

乳成分による肥満モデルマウスのインスリン抵抗性 改善効果に関する研究

大妻女子大学家政学部：青江 誠一郎

要 約

【実験 1】

乳より調製したカルシウムと乳糖を遺伝性肥満マウスに摂取させ、内臓脂肪型肥満および耐糖能にどのような影響を及ぼすかを検討した。

4週齢雄のKK/Taマウスを用い、1週間の予備飼育後、1群8匹の4群に群分けした。脂肪エネルギー比50%の高脂肪食に炭酸カルシウムとミセル性リン酸カルシウム(MCP)をCaとして0.5%添加した飼料を摂取させた。また、乳中の他の因子の影響を調べるため、ショ糖5%添加群と乳糖5%添加群を設けた。各飼料は、50日間自由摂食させて比較した。実験48日目に6時間絶食後、耐糖能試験を行った。マウスは4時間絶食後、エーテル麻酔下で採血し、肝臓、腹腔内脂肪を摘出後、重量を測定した。血清生化学値は酵素法により、血清ホルモン濃度はELISA法により測定を行った。肝臓脂質はFolch法により抽出後、同様に酵素法で分析した。各脂肪組織は、コールターカウンター(マルチサイザー-3)によって脂肪細胞の大きさの測定を行った。統計解析は、カルシウムと糖質を因子とした二元配置分散分析により行った。

各群のマウスはいずれも肥満を呈したが、終体重はショ糖食と比べて乳糖食で有意に低かった。一方、各群の腹腔内の脂肪組織重量には有意差はなかった。また、血清レプチン濃度および空腹時血糖は、乳糖食で有意に低かった。肝臓重量、肝臓コレステロールおよびトリグリセリド蓄積量は、MCP群で有意に低かった。さらに、後腹壁脂肪は、MCP群で脂肪細胞の平均サイズが有意に小さく、肥大化が抑制された。血清インスリン濃度は、乳糖・MCP群で有意に低く、相乗作用が認められた。

以上の結果より、乳糖はショ糖に比べて体重増加を抑制し、血糖値を低下させることが示された。また、MCPは肝臓の脂質蓄積および脂肪細胞の肥大化を抑制することが示された。これらは、カルシウム代謝ホルモンおよび糖代謝ホルモンの分泌を介して脂質蓄積を抑制したと推定した。すなわち、MCPと乳糖を含む食品である乳製品の摂取が、脂肪蓄積の抑制や耐糖能の改善に相乗的效果があることが示唆された。

【実験 2】

実験 2 では、乳由来カルシウムおよび乳糖の摂取が、ストレプトゾトシン微量投与によるⅡ型糖尿病モデルマウスにおいてどのような影響を及ぼすのかを検討した。

実験動物は4週齢のC57BL/6Jマウスを用い、1週間の予備飼育後、1群8匹の4群に群分けし、ストレプトゾトシン(STZ)微量投与(70mg/kg体重)により2型糖尿病を誘発させた。また、STZを投与しない群を6匹設けた。実験飼料は、脂肪エネルギー比50%の高脂肪食に炭酸カルシウムまたはレンネットカゼインより調製したミセル性リン酸カルシウム(MCP)をCaとして0.5%配合し、さら

に、ショ糖5%添加群と乳糖5%添加群を設け、各飼料を30日間自由摂取させた。実験28日目に6時間絶食後、耐糖能試験を行った。31日目に4時間絶食後、エーテル麻酔下で採血し、肝臓、腹腔内脂肪組織を摘出後、重量を測定した。血清生化学値は酵素法で分析した。肝臓脂質はFolch法により抽出し血清と同様に測定した。血清ホルモン濃度はELISA法で分析した。脂肪組織は、コールターカウンター（マルチサイザー3）により脂肪細胞の大きさの測定を行った。統計解析は、カルシウムと糖質を因子とした二元配置分散分析により行った。

終体重、腹腔内脂肪量、血清遊離脂肪酸濃度、血清レプチン濃度、AUC、脂肪細胞サイズ、はMCP群で有意に低かった。肝臓重量および血清インスリン濃度はショ糖食においてMCP群が有意に低かったが、乳糖食においてはMCPの影響が検出できなかった。空腹時血糖値は乳糖食で有意に低かった。また、血清インスリン濃度は腹腔内脂肪重量および血清レプチン濃度との間に正の相関を示した。

以上の結果から、乳由来のカルシウムであるMCPの摂取は腹腔内脂肪の蓄積を抑制する作用があることが示された。これは、2型糖尿病モデルマウスにおいてMCPの摂取がインスリン上昇を抑制し、脂肪細胞における脂肪合成が抑制されたためであると考えられた。また、本研究では乳糖の有無がMCPの効果に影響を示したものであり、カルシウム単独で摂取するよりも牛乳として複数の有効成分を摂取することが有効であると考えられた。

序 論

日本において、肥満者および生活習慣病疾患者の増加が問題視されるようになり、生活習慣病の予防や重症化の予防を目的として平成20年4月より特定健診・特定保健指導が行われるようになった。平成20年度の国民健康・栄養調査の結果では男性における肥満者は40代が最も多く35.9%、女性では70歳代以上が最も多く26.8%であった¹⁾。男性肥満者の増加傾向は鈍化しつつあるものの依然高い割合であり、これと同様にメタボリックシンドローム（内臓脂肪症候群）が強く疑われる者または予備群と考えられる者の割合が高い。日本におけるメタボリックシンドロームの基準は2005年に定められ、内臓脂肪型肥満に加え、高血糖、高血圧、脂質異常のうち2つ以上があてはまると同症候群と診断される。40〜74歳の男性で2人に1人、女性の5人に1人が基準にあてはまると報告された¹⁾。

内臓脂肪型肥満がメタボリックシンドロームの根底にある理由は、内臓脂肪がトリグリセリドを蓄積しやすく、またそれを燃焼しやすい脂肪組織であるということである。従って、内臓脂肪を蓄積した人からは空腹時に遊離脂肪酸やグリセロールが過剰に分泌され、脂質異常症や高血糖を引き起こす。これに加え、内臓脂肪から分泌される生理活性物質（アディポサイトカイン）が動脈硬化を引き起こす要因となる。蓄積した脂肪の中に酸化性のストレスが現れ、このストレスが肥満に関与したメタボリックシンドロームの一因となる^{2~5)}。また、酸化性のストレスは肥満により増加し、蓄積された脂肪の酸化性のストレスの増加は、アディポサイトカインの調節不全の原因となる²⁾。

メタボリックシンドロームの成因には、遺伝的背景、生活環境因子がある。生活環境因子には食事も含まれ、食事を改善することはメタボリックシンドロームのリスク因子を改善することにつながる。このような背景から、食品中の抗肥満成分やメタボリックシンドロームを予防する食

事因子が注目され、研究されるようになった。今回の研究テーマであるカルシウムもその一つである。McCarron⁶⁾らはNAHNES (National Health and Nutrition Examination Survey) データから乳製品が主体のカルシウム摂取と体重には負の相関がある事を報告した。また、CARDIA

(Coronary Artery Risk Development in young Adults) 研究では、ヒト介入試験において乳製品の摂取とBMIを含むインスリン抵抗性症候群のすべての要素との間に負の相関があることが示された⁷⁾。いくつかの観察研究では、カルシウムの摂取または乳製品の摂取と体重や体組成、またはその両方に負の相関があると示されているが^{8~13)}、注目すべきことは、乳製品を摂取した場合に影響が大きいということである。炭酸カルシウムと比較すると、乳由来のカルシウムは、食事誘発性肥満の著しい減少と、マウスと人間の両方におけるエネルギー制限中の体重と脂肪の減少が顕著であると報告された^{14~16)}。Sun¹⁷⁾らは、乳製品以外のものからカルシウムを与えたものに比べて、乳製品を与えたものは脂質生成の抑制や脂肪分解に対する影響が大きく、乳製品のカルシウムがカルシウムの中でも抗肥満に対して最も大きな影響を与えると報告した。このように、カルシウムの抗肥満効果について数多く報告されている一方で、否定的な報告も多くある。人種や食習慣、エネルギー摂取などが様々であることや、米国ではカルシウムの代用指標として乳製品が使われていることなど検討すべき点は多く、疫学調査では一定の見解が得られていない。乳中のカルシウムが独立して、あるいは乳中に含まれる他の成分と相乗的に体脂肪蓄積に影響をあたえるのかは未だ明らかとなっていない。また、内臓脂肪型肥満に伴う耐糖能の異常に対してカルシウムがどのように関係するかという研究はほとんど行われていない。

そこで本研究では、乳中のカルシウムの主要形態であるミセル性リン酸カルシウム (MCP) と炭酸カルシウムの2種類のカルシウムを用い、カルシウムの質の違いによる影響を検討した。また、カルシウムの吸収促進因子の一つである牛乳中の乳糖にも着目し、相乗作用の検討も行った。

実験1では、脂肪を蓄積しやすい遺伝性肥満モデルマウス (KK/Taマウス) を用いて評価した。KKマウスの雄は一般飼料でも生後17~18週齢で80%前後が尿糖陽性を示す。血糖値の上昇は体重が35~40gを超える頃に発現することから体脂肪の蓄積 (肥満) が高血糖発症の一義的役割を果たしていると考えられる。これらの症状は複数の遺伝子の関与によって発症すると考えられている。

実験2では、近年報告されたストレプトゾトシン微量投与による2型糖尿病モデルマウスを用いて、インスリン分泌や耐糖能等の糖尿病指標に注目することで、カルシウム摂取と脂肪蓄積の関係メカニズムについて、さらなる解明を試みた。

実験方法

【実験1】

1. カルシウム

対照群のカルシウム源は、炭酸カルシウム (炭酸Ca) を用いた。カルシウム含量は40%であった。ミセル性リン酸カルシウム (MCP) は牛乳カルシウムの主要形態である。カゼインのリン酸基を介してカゼイン分子を架橋し、カゼインミセルと呼ばれるコロイド粒子の構造維持のため、重要な役割を果たしている。本実験では、レンネットカゼインをトリプシンで分解後、酸性化して不溶性のペプチドを除き、上澄み液をアルカリ性にして限外濾過で不要なペプチドを除去し、調製したもの¹⁸⁾を用いた。カルシウム含量は12.7%、タンパク質含量は61.7%であった。FIGURE1-1

