

ラクトースによる脂質・糖質・ミネラル代謝改善効果の検討

日本女子大学 家政学部 食物学科 栄養学研究室 五関 正江

要 約

【目的】牛乳・乳製品に含まれるラクトース (乳糖) は、カルシウム吸収促進や骨代謝改善効果が報告されてきたが、そのメカニズムについては未だ不明な点が多い。われわれは先行研究において、高脂肪食にラクトースを添加して長期間 (85 日間) 飼育することにより、ラクトースによる骨密度増加やカルシウム吸収促進作用だけでなく、抗肥満作用、血清トリグリセリドならびに血糖値低下作用、さらに血中活性型ビタミンD濃度低下作用などを明らかにした。そこで、今回、ラクトースによる脂質・糖質・ミネラル代謝に対する影響について、さらに詳細に検討するため、ラクトース短期投与実験系を用いて、腸管や腎臓に存在する脂質代謝あるいはミネラル代謝に関わっている可能性が示されている小腸型アルカリホスファターゼ (ALP) 遺伝子発現レベルの比較検討を中心に、ラクトース投与による作用メカニズムを明らかにすることを目的とした。

【方法】6 週齢の SD 系雌ラット 69 匹をコントロール (Cont) 群、ラクトース投与 (Lac) 群、高脂肪食 (Fat) 群、および高脂肪食に Lac を添加した (Fat+Lac) 群の計 4 群に分け、実験食投与後 7 日目、14 日目に採血し組織のサンプリングを行った。小腸、肝臓、腎臓の ALP 活性測定や臓器非特異型 ALP (TNSALP)・小腸型 ALP 遺伝子 (IAP-1, IAP-2) に特異的なプライマーを用いた Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) 分析、7 日目と 13 日目に 24 時間尿および糞を採取し、カルシウム量を測定した。

【結果】実験食投与 14 日目において、腎臓の ALP 比活性が Lac 群で Cont 群に比べ、有意に上昇し ($p < 0.01$)、Fat+Lac 群においても、Fat 群に比べ、有意な高値を示した ($p < 0.05$)。RT-PCR 分析によるラクトース投与の ALP 遺伝子発現への影響は、TNSALP の PCR 産物では 4 群間で特に差は認められなかったが、小腸型 ALP (IAP-1) で Lac 群と Fat+Lac 群の両群で Cont 群に比べ、mRNA の顕著な発現増強が認められた。また、尿中カルシウム排泄量において、7 日目および 13 日目ともに Lac 群が Cont 群に比べ、有意に高値を示した ($p < 0.05$)。

【結論】腎臓は、カルシウム・リンなどのミネラル排泄の調節だけでなく、ビタミンDの活性化、血圧調節など生体内における重要な臓器であり、生活習慣病発症とも関わりが深く、今回、ラクトース短期投与により腎臓中の ALP 活性が上昇し、ALP の mRNA の発現が増強されたことは驚くべき結果であった。今後、さらに腎臓における ALP 活性誘導機序を明らかにすることにより、ラクトース投与による脂質代謝、糖質代謝、ミネラル代謝などへの作用メカニズムの解明につながる可能性が期待された。

