

乳成分による肥満因子の制御に関する研究

—継続的な食事前の牛乳摂取がインスリン感受性に及ぼす影響—

北海道大学創成科学共同研究機構・明治乳業寄附研究部門 松本 恵

1. 要 約

[目 的]

乳製品を日常的に摂取することは、疫学調査で抗肥満効果があると報告されている。本研究では牛乳と肥満の関係を明らかにするために、牛乳を毎日の食事の前に飲むことによって、糖代謝に影響を与えるか実験動物を用いて検討した。

[実験方法]

F344 ラットのオス 3 週令 24 匹を、毎日、明期の 8 時間絶食させ、飼料給餌直前に牛乳または疑似乳（マルトース、卵白、ラード、ミネラルで調製）を 30 mL / kg 投与した。試験飼育 6 週目に飼料摂取後の血糖値の経時変化を飼料摂取から 4 時間後まで尾静脈採血して測定し、さらに経口糖付加試験（Oral Glucose Tolerance Tests）も行った。また、空腹時に尾採血した血液を用いて、血中中性脂肪とフルクトサミン濃度を測定した。試験飼育 7 週目に解剖し、消化管粘膜の糖輸送担体の mRNA 発現量を測定した。さらに、盲腸内容物を採取し、内容物中有機酸量を HPLC を用いて分析し、微生物叢を T-RFLP 法を用いて分析した。

[結果と考察]

最終体重、エネルギー摂取量、飼料効率、各種臓器重量に、牛乳と疑似乳飲用による大きな変化は見られなかった。しかし、飼料摂取前に牛乳を投与することによって、疑似乳群よりも飼料摂取後 60 分の血糖値の上昇を有意に抑制した。また、OGTT においても、牛乳群は疑似乳群と比較してグルコース投与後 15 分の血糖値と血中インスリン濃度の上昇を有意に抑制した。血中フルクトサミン濃度も牛乳群で有意に低値を示した。このことから、牛乳を継続的に食事前に摂取することは、インスリン感受性を改善する効果があることが示唆された。

この牛乳の効果のメカニズムとして、消化管粘膜と盲腸内容物を分析した結果、消化管粘膜の GLUT2 の mRNA の発現量は牛乳を投与することによって、十二指腸で有意に低値を示した。盲腸内容物中の総短鎖脂肪酸量は牛乳群で有意に高値を示し、とくにプロピオン酸が高かった。盲腸内菌叢は疑似乳群と牛乳群で明らかに変化し、とくにプロピオン酸生成菌が牛乳群で上昇していることが明らかとなった。このことから、牛乳のインスリン感受性改善効果は継続的に牛乳を飲むことによって、消化管糖輸送担体の発現量が変化し、また、大腸での発酵が変化することが関係している可能性が示唆された。

[結 論]

牛乳を継続的に長期間、食餌の前に飲むことによって、インスリン感受性が改善されることが明らかとなった。そのメカニズムは十二指腸の糖輸送担体の GLUT2 発現量が減少したことと、腸内細菌層が変化し、盲腸内プロピオン酸濃度が上昇したことが関係していることが示唆された。

キーワード

牛乳、インスリン感受性、食後血糖値、経口糖付加試験、GLUT2、短鎖脂肪酸、盲腸内菌叢

1. 研究の目的及び本研究の背景

乳製品を日常的に摂取することは健康にとって有益であると考えられており、近年、乳を飲むことによって、ヒトにおいて疫学的調査では抗肥満効果があることが報告された (1, 2)。そのため、牛乳には肥満を制御する効果が期待されるが、動物試験を用いて詳細なメカニズムを調べた報告はまだ少ない。乳タンパク質や乳糖、乳カルシウムなど、個々の成分についての研究報告はあっても (3, 5)、実際に牛乳を飲用した後の栄養生理作用については明らかではない点が残されている。牛乳は多くの成分を含んでいる食品であり、それらが複雑な相互作用を発揮することが考えられるため、肥満因子に対する牛乳全体の影響を評価することが必要である。そこで、本研究では、牛乳と肥満の関係を明らかにするために、ラットに長期間毎日、食事の前に牛乳または疑似乳 (マルトース、卵白、ラード、ミネラルで調製) を飲用させ、食後の血糖値の測定試験と経口糖付加試験 (OGTT) を行い、糖代謝の変化を観察することとした。この際、飼料の糖質源を標準的な飼料としてデキストリンを用いる群とメタボリックシンドロームを引き起こしやすいシュークロースを用いる群を設け、牛乳の効果を比較することとした (6, 7)。また、飼料摂取前に毎日継続的に乳試料を飲むことが消化管に与える影響と、糖代謝との関係を探るために、消化管の糖代謝関連酵素や糖輸送担体の発現変化を観察するとともに、大腸での発酵や腸内菌叢の変化を観察した。