に調製法を示す。

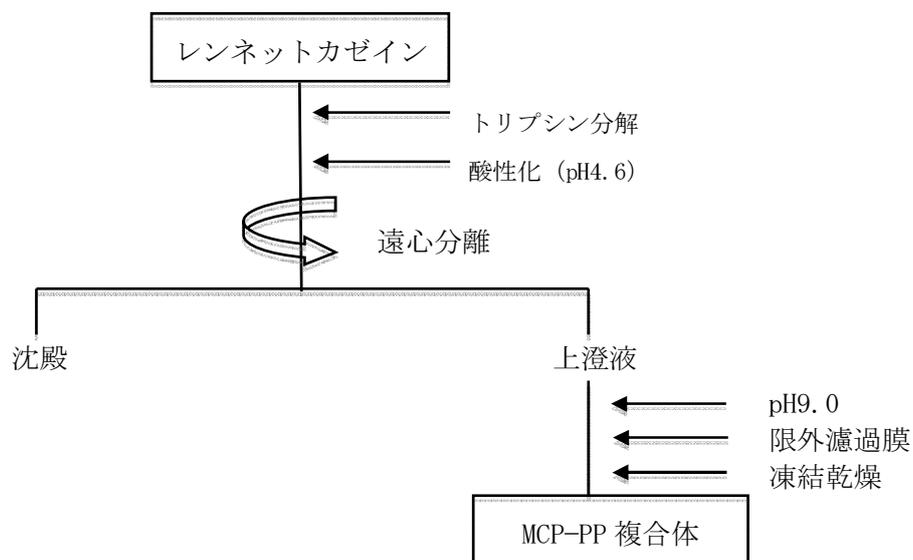


FIGURE1-1 限外濾過を利用したMCP-PP複合体の調整法¹⁸⁾

MCP-PP : ミセル性リン酸カルシウム

2. 動物実験

実験飼料の組成をTable1-1に示す。AIN-93G組成を基本とし、脂肪エネルギー比が50%となるようにラードを配合した高脂肪食を用いた。カルシウム源として、炭酸カルシウムまたはミセル性リン酸カルシウムをカルシウム含量が500mg/100gとなるように配合した。また、ショ糖または乳糖を5%添加し、計4種類の飼料を作成した。

4週齢オスKK/Taマウスを用い、1週間の予備飼育後、1群8匹の4群に群分けした。Table1-1に示した実験飼料と水を50日間自由摂食させた。なお、飼育環境は室温 $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $50\pm 5\%$ 、12時間明暗サイクル(8-20時)とした。

実験最終前週より5日分の糞を採取し、カルシウム量を測定した。実験48日目に6時間絶食後、耐糖能試験(GTT)を行った。耐糖能試験は、グルコース1g/kg体重となるように腹腔内注射をし、0分、15分、30分、60分、120分の計5回tail bleedingにより採血を行った。解剖当日は、体重と飼料摂取量を測定後、4時間絶食後、エーテル麻酔下で開腹して心臓より血液を採取し、肝臓、後腹壁脂肪、副睾丸周辺脂肪、腸間膜脂肪を摘出し、重量を測定した。その後、肝臓は凍結乾燥後重量を測定して粉碎し、後腹壁脂肪、副睾丸周辺脂肪、腸間膜脂肪は1%4酸化オスミウム溶液で固定し、それぞれの分析用の試料とした。

Table1-1飼料組成

	シヨ糖		乳糖	
	CaCO ₃	MCP	CaCO ₃	MCP
カゼイン	200	163.4	200	163.4
L-シスチン	3	3	3	3
コーンスターチ	161.501	168.946	158.901	166.346
αコーンスターチ	132	132	132	132
シヨ糖	100	100	50	50
乳糖(1水和物)	0	0	52.6	52.6
大豆油	70	70	70	70
ラード	200	200	200	200
セルロース	50	50	50	50
AIN-93G特殊ミネラル混合*	35	35	35	35
CaCO ₃	12.495	0	12.495	0
MCP-PP	0	50	0	50
MgO	0.84	0.84	0.84	0.84
KH ₂ PO ₄	18.45	8	18.45	8
KCL	4.2	6.3	4.2	6.3
AIN-93ビタミン混合	10	10	10	10
重酒石酸コリン	2.5	2.5	2.5	2.5
t-ブチルヒドロキノン	0.014	0.014	0.014	0.014

*CaCO₃,KH₂PO₄,MgOを含まないミネラル混合

3. 血清生化学分析

採血した血液は、血清を分離し、血清コレステロール、血清トリグリセリド、遊離脂肪酸、血糖は酵素法にて分析した。血清総コレステロールの定量は、「コレステロールE-テストワコー」、血清トリグリセリドの定量は「トリグリセライドE-テストワコー」、血清遊離脂肪酸の定量は「NEFAC-テストワコー」、血糖値の定量は「グルコースCII-テストワコー」(いずれも和光純薬工業株式会社)を用いた。

4. 肝臓脂質の分析

肝臓を凍結乾燥後粉碎し、0.4~0.6g精秤し、クロロホルム:メタノール(2:1)溶液を用いたFolch法により肝臓脂質を抽出した。クロロホルム:メタノール:水(3:48:47)で調製したFolch水洗用ブランクを用いて可溶性塩類等を除去した後、ドラフト内で窒素気流下によって溶媒を除去(60℃恒温槽)し、10%TritonX-100を含むイソプロパノールに溶解して検液とした。コレステロール、トリグリセリド濃度を酵素法にて分析し、肝臓脂質量を算出した。

5. 糞中カルシウム

糞を乾燥・粉碎後、0.1g精秤し、マッフル炉550℃で灰化し、1N硝酸を加え乾固してマッフル炉で再び4時間加熱した。次に、6N塩酸を加え乾固後、1N硝酸で20mlに定容し、原子吸光法で分析した。

6. 脂肪細胞のサイズの計測

後腹壁脂肪組織、副睪丸周辺脂肪組織、腸間膜脂肪組織をそれぞれ1% 4酸化オスミウム溶液で固定し、200メッシュと20メッシュのフィルターで固定された脂肪細胞をリン酸緩衝生理食塩水で水洗・回収後、コールターカウンター(ベックマンコールター社、マルチサイザー3)を用いて1000個の脂肪細胞の大きさと分布の測定を行った。

7. 血清ホルモン濃度の分析

採血した血液は、血清を分離し、血清インスリン濃度、血清PTH濃度、血清レプチン濃度、血清アディポネクチン濃度をELISA法で分析した。血清インスリン濃度の定量は「レビス インスリン-マウス (Hタイプ)」、血清PTH濃度の定量は「Mouse Intact PTH ELISA KIT」、血清レプチン濃度の定量は「マウスレプチンイムノアッセイキット」、アディポネクチン濃度は「レビス 高分子アディポネクチン-マウス/ラット」をそれぞれ用いた。

8. 統計分析

すべての測定結果は平均値±標準偏差で示した。統計解析は、カルシウムと糖質を因子とした二元配置分散分析ならびに相関分析を行った。有意水準は5%とした。統計解析はJMP ver9.0を用いた。

【実験2】

1. カルシウム

実験1と同様のカルシウムを用いた。

2. 動物実験

実験動物は4週齢のC57BL/6Jマウスを38匹用い、1週間の予備飼育後、体重により1群8匹の4群に群分けし、ストレプトゾトシン(STZ)微量投与(70mg/kg体重)により膵臓B細胞に損傷を与えることにより2型糖尿病を誘発させた。また、STZを投与しない(無投与)群を6匹設けた。実験飼料はAIN-93G組成を基本とし、脂肪エネルギー比が50%になるようにラードを添加した高脂肪食に、炭酸カルシウム(炭酸Ca) またはミセル性リン酸カルシウム(MCP-PP)をCaとして0.5%配合し、さらに、それぞれにショ糖を5%添加したショ糖食と乳糖を5%添加した乳糖食を設けた。また、STZ無投与群にはAIN-93G組成の飼料(ラード無添加、炭酸Ca、ショ糖を配合)を用いた。実験飼料の組成をTable2-1に示す。各飼料と水をそれぞれ30日間自由摂取させ、体重と飼料摂取量を2~3日置きに測定した。飼育環境は、室温 $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 5^{\circ}\text{C}$ 、12時間明暗サイクル(8時~20時)とした。

実験29日目に6時間絶食後、耐糖能試験(GTT)を行った。また、実験最終前週より6日分の糞を採取した。実験31日目に4時間絶食後、エーテル麻酔下で開腹、心臓より採血し、肝臓、後腹壁脂肪、副睪丸周辺脂肪、腸間膜脂肪を摘出し、重量を測定した。血液は血清を遠心分離後、 -80°C で保存した。肝臓は凍結乾燥後、重量測定、粉碎し、各種腹腔内脂肪組織は必要量を採取し、それぞれの分析用試料とした。

Table2-1 飼料組成

	(g/kg diet)				
	無投与	シヨ糖		乳糖	
		CaCO ₃	MCP	CaCO ₃	MCP
カゼイン	200	200	163.4	200	163.4
L-シスチン	3	3	3	3	3
コーンスターチ	397.49	161.501	168.946	158.901	166.346
αコーンスターチ	132	132	132	132	132
シヨ糖	100	100	100	50	50
乳糖(1水和物)	0	0	0	52.6	52.6
大豆油	70	70	70	70	70
ラード	0	200	200	200	200
セルロース	50	50	50	50	50
AIN-93G特殊ミネラル混合*	35	35	35	35	35
CaCO ₃	12.495	12.495	0	12.495	0
MCP-PP	0	0	50	0	50
MgO	0.84	0.84	0.84	0.84	0.84
KH ₂ PO ₄	18.45	18.45	8	18.45	8
KCL	4.2	4.2	6.3	4.2	6.3
AIN-93ビタミン混合	10	10	10	10	10
重酒石酸コリン	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
t-ブチルヒドロキノン	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014

*CaCO₃,KH₂PO₄,MgOを含まないミネラル混合

3. 血清生化学値と血清ホルモン濃度の分析

総コレステロール、トリグリセリド、遊離脂肪酸、グルコース濃度は酵素法にて分析した。また、副甲状腺ホルモン(PTH)、インスリン、レプチン、アディポネクチン濃度はELISA法にて測定した。試薬は実験1と同一のメーカーのものを用いた。