キーワード：ラクトース、アルカリホスファターゼ、カルシウム、脂質、小腸、腎臓

背景および研究目的

牛乳・乳製品が骨粗鬆症の予防に有用であることが従来から示され、さらに抗肥満効果も備えている可能性が示唆されている。牛乳・乳製品の主要成分の一つであるラクトース（乳糖）についても、カルシウム吸収促進作用との関連で骨代謝改善効果が報告されているがそのメカニズムについては不明な点が多い。また、ラクトースの抗肥満効果についてはこれまでほとんど注目されていなかった。肥満はそれ自体が動脈硬化性疾患の危険因子になることはもちろん、糖尿病や高血圧が併発する場合はさらに合併症のリスクを高める。現在、肥満はメタボリックシンドロームの中核的な病態として捉えられている。現代の日本人の食生活は、欧米化が進み、脂肪からのエネルギー摂取比率が増加傾向にある。これらの点から、高脂肪食下でのラクトースの抗肥満作用を詳しく検討することは、生活習慣病予防における新しい役割を牛乳乳製品に求めうるか否かを検証することになる。牛乳・乳製品による抗肥満効果の可能性が示唆されているが、そのメカニズムに関する科学的根拠となる報告は少なかった。そこで、我々は動物を用いて、ラクトースによる抗肥満・脂質代謝改善効果について解析し、世界で初めて明らかにすることができた⁽¹⁾。すなわち、ラットを用いた *in vivo* 系の実験において、高脂肪食摂取時の体重増加がラクトース添加によって有意に低値を示し、血糖値についても有意に低値となることを示した⁽¹⁾。以前、我々はラクトースの効果を遺伝子レベルで検討した先行研究で、ラットへのラクトース投与による、小腸アルカリホスファターゼ (ALP) 活性の増加および mRNA 発現の増強を確認した⁽²⁾。また、小腸 ALP 遺伝子ノックアウトマウスを用いた実験から小腸 ALP が脂質代謝に関わっている可能性が示されており⁽³⁾、ラクトースによる小腸 ALP 活性増強とその遺伝子発現増加効果は脂質代謝に大いに関わっている可能性が考えられる。

これまでのラクトースに関する報告は、カルシウム吸収促進効果および骨代謝改善効果が中心であった⁽⁴⁾。我々も先行研究において腰椎骨密度が、通常食および高脂肪食下にてラクトース添加によって有意に増加していたこと、尿中カルシウム排泄量が増加したことを明らかにした⁽¹⁾。これらのことからラクトースが何らかのメカニズムを介してカルシウム代謝に影響を与えていることが予想された。また、近年カルシウム摂取による脂質代謝改善効果を示唆する報告⁽⁷⁾もあるが、未だ詳細は不明である。

これらのことを踏まえて、今回の研究では、ラクトースによる脂質・糖質・ミネラル代謝に対する影響について遺伝子レベルで検討を行った。

実験方法

① 飼育条件

実験動物には6週齢のSD系雌ラット69匹を用いた。7日間の予備飼育の後、AIN-93M⁽⁸⁾を与えるコントロール (Cont) 群、飼料重量の10%をラクトースに置換したラクトース投与 (Lac) 群、ラードを用いて脂肪からのエネルギー比40%に調整した高脂肪食 (Fat) 群、さらに脂肪エネルギー

ギー比 40 % に調整した上にラクトース 10 % に置き換えたラクトース + 高脂肪食 (Fat+Lac) 群の 4 群に分けて飼育した (Fig. 1)。飼料はすべてカルシウム 0.5 %、リン 0.3 % に調整した。

動物は、室温 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 5\%$ 、12 時間ごとの明暗サイクル (明期 7:00 a. m. ~ 7:00 p. m.) の環境下で飼育し、飼料および脱イオン水・蒸留水を自由摂取させた。実験食開始後 7 日目、14 日目にサンプリングを行った。