2. 研究方法

①実験動物と飼育方法

3週令の雄性 F344 ラット 24 匹 (日本 SLC, 静岡) を購入後、室温 $22^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 50 %、AM 5:00 から PM 5:00 までの明暗サイクルの条件下で 4 日間予備飼育した。その後、体重と尾静脈血中の空腹時血糖値、中性脂肪濃度がそれぞれ等しくなる様に試験飼料と乳試料の異なる 4 群に組み分けて、試験飼育を開始した。試験群は、デキストリン食 (D) で牛乳 (CM) または疑似乳 (AM) を投与する群とシュークロース食 (S) で牛乳 (CM) または疑似乳 (AM) を投与する群を設けた。試験飼料、乳試料の組成は Table 1 と 2 に示した (8)。試験飼育期間中は、毎日、体重と摂食量を測定し、AM 9:00 から PM 5:00 までは飼料を飼育ケージから抜いて、8 時間の絶食と

した。PM 5:00 に kg 体重あたり 30 mL の乳試料をフィーディングチューブを用いて投与し、30 分後、新しい飼料を与えた。

②食後の血糖値と血中インスリン濃度の測定と経口糖付加試験 (OGTT)

試験飼育 43 日目の PM 5:00 に乳試料を kg 体重あたり 30 mL (6 mL/200 g) 投与し、その 30 分後、飼料 2 g を与え、4 時間後まで 30 分毎に尾静脈採血した。遠心分離して得られた血清から、血糖値を酵素法 (グルコーステストワコー、和光純薬株式会社、東京)、インスリン濃度を ELISA 法 (レビスインスリンラット T、シバヤギ株式会社、東京) で測定した。また、試験飼育 45 日目には、PM 5:00 にグルコースを 2 g/kg、フィーディングチューブを用いて経口投与し、2 時間後まで同じく尾静脈採血して、得られた血清から血糖値と血中インスリン濃度を測定した。また、この時の試験開始前、すなわち空腹時の血清を用いて、血糖値、血中インスリン濃度、血中中性脂肪濃度、血中フルクトサミン濃度なども測定した。

③消化管粘膜の糖代謝関連酵素や糖輸送担体の mRNA 発現量の測定

試験飼育 49 日目にネンブター麻酔下で開腹し、十二指腸、空腸、回腸、盲腸をそれぞれ摘出し、腸管の筋層を剥離した後、総 RNA を抽出し (9)、real-time PCR (8, 7300 Real-Time PCR System, Applied Biosystems, 東京) を用いて各糖代謝関連酵素や糖輸送担体 (Proglucagon: NM-017077, Glucoamylase: XM-231714, Isomaltase-Sucrase complex: NM-013061, Lactase: XM-341115, SGLT1: NM-013033, GLUT2: NM-012879) の mRNA 発現量を測定した。

④盲腸内容物中の有機酸濃度と腸内菌叢の分析

解剖時に摘出した盲腸から内容物を採取し、一部をホモジナイズして上清を HPLC (SLC-10 AVP, 島津製作所、京都) 分析し、乳酸、コハク酸、酢酸、プロピオン酸、酪酸量を測定した (10)。また、盲腸内容物から 16s リボソーム RNA を抽出し、TRFLP 分析し、腸内菌叢の変化をクラスター解析して確認し、各群の特異的なピークに関してはスペクトルを解析 (CEQ8000 DNA analysis system, Beckman Coulter, USA) し、類似する菌種を検索した (11)。

⑤統計処理

全てのデータを平均値±標準誤差で示した。食後の血糖値と血中インスリン濃度、経口糖付加試験、空腹時血液データ、盲腸内容物有機酸濃度を二元配置分散分析した。有意差検定ソフトには STATCEL2 (OMS, 埼玉) を用い、Tukey-Kramer test で検定した。