4. 耐糖能試験

実験29日目に9:00より6時間絶食後、20%グルコース溶液を1g/kg体重となるように腹腔内投与し、経時的に尾部より採血し、電極法で0、15、30、60、120分の血糖値を測定し、血中濃度-時間曲線下面積(AUC)を求めた。

5. 肝臓脂質量の測定

肝臓を凍結乾燥後、粉碎し、0.15~0.20g精秤、クロロホルム:メタノール(2:1)溶液を用いたFolch法により、肝臓脂質を抽出した。クロロホルム:メタノール:水(3:48:47)で調製したFolch水洗用ブランクを用いて可溶性塩類等を除去した後、ドラフト内で窒素気流下によって溶媒を除去(60℃恒温槽)し、10%TritonX-100を含むイソプロパノールに溶解して検液とした。検液中の総コレステロール、トリグリセリド量を実験1と同様に酵素法にて分析し、肝臓脂質量を算出した。

6. 糞中カルシウムの分析

実験1と同様の方法で飼料および糞中カルシウム濃度を測定した。

7. 脂肪細胞サイズの計測

後腹壁脂肪、副睪丸周辺脂肪、腸間膜脂肪組織は約0.02gずつ採取し、オスミウム固定法により実験1と同様に測定した。

8. 統計解析

すべての測定結果は平均値±標準偏差で示した。STZ投与により2型糖尿病モデルとした4群において、カルシウムと糖質を因子とした二元配置分散分析と相関分析により、実験1と同様に解析した。

実験結果

【実験1】

1. マウスの成長結果

マウスの成長結果をTable1-2に示す。飼料摂取量はいずれの群も有意差は見られなかったが、終体重、体重増加量は糖質の比較において乳糖食で有意に低く、また飼料効率も乳糖食で低い傾向が見られた (P=0.06)。カルシウム比較においても、MCP群が炭酸Ca群に比べて体重が軽い傾向にあった (P=0.07)。

Table1-2 成長結果

	シヨ糖		乳糖		two-way ANOVA		
	CaCO ₃	MCP	CaCO ₃	MCP	Ca	Sugar	Ca × Sugar
初体重(g)	21.7±1.4	21.8±1.0	21.7±1.2	21.7±1.0	NS	NS	NS
終体重(g)	44.1±2.8	42.6±2.0	42.3±1.9	41.1±2.4	P=0.07	P<0.05	NS
体重増加量(g/d)	0.45±0.04	0.42±0.04	0.41±0.03	0.39±0.05	P=0.07	P<0.05	NS
飼料摂取量(g/d)	3.5±0.4	3.2±0.2	3.4±0.2	3.3±0.4	NS	NS	NS
飼料効率(%)	13.0±0.9	13.0±1.5	12.1±0.8	11.9±1.9	NS	P=0.06	NS

数値は平均値±標準偏差を表す

2. カルシウム排泄量および見かけのカルシウム吸収率

摂取カルシウム量、糞中カルシウム排泄量、カルシウムの見かけの吸収量および消化吸収率をTable1-3に示す。すべての項目において、いずれの群も有意差は見られず、カルシウムの吸収量は同等であった。

Table1-3 Caの排泄量と見かけの吸収率

	シヨ糖		乳糖		two-way ANOVA		
	CaCO ₃	MCP	CaCO ₃	MCP	Ca	Sugar	Ca × Sugar
摂取Ca量(mg/d)	17.3±2.1	16.1±1.1	17.2±1.2	16.5±2.2	NS	NS	NS
糞中排泄Ca量(mg/d)	12.1±3.0	10.5±1.5	11.8±1.6	11.0±3.0	NS	NS	NS
見かけのCa消化吸収量(mg/d)	5.2±1.0	5.7±0.7	5.3±0.4	5.5±0.8	NS	NS	NS
見かけの消化吸収率(%)	33.4±5.2	33.5±4.5	33.3±4.6	34.1±8.7	NS	NS	NS

数値は平均値±標準偏差を表す

3. 肝臓重量・脂肪組織重量

マウスの肝臓重量および腹腔内脂肪組織重量をTable1-4に示す。肝臓重量はカルシウムの比較においてMCP群で有意に低く (P<0.05)、糖質の比較において乳糖食で低い傾向が見られた (P=0.09)。後腹壁脂肪重量、副睪丸周辺脂肪重量、腸間膜脂肪重量はいずれの群も有意差は見られなかった。

Table1-4 肝臓重量および腹腔内脂肪組織重量

	シヨ糖		乳糖		two-way ANOVA		
	CaCO ₃	MCP	CaCO ₃	MCP	Ca	Sugar	Ca × Sugar
肝臓(g)	2.66±0.33	2.38±0.31	2.50±0.39	2.08±0.36	P<0.05	P=0.09	NS
後腹壁脂肪(g)	0.83±0.09	0.85±0.20	0.74±0.11	0.77±0.13	NS	NS	NS
副睾丸周辺脂肪(g)	1.63±0.15	1.47±0.23	1.48±0.21	1.53±0.18	NS	NS	NS
腸間膜脂肪(g)	1.03±0.07	1.03±0.13	1.01±0.21	0.93±0.19	NS	NS	NS

数値は平均値±標準偏差を表す

4. 血清生化学値と血清ホルモン濃度

血清生化学値と血清ホルモン濃度をTable1-5に示す。血清トリグリセリド濃度、遊離脂肪酸濃度は、いずれの群も有意差は見られなかった。血清総コレステロール濃度はMCP群・シヨ糖食および炭酸Ca群・乳糖食で有意に低かった。血清グルコース濃度は、カルシウムの比較においてMCP群が、糖質の比較において乳糖群が有意に低かった。血清インスリン濃度は、交互作用が有意となり、MCP群・乳糖食が炭酸Ca・乳糖食群に比べて有意に低く、カルシウムで比較するとMCP群で低い傾向が見られた (P=0.06)。血清レプチン濃度は、糖質の比較において乳糖食で有意に低かった。血清PTH、アディポネクチン濃度は、いずれの群も有意差は見られなかった。

Table1-5 血清生化学値と血清ホルモン濃度

	シヨ糖		乳糖		two-way ANOVA		
	CaCO ₃	MCP	CaCO ₃	MCP	Ca	Sugar	Ca × Sugar
総コレステロール(mg/dl)	157.6±11.2	136.3±20.9	134.5±13.9	151.1±20.9	NS	NS	P<0.05
トリグリセリド(mg/dl)	247.1±82.6	245.2±46.2	261.4±61.8	241.6±52.5	NS	NS	NS
遊離脂肪酸(mEq/l)	1.03±0.38	0.86±0.14	0.93±0.27	0.79±0.30	P=0.08	NS	NS
グルコース(mg/dl)	645.3±139.2	498.6±134.5	509.5±71.6	453.7±95.6	P<0.05	P<0.05	NS
インスリン(ng/ml)	47.5±13.9	57.7±36.3	72.6±23.7	27.5±15.2*	P=0.06	NS	P<0.05
レプチン(ng/ml)	78.0±10.7	83.0±6.6	73.3±7.0	75.8±6.4	NS	P<0.05	NS
PTH(pg/ml)	46.5±25.9	50.1±22.5	46.6±34.1	50.7±21.3	NS	NS	NS
アディポネクチン(ng/ml)	836.2±150.4	848.1±317.4	782.5±206.1	778.0±363.5	NS	NS	NS

数値は平均値±標準偏差を表す

*乳糖・CaCO₃群に比べて有意差あり(P<0.05)

5. 肝臓脂質

肝臓脂質をTable1-6に示す。肝臓重量あたりのコレステロール量およびトリグリセリド量はカルシウムの比較においてMCP群で有意に低かった。グラムあたりでは、コレステロール濃度がカルシウムの比較においてMCP群で有意に低く、また糖質の比較において乳糖食で低い傾向が見られた (P=0.07) が、トリグリセリド濃度ではいずれの群も有意差は見られなかった。相関分析の結果、肝臓コレステロール濃度と血清インスリン濃度(r=0.34, P=0.07)、肝臓トリグリセリド濃度と血清PTH濃度(r=0.50, P<0.05)に正の相関が見られ、肝臓脂質はカルシウムあるいは糖質の違いによるホルモン応答の差の影響を受けた可能性が示された。

Table1-6 肝臓脂質濃度

	シヨ糖		乳糖		two-way ANOVA		
	CaCO ₃	MCP	CaCO ₃	MCP	Ca	Sugar	Ca × Sugar
コレステロール(mg/liver)	35.0±2.2	28.7±6.1	32.7±6.0	21.0±8.1	P<0.05	P<0.05	NS
(mg/g liver)	13.5±1.2	12.7±2.0	13.2±1.3	10.4±2.2	P<0.05	P=0.07	NS
トリグリセリド(mg/liver)	296.1±63.4	256.0±76.1	277.8±109.8	174.9±91.7	P<0.05	NS	NS
(mg/g liver)	112.5±13.5	111.9±24.9	109.5±30.4	84.1±30.6	NS	NS	NS

数値は平均値±標準偏差を表す

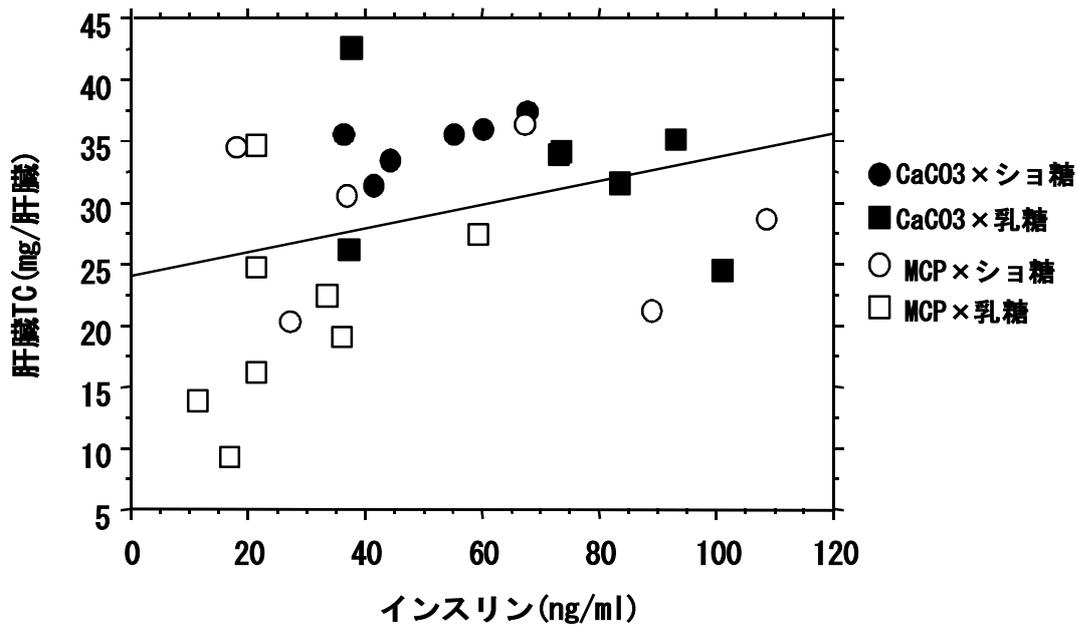


FIGURE1-2 肝臓 コレステロール濃度と血清インスリン濃度の関係

$r=0.34$ ($P=0.07$)