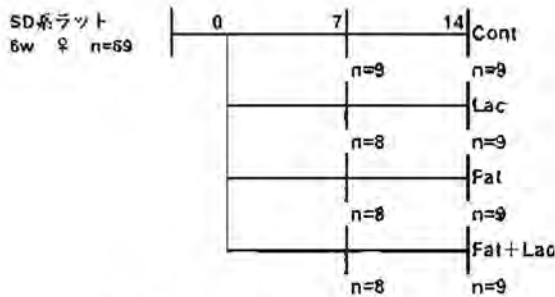


図 1 実験プロトコール

② 血清カルシウムおよび血清グルコース測定

採取した血液を遠心分離し、上清を血清サンプルとした。その後カルシウムは OCPC 法⁹⁾、グルコースは GLDH 法¹⁰⁾にて測定した。

③ ALP 活性測定

解剖直後のラットから十二指腸、空腸、回腸を採取して、縦に切開し、冷生理食塩水で洗浄し、スライドガラスでスクレープしたものを小腸粘膜サンプルとした。なお、小腸については胃幽門部から 3cm を十二指腸とし、その後盲腸までを上部 1/2 については空腸、下部 1/2 については回腸とした。空腸・回腸はさらに 2 等分し、上から順に空腸上部、空腸下部、回腸上部、回腸下部とした。肝臓は冷生理食塩水で洗浄後、解剖ばさみで細かく刻み、右葉・左葉を合わせたものを、腎臓は冷生理食塩水で洗浄したものをそれぞれのサンプルとした。

④ RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) 分析

腎臓サンプルから、チオシアン酸フェノールクロロホルム法で total RNA を抽出し、cDNA を作製した。ラット臓器非特異型 ALP (TNSALP) およびラット小腸 ALP の mRNA (β IAP-1¹¹⁾ および β IAP-2¹²⁾ に特異的なプライマーを用いて PCR を行った。

⑤ カルシウム出納試験

7 日目および 13 日目に実験動物を個別に代謝ケージに入れ、24 時間尿および糞を採取し、カルシウムを測定した。この際、尿は腐敗およびカルシウムの沈殿を防ぐため、あらかじめ 6N-HCl を 2ml 入れた蓄尿用三角フラスコにて採取した。採尿後、脱イオン・蒸留水でケージに付着した尿を洗い流し、合わせて尿量とした。遠心分離し、その上清を試料として尿サンプルは冷蔵保存した。その後、カルシウム排泄量は OCPC 法⁹⁾により測定した。

糞は、アルミホイルに包んで冷凍保存した。その後、糞に付着しているラットの毛などの異物をピンセットで注意深く除去し、マッフル炉 ($550 \sim 600^\circ\text{C}$) で約 15 時間灰化後、1N-HNO₃ で溶

解抽出し、カルシウムを尿と同様の方法で測定した。

餌摂取量よりカルシウム摂取量を算出し、吸収量は摂取量から糞中排泄量を引いて求め、さらに蓄積量は吸収量から尿中排泄量を引いて求めた。

⑥ 統計処理

Cont群とLac群、Cont群とFat群、Fat群とFat+Lac群の値をそれぞれStudentのt検定にて検討した。なお、統計ソフトにはSPSS (13.0J for windows) を用いて実施した。

結果

エネルギー摂取量

14日間の平均エネルギー摂取量は、Cont群 $57.7 \pm 1.3 \text{ kcal/day}$ (平均 \pm 標準誤差)、Lac群 $60.0 \pm 1.6 \text{ kcal/day}$ 、Fat群 $63.0 \pm 2.2 \text{ kcal/day}$ 、Fat+Lac群 $62.4 \pm 2.0 \text{ kcal/day}$ であり、各群間に有意な差はみられなかった。

