

「乳糖による食欲調節メカニズムについて」

東京都老人医療センター内分泌科部長 細井孝之

要 旨

本研究は、マウスを用いたin vivo系を用いて、牛乳中に含まれている二糖類である乳糖（ラクトース）による減量・抗肥満作用について生体内での効果を明らかにすることを目的とした。

4週齢ICR系雌マウス（56匹）について

Control食群（Cont.）

Control食のコーンスターチのうち、飼料重量の10%をラクトースに置き換えたラクトース10%食群（Lac.）

Control食のコーンスターチのうち、ラードに置き換え、脂質エネルギー比率を40%に調整した脂質40%食群（High fat）

Control食のコーンスターチのうち、ラードに置き換え、脂質エネルギー比率を40%に調整した脂質40%食群（High fat）にさらに飼料重量の10%をラクトースに置き換えた脂質40%・ラクトース10%食群（High fat Lac.）

の4群に分けた。飼育期間中、体重を2日おきに測定した。84日間飼育した後、小腸ALP比活性を測定した。

High Fat群の最終体重は、Cont.群に比べて有意な高値を示し、High fat Lac.群は、High Fat群に比べ、有意な低値を示した。一方、Lac.群とCont.群間には有意な差はみられなかった。

小腸ALP比活性では、High Fat群およびHigh fat Lac.群はCont.群に比べ、低値傾向を示したが、有意な差はみられなかった。

これらのことから、ラクトースが高脂肪食において体重増加を抑制している可能性が示された。本研究の結果は、乳糖（ラクトース）を含んだ乳製品の摂取と脂質摂取との関わりを示した結果であり、生活習慣予防の観点からも今後の研究の発展が期待される。

1. 背景および研究目的

牛乳中に含まれる乳糖（ラクトース）の効果としては、カルシウム吸収促進効果および骨代謝改善効果が報告されている¹⁻³⁾。牛乳中には、約5%のラクトースが含まれており、牛乳中のカルシウムの吸収を促進させていると考えられている。しかしながら、カルシウム吸収促進作用のメカニズムについては、いくつかの説があるものの、不明な点が多い。また、乳糖の減量・抗肥満効果については、今までほとんど注目されておらず、もしその効果が明らかになれば牛乳の食欲調節メカニ

ズムを解明するための有用な科学的証拠が得られることが期待できる。

また、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り、今後もこの傾向は続くと考えられる。従って、高脂肪食における乳糖の抗肥満効果を明らかにできれば、牛乳摂取による生活習慣病予防への効果について、科学的証拠を得ることが期待できよう。

われわれは、すでに先行研究において乳糖投与により、ラットの小腸アルカリホスファターゼ (ALP) 活性の有意な上昇およびmRNA発現増強を明らかにしてきた⁴⁾。先行研究は、乳糖による小腸ALPの誘導効果を明らかにできた最初の報告である。小腸ALPの生理機能はいまだ明らかではないが、これまで脂肪食投与によって小腸ALPが誘導されることが報告されており、食餌中の栄養素の影響を強く受ける酵素であると考えられる。最近、小腸ALP遺伝子のノックアウトマウスが作成され、高脂肪食で飼育した場合、野生型マウスに比べ、体重増加量、小腸上皮における脂肪のトランスポートの増加、血清トリグリセライドの上昇が確認されており、小腸ALPが脂肪の吸収を調節している可能性が示された⁵⁾。乳糖投与で誘導された小腸ALPにより脂肪の吸収が抑えられ、減量・抗肥満効果に結びついたのではないかと考察した。そこで、予備実験的に飼料摂取量を比較したところ、ラクトース群ではコントロール食群に比べ、飼料摂取量がやや減少しており、血清トリグリセライド値が高値傾向を示した。これらの結果は、ラクトース投与が食欲調節あるいは小腸での栄養吸収に関与している可能性を示すものであり、さらに詳しい実験計画を進めて、科学的証拠を得るべきであると考えた。