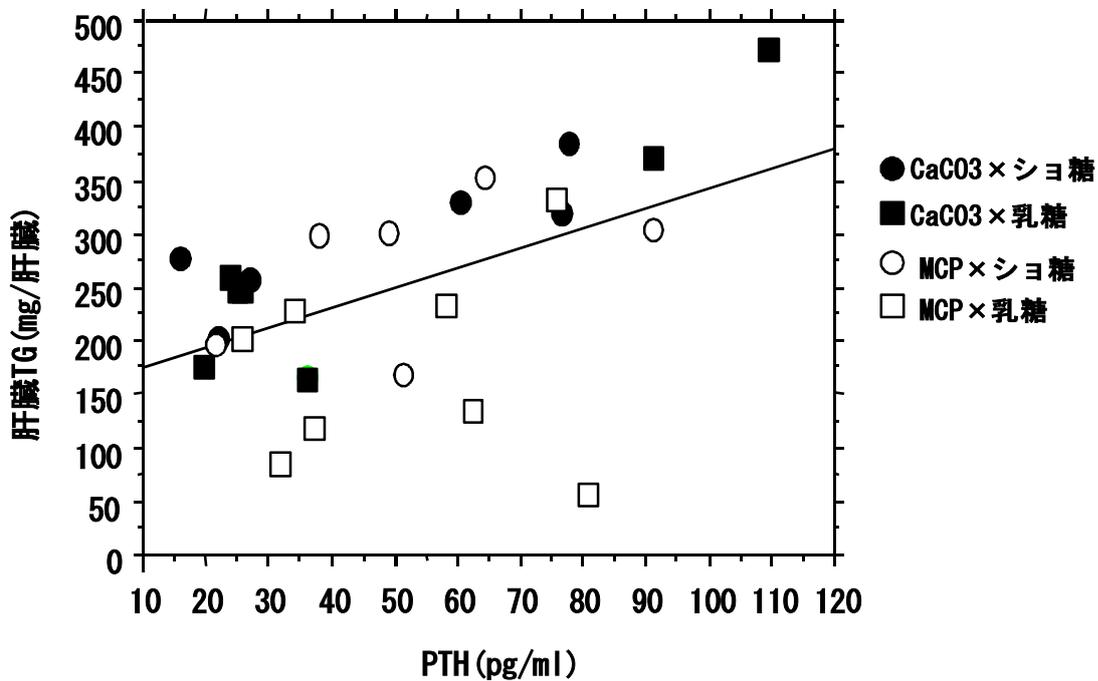


FIGURE1-3 肝臓トリグリセリド濃度と血清PTH濃度の関係

$r=0.50$ ($p<0.05$)

6. 耐糖能試験

耐糖能試験の結果をTable1-7に示す。GTT 0分値（空腹時血糖）は糖質の比較において乳糖食で有意に低かった。GTT120分値、曲線下面積（AUC）は、いずれの群も有意差は見られなかった。

Table1-7 耐糖能試験

	シヨ糖		乳糖		two-way ANOVA		
	CaCO ₃	MCP	CaCO ₃	MCP	Ca	Sugar	Ca × Sugar
GTT 0分 (mg/dl)	433.6±85.0	366.9±90.9	310.0±52.4	348.4±107.8	NS	P<0.05	NS
GTT Max (mg/dl)	574.0±43.1	527.9±66.8	520.7±73.7	557.4±46.6	NS	NS	P<0.05
GTT 120分 (mg/dl)	433.0±63.9	395.7±130.2	374.7±94.3	408.1±84.1	NS	NS	NS
AUC(Σmg/dl・分)	61803±6090	56139±9866	55640±10315	58753±6582	NS	NS	NS

数値は平均値±標準偏差を表す

7. 脂肪細胞のサイズ

脂肪細胞のサイズをTable1-8に示す。後腹壁脂肪組織では、カルシウムの比較においてMCP群が有意に小さかった。副睾丸周辺脂肪組織では、いずれの群にも有意差は見られなかった。腸間膜脂肪組織では、MCP群・シヨ糖食、炭酸Ca群・乳糖食で有意に低かった。

Table1-8 脂肪細胞サイズ

	シヨ糖		乳糖		two-way ANOVA		
	CaCO ₃	MCP	CaCO ₃	MCP	Ca	Sugar	Ca × Sugar
後腹壁脂肪細胞サイズ(μm)	77.9±4.1	73.9±2.8	78.8±10.0	71.3±4.9	P<0.05	NS	NS
副睾丸周辺脂肪細胞サイズ(μm)	72.0±6.6	77.7±6.3	75.2±7.9	73.8±6.7	NS	NS	NS
腸間膜脂肪細胞サイズ(μm)	78.4±5.9	74.5±4.7	73.8±5.8	77.9±4.7	NS	NS	P<0.05

数値は平均値±標準偏差を表す(40μm以上の粒子を計測)

8. 脂肪個数の割合

脂肪細胞サイズが40μm以上の脂肪細胞数における70μm以上の脂肪細胞数の割合をTable1-9に示す。後腹壁脂肪組織では、カルシウムの比較においてMCP群で70μm以上の脂肪細胞数が有意に少なかった。副睾丸周辺脂肪組織では、いずれの群にも有意差は見られなかった。腸間膜脂肪組織では、MCP群・シヨ糖食、炭酸Ca群・乳糖食で有意に低かった。

Table1-9 肥大化した脂肪細胞の割合

	シヨ糖		乳糖		two-way ANOVA		
	CaCO ₃	MCP	CaCO ₃	MCP	Ca	Sugar	Ca × Sugar
後腹壁脂肪(%)	45.5±5.9	39.1±4.1	47.2±11.5	37.3±7.6	P<0.05	NS	NS
副睾丸周辺脂肪(%)	37.5±8.6	44.8±6.6	42.6±10.6	39.2±9.1	NS	NS	NS
腸間膜脂肪(%)	52.2±6.3	45.8±7.8*	44.5±7.5	51.0±5.1†	NS	NS	P<0.05

数値は平均値±標準偏差を表す(70μm以上の粒子数/全粒子数)

*シヨ糖・CaCO₃群と比べて有意差あり(P<0.05)

†乳糖・CaCO₃群と比べて有意差あり(P<0.05)

【実験2】

1. マウスの成長結果

マウスの成長結果をTable2-2に示す。飼料摂取量には有意差は見られなかった。しかし、終体重、体重増加量、飼料効率は、糖の質に関わらず、MCP群が炭酸Ca群に比べて有意に低かった。このことから、STZ投与2型糖尿病モデルマウスにおいて、MCPは体重増加を抑制することが示された。

Table2-2 成長結果

	無投与	シヨ糖		乳糖		two-way ANOVA		
		CaCO ₃	MCP	CaCO ₃	MCP	Ca	Sugar	Ca × Sugar
初体重(g)	19.3±0.4	19.5±0.5	19.5±0.4	19.5±0.6	19.5±0.5	NS	NS	NS
終体重(g)	26.4±1.9	28.3±2.2	25.8±0.6	27.2±1.9	26.1±1.3	P<0.05	NS	NS
体重増加量(g/day)	0.23±0.07	0.28±0.07	0.20±0.02	0.25±0.06	0.21±0.04	P<0.06	NS	NS
飼料摂取量(g/day)	3.4±0.5	2.3±0.2	2.1±0.1	2.3±0.3	2.3±0.1	NS	P=0.06	P=0.05
飼料効率(%)	6.9±1.4	12.3±2.1	9.6±0.8	10.8±1.7	9.1±1.3	P<0.05	NS	NS

数値は平均値±標準偏差を表す

2. 見かけのカルシウム消化吸収率

Ca摂取量、糞中Ca排泄量、見かけのCa消化吸収率をTable2-3に示す。

カルシウム吸収率では有意差が見られなかったが1日あたりの糞中カルシウム排泄量は糖質によらずMCP群で有意に少なく、吸収量が多い可能性が示唆された。

Table2-3 Caの排泄量と見かけの吸収率

	無投与	シヨ糖		乳糖		two-way ANOVA		
		CaCO ₃	MCP	CaCO ₃	MCP	Ca	Sugar	Ca × Sugar
Ca摂取量(mg/d)	22.2±4.3	13.8±1.4	12.5±0.6	14.3±1.9	13.9±1.3	NS	P=0.08	NS
糞中Ca排泄量(mg/d)	10.0±0.7	8.9±1.0	8.0±1.1	9.2±1.2	8.3±0.7	P<0.05	NS	NS
見かけのCa消化吸収率(%)	53.9±8.4	35.6±5.2	36.4±7.0	35.5±4.5	40.1±5.4	NS	NS	NS

数値は平均値±標準偏差を表す。

3. マウスの肝臓重量および腹腔内脂肪組織重量

マウスの肝臓重量および腹腔内脂肪組織重量をTable2-4に示す。肝臓重量では糖とカルシウムの交互作用に有意差が見られ、シヨ糖食の炭酸Ca群が最も高い値を示した。すなわち、それ以外の群(シヨ糖食のMCP群と乳糖食の各群)において、肝臓重量の増加が抑制された。

後腹壁脂肪、副睪丸周辺脂肪、腸間膜脂肪の重量は、糖の質に関わらず、MCP群が炭酸Ca群に比べて有意に低かった。このことから、STZ投与2型糖尿病モデルマウスにおいてMCPは腹腔内脂肪の蓄積を抑制することが示された。