最終体重

図2に14日サンプルの成長曲線、図3に7日および14日サンプルの最終体重を示す。各群間に有意な差はみられなかった。

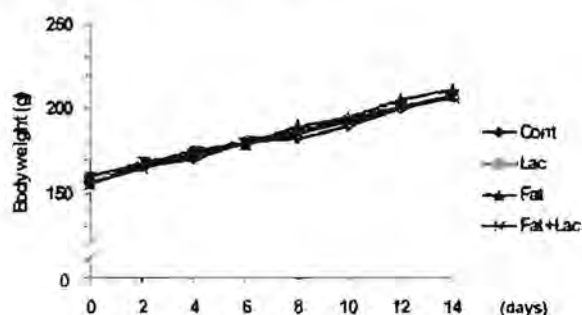


図2 成長曲線

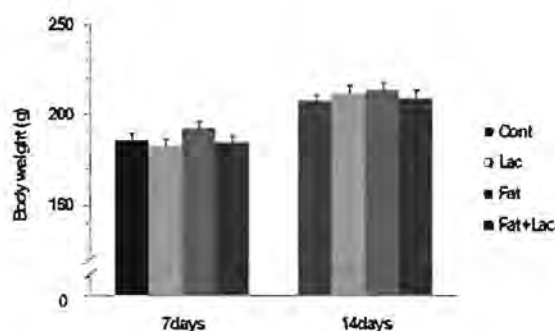


図3 最終体重

血清カルシウム測定

図4に示す通り、血清カルシウム濃度において各群間に差はみられなかった。



図4 血清カルシウム濃度

血清グルコース測定

図5に示す通り、血清グルコース濃度において各群間に差はみられなかった。

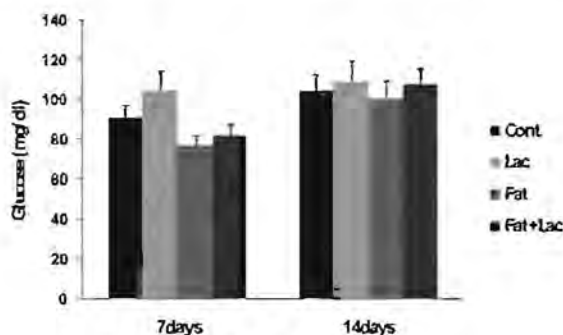


図5 血清グルコース濃度

小腸 ALP 比活性

小腸 ALP 比活性の結果を図6～10に示す。14日目の十二指腸において、Fat群がCont群に比べて有意に高値を示した ($p < 0.05$, 図6)。7日目の空腸上部においてもFat群がCont群に比べて有意に高値を示した ($p < 0.05$, 図7)。さらに、空腸下部においては7日目および14日目ともにLac群がCont群に比べて小腸 ALP 比活性が有意に高値を示した (それぞれ $p < 0.05$, 図8)。回腸上部および回腸下部では群間に有意な差はみられなかった (図9, 10)。