そこで、本研究では、乳糖投与による減量・抗肥満効果について、マウスを用いたin vivo系で生体内での効果を明らかにすることを目的とした。

2. 実験方法

1) 実験方法および飼育条件

実験動物には、4週齢ICR系雌マウス(40匹)を用いた。13日間の予備飼育の後、AIN-93を与える Control食群 (Cont.)、Control食のコーンスターチのうち、飼料重量の10%を乳糖(ラクトース)に置き換えたラクトース10%食群 (Lac.)、ラードに置き換え、脂質エネルギー比率を40%に調整した脂質40%食群 (High fat)、脂質エネルギー比率40%に調整し、さらにラクトース10%に置き換えた・脂質40%・ラクトース10%食群 (High fat Lac.) の計4群とし、さらに84日間飼育した。4群ともカルシウムは0.5%、リンは0.3%に調整した (Fig.1)。

動物は、室温 23 ± 1 、湿度 $50 \pm 5\%$ 、12時間ごとの明暗サイクル(明期7:00a.m.~7:00p.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。84日目(3 months)に各群10匹を解剖した。

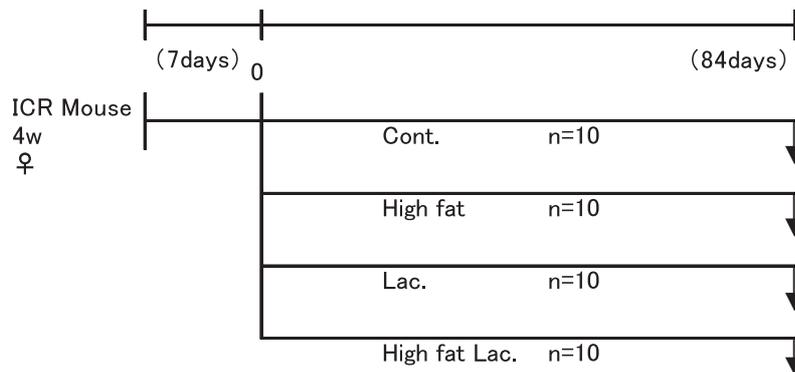


Fig. 1 Experimental protocol

2) 解剖

動物は6時間(7:00a.m.~1:00p.m.)絶食させた後、ジエチルエーテル麻酔下で心臓より全採血した。

3) 血清生化学検査

採取した血液を遠心分離(2500rpm,10min)し、上清を血清サンプルとした。その後、カルシウム(Ca)はOCPC法、無機リン(P)はFiske-Subbbazow法、アルカリホスファターゼ(ALP)はBessey-Lowry法、総たんぱく質はBiuret法により測定した。血清トリグリセライドはGPO・DAOS法、コレステロールはコレステロールオキシダーゼ・DAOS法、遊離脂肪酸はACS・ACDO法にて測定した。

4) アルカリホスファターゼ活性測定

3ヵ月後の解剖直後のマウスから小腸を採取して縦に切開し、冷生理的食塩水で洗浄後、スライドガラスで小腸粘膜をスクレープしたものを小腸粘膜のサンプルとした。小腸粘膜サンプル0.5gに10mM TBS containing 1 mM PMSFを加えてホモジナイズ(POLYTRON PT1200, KINEMATICA AG, Swizerland)し、20% TrintonX-100を25 μ l加えて室温で15分間攪拌した。その後、遠心分離(7000rpm、15min.)し、得られた上清を酵素抽出液とした。酵素抽出液に、p-NPP基質液を加え、37 $^{\circ}$ Cで反応させ、405nmにて吸光度を測定した。たんぱく質はBCA Protein Assay Kit(PIERCE, IL, U.S.A)を使用して定量した。

5) 腰椎摘出骨測定

マウスの腰椎を摘出し、第4・5腰椎の骨計測(骨密度計測および力学的指標計測)を(株)ア

ロカ社製 実験動物用X線CT. LA Thetaを用いて行った。

6) 骨重量の測定

解剖時に左大腿骨を採取し、新鮮時に周囲の軟部組織を充分除去した後、新鮮骨重量 (Fresh weight) を測定した。その後100 のマッフル炉中で24時間乾燥後、乾燥重量 (Dry weight) を測定した。さらに、600 のマッフル炉中で灰化し、恒量を得て、灰化重量 (Ash weight) とした。

7) 大腿骨成分の測定

骨の灰化物はその後1N-HNO₃で溶解抽出し、Ca含量はOCPC法、P含量はFiske-Subbarow法により測定した。

8) 統計処理

これらの分析には、統計ソフトSPSS (9. 0J. for windows) を使用し、各データの有意差検定は一元配置の分散分析を行った後、scheffeの検定を行った。