Table2-4 肝臓重量および腹腔内脂肪組織重量

	無投与	シヨ糖		乳糖		two-way ANOVA		
		CaCO ₃	MCP	CaCO ₃	MCP	Ca	Sugar	Ca × Sugar
肝臓(g)	1.00±0.16	1.14±0.07	1.03±0.10	1.01±0.09	1.05±0.09	NS	P=0.07	P<0.05
後腹壁脂肪(g)	0.27±0.09	0.44±0.16	0.27±0.06	0.34±0.15	0.25±0.05	P<0.05	NS	NS
副睪丸周辺脂肪(g)	0.67±0.23	1.09±0.35	0.74±0.12	0.93±0.35	0.72±0.14	P<0.05	NS	NS
腸間膜脂肪(g)	0.29±0.09	0.35±0.14	0.24±0.02	0.33±0.12	0.24±0.06	P<0.05	NS	NS

数値は平均値±標準偏差を表す

4. 脂肪細胞サイズ

脂肪細胞サイズの測定結果をTable2-5に示す。後腹壁脂肪では細胞サイズに有意差が見られなかった。副睪丸周辺脂肪についてはMCP群が炭酸Ca群に比べて低い傾向となった(P=0.05)。腸間膜脂肪ではMCP群が炭酸Ca群に比べて有意に低値を示した。したがって、脂肪組織によって応答の差はあったが、STZ投与2型糖尿病モデルマウスにおいてMCPには腹腔内脂肪細胞の肥大化抑制作用があることが示された。

Table2-5 脂肪細胞サイズ

	無投与	シヨ糖		乳糖		two-way ANOVA		
		CaCO ₃	MCP	CaCO ₃	MCP	Ca	Sugar	Ca × Sugar
後腹壁脂肪サイズ(μm)	58.7±6.2	65.4±12.6	64.3±7.1	57.3±11.5	65.2±6.7	NS	NS	NS
副峯丸周辺脂肪サイズ(μm)	73.1±6.3	82.7±10.1	74.8±3.3	78.2±10.0	74.7±5.8	P=0.05	NS	NS
腸間膜脂肪サイズ(μm)	66.4±6.1	65.9±7.1	60.5±3.8	63.3±4.4	60.7±6.1	P<0.05	NS	NS

数値は平均値±標準偏差を表す

5. 血清生化学値と血清ホルモン濃度

血清生化学値と血清ホルモン濃度をTable2-6に示す。血清総コレステロール、トリグリセリド、グルコース、PTH濃度は、いずれの群でも有意差が見られなかった。一方、血清遊離脂肪酸とレプチン濃度は、MCP群が炭酸Ca群に比べて有意に低かった。また、血清インスリンとアディポネクチン濃度は交互作用に有意差が認められ、インスリンはシヨ糖食のMCP群で最も低く、アディポネクチンは乳糖食のMCP群で最も高い値となった。さらに、血清インスリンとレプチン濃度、各種腹腔内脂肪組織重量との間の相関性を検定した結果、相互間に有意な正の相関が認められた(FIGURE2-1, 2-2)。

Table2-6 血清生化学値

	無投与	シヨ糖		乳糖		two-way ANOVA		
		CaCO ₃	MCP	CaCO ₃	MCP	Ca	Sugar	Ca × Sugar
総コレステロール(mg/dl)	127.2±30.1	135.6±31.4	143.5±26.8	130.6±34.1	140.4±35.0	NS	NS	NS
トリグリセリド(mg/dl)	121.2±27.4	101.4±13.4	108.8±10.5	106.0±23.2	111.8±18.5	NS	NS	NS
遊離脂肪酸(mEq/l)	0.638±0.16	0.601±0.11	0.547±0.04	0.634±0.07	0.535±0.07	P<0.05	NS	NS
グルコース(mg/dl)	340.6±73.9	393.4±103.6	430.1±104.1	374.2±106.9	404.3±53.0	NS	NS	NS
PTH(pg/ml)	34.73±4.96	37.19±7.55	40.75±7.33	35.0±3.78	36.94±8.73	NS	NS	NS
インスリン(ng/ml)	1.30±0.33	1.40±0.39	1.00±0.30	1.05±0.26	1.30±0.33	NS	NS	P<0.05
レプチン(ng/ml)	8.81±4.23	19.11±11.32	8.49±3.05	13.24±9.35	9.11±4.56	P<0.05	NS	NS
アディポネクチン(ng/ml)	1.07±0.28	0.79±0.24	0.70±0.26	0.92±0.13	1.14±0.21	NS	P<0.05	P<0.05

数値は平均値±標準偏差を表す

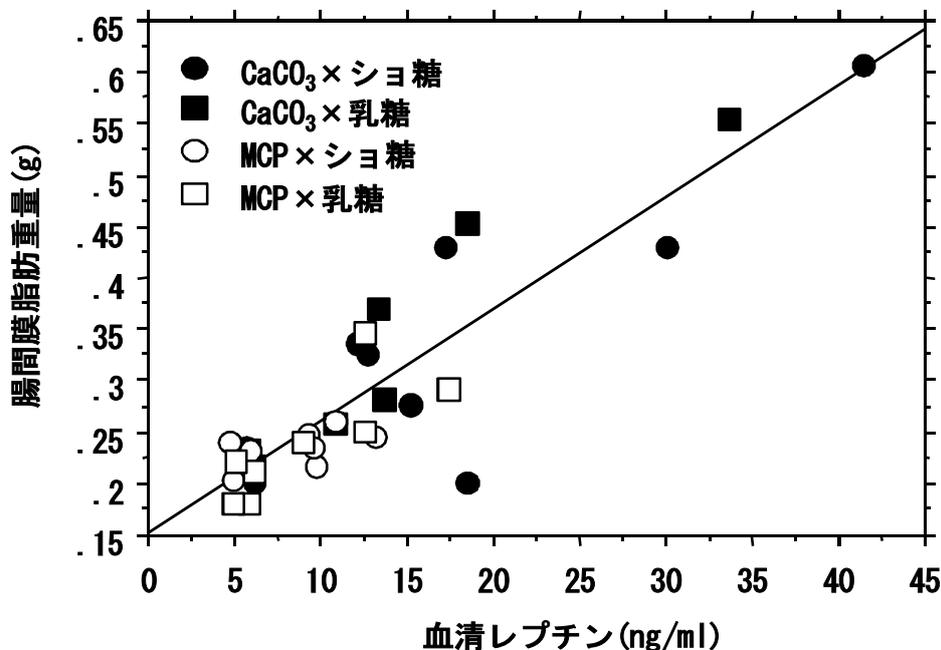


FIGURE2-1 血清レプチン濃度と腸間膜脂肪重量の相関
r=0.845 (P<0.05)

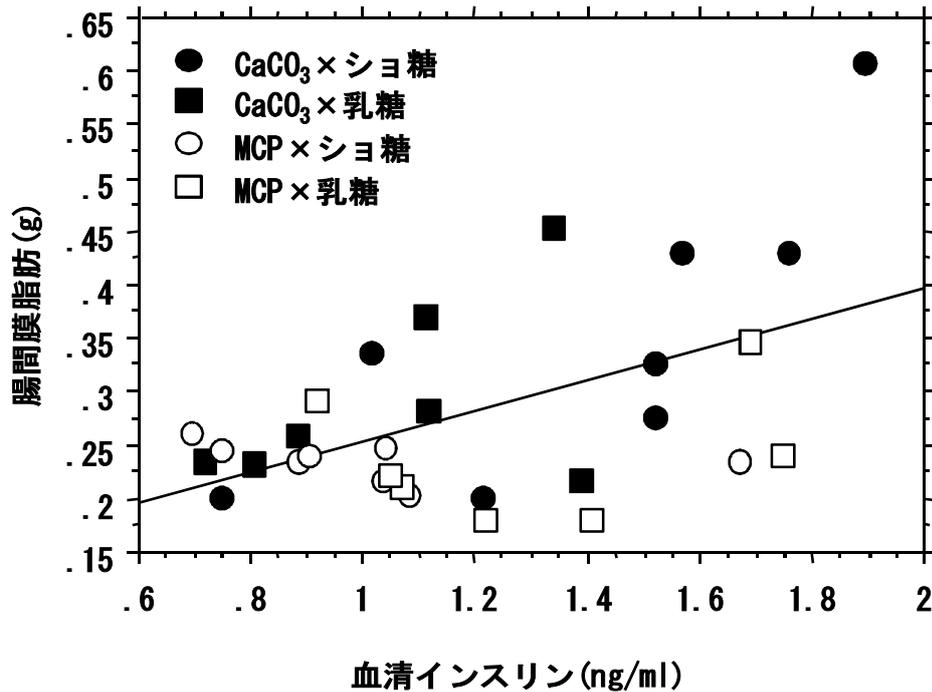


FIGURE2-2 血清インスリン濃度と腸間膜脂肪重量の相関
 $r=0.506(P<0.05)$

6. 肝臓脂質

肝臓脂質をTable2-7に示す。肝臓総コレステロール、トリグリセリド値は、いずれの群にも有意差が見られなかった。ただし、肝臓全重量中のトリグリセリド値はショ糖食のMCP群で低い傾向を示した。

Table2-7 肝臓脂質

	無投与	ショ糖		乳糖		two-way ANOVA		
		CaCO ₃	MCP	CaCO ₃	MCP	Ca	Sugar	Ca × Sugar
総コレステロール(mg/肝臓)	1.6±0.2	1.8±0.3	1.8±0.1	1.7±0.1	1.9±0.3	NS	NS	NS
(mg/g肝臓)	1.6±0.1	1.6±0.2	1.7±0.1	1.7±0.2	1.8±0.2	P=0.07	NS	NS
トリグリセリド(mg/肝臓)	9.8±3.1	18.4±6.3	11.9±3.4	13.4±6.3	14.2±4.4	NS	NS	P=0.06
(mg/g肝臓)	9.9±2.9	16.0±5.1	11.4±2.9	13.5±7.5	13.6±4.0	NS	NS	NS