3. 実験結果

①体重と飼料効率

初期体重と解剖時体重は全ラットにおいて有意な差は見られなかった。また、飼料効率も各群で変化は見られなかった。

②食後の血糖値と血中インスリン濃度

食後の血糖値は乳試料を投与した後 60 分まで、ゆるやかに上昇し、60 から 90 分の間に急激に

上昇した (Fig. 1)。90 分の血糖値は牛乳投与群 (D-CM, 11.31 (SEM 0.29) versus S-CM, 10.21 (SEM 0.20) mmol/l) と疑似乳投与群 (D-AM, 13.30 (SEM 0.72) versus S-AM, 11.36 (SEM 0.30) mmol/l) と比較して牛乳投与群で有意に低値を示した。血中インスリン濃度は 60 分でピークに達し、牛乳群は疑似乳群よりも有意に低値を示した。血糖値、血中インスリン濃度ともに 270 分までの曲線下面積 (AUC) を計算した結果 (Table 3)、牛乳群は全ての時間で有意に低値を示した。また、飼料の糖質源の違いによる食後の血糖値と血中インスリン濃度の変化を比較して、90 分の血糖値はデキストリン食群で有意に高値を示し (Fig. 1a, Diet, $P=0.002$)、AUC は 0-150 分で高値傾向、0-210 分では有意に高値であった。血中インスリン濃度は乳試料投与後 30 分で有意にデキストリン食群が低値を示したが (Fig. 1b, Diet, $P < 0.001$)、AUC には、飼料の糖質源による変化は見られなかった。

③経口糖付加試験 (OGTT)

空腹時 (0 分) の血糖値は全群で差は見られなかったが、血中インスリン濃度は牛乳群で疑似乳群と比較して有意に低値を示した。全ての群で血糖値と血中インスリン濃度は 15 分にピークとなり、その後、速やかに低下した (Fig. 2)。ピーク時の 15 分の血糖値と血中インスリン濃度ともに、牛乳群で疑似乳群よりも有意に低値を示した。血糖値、血中インスリン濃度ともに 120 分までの AUC を計算した結果 (Table 4)、血糖値は 60 分まで、血中インスリン濃度は 120 分まで牛乳群で有意に低値を示した。また、飼料の糖質源の違いによる経口糖付加試験結果への影響を比較して、15 分の血糖値、インスリン濃度ともにシュークロース食群で有意に上昇し、AUC も、血糖値の 0-120 分以外、有意に高値を示した。

④空腹時血中中性脂肪濃度とフルクトサミン濃度

血中中性脂肪濃度はシュークロース食群で有意に高値を示したが、乳試料の違いによる差は見られなかった。血中フルクトサミン濃度は牛乳群で疑似乳群と比較して有意に低値を示した (Table 5)。

⑤盲腸内容物の有機酸分析

盲腸内容物重量は牛乳群で疑似乳群よりも有意に増加した。総短鎖脂肪酸も牛乳群で高値傾向を示し、特にプロピオン酸が有意に高値を示した (Table 6)。また、デキストリン食群では酢酸、総短鎖脂肪酸量が有意に高値を示したが、プロピオン酸量は高値傾向を示すに留まった。

⑥盲腸内菌叢

制限酵素 *HhaI* を用いた TRFLP プロファイルは Fig. 3 に示した。デキストリンとシュークロース食を比較して、デキストリン食にピーク Y (364 bp) が多く、シュークロース食にピーク X (209 bp) が多く認められ、ピーク Y (364 bp) はシュークロース食群にのみ検出された。一方、ピーク Z (641 bp) は飼料の違いに関わらず、牛乳群で特異的に検出された。このピーク Z を BLAST 検索 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) したところ、*Phascolarctobacterium faecium* (GenBank accession, X72865) と相似していることが認められた。

T-RFLP プロファイルパターンから系統樹を作成 (Fig. 4) し、クラスター解析したところ、飼料によって、明確に別々のクラスターに分かれ、さらに、乳試料によって別のクラスターに分かれた。

⑦消化管粘膜の糖代謝関連酵素と糖輸送担体の mRNA 発現量

十二指腸の GLUT2mRNA 発現量は牛乳群で 20 % ($P=0.027$) 疑似乳群よりも低下した (Fig. 5)。しかし、空腸や回腸では差は見られなかった。また、その他の輸送担体と酵素、プログルカゴンの mRNA 発現量には全群で差が見られなかった。また、食餌の糖質源による大きな変化は見られなかった。