3. 結果

1) 体重増加および最終体重

Table 1 に実験食開始時体重、Fig. 2 に解剖前日の最終体重を示した。実験食開始時の体重には各群間に有意な差はみられなかった。3ヶ月後においてHigh fat群は、Cont.群に比べて有意な高値を示した。またHigh fat Lac.群は、High fat群に比べ、有意な低値を示した。Lac.群とCont.群間には有意な差はみられなかった。

Table 1 Initial body weight

Groups	n	(g)
Cont.	10	24.4 ± 0.5
High fat.	10	24.3 ± 0.5
Lac.	10	24.3 ± 0.4
High fat Lac.	10	24.4 ± 0.4

Each value represents mean ± S.E.

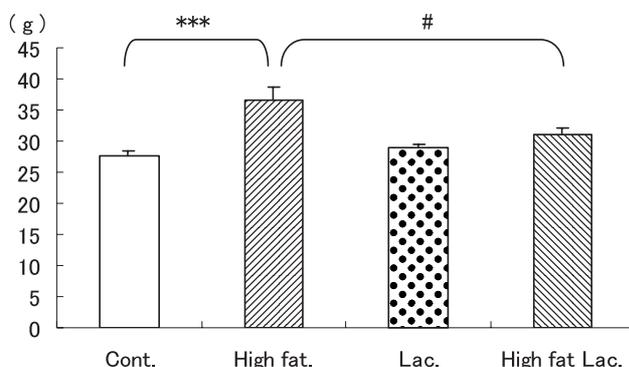


Fig. 2 Final body weight

***: Significant difference between the values of the control group and High Fat group ($p < 0.001$). #: Significant difference between the values of the High Fat group and High Fat Lac. group ($p < 0.05$).

2) 血清生化学検査

Table 2 に血清総たんぱく質、カルシウム、リンの結果を示した。各群間に有意な差は見られなかった。Table 3 に血清ALPの結果を示した。各群間に有意な差は見られなかったがHigh fat群に比しHigh fat Lac群において高い傾向が認められた。

Table 2 The level of serum Total protein, Calcium, Phosphorus,

Groups	n	Total protein (g/dl)	Calcium (mg/dl)	Phosphorus (mg/dl)
Cont.	10	4.84 ± 0.03	8.80 ± 0.10	9.13 ± 0.62
High fat	10	4.88 ± 0.06	9.07 ± 0.09	8.23 ± 0.63
Lac.	10	4.84 ± 0.09	8.91 ± 0.12	8.27 ± 0.73
High fat Lac.	10	4.97 ± 0.08	8.89 ± 0.15	8.87 ± 0.38

Each value represents mean ± S.E.

Table 3 The level of serum alkaline phosphatase

Groups	n	(IU/L)
Cont.	10	176.5 ± 10.57
High fat.	10	122.3 ± 9.19
Lac.	10	189.5 ± 21.29
High fat Lac.	10	159.0 ± 15.62

Each value represents mean ± S.E.

3) 小腸ALP活性測定

Table 4 に小腸ALP比活性を示した。小腸ALPにおいて、High fat群およびHigh fat Lac群はCont.群に比べ、低値傾向を示したが、有意な差はみられなかった。

Table 4 ALP specific activity of the small intestine

Groups	n	(U/mg protein)
Cont.	10	0.21 ± 0.05
High fat.	10	0.11 ± 0.02
Lac.	10	0.26 ± 0.02
High fat Lac.	10	0.12 ± 0.23

Each value represents mean ± S.E.

4) 腰椎の骨密度および骨強度計測

Table 5 に皮質骨密度、海面骨密度、全骨密度、骨梁密度を示した。いずれにおいても、各群間に有意な差は見られなかった。

力学的指標である平均断面 2 次モーメント (Fig. 3)、断面 2 次極モーメント (Fig. 4)、最小断面 2 次モーメント (Fig. 5) において、各群間に有意な差は見られなかった。

Table 5 BMD of lumber vertebrae

Group	n	Cortical BMD (mg/cm ³)	Cancellous BMD (mg/cm ³)	Total BMD (mg/cm ³)	Trabecular BMD (mg/cm ³)
Cont.	10	556.1 ± 10.8	349.8 ± 12.4	469.0 ± 12.4	497.0 ± 10.0
High fat.	10	551.9 ± 11.2	343.9 ± 7.2	460.5 ± 9.2	481.3 ± 7.2
Lac.	10	578.4 ± 7.1	356.7 ± 7.4	481.2 ± 6.3	499.1 ± 6.2
High fat Lac.	10	558.6 ± 10.0	358.5 ± 11.2	478.7 ± 9.2	492.5 ± 9.8

Each value represents mean ± S.E.