数値は平均値±標準偏差を表す

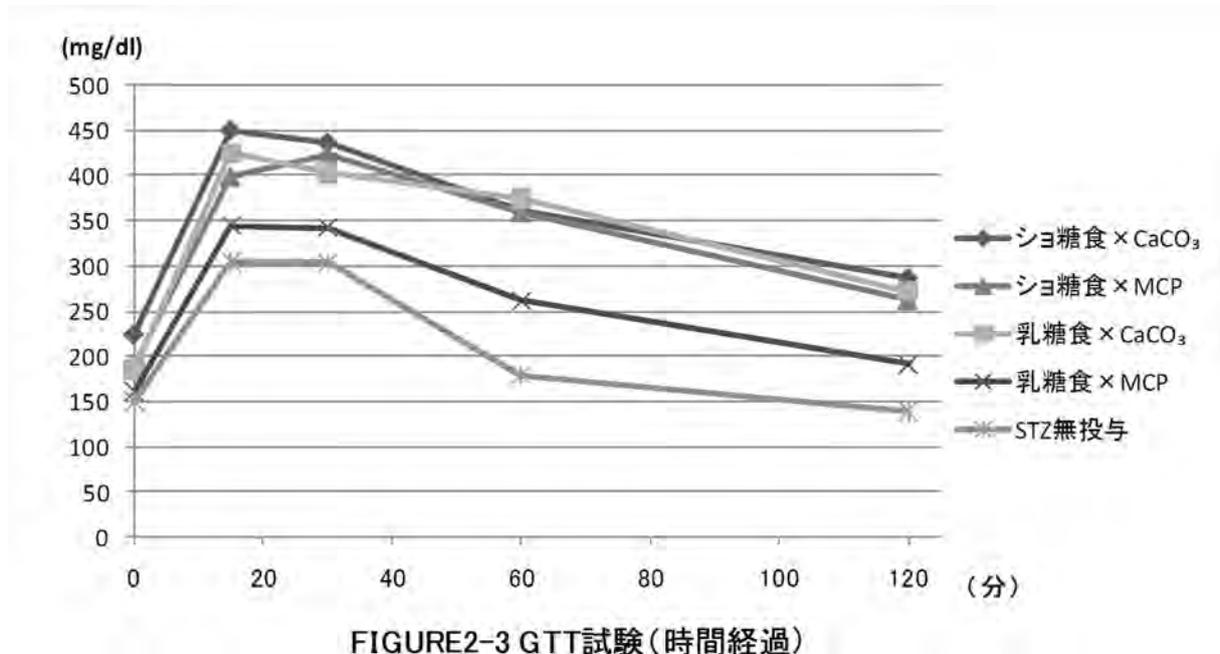
7. 耐糖能試験結果

耐糖能試験結果をFIGURE2-3とTable2-8に示す。120分血糖値は、いずれの群にも有意差が見られなかった。一方、6時間絶食による空腹時血糖値である0分値においては、乳糖食がショ糖食に比べて有意に低く、また、MCP群は炭酸Ca群に比べて有意ではないが低い傾向を示した。最大血糖値とAUCでは有意差は認められなかったが、MCP群が炭酸Ca群に比べて低い傾向を示した。

Table2-8 耐糖能試験

	無投与	シヨ糖		乳糖		two-way ANOVA		
		CaCO ₃	MCP	CaCO ₃	MCP	Ca	Sugar	Ca × Sugar
空腹時血糖値(mg/dl)	150.3±27.5	224.6±27.2	188.6±50.0	184.9±43.1	160.9±45.0	P=0.05	P<0.05	NS
最大血糖値(mg/dl)	336.8±27.4	454.3±60.9	439.3±80.1	451.5±97.9	355.5±96.2	P=0.08	NS	NS
AUC(Σmg/dl・分)	2475±4331	43036±9872	40928±9281	41836±12757	31557±9442	P=0.06	NS	NS

数値は平均値±標準偏差を表す



考 察

実験1のマウスの成長結果において、終体重、体重増加量はシヨ糖食に比べ乳糖食で有意に低かった。飼料摂取量は、いずれの群も有意差はみられなかったが、飼料効率が乳糖食で低い傾向があり、シヨ糖と乳糖の利用性の違いが終体重および体重増加量に影響を与えたと考えられる。また、肝臓重量はMCP(ミセル性リン酸カルシウム)群で有意に低かった。Sun¹⁷⁾らは、乳製品以外のものからカルシウムを与えたものに比べて、乳製品を与えたものは脂質生成の抑制や脂肪分解に対する影響が大きく、乳製品のカルシウムがカルシウムの中でも肥満抑制に対して最も大きな影響を与えると報告している。乳由来のカルシウムであるMCPおよび乳中成分の一つでありカルシウムの吸収促進因子である乳糖食が、体重増加や臓器重量の増加抑制に影響を与えたという今回の結果と一致している。

Zemel¹⁶⁾らの研究では、低カルシウム食に応答して増加するカルシトリオール¹⁷⁾の産生が細胞内カルシウムイオンを増加させ、このカルシウムイオンが脂質生成の遺伝子発現と脂質生成を刺激し、また脂肪分解を抑制することで体脂肪蓄積を増やすことを示している。すなわち、カルシウムを十分摂取した場合カルシトリオール¹⁷⁾の産生が抑制され、脂肪蓄積を抑制する。本研究で用いたMCPは乳由来のカルシウムであり、カルシウム素材単独よりも吸収性ならびに生体利用性が優れている^{18,19)}。同量のカルシウムを飼料に添加した場合、カルシウムとしての利用性が高いMCPあるいはカルシウムの吸収促進因子である乳糖を付加した飼料を摂取した群では、血清PTH濃度が低下する

ことが予測されたが、今回はそのような結果は得られなかった。しかしながら、血清PTH濃度と肝臓トリグリセリド量に正の相関が見られたため、カルシトリオールが脂質代謝に影響を及ぼしたことが示唆される。

実験1のカルシウムの糞中排泄量、見かけの消化吸収量および吸収率は、いずれの群でも有意差は見られなかった。炭酸カルシウムに比べてMCPはカルシウムの利用性が高く、また乳糖は腸管でのカルシウム吸収を促進することが知られているが、カルシウムを0.5%配合した今回の結果では飼料の違いによる吸収の差は見られなかった。血清PTH濃度に差が見られなかったことから、血中のカルシウム濃度が十分であったことが考えられる。MCPを低カルシウム食のカルシウム源として飼料に配合した場合は、吸収量および吸収率に有意差が表れる可能性が考えられるが、カルシウム量が十分である飼料ではMCPや乳糖がカルシウム吸収に及ぼす影響は少ないことが示された。

実験1の肝臓重量はMCP群で有意に低かった。肝臓あたりのコレステロール量およびトリグリセリド量がMCP群で有意に低く、肝臓重量の結果と一致している。また、乳糖食において肝臓あたりのコレステロール量が有意に低く、乳糖食の肝臓重量が低い傾向にある。すなわち、肝臓重量と肝臓脂質量には相関関係があることが示された。これらの結果より、MCPは肝臓の脂質代謝に影響を与え、脂肪肝の抑制および肝臓重量増加の抑制に働くことが示された。

実験1の後腹壁脂肪組織、副睾丸周辺脂肪組織、腸間膜脂肪組織は、いずれの群も重量に有意差は見られなかった。終体重および体重増加量がシヨ糖食に比べて乳糖食で有意に低かったことから、これらの脂肪組織以外の脂肪量の減少が考えられる。また、肝臓重量がMCP群で有意に低く、乳糖食で低い傾向であったことや肝臓脂質濃度がMCP群あるいはシヨ糖食で有意に低かったことなどから、内臓脂肪重量の差が体重に反映したことも示された。

各脂肪組織重量に有意差は見られなかったものの、後腹壁脂肪細胞サイズはMCP群で有意に小さかった。また、脂肪サイズ40 μ m以上の脂肪細胞個数における70 μ m以上の脂肪細胞個数の割合もMCP群で有意に低かった。このことより、後腹壁脂肪の肥大化がMCPによって抑制されたことが示された。しかし、3種類の脂肪組織の中で、脂肪重量の変化が最も大きいと考えられる腸間膜脂肪組織において、脂肪細胞サイズおよび肥大化脂肪個数割合は、MCP群・シヨ糖食、炭酸Ca群・乳糖食で低く、本結果は後述のSTZ投与2型糖尿病マウスでは見られなかったことからKKマウス特有の現象か、一過性のものであったと考えられる。

実験1の血清総コレステロール濃度は、MCP群・シヨ糖食、炭酸Ca群・乳糖食で低く、カルシウムと糖質の交互作用に有意差が認められたが、この結果は矛盾がありMCPおよび乳糖の影響を直接示したものではないと考えられる。血清トリグリセリド濃度、血清遊離脂肪酸濃度には、いずれの群でも有意差は見られなかった。血清グルコース濃度は、MCP群、乳糖群でいずれも有意に低値を示した。絶食4時間後に採血し分析を行った値であるため空腹時血糖ではないが、MCPおよび乳糖は血糖値の上昇抑制に働くことが示された。

実験1の血清インスリン濃度は、MCP群・乳糖食で他の飼料と比べて有意に低く、MCPと乳糖の相乗作用がみられた。また、血清レプチン濃度は乳糖食で有意に低かった。血清PTH濃度および血清アディポネクチン濃度はいずれの群も有意差が見られなかった。インスリン抵抗性を示している場合、血清インスリン濃度が上昇することから、MCPと乳糖を同時に摂取した場合、耐糖能の改善が期待できることが考えられる。血清レプチン濃度は脂肪細胞量と比例すると考えられている

ホルモンであり、血清レプチン濃度が低いということは、全身の脂肪量が少ないことが示唆される。各脂肪組織重量はいずれの群も有意差は見られなかったが、シヨ糖食に比べて乳糖食は体重が軽く、体脂肪蓄積量が少ないことが考えられ血清レプチン濃度の結果と一致する。血清アディポネクチン濃度は体脂肪量と負の相関を示すことが知られているが、今回の結果では有意差はなかった。

血清インスリン濃度は肝臓あたりのコレステロール量と、血清PTH濃度は肝臓あたりのトリグリセリド量と正の相関が見られた。この結果より、肝臓脂質の代謝はホルモンを介して調節されるということが示され、インスリンはコレステロール代謝の調節を、PTHはトリグリセリド代謝の調節に関与したと考えられる。これまでZemelらはPTHや 1α 、 $25(\text{OH})_2\text{D}_3$ を介して脂肪蓄積が抑制されると報告してきた。Zemelらが示しているメカニズムは、 1α 、 $25(\text{OH})_2\text{D}_3$ が脂肪酸合成を助け、カルシウムイオンの流入の調節を介して脂肪分解を抑制すること、またビタミンDの核内受容体を介してUCP2発現を抑えるという事、これらの理由より、脂肪細胞のアポトーシスは減少し脂肪が蓄積する²⁰⁾ というものである。すなわち、PTHや 1α 、 $25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 濃度の低下は脂肪蓄積の抑制に働くというものである。確かに、PTHに関してはトリグリセリド量と正の相関があったことから脂質蓄積を抑制したと考えられる。しかしながら、インスリンを介して脂質の代謝を調節する可能性も今回の結果から考えられ、Zemelらが示しているメカニズムとは違ったメカニズムで脂肪蓄積が抑制される可能性がある。

