholic fatty liver disease in high-fructose-fed adult mice.,” *Nutr Res.*, vol. 91, pp. 26-35, 2021. PMID: 34130208. DOI: 10.1016/j.nutres.2021.04.008
- [144] Moon Ho Do, Eunjung Lee, Mi-Jin Oh, Yoonsook Kim, Ho-Young Park., “High-Glucose or -Fructose Diet Cause Changes of the Gut Microbiota and Metabolic Disorders in Mice without Body Weight Change.,” *Nutrients.*, vol. 10(6):761, 2018. PMID: 29899272. PMCID: PMC6024874. DOI: 10.3390/nu10060761
- [145] Haoming Wu, Yang Wang, Qianqian Yao, Linlin Fan, Lu Meng, Nan Zheng, Huiying Li, Jiaqi Wang., “Alkaline phosphatase attenuates LPS-induced liver injury by regulating the miR-146a-related inflammatory pathway.,” *Int Immunopharmacol.*, vol. 101(Pt A):108149, 2021. PMID: 34634739. DOI: 10.1016/j.intimp.2021.108149
- [146] Hongyu Wang, He Zhang, Yong Su., “New Insights into the Diurnal Rhythmicity of Gut Microbiota and Its Crosstalk with Host Circadian Rhythm.,” *Animals (Basel).*, vol. 12(13), p. 1677, 2022.
- [147] Daigo Yokoyama, Hiroyuki Sakakibara, Hajime Fukuno, Keisuke Kimura, Amane Hori, Takayuki Nara, Ken Kato, Masanobu Sakono., “Whey Protein-hydrolyzed Peptides Diminish Hepatic Lipid Levels in Rats Consuming High-sucrose Diets.,” *Food Science and Technology*

*Research.*, vol. 22 (5) pp. 631-638, 2016. <https://doi.org/10.3136/fstr.22.631>

- [148] Kanakaraju Kaliannan, Sulaiman R Hamarneh, Konstantinos P Economopoulos, Sayeda Nasrin Alam, Omeed Moaven, Palak Patel, Nondita S Malo, Madhury Ray, Seyed M Abtahi, Nur Muhammad, Atri Raychowdhury, Abeba Teshager, Mussa M Rafat Mohamed, Angela K Moss, Rizwan Ahmed, Shahrad Hakimian, Sonoko Narisawa, José Luis Millán, Elizabeth Hohmann, H Shaw Warren, Atul K Bhan, Madhu S Malo, Richard A Hodin., “Intestinal alkaline phosphatase prevents metabolic syndrome in mice.,” *Proc Natl Acad Sci USA.*, vol. 110 (17), pp. 7003-7008, 2013. PMID: 23569246. PMCID: PMC3637741. DOI: 10.1073/pnas.1220180110
- [149] Madhu S Malo., “A High Level of Intestinal Alkaline Phosphatase Is Protective Against Type 2 Diabetes Mellitus Irrespective of Obesity.,” *EBioMedicine.*, vol. 2(12), pp. 2016-2023, 2015. PMID: 26844282. PMCID: PMC4703762. DOI: 10.1016/j.ebiom.2015.11.027
- [150] Jan Bilski, Agnieszka Mazur-Bialy, Dagmara Wojcik, Janina Zahradnik-Bilska, Bartosz Brzozowski, Marcin Magierowski, Tomasz Mach, Katarzyna Magierowska, Tomasz Brzozowski., “The Role of Intestinal Alkaline Phosphatase in Inflammatory Disorders of Gastrointestinal Tract.,” *Mediators Inflamm.*, 2017:9074601, 2017. PMID: 28316376. PMCID: PMC5339520. DOI: 10.1155/2017/9074601