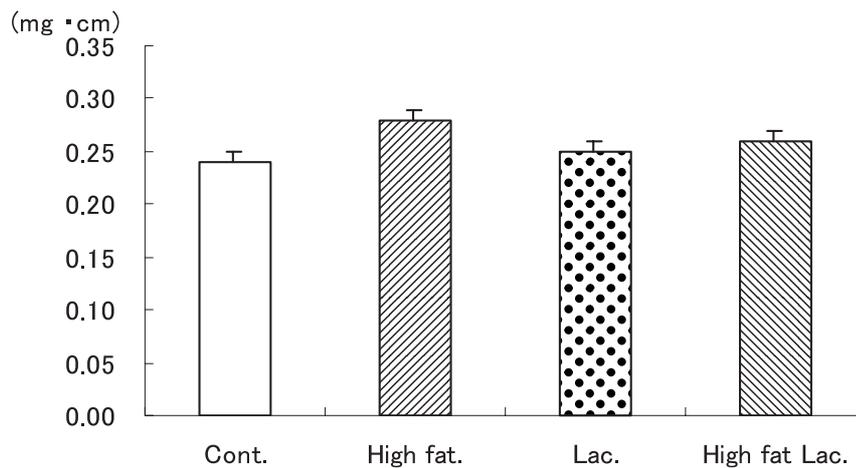


Fig. 3 Mean cross-sectional moment of inertia of lumber vertebrae

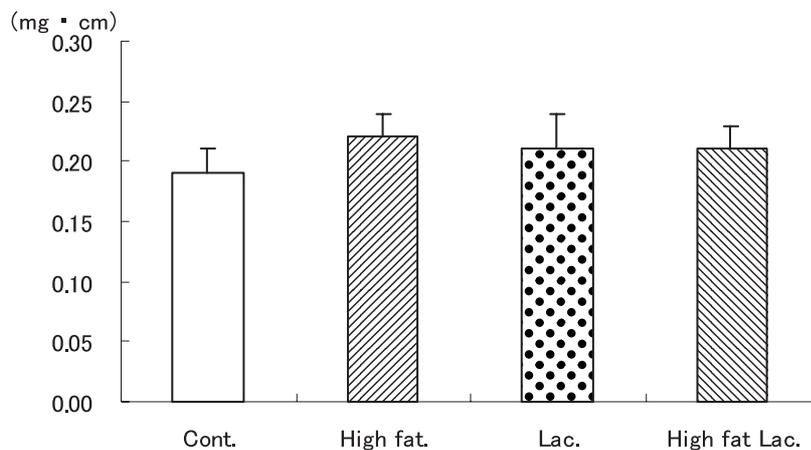


Fig. 4 Minimum cross-sectional moment of inertia of lumber vertebrae

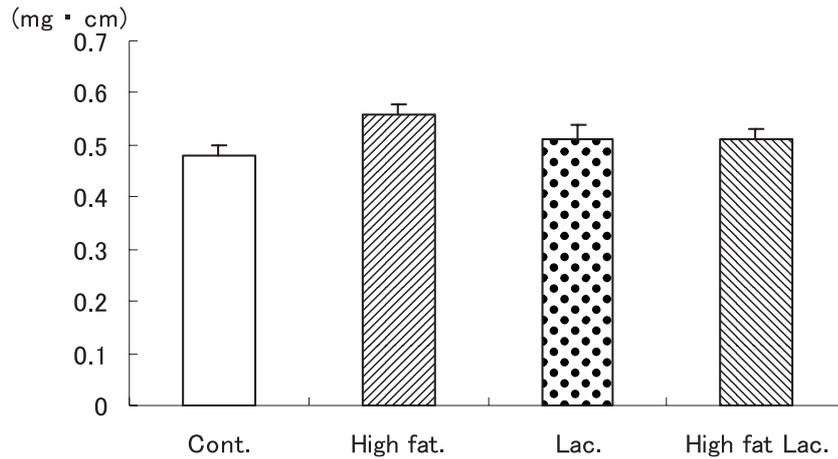


Fig. 5 Polar moment of inertia of lumber vertebrae

5) 大腿骨成分

Table 6 に新鮮重量、乾燥重量、灰化重量を示した。いずれにおいても、各群間に有意な差は見られなかった。

Table 7 に大腿骨中のCa, P量を示した。いずれにおいても各群間に有意な差は見られなかった。

Table 6 Weight of left femur

Group	n	Fresh weight (g)	Dry weight (g)	Ash weight (g)
Cont.	10	0.083±0.002	0.051±0.001	0.034±0.001
High fat	10	0.089±0.002	0.054±0.002	0.037±0.001
Lac.	10	0.087±0.003	0.054±0.002	0.036±0.001
High fat Lac.	10	0.087±0.002	0.053±0.001	0.037±0.001

Each value represents mean±S.E.

Table 7 Calcium and Phosphorus contents of femur

Group	n	Calcium (mg)	Phosphorus (mg)	Ca/Dry weight (%)	P/Dry weight (%)	Ca/P
Cont.	10	12.0±0.3	6.1±0.2	23.5±0.4	11.9±0.3	1.97±0.04
High fat.	10	12.6±0.6	6.2±0.2	23.5±0.8	11.6±0.3	2.03±0.06
Lac.	10	12.4±0.3	6.1±0.2	23.3±0.6	11.4±0.2	2.04±0.05