実験1の耐糖能試験は、0分で乳糖食が有意に低かった。最高血糖値はMCP群・シヨ糖食、炭酸Ca群・乳糖食で低い値となり、カルシウムと糖質の交互作用で有意差が見られた。120分およびAUC（曲線下面積）では有意差は見られなかった。0分は6時間絶食後の値であり空腹時血糖である。乳糖食が有意に低かったことから、乳糖が耐糖能の改善に働くことが示された。しかしながら、カルシウムの質の違いによる差は見られなかった。

以上の結果より、推定される脂肪蓄積抑制のメカニズムをFIGURE1-4に示した。食事性カルシウムが増加することにより、血中の活性型ビタミンD濃度の低下が起こる。活性型ビタミンDは、細胞内にカルシウムイオンが流入するのを促進する。すなわち、カルシウム摂取量が十分である場合、脂肪細胞内へのカルシウムイオンの流入は抑制される。これによりUCP2が増加し、熱産生が増加する。また、脂肪細胞のアポトーシスが促進され脂肪の蓄積が抑制される。今回の研究結果より、もう一つの脂肪蓄積抑制のメカニズムが考えられる。食事性カルシウムにより血中のカルシウムが十分であると、活性型ビタミンD濃度の低下によりランゲルハンス島B細胞へのカルシウムイオンの流入が抑制される。細胞内カルシウムイオンはインスリンの分泌を促進する可能性があると考えられ、B細胞へのカルシウムイオンの流入抑制はインスリンの分泌を抑制する効果があると考えられる。すなわちインスリン感受性の改善が期待される。このことが血糖値を下げるだけでなく、脂肪細胞内でのFAS（脂肪酸合成酵素）を抑制し、脂肪合成の抑制と脂肪分解の促進が起こる。すなわち脂肪蓄積が抑制される。

実験1の結果より、MCPおよび乳糖の摂取、すなわち乳成分の摂取は体脂肪蓄積の抑制および耐糖能の改善に効果があると考えられる。また、これらの効果はインスリン分泌の節約によるメカニズムを示唆した。カルシウムの質の違いの他、乳中のカルシウム促進因子ある乳糖にも着目し、今回の研究を行ってきた。体重増加量、血清グルコース濃度など乳糖が影響している結果も得ら

れたが、全ての脂質代謝指標に影響があったわけではない。乳糖の他の因子が、あるいは数多くの生理活性物質が相乗的に作用して脂質蓄積の抑制に効果を及ぼしている可能性もある。また、KKマウスという遺伝的に過食で肥満を呈するマウスを用いたことにより、作用が顕著となった項目と作用が検出できなかった項目がある可能性がある。そこで、遺伝的に正常な動物にSTZを微量投与して2型糖尿病を発症させるモデルマウスを用いて次の検討を行った。

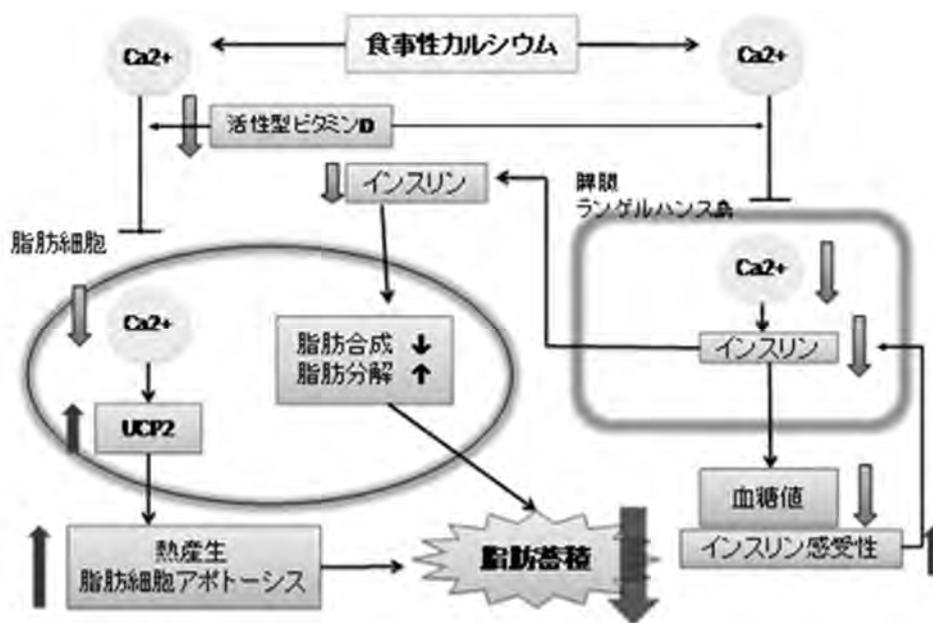


FIGURE1-4 脂肪蓄積抑制のメカニズム

実験2の成長結果より、終体重、体重増加量、飼料効率は、糖の質に関わらずMCP群が炭酸Ca群に比べて有意に低かった。したがって、MCPは炭酸Caと比較して体重増加を抑制することが示された。本結果は、KKマウスよりも顕著に表れた。

実験2の糞中Ca結果より、採糞期間中の見かけのCa消化吸収率には有意差が見られなかったが、糞中Ca排泄量はMCP群が有意に低く、カルシウム吸収量がMCP群で多かった可能性が示された。腸管におけるCaの吸収形式には、濃度勾配に逆らって吸収できる能動輸送と受動輸送とがある。能動輸送にはCa結合タンパク質(CaBP)が関与している。CaBPの転写は $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ により活性化される。受動輸送では濃度勾配に依存して、主にパラセラー(細胞間)ルートでCaが吸収される²¹⁾。牛乳中に含まれる乳糖のCa吸収促進効果については、小腸の絨毛組織のCa透過性を強めるという説²⁴⁾、乳糖が腸内細菌の利用を受けることにより腸内pHが低下(可溶性Caの増加)し、Caの吸収を促進するという説²³⁾、乳糖がキレートや複合体を形成する(可溶性Caの増加)という説²⁴⁾などが報告されている。すなわち乳糖には腸管におけるCaの受動輸送促進効果が期待された。また、一般に、リン酸Caは水に不要であるが、本研究で使用したMCPすなわちMCP-PP複合体は水に極めて溶けやすく、乳中と同じように架橋を形成していることが確認されている。さらに、牛乳中のCaの約2/3、無機リン酸(Pi)の1/2がMCPとして存在し、溶解相中のそれと絶えず置き換わる平衡状態にあり、さらに溶解相中のCaとPiはリン酸Caに関して過飽和状態であり、溶解度以上に存在するそれ

らがMCPを形成していると考えられている^{18, 25)}。したがって、MCPの形態では、腸管において溶解相中のCa²⁺ が体内に吸収された際、速やかにCaを溶出することで溶解相中に高濃度のCa²⁺ を保つことにより高いCa吸収効率を示すことが期待された。しかしながら、今回の6日間の採糞・分析結果からCaの見かけの消化吸収率においては、いずれの群にも有意差が見られなかった。これは、一日のカルシウム吸収量全体を示したものであり、吸収効率あるいは吸収速度を反映したものではない。前述したように、乳糖やMCPの形態には腸管におけるCaの吸収促進効果が期待されることから、一日当たりの吸収量ではなく、摂食後の吸収速度には差があった可能性も考えられる。

実験2の臓器重量において、肝臓重量では糖とCaの交互作用に有意差が見られた。ショ糖食の炭酸Ca群は有意に高く、それ以外の3群(ショ糖食のMCP群と乳糖食の各群)において低い結果となった。ショ糖食においてはMCPが肝臓の脂肪蓄積を有意に抑制したと考えられる。乳糖食においては、乳糖自体も肝臓重量の増加を有意に抑制したために、Caの形態による違いがあまり表れなかったと考えられる。すなわち、高脂肪食下において、MCPと乳糖のそれぞれに肝臓重量の増加を抑制する作用が示された。脂肪組織重量では、後腹壁脂肪、副睾丸周辺脂肪、腸間膜脂肪の全ての組織重量において、糖の質に関わらず、MCP群が有意に低かった。このことから、MCPは腹腔内脂肪の蓄積を抑制することが示された。本結果は、実験1で顕著でなかった作用をC57BL/6Jマウスでは感度良く検出できたものと考えられる。これまでに、乳製品に含まれるCaの形態や、乳のCa以外の成分による肥満抑制効果が示唆されている。本結果では、腹腔内脂肪組織においてMCPの形態による増加抑制効果が見られたが、乳成分である乳糖の影響はほとんど見られなかった。

Caの脂肪蓄積抑制メカニズムについて、ヒト²⁶⁾ と動物²⁷⁾ における研究が、食事性Ca含量の十分な増加は胃腸器官における不消化のCaセッケンの構成を促進することを明らかにしている。すなわち、高Ca食を食べている動物とヒトでは食事中脂質の吸収低下によって体脂肪蓄積に減少を引き起こすというものである。しかし、本研究では飼料中Ca含量を全ての群において0.5%に統一しているため、このような脂質吸収率への影響は考えにくい。実験1で考察したように、Zemelらは、食事性カルシウムが体脂肪蓄積に減少を引き起こすという所見に基づき、低Ca食に反応して生じる活性型ビタミンDの上昇は、脂肪細胞へのCaイオン流入を刺激し、それによって体脂肪蓄積が増加するということを提唱した¹³⁾。さらに、ヒトの脂肪細胞における活性型ビタミンD処理が、脂肪酸合成酵素(FAS)の活性化と脂肪分解の抑制を引き起こすことを示している^{13, 28)}。つまり、高Ca食に伴う活性型ビタミンDの産生抑制は、脂肪細胞内Caイオンを減少させ、FASを阻害し、脂肪分解を活性化することにより、抗肥満効果を発揮するというメカニズムが考えられる。したがって、本研究において食事中Ca量を全群において0.5%に調製したにも関わらずMCP群に腹腔内脂肪蓄積抑制が見られたことから、MCPの形態がCaの利用性に影響したと考えられる。脂肪細胞サイズにおいて、後腹壁脂肪では細胞サイズに有意差が見られなかった。一方、副睾丸周辺脂肪については、MCP群が炭酸Ca群に比べて低い傾向となった(P=0.05)。腸間膜脂肪ではMCP群が有意に低値を示した。したがって、STZ投与2型糖尿病モデルマウスにおいては、MCPには腹腔内脂肪細胞の肥大化抑制効果があることが示された。これは脂肪組織重量の測定結果と同様の傾向となっており、MCPにより各脂肪細胞における脂肪合成が抑制されたことが示された。本結果は、実験1より顕著となった項目である。