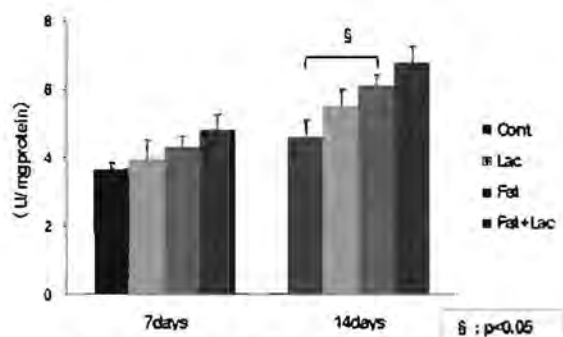


図6 十二指腸におけるALP比活性

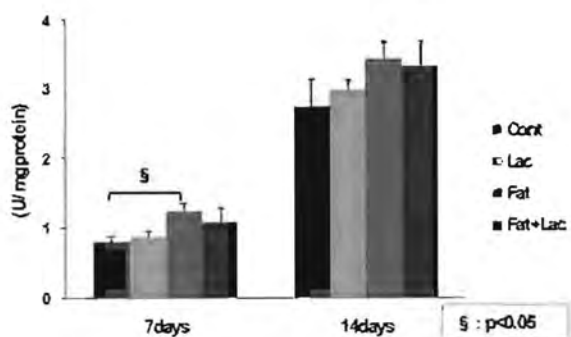


図7 空腸上部におけるALP比活性

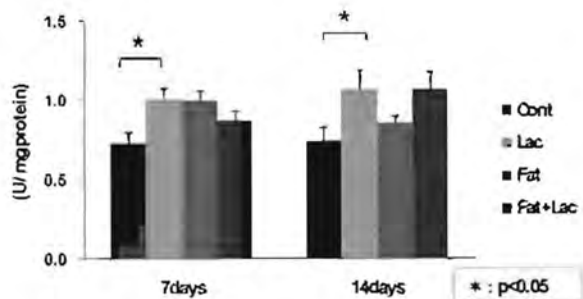


図8 空腸下部におけるALP比活性

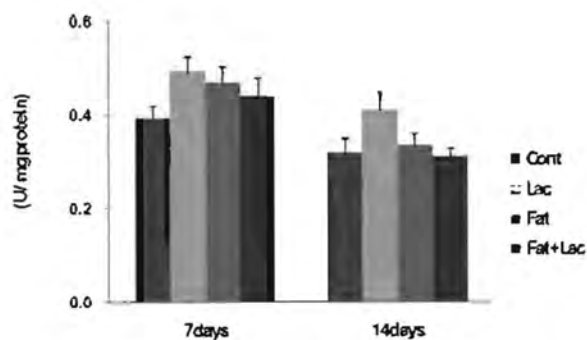


図9 回腸上部におけるALP比活性

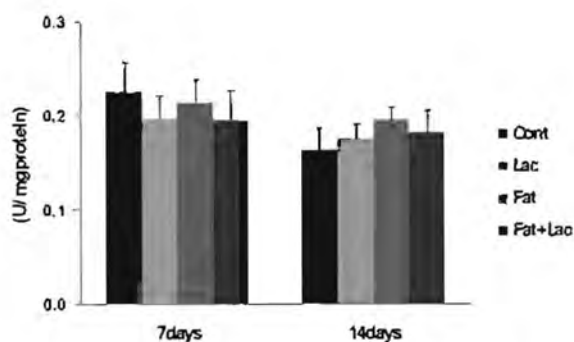


図10 回腸下部におけるALP比活性

肝臓 ALP 比活性

肝臓における ALP 比活性の結果を図 11 に示す。7 日目および 14 日目において、Fat 群が Cont 群に比べて有意に低値を示した (それぞれ $p < 0.01$ 、 $p < 0.05$)。

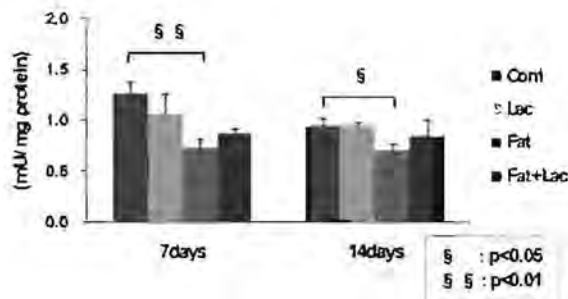


図 11 肝臓 ALP 比活性

腎臓 ALP 比活性

腎臓における ALP 比活性の結果を図 12 に示す。本研究では、14 日目の腎臓 ALP 比活性において、Lac 群で Cont 群に比べ、有意に上昇し ($p < 0.01$)、Fat+Lac 群においても Fat 群に比べ、有意な高値を示した ($p < 0.05$)。