4. 考 察

これまでの牛乳とインスリン感受性の関係を調べた動物試験では、乳成分を長期に生理的な量を投与した報告はなかった。そのため、私たちは、牛乳を液体のまま投与するという方法を用いて、より生理的な条件下での試験に取り組んだ。ラットに毎日投与した乳試料の量は、一日に摂取する飼料のエネルギー (8,360-10460 kJ/day) のうち、およそ 6 から 8% に設定されており、これは、ヒトに換算すると一日に 200 mL 程度飲むことと同程度である。本試験では、私たちは、OGTT や、空腹時血中フルクトサミン濃度の低下で見られた様に牛乳のインスリン感受性改善効果を明らかにした。この効果は、デキストリンとシュークローズ食のどちらの群においても発揮され、食餌組成と乳試料の交互作用は全試験で見られなかった。このため、牛乳はシュークローズ食によって引き起こされたメタボリックシンドローム様のインスリン抵抗性を改善する可能性も示唆された。

また、インスリン感受性の改善メカニズムに関して、2つの面白い結果が得られた。一つは、十二指腸 GLUT2 mRNA 発現量が疑似乳を投与したラットと比較して牛乳を投与したラットで大きく減少していたということである。GLUT2 は腸の上皮細胞膜に発現し、管腔内に流れ込んで来たグルコースの 60% を取り込むことが知られている (12)。本試験では牛乳の影響による GLUT2 の発現量低下は、空腸または回腸では認められず、十二指腸のみで観察された。したがって、牛乳投与によるグルコース吸収への影響は、さほど大きな影響ではないかもしれない。しかし、この十二指腸 GLUT2 mRNA 発現量の 20% の低下によって、牛乳摂取の後のグルコースの吸収が遅れるかもしれないことは、インスリン感受性に十分影響を与えたことが考えられた。しかし、十二指腸での GLUT2 mRNA 発現量に影響を及ぼす食品については現在のところほとんど報告が無く、糖代謝との関係を明らかにするためには、今後、より詳細な検討が必要である。牛乳の投与は SGLT1 または小腸のプログルカゴン mRNA 発現量には影響を示さなかったため、SGLT1 と GLP-1 は牛乳によるインスリン感受性の改善には直接的には関係していない可能性が示唆された。

二つ目のメカニズムとしては、盲腸の腸内菌叢と短鎖脂肪酸の構成が牛乳を継続的に摂取することによって、大きく変化したことである。牛乳を投与したラットで観察された特徴のある T-

RFLP ピークは *P. faecium* の 16S の rRNA 遺伝子に相似した。この、*P. faecium* はコハク酸を消費して、プロピオン酸 (13, 14) を生産することが報告されており、実際に、私たちの試験では、盲腸内容物中のプロピオン酸濃度は、牛乳を投与した群で上昇した。近年、実験動物で、腸内菌叢の変化がインスリン抵抗性 (15, 16) に影響を及ぼすことが報告されている。さらに、ヒト介入試験においても、7 週間のプロピオン酸を含むカプセルの経口投与がインスリン抵抗性 (17) を大幅に向上させることが示唆された。したがって、長期に摂取した牛乳の影響によって引き起こされた、腸内菌叢と短鎖脂肪酸の構成の変化は、インスリン感受性の改善効果と関係していたことが示唆された。

5. 結論

ラットを用いた動物試験で、生理的な投与量の牛乳を継続的に長期間、食餌の前に飲用することによって、食後の高血糖、高インスリン血症が抑制され、インスリン感受性が改善されることが明らかとなった。その作用メカニズムは十二指腸の糖輸送担体である、GLUT2 の発現量が減少したことと、腸内細菌層が変化し、盲腸内のプロピオン酸濃度が上昇したことが関係していることが示唆された。