実験2の血清生化学値と血清ホルモン濃度において、血清遊離脂肪酸とレプチン濃度は、MCP

群が炭酸Ca群に比べて有意に低かった。また、血清インスリンとアディポネクチン濃度は交互作用に有意差が認められた。血清遊離脂肪酸は主に脂肪組織の中性脂肪のホルモン感受性リパーゼによる分解とFFAの放出、肝臓での取り込みによって調節され、糖尿病や肥満などにより増加することが知られている。よって、MCP群におけるこの値の有意な低値は、MCPが糖尿病や肥満の進行を抑制したことを示している。レプチンは主に脂肪細胞に由来する抗肥満因子である。実験2では、レプチンと腸間膜脂肪重量との間に有意な相関が見られた。すなわち、MCPは腸間膜脂肪の増加を抑制し、結果としてレプチン分泌の増加を抑制したことが示された。また、インスリンとレプチン濃度、インスリンと腹腔内脂肪重量との間にはそれぞれ正の有意な相関が見られた。このことは、インスリン分泌の増加により腹腔内脂肪重量の増加に関係したことを示唆している。アディポネクチンはショ糖食では無投与群と比較して有意に低い値となったが、一方、乳糖食ではその値が保たれた。さらに、乳糖とMCPの交互作用により最も高い値となった。アディポネクチンは抗動脈硬化作用、抗糖尿病作用を有するメタボリックシンドロームのキー分子の一つであり、肥満や内臓脂肪の過剰蓄積により血中濃度が低下する。したがって、乳糖はこの値の低下を抑制し、さらに、乳糖とMCPとの相乗効果により高い値が保たれ、抗動脈硬化作用、抗糖尿病作用が維持されたことが考えられる。

実験2の肝臓脂質において、肝臓中のトリグリセリド量はショ糖と炭酸Caとの交互作用により高い傾向が見られ、それ以外の3群(ショ糖食のMCP群と乳糖食の各群)において低い結果となった。これは、肝臓臓器重量の結果と同じ傾向であり、肝臓の肥大化が主に余剰なトリグリセリドの蓄積によるものであることが示された。すなわち、高脂肪食下において、MCPと乳糖のそれぞれに肝臓へのトリグリセリド蓄積抑制効果が示された。

実験2の耐糖能試験において、6時間絶食による空腹時血糖値である0分値は、乳糖食がショ糖食に比べて有意に低く、また、MCP群は炭酸Ca群に比べて低い傾向を示した。最大血糖値とAUCでもMCP群が低い傾向を示した。CARDIA研究では、乳製品の摂取とBMIを含むインスリン抵抗性症候群のすべての要素との間に負の相関が示されている⁷⁾。本結果では、マウスにおいて、乳成分であるMCPと乳糖の交互作用により、耐糖能低下抑制効果が見られた。

実験1, 2を通じて、牛乳中の主要なカルシウム形態であるミセル性リン酸カルシウムは生体利用性の高いカルシウムであり、カルシウム調節ホルモンを介して腹腔内脂肪蓄積を抑制することが示された。また、ミセル性リン酸カルシウムは膵臓からの耐糖能異常に伴うインスリンの過剰分泌を抑制し、インスリン抵抗性の改善とそれに伴う肝臓脂質および腹腔内脂肪蓄積を抑制する作用を有することが新たに示唆された。また、牛乳中に存在する乳糖はこれら作用を相乗的あるいは別のメカニズムで作用することが示され、まさに牛乳を摂取することは内臓肥満を源流とするメタボリックシンドロームあるいはインスリン抵抗性の予防に有効であることが示された。今後は、インスリン応答を介して肝臓および脂肪組織の脂質代謝の応答がどのように変化したか、ならびに脂肪細胞の機能にどのように影響したのかについてさらに検討したい。また、カルシウム、乳糖以外に乳清たんぱく質が脂肪蓄積を抑制するという説が出されている。実験2の実験系は感度良くこれら効果を検出できたことから乳清たんぱく質の影響も併せて調べていきたい。

文献

- 1) 健康局総務課生活習慣病対策室：平成20年国民健康・栄養調査の概要， pp 3-4, 43, 2009
- 2) Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Makishima M, Matsuda M, et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest.* 114: 1752-61, 2004.
- 3) Atabek ME, Vatansev H, Erkul I. Oxidative stress in childhood obesity. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 17: 1063-8, 2004
- 4) Lin TK, Chen SD, Wang PW, Wei YH, Lee CF, Chen TL, Chuang YC, Tan TY, Chang KC, et al. Increased oxidative damage with altered antioxidative status in type 2 diabetic patients harboring the 16189 T to C variant of mitochondrial DNA. *Ann N Y Acad Sci,* 1042: 64-9, 2005
- 5) Sonta T, Inoguchi T, Tsubouchi H, Sekiguchi N, Kobayashi K, Matsumoto S, Utsumi H, Nawata H. Evidence for contribution of vascular NAD(P)H oxidase to increased oxidative stress in animal models of diabetes and obesity. *Free Radic Biol Med.* 27: 115-23, 2004
- 6) McCarron, D. A., Morris, C. D., Henry, H. J., and Stanton, J. L. Blood pressure and nutrient intake in the United States. *Science* 224: 1392-1398, 1984
- 7) Pereira MA, Jacobs DR, Van Horn L, Slattery ML, Kartashov AI, Ludwig DS. Dairy consumption, obesity and the insulin resistance syndrome in young adults. The CARDIA study. *J Am Med Assoc* 287: 2081-2089
- 8) Davies KM, Heaney RP, Recker RR, et al. Calcium intake and body weight. *J Clin Endocrinol Metab* 85: 4625-8, 2000
- 9) Jacqmain M, Doucet E, Dspres JP, Bouchard C, Tremblay A. Calcium intake, body composition, and lipoprotein-lipid concentrations in adults. *Am J Clin Nutr* 77:1448-52, 2003
- 10) Lin YC, Lyle RM, McCabe LD, McCabe GP, Weaver CM, Teegarden D. Dairy calcium is related to changes in body composition during a two-year exercise intervention in young women. *J Am Coll Nutr* 19: 754-60, 2000
- 11) Loos RJ, Rankinen T, Leon AS, et al. Calcium intake is associated with adiposity in black and white men and white women of the HERITAGE Family Study. *J Nutr* 134: 1772-8, 2004
- 12) Lorenzen JK, Molgaard C, Michaelsen KF, Astrup A. Calcium supplementation for 1 y does not reduce body weight or fat mass in young girls. *Am J Clin Nutr* 83: 18-23, 2006
- 13) Zemel MB, Shi H, Gree B, Dirienzo D, Zemel PC. Regulation of adiposity by dietary calcium. *FASEB J* 14:1132-8, 2000
- 14) Zemel MB, Thompson W, Milstead A, Morris K, Campbell P. Calcium and dairy accelerate of weight and fat loss during energy restriction in obese adults. *Obes Res* 12: 582-590, 2004
- 15) Shi H, Dirienzo D, Zemel MB. Effects of dietary calcium on adipocyte lipid metabolism

- and body weight regulation in energy-restricted ap2-agouti transgenic mice. *FASEB J* 15: 291-293, 2001.
- 16) Zemel MB. Mechanisms of dairy modulation of adiposity. *J Nutr* 133: 252S-256S, 2003
 - 17) 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* 134: 3054-3060, 2004
 - 18) 青木孝良・青江誠一郎：ミセル性リン酸カルシウムの生体利用性, *CLINICAL CALCIUM* Vol. 16, No. 10, 2006
 - 19) Toba Y, Kato K, Takada Y, Yanaka M, Nakano Y, Aoki T, Aoe S. Bioavailability of milk micellar calcium phosphate-phosphopeptide complex in rats. *J Nutr Sci Vitaminol* 45: 311-323, 1999
 - 20) Zemel MB. Nutrition and endocrine modulation of intracellular calcium: implications in obesity, insulin resistance and hypertension. *Mol Cell Biochem* 188: 129-36, 1998
 - 21) Louie D. Intestinal bioavailability and absorption of calcium. In "Calcium and Phosphorous in Human Health" ed by Anderson JJB, Garner SC, CRC Press, Florida. pp45-62, 1995.
 - 22) Buchoski MS, Miller DD. Lactose, calcium source and age affect calcium bioavailability in rats. *J Nutr* 121 : 1746-54, 1991
 - 23) Birlouez-Aragon I. Effect of lactose hydrolysis on calcium absorption during duodenal milk perfusion. *Nutr. Dev* 28: 1465-1472, 1998
 - 24) Bronner F. Intestinal calcium absorption: mechanisms and applications. *J Nutr* 117:1347-1352, 1987
 - 25) 青木孝良：牛乳・乳成分の新しい機能(ミネラル等). 乳技協資料41 : pp2774-2791, 2000
 - 26) Denke MA, Fox MM, Schulte MC. Short-term dietary calcium fortification increases fecal saturated fat content and reduces serum lipids in men. *J Nutr* 123:1047-1053, 1993
 - 27) Xue B, Greenberg AG, Kraemer FB, Zemel MB. Mechanism of intracellular calcium($[Ca^{2+}]_i$) inhibition of lipolysis in human adipocytes. *FASEB J* 15:2527-2529 ,2001
 - 28) Shi H, Norman AW, Okamura WH, Sen A, Zemel MB.
1, α , 25-Dihydroxyvitamin D3 modulates human adipocyte metabolism via non-genomic action. *FASEB J* 15 : 2751-2753 ,2001