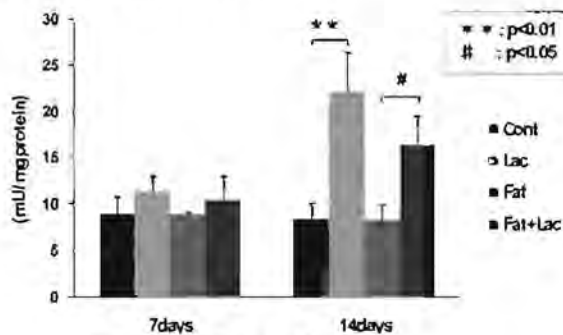


図 12 腎臓 ALP 比活性

RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) 分析

ALP 比活性において、Lac 群で Cont 群に比べ有意な活性誘導がみられた 14 日目の腎臓サンプルに関して、臓器非特異型 ALP 遺伝子の mRNA (TNSALP)、ラット小腸型 ALP の 2 種類の mRNA、rIAP-1、rIAP-2 遺伝子に特異的プライマーを用いて RT-PCR 分析を行い、それぞれの遺伝子の mRNA 発現を、Cont 群、Lac 群、Fat 群、Fat+Lac 群で比較した。図 13 に 14 日目の腎臓における電気泳動像を示した。TNSALP の PCR 産物 (327bp) は、全ての群において検出された。一方、rIAP-1 の PCR 産物 (282bp) は、Lac 群と Fat+Lac 群においてのみ検出された。また、rIAP-2 の PCR 産物 (219bp) は、どの群においてもほとんど検出されなかった。

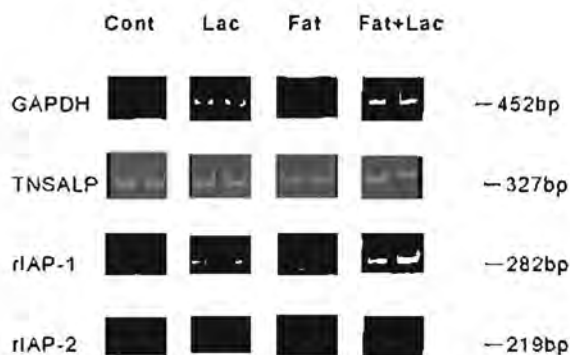


図13 腎臓サンプルのRT - PCR分析

カルシウム出納試験

糞中カルシウム排泄量、カルシウム吸収量、尿中カルシウム排泄量、カルシウム蓄積量の結果を図14～17に示す。尿中カルシウム排泄量において、7日目および13日目ともにLac群がCont群に比べ、有意に高値を示した(それぞれ $p < 0.05$ 、図16)。糞中カルシウム排泄量、カルシウム吸収量、カルシウム蓄積量では群間に有意な差はみられなかった(図14、15、17)