6. 引用文献

1. Elbon. M. S., Johnson. A. M., Fischer. G. J. (1994) Milk consumption in older americans. Am J public Healtyh, 88 : 1221-1224
2. Summerbell. C. D., Watts. C., Higgins. J. P., Garrow. J. S. (1998) Randomised controlled trial of novel, simple, and well supervised weight reducing diets in outpatients. 317, 1487-1489.
3. Anderson GH, Tecimer SN, Shah D, Zafar TA. (2004) Protein source, quantity, and time of consumption determine the effect of proteins on short-term food intake in young men. J Nutr. 134 : 3011-3015.
4. Arthur. P. G, Kent. J. C., Hartmann. P. E. (1994) Metabolites of lactose synthesis in milk from diabetic and nondiabetic women during lactogenesis II. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 19 : 100-108.
5. Shi. H., Dirienzo D, Zemel. M. B. (2001) Effects of dietary calcium on adipocyte lipid metabolism and body weight regulation in energy-restricted aP2-agouti transgenic mice. FASEB J. 15 : 291-293.
6. Gomez Dumm CL (1996) Long-term administration of a sucrose-rich diet to normal rats : relationship between metabolic and hormonal profiles and morphological changes in the endocrine pancreas. Metabolism. 45, 1527-1532.
7. Oliart Ros RM, Torres-Marquez ME, Badillo A & Angulo Guerrero O (2001) Dietary fatty acids effects on sucrose-induced cardiovascular syndrome in rats. J. Nutr. Biochem. 12, 207-212.
8. Reeves PG, Nielsen FH & Fahey GC Jr (1993) 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.* 123, 1939-1951.
9. Inoue R, Otsuka M, Nishio A & Ushida K (2007) Primary administration of *Lactobacillus johnsonii* NCC533 in weaning period suppresses the elevation of proinflammatory cytokines and CD86 gene expressions in skin lesions in NC/Nga mice. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 50, 67-76.
 10. Shiga K, Hara H, Okano G & Aoyama Y (2003) Ingestion of water-soluble soybean fiber prevents gastrectomy-induced iron malabsorption, anemia and impairment of voluntary running exercise performance in rats. *J. Nutr.* 133, 1120-1126.
 11. Inoue R, & Ushida K (2003) Development of the intestinal microbiota in rats and possible interactions with the evolution of the luminal IgA in the intestine. *FEMS Microbiol. Ecol.* 45, 147-153.
 12. Gouyon F, Caillaud L, Carriere V, Klein C, Dalet V, Citadelle D, Kellett GL, Thorens B, Leturque A & Brot-Laroche E (2003) Simple-sugar meals target GLUT2 at enterocyte apical membranes to improve sugar absorption : a study in GLUT2-null mice. *J. Physiol.* 552, 823-832.
 13. Janssen PH & O' Farrell KA (1999) *Succinispira mobilis* gen. nov., sp. nov., a succinate-decarboxylating anaerobic bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 3, 1009-1013.
 14. van Gylswyk NO, Hippe H & Rainey FA (1997) *Schwartzia succinivorans* gen. nov., sp. nov., another ruminal bacterium utilizing succinate as the sole energy source. *Int J Syst Bacteriol.* 47, 155-159.
 15. Dumas ME, Barton RH, Toye A et al. (2006) Metabolic profiling reveals a contribution of gut microbiota to fatty liver phenotype in insulin-resistant mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 12511-12516.
 16. Cani PD, Amar J, Iglesias MA et al. (2007) Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 56, 1761-1772.
 17. Venter CS, Vorster HH & Cummings JH (1990) Effects of dietary propionate on carbohydrate and lipid metabolism in healthy volunteers. *Am. J. Gastroenterol* 85, 549-553.

Table 1. Composition of artificial milk (AM)

	g / 100 ml
Carbohydrate ¹	4.95
Protein ²	3.40
Lipid ³	3.90
K ⁴	0.15
Ca ⁵	0.11
Mg ⁶	0.01
P ⁷	0.09
Na ⁸	0.07

¹ Maltose (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan).

² Egg white protein (PROCESSED EGG, Taiyo Kagaku Co., Ltd., Mie, Japan).

³ Lard (Sow Brand Milk Product Co., Ltd., Sapporo, Japan).

⁴ Potassium sulfate (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan).

⁵ Calcium carbonate (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan).

⁶ Magnesium oxide (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan).

⁷ Sodium dihydrogenphosphate dihydrate (Nacalai Tesque, Inc., Kyoto, Japan).

⁸ Content of Na in AM was the estimated source of P's Na content.

Table 2. Experimental diet composition.

	Dextrin	Sucrose
	g / kg diet	
Casein ¹	200.0	200.0
Dextrin ²	629.5	-
Sucrose ³	-	629.5
Lard ⁴	70.0	70.0
Mineral mixture ⁵	35.0	35.0
Vitamin mixture ⁶	10.0	10.0
Choline chloride ⁷	2.5	2.5
L-Cystine ⁸	3.0	3.0
Cellulose ⁹	50.0	50.0

¹ ALACID (New Zealand Daily Board).

² TK-16 (Matsutani Chemical Industry Co., Ltd., Hyogo, Japan).

³ Sucrose (Nippon Beet Sugar Mfg. Co., Ltd., Obihiro, Japan).