High fat Lac.	10	12.3±0.2	6.3±0.1	23.3±0.3	11.9±0.2	1.97±0.04

Each value represents mean±S.E.

4. 考察

今回の研究は、乳糖（ラクトース）投与による減量・抗肥満効果について、マウスを用いたin vivo系で生体内での効果を明らかにすることを目的とした。

脂質エネルギー比率を40%に調整したHigh fat群は、Cont.群に比べて有意な体重増加を示した。しかし、High fat食の飼料重量の10%をラクトースに置き換えたHigh fat Lac.群は、High fat群に比べ、有意な体重減少を示した。このことから、ラクトースが高脂肪食中の脂肪吸収を抑え、体重増加を抑制していることが明らかとなった。一方、Lac.群とCont.群間には、体重増加量において有意な差はみられなかった。したがって、ラクトースによる飼料効率低下作用は、高脂肪食を摂取した時だけに起こるものと考えられる。

乳製品摂取による抗肥満効果については、乳製品中に含まれるカルシウムが関与しているという報告もある。Zemel et al.は食事誘導性肥満マウスであるagouti遺伝子トランスジェニックマウスを用いた実験で、カルシウム1.2%高脂肪食群は、カルシウム0.4%高脂肪食のコントロール食群に比べて、内臓脂肪量が有意に減少することを報告している⁶⁾。そして、食事時のカルシウムの増加によって、脂肪細胞内へのカルシウムイオン流入が抑制され、また、エネルギー代謝も調節され、肥満リスクが減少するという仮説を立てた。さらに、コントロール食のカゼインを脱脂粉乳に置き換えたカルシウム1.2%高脂肪・脱脂粉乳食群と、カルシウム2.4%高脂肪・脱脂粉乳食群をカルシウム1.2%高脂肪コントロール食群と比較すると、内臓脂肪量が有意に減少し、特にカルシウム2.4%食群では顕著に減少することを報告している⁶⁾。Zemel et al.は肥満患者に対する介入試験においても、高カルシウム食による体重減少効果を明らかにし、さらに乳製品摂取によって体重減少効果が増強されることを報告している⁷⁾。つまり、カルシウム増加による肥満抑制効果のみならず、脱脂粉乳など乳製品に含まれるカルシウム以外の成分によっても肥満抑制効果があることを示唆している。