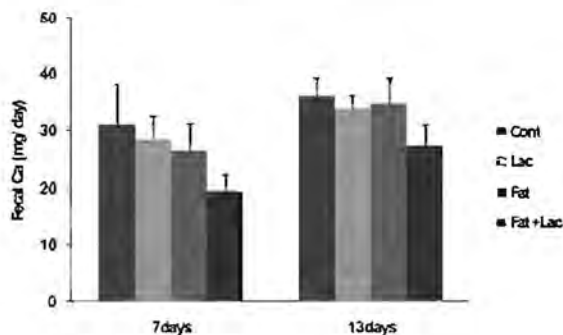


図14 糞中カルシウム排泄量

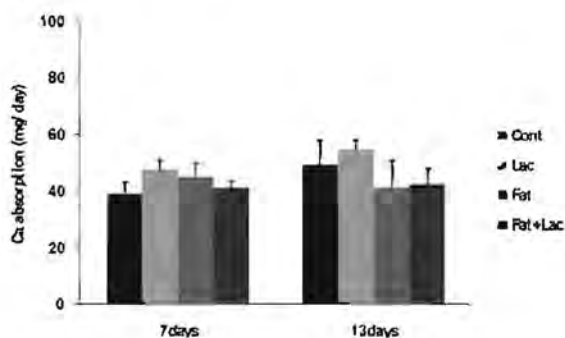


図15 カルシウム吸収量

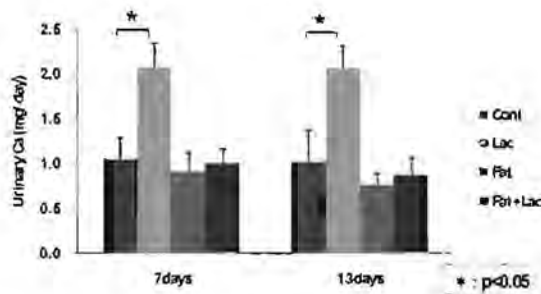


図 16 尿中カルシウム排泄量

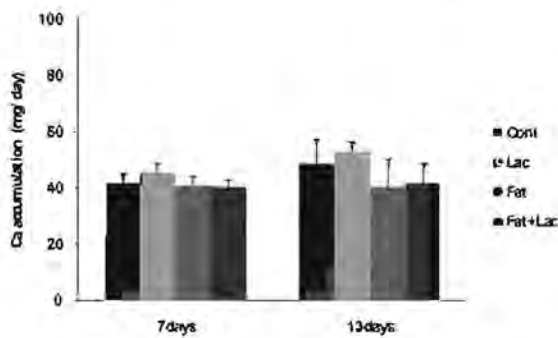


図 17 カルシウム蓄積量

考 察

本研究では、ラクトースによる脂質・糖質・ミネラル代謝改善効果について検討するために、小腸、肝臓、腎臓の ALP 動態への影響について調べた。実験食投与 14 日目の最終体重に群間での有意な差が見られなかった。14 日間の平均エネルギー摂取量が群間で差がなかったことから、体重においても差がみられなかったと考えられる。我々は、84 日間の長期飼育においては、ラクトースが高脂肪食による体脂肪増加を抑制することを報告しており¹⁾、ラクトースによる抗肥満効果は長期間飼育の場合に発揮されるものと推察される。

小腸 ALP 比活性において、14 日目の十二指腸 (図 6) および 7 日目の空腸上部 (図 7) にて Fat 群が Cont 群に比べて有意に高値を示した。ラット小腸 ALP 活性が、脂肪食によって誘導されること²⁾が先行研究で報告されており、今回の結果と一致した。さらに、図 8 に示すとおり、空腸下部においては 7 日目および 14 日目ともに Lac 群が Cont 群に比べて小腸 ALP 比活性が有意に高値を示した。この結果は我々の先行研究と一致する³⁾。

本研究では、14 日目の腎臓 ALP 比活性において、Lac 群で Cont 群に比べ有意に上昇し、また Fat+Lac 群においても Fat 群に比べ有意に高値を示した (図 12)。さらに、臓器非特異型 ALP 遺伝子の TNSALP、小腸型 ALP 遺伝子である *iIAP-1*、*iIAP-2* 遺伝子に特異的プライマーを用いて RT-PCR 分析を行い比較したところ、TNSALP の PCR 産物は、全ての群において検出された。一方、*iIAP-1* の PCR 産物は、Lac 群と Fat+Lac 群においてのみ検出された (図 13)。つまり、腎臓での ALP 比活性上昇は小腸 ALP mRNA 転写レベルでの誘導であることが示唆された。ラット小腸型

ALP では、2 種類の mRNA のそれぞれの大きさは rIAP-1 が 2.7kb、rIAP-2 は 3.0kb と報告されている⁶⁴。rIAP-2 は、1 α , 25 (OH) $_2$ D $_3$ により誘導された遺伝子群の中から発見されてクローニングされた遺伝子であり⁶⁵、小腸上部に存在することが報告されている⁶⁶。一方、rIAP-1 は小腸全体に存在していることが知られている⁶⁴。さらに、2 種類の小腸 ALP 遺伝子のそれぞれの 5' 側のプロモーター領域の相違による発現調節の違いも報告されている⁶⁶。小腸型 ALP の機能については明らかにされていないが、遺伝子ノックアウトマウスの実験では、脂質代謝との関連が示されている⁶⁷。小腸 ALP 遺伝子ノックアウトマウスでは、通常の飼育条件において、肉眼および、組織学的には野生型マウスとの違いは確認できなかった。しかしながら長期間の高脂肪食投与によって、野生型マウスに比べて体重増加、小腸上皮における脂肪輸送の増加や血清トリグリセライドの上昇が確認され、小腸 ALP が脂質代謝に関わっている可能性が示唆されている⁶⁸。