⁴ Lard (Snow Brand Milk Products Co., Ltd., Sapporo, Japan).

^{5,6} Mineral and vitamin mixtures were prepared according to the AIN-93G formulation (CLEA Japan, Inc., Tokyo, Japan).

^{7,8} Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan

⁹ Cellulose powder (JustFiber, Morimura Bros., Inc., Tokyo, Japan).

Table 3. Area under the curve (AUC) analysis for postprandial serum glucose and insulin in D-AM, D-CM, S-AM, and S-CM rats in response to oral milk administration (5 ml/rat) and subsequent feeding of each test diet (2 g/rat).

	Glucose						Insulin					
	0-150 min		0-210 min		0-270 min		0-150 min		0-210 min		0-270 min	
	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM
	mmol/l						ng/ml					
Dextrin diet												
AM	48.8	1.6	69.3	1.8	87.0	1.8	15.8	1.2	18.3	1.3	20.4	1.2
CM	44.8	0.6	65.0	0.8	82.9	1.1	10.8	0.9	13.8	0.9	16.7	0.9
Sucrose diet												
AM	46.2	0.7	65.9	1.3	84.1	1.6	16.0	1.1	19.1	1.3	21.9	1.5
CM	43.5	0.3	63.3	0.5	81.4	0.4	11.4	1.3	14.8	1.6	18.0	1.8

Two-way ANOVA

P-values

Diets	0.052	<u>0.042</u>	0.117	0.724	0.511	0.339
Milk	<u>0.002</u>	<u>0.008</u>	<u>0.020</u>	<u>0.001</u>	<u>0.003</u>	<u>0.014</u>
Diets x Milk	0.057	0.504	0.641	0.847	0.947	0.932

The postprandial blood glucose and insulin tolerance tests were performed on day 43 of the experimental diet administration. Each value represents the mean with SEM, n = 6. P values were estimated via two-way ANOVA. P values < 0.05 are underlined.

Table 4. Area under the curve (AUC) analysis for serum glucose and insulin concentrations in D-AM, D-CM, S-AM, and S-CM rats in response to oral glucose administration (2 g/kg).

	Glucose						Insulin					
	0-30 min		0-60 min		0-120 min		0-30 min		0-60 min		0-120 min	
	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM
	mmol/l						ng/ml					
Dextrin diet												
AM	15.5	0.2	31.3	0.7	57.5	1.2	24.0	2.0	37.0	2.6	39.1	2.6
CM	14.9	0.2	30.4	0.8	56.7	1.5	16.9	1.5	28.0	2.5	30.2	2.5
Sucrose diet												
AM	16.1	0.2	33.5	0.3	60.1	0.7	29.9	1.0	46.1	2.4	48.9	2.7
CM	15.4	0.4	31.5	0.7	57.9	1.2	27.4	2.3	41.3	3.0	43.5	3.1

Two-way ANOVA

P-values

Diets	<u>0.050</u>	<u>0.015</u>	0.117	<u><0.001</u>	<u><0.001</u>	<u><0.001</u>
Milk	<u>0.026</u>	<u>0.029</u>	0.208	<u>0.012</u>	<u>0.017</u>	<u>0.016</u>
Diets x Milk	0.873	0.417	0.558	0.200	0.452	0.530

Each value represents the mean with SEM, n = 6. P values were estimated via two-way ANOVA. P values < 0.05 are underlined.

Table 5. Fasted serum triglycerides and fructosamine concentrations in D-AM, D-CM, S-AM, and S-CM rats.

	Triglyceride		Fructosamine	
	Mean	SEM	Mean	SEM
	mmol/l		μmol/l	
Dextrin diet				
AM	1.3	0.1	136.7	6.3
CM	1.4	0.1	120.2	4.2
Sucrose diet				
AM	2.1	0.1	152.7	15.4
CM	1.9	0.2	122.3	3.9

Two-way ANOVA

P-values		
Diets	<u><0.001</u>	0.315
Milk	0.878	<u>0.015</u>
Diet x Milk	0.426	0.442

Each value represents the mean with SEM, n = 6. P values were estimated via two-way ANOVA. Tail-blood from 8-h-fasted rats was used to determine triglyceride concentrations on day 45. Abdominal aorta blood was used to determine fructosamine concentrations on day 49. P values < 0.05 are underlined.

Table 6. Pools of organic acids in cecal contents from D-AM, D-CM, S-AM, and S-CM rats.