Mirmiran P. et al.は、乳製品消費量と体格指数であるBMIに逆相関があることを報告している⁸⁾。今回の我々のデータによって脱脂粉乳および乳製品に含まれているラクトースに抗肥満効果があることが示唆された。牛乳中に含まれる乳糖の効果としては、カルシウム吸収促進効果および骨代謝改善効果が報告されている¹⁻³⁾。ラクトースのCa吸収促進作用については諸説あり、小腸の絨毛組織のCa透過性を強めるという説³⁾、腸内乳酸菌が増加することにより腸内pHが低下し、Ca吸収を促進するという説⁹⁾、ラクトースがキレートや複合体を形成するという説¹⁰⁾などが報告されている。しかし、そのメカニズムについては、いまだ不明な点が多く残されている。われわれは、すでに先行研究において乳糖投与により、ラットの腸アルカリホスファターゼ（ALP）活性の有意な上昇およびmRNA発現増強を明らかにしてきた⁴⁾。先行研究は、ラクトースによる小腸ALPの誘導効果を明らかにできた最初の報告である。小腸ALPの生理機能はいまだ明らかではないが、骨に存在する臓器非特異型ALPは、先天的なTNSALP遺伝子の異常である低ホスファターゼ症（hypophosphatasia: HOPS）の研究¹¹⁻¹⁷⁾から骨石灰化に関与している可能性があると考えられている。小腸ALPは、脂肪

食投与によって誘導されることが報告されており¹⁸⁾、食餌中の栄養素の影響を強く受ける酵素であると考えられる。また、小腸ALP遺伝子のノックアウトマウスが作成され、高脂肪食で飼育した場合、野生型マウスに比べ、体重増加量、小腸上皮における脂肪のトランスポートの増加、血清トリグリセライドの上昇が確認されており、小腸ALPが脂肪の吸収を調節している可能性が示された⁵⁾。しかし、今回マウスを用いた実験ではラクトースによる小腸ALP活性の上昇はみられなかった。さらに、高脂肪食および高脂肪・ラクトース食では、コントロール食に比べて小腸ALP比活性が低下傾向にあった。高脂肪食群と高脂肪・ラクトース食群では小腸ALP活性に有意な差はみられなかった。このことからラクトースによる抗肥満効果は、脂質代謝の改善効果であると考えられるが、小腸ALP活性を介さない他の経路による脂質代謝改善効果であることが示唆された。

今回、普通脂肪食のラクトース群、高脂肪食のラクトース群ともにコントロール群と比較して、飼料摂取量に差はみられなかった。つまり、摂取量が同じであっても脂肪吸収量がラクトースによって減少した可能性が示唆された。脂肪が吸収され、体内に蓄積される代謝経路に乳糖が直接または間接的に関与している可能性が示唆された。つまり、ラクトースの存在が直接的に脂肪吸収を妨げる作用や、乳糖が腸内細菌によって分解されることによって腸内環境が変化することによる間接的作用などが考えられる。ラクトースによる脂肪吸収抑制作用については更に検討を進めていく必要がある。

最近の研究で、膵β細胞からのインスリン分泌を増強する消化管ホルモンであるGastric inhibitory polypeptide (GIP) と肥満の関連が示唆された。GIP受容体欠損マウスでは高脂肪食で飼育しても、野生型マウスにみられるような体重増加はみられず、通常食を摂取した場合と同様の体重であるという研究報告がなされている(19)。今後の研究では、ラクトースによる脂質代謝に対する影響をGIPなど脂質代謝に関わる物質について遺伝子レベルで明らかにしたいと考えている。

本研究は、肥満による生活習慣病予防にラクトースを含んだ乳製品の摂取が貢献できることを示唆した最初の報告である。ラクトースは、通常量の脂肪食摂取時には脂質代謝へ影響することはなく、高脂肪食摂取時の脂肪吸収量が過剰になった際に脂質吸収を抑える作用があることが示唆された。脂肪摂取量、特に飽和脂肪酸の摂取量の増加が指摘されている現代人の食生活にとって、ラクトースは大変有効な抗肥満効果を示す牛乳成分であると考えられる。

謝 辞

本研究は日本女子大学家政学部食物学科五関正江博士との共同研究としておこなわれた。

参考文献

- 1) Greger JH, Gutkowski CM, Interaction of lactose with calcium, magnesium, and zinc in rats. J Nut 1989; 119:1691-1697.