腎臓はカルシウム代謝調節における重要な臓器の 1 つである。本研究においても、ラクトース投与により尿中カルシウム排泄量が増加していることが明らかになった。つまり、ラクトースは腎臓においてカルシウム代謝に影響を及ぼしていることが示唆される。今回、ラクトース投与によって腎臓での ALP 比活性が上昇し、小腸型 ALP の mRNA が誘導されたことと、尿中カルシウム排泄量が増加したことが相互に関連があるのかについてはさらに検討する必要がある。

参考文献

- (1) Goseki-Sone M, Maruyama R, Sogabe N, Hosoi T. Effects of dietary lactose on long-term high-fat-diet-induced obesity in rats. *Obesity* 2007 ; 15 : 2605-13.
- (2) Sogabe N, Mizoi L, Asahi K, Ezawa I, Goseki-Sone M. Enhancement by lactose of intestinal alkaline phosphatase expression in rats. *Bone* 2004 ; 35 : 249-55.
- (3) Narisawa S, Huang L, Hasegawa H, Alpers DH, Millan JL. Accelerated fat absorption in intestinal alkaline phosphatase knockout mice. *Mol Cell Bio.* 2003 ; 7525-30
- (4) Greger JH, Gutkowski CM, Interaction of lactose with calcium, magnesium, and zinc in rats. *J Nutr* 1989 ; 119 : 1691-97
- (5) Armbrrecht HJ. Age and the effects of lactose on calcium and phosphorus uptake by rat small intestine. *Nutr Res* 1987 ; 7 : 1169-77
- (6) Buchoski MS, Miller DD. Lactose, calcium source and age affect calcium bioavailability in rats. *J Nutr* 1991 ; 121 : 1746-54.
- (7) Sun X, Zemel MB. Calcium and dairy products inhibit weight and fat regain during ad libitum consumption following energy restriction in Ap2-agouti transgenic mice. *J Nutr.* 2004 ; 134 : 3054-60.
- (8) Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC 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.* 1993 ; 123 : 1939-51

- (9) Gitelman HJ. An improved automated procedure for the determination of calcium in biological specimens. *Anal Biochem* 1967 ; 18 : 521-31.
- (10) Pauly HE, Pfeleiderer G. D-glucose dehydrogenase from *Bacillus megaterium* M 1286 : purification, properties and structure, Hoppe. Seylers. *Z Physiol Chem* 1975 ; 356 : 1613-23.
- (11) Lowe M, Strauss AW, Alpers R, Seetharam S, Alpers DH. Molecular cloning and expression of a cDNA encoding the membrane-associated rat intestinal alkaline phosphatase. *Biochem Biophys Acta*. 1990 ; 1037 : 170-77.
- (12) Strom M, Krisinger J, Deluca HF. Isolation of a mRNA that encodes a putative intestinal alkaline phosphatase regulated by 1,25-dihydroxy vitamin D-3. *Biochem Biophys Acta*. 1991; 1090:299-304.
- (13) Young GP, Yedlin ST, Alpers DH. Distribution of soluble and membranous forms of alkaline phosphatase in the small intestine of the rat. *Biochim Biophys Acta*. 1981 ; 676 : 257-65.
- (14) Yeh K, Yeh M, Holt PR, Alpers DH. Development and hormonal modulation of postnatal expression of intestinal alkaline phosphatase mRNA species and their encoded isoenzymes. *Biochem. J* 1994 ; 301 : 893-99.
- (15) Zhang Y, Shao JS, Xie QM, Alpers DH. Immunolocalization of alkaline phosphatase and surfactant-like particle proteins in rat duodenum. *Gastroenterology*. 1996 ; 110 : 478-88.
- (16) Xie QM, Zhang Y, Mahmood S, Alpers DH. Rat intestinal alkaline phosphatase II messenger RNA is present in duodenal crypt villus cells. *Gastroenterology*. 1997 ; 112 : 376-86