	Succinate		Lactate		Acetate		Propionate		n-Butyrate		Total SCFA		Cecal contents	
	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM
	μmol													
Dextrin diet														
AM	1.0	0.5	2.2	0.7	53.4	5.6	19.0	1.9	11.3	2.0	83.7	9.0	2.0	0.1
CM	1.5	1.0	3.0	1.3	65.1	6.1	28.1	4.0	5.8	0.6	99.4	9.0	3.3	0.2
Sucrose diet														
AM	8.6	4.5	3.0	0.9	42.4	4.8	15.5	1.7	7.5	2.1	65.5	8.0	2.0	0.2
CM	3.3	3.0	2.7	1.7	50.9	5.9	21.4	2.6	7.9	3.5	80.2	6.9	2.8	0.2

Two-way ANOVA

P-values							
Diets	0.100	0.855	<u>0.033</u>	<u>0.071</u>	0.718	<u>0.034</u>	0.096
Milk	0.384	0.846	0.082	<u>0.011</u>	0.286	0.079	<u><0.001</u>
Diets x Milk	0.299	0.666	0.748	0.547	0.211	0.953	0.168

Each value represents the mean with SEM, n = 6. P values were estimated via two-way ANOVA. Total SCFA – sum of acetate, propionate, and n-butyrate concentrations. Cecal contents were used to determine pools of organic acids on day 49. P values < 0.05 are underlined.

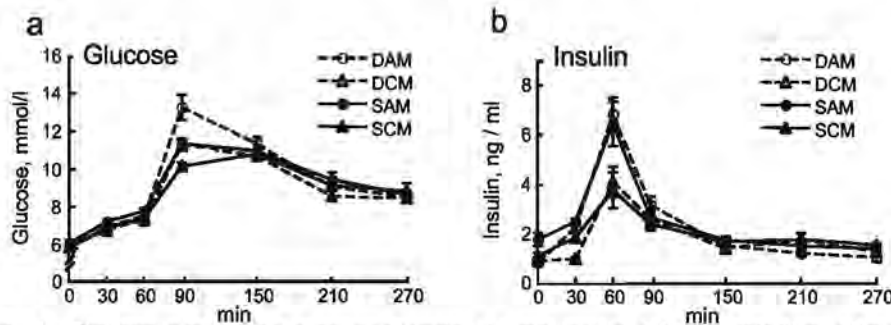


Fig. 1. Changes in postprandial serum glucose (a) and insulin (b) concentrations after oral milk administration (5 ml/rat) and subsequent test diet administration (2 g/rat) in D-AM, D-CM, S-AM, and S-CM rats. Postprandial serum glucose and insulin tolerance tests were performed on day 43 after the start of experimental diet administration. Each value represents the mean with SEM, n = 6. P values were estimated for peak values via two-way ANOVA: (a) 90-min blood glucose: Diet, P = 0.002; Milk, P = 0.001; Diet x Milk, P = 0.335, (b) 30-min blood insulin (milk administration after 30 min): Diet, P < 0.001; Milk, P < 0.001; Diet x Milk, P = 0.027; 60 min (diet fed after 30 min): Diet, P = 0.620; Milk, P = 0.001; Diet x Milk, P = 0.97.

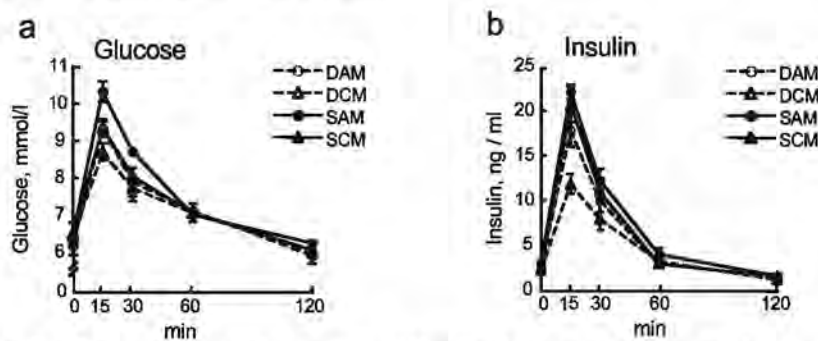


Fig. 2. Changes in serum glucose (a) and insulin (b) concentrations as determined OGTT in D-AM, D-CM, S-AM, and S-CM rats. OGTT were performed on day 45 of the experimental diet. Each value represents the mean with SEM, n = 6. P values were estimated for peak values via two-way ANOVA: (a) 0-min serum glucose: Diet, P = 0.071; Milk, P = 0.815; Diet x Milk, P = 0.401, 15-min serum glucose: Diet, P = 0.003; Milk, P = 0.004; Diet x Milk, P = 0.501, (b) 0-min serum insulin: Diet, P = 0.108; Milk, P = 0.034; Diet x Milk, P = 0.150, 15-min serum insulin: Diet, P < 0.001; Milk, P = 0.021; Diet x Milk, P = 0.137.