- 2) Armbrecht HJ. Age and the effects of lactose on calcium and phosphorus uptake by rat small intestine. *Nutr Res* 1987; 7:1169-77.
- 3) Buchoski MS, Miller DD. Lactose, calcium source and age affect calcium bioavailability in rats. *J Nutr* 1991; 121:1746-54.
- 4) Sogabe N, Mizoi L, Asahi K, Ezawa I, Goseki-Sone M. Enhancement by lactose of intestinal alkaline phosphatase expression in rats. *Bone*. 2004 Jul;35 (1) :249-55.
- 5) Narisawa S, Huang L, Hasegawa H, Alpers DH, Millan JL. Accelerated fat absorption in intestinal alkaline phosphatase knockout mice. *Mol Cell Bio*. 2003; 7525-7530.
- 6) Zemel MB, Shi H, Greer B, Dirienzo D, Zemel PC. Regulation of adiposity by dietary calcium. *FASEB J*. 2000 Jun;14 (9) :1132-8.
- 7) Zemel MB, Thompson W, Milstead A, Morris K, Campbell P. Calcium and dairy acceleration of weight and fat loss during energy restriction in obese adults. *Obes Res*. 2004 Apr;12 (4) :582-90.
- 8) Mirmiran P, Esmailzadeh A, Azizi F. Dairy consumption and body mass index: an inverse relationship. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2005 Jan;29 (1) :115-21.
- 9) Birlouez-Aragon I. Effect of lactose hydrolysis on calcium absorption during duodenal milk perfusion. *Nutr.Dev*. 1998; 28: 1465-1472.
- 10) Bronner F. Intestinal calcium absorption: mechanisms and applications. *J Nutr*. 1987; 117:1347-1352
- 11) Orimo H, Hayashi Z, Watanabe A, Hirayama T, Hirayama T, Shimada T. Novel missense and frameshift mutations in the tissue-nonspecific alkaline phosphatase gene in a Japanese patient with hypophosphatasia. *Hum Mol Genet* :1994; 3:1683-1684.
- 12) Orimo H, Goseki-Sone M, Sato S, Shimada T. Detection of deletion 1154-1156 hypophosphatasia mutation using TNSALP exon amplification. *Genomics*. 1997; 42:364-366.
- 13) Goseki-Sone M, Orimo H, Iimura T, Takagi Y, Watanabe H, Taketa K, Sato S, Mayanagi H, Shimada T, Oida S. Hypophosphatasia: identification of five novel missense mutations (G507A, G705A, A748G, T1155C, G1320A) in the tissue-nonspecific alkaline phosphatase gene among Japanese patients. *Hum Mutat Suppl* 1998; 1:S263-S267.
- 14) Goseki-Sone M, Orimo H, Iimura T, Miyazaki H, Oda K, Shibata H, Yanagishita M, Takagi Y, Watanabe H, Shimada T, Oida S. Expression of the Mutant (1735T-del) tissue-nonspecific alkaline phosphatase gene from hypophosphatasia patients. *J Bone Miner Res* 1998; 13:1827-1834.
- 15) Orimo H, Girschick HJ, Goseki-Sone M, Ito M, Oda K, Shimada T. Mutational analysis and functional correlation with phenotype in German patients with childhood-type

hypophosphatasia. *J Bone Miner Res* 2001; 16:2313-2319.

- 16) Orimo H, Goseki-Sone M, Inoue M, Tsubakio Y, Sakiyama T, Shimada T Importance of deletion of T at nucleotide 1559 in the tissue-nonspecific alkaline phosphatase gene in Japanese patients with hypophosphatasia. *J Bone Miner Metab* 2002 ; 20: 28-33.
- 17) Watanabe H, Goseki-Sone M, Orimo H, Hamatani R, Takinami H, Ishikawa I Function of mutant (G1144A) tissue-nonspecific ALP gene from hypophosphatasia. *J Bone Mine Res* 2002; 17:1945-1948.
- 18) Goseki-Sone M, Oida S, Iimura T, Yamamoto A, Matumoto NH, Omi N, Takeda K, Maruoka Y, Ezawa I, Sasaki S. Expression of mRNA encoding intestinal type alkaline phosphatase in rat liver and its increase by fat-feeding. *Liver* 1996; 16:358-364.
- 19) Miyawaki K, Yamada Y, Yano H, Seino Y et al. Glucose intolerance caused by a defect in the entero-insular axis : A study in gastric inhibitory polypeptide receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999, 96:14843-14847.