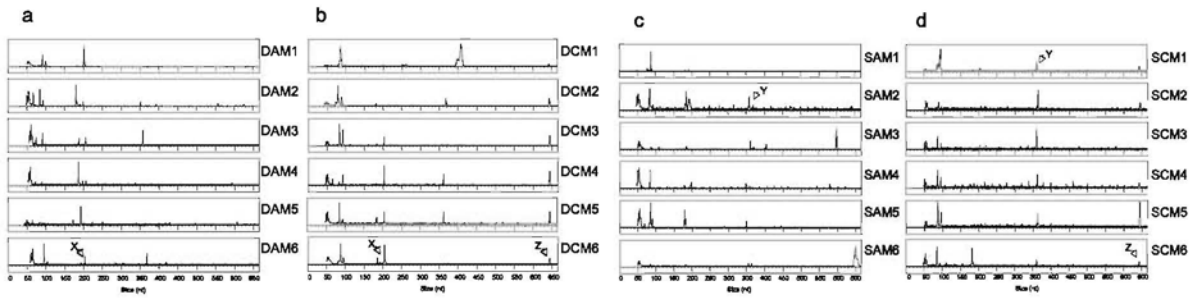


Fig. 3. T-RFLP profiles representing cecal bacterial diversity in rats administered CM or AM while on a dextrin- (a and b) or sucrose-based diet (c and d). Peak X (209 bp) was observed more frequently in the dextrin- versus sucrose-fed rats, whereas peak Y (364 bp) appeared frequently in the sucrose-fed rats, but not in the dextrin-fed rats. Peak Z (641 bp) was almost uniquely observed in CM-treated rats, regardless of diet type.

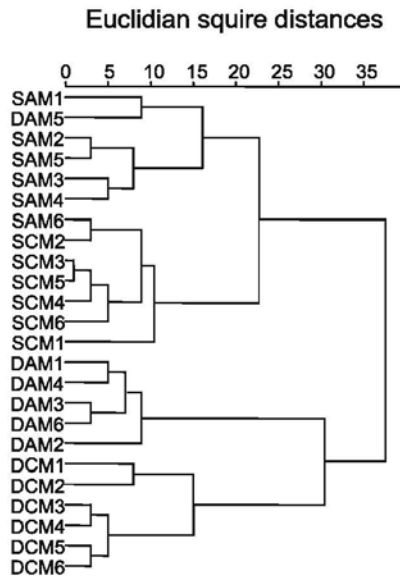


Fig. 4. The dendrogram based on the T-RFLP profiles was generated using a hierarchical clustering analysis with Euclidean square distances. The combinations of capital letters and numbers at the top left of each dendrogram represent the numbers of rats from the D-AM, D-CM, S-AM, and S-CM groups.

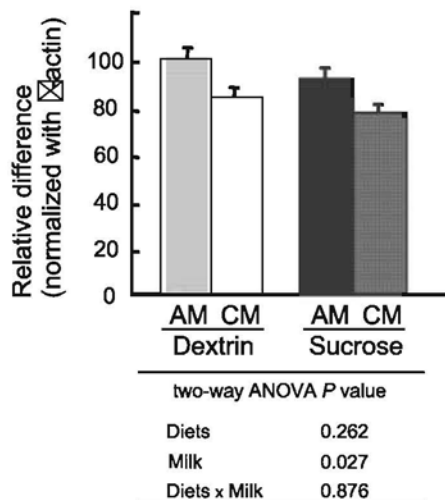


Fig. 5. Duodenal GLUT2 mRNA expression in D-AM, D-CM, S-AM, and S-CM rats. The arbitrary units for GLUT2 expression were normalized against β -actin expression and subjected to statistical analysis. Data are presented as relative differences when the value of D-AM = 100% (mean value with SEM, $n = 6$). Results of the statistical analyses (two-way ANOVA) are presented below the x-axis captions.