

第3章 キビタンパク質濃縮物(PMP)がC57BL/6J系マウスに及ぼす影響

第1節 高コレステロール食餌条件におけるPMP摂取がC57BL/6J系マウスの脂質代謝に及ぼす影響

最近、生活水準の向上、食習慣の欧米化に伴い、脂肪摂取量の増加、運動不足などにより循環器疾患が増加している。その原因として高コレステロール血症が挙げられている [94,95]。一般的に、脂質代謝異常症と診断されるのは、中性脂肪値150mg/dL以上、LDL-コレステロール値140mg/dL以上、HDL-コレステロール40mg/dL未満のいずれかを満たす場合である [96]。

高コレステロール血症は、特に自覚症状がなく、血液の粘度、血小板の凝集力を増加と血液循環障害および微細循環不全を発症させ、アテローム動脈硬化症、虚血性心疾患、脳梗塞、高血圧、肥満、糖尿病などの要因となる [97]。高コレステロール血症の原因が、遺伝子要因であることも無視できないが [98]、それ以外の食事因子などの生活習慣が原因となることも多く認められている [99]。このような疾患は、血清脂質濃度と相関関係があることが知られている [99]。血清脂質濃度に影響を及ぼす食事因子の中で注目されている成分として、タンパク質が挙げられる。冠状動脈硬化症と動物性タンパク質の間には相関関係があり、植物性タンパク質の間には逆相関関係があると報告されている [100-102]。一般に、動物性タンパク質は、植物性タンパク質と比較して、血漿コレステロール濃度を上昇させるといわれている [103]。代表的な動物性タンパク質であるカゼインは、血漿コレステロール濃度を高めることは広く知られている [104]。大豆タンパク質を他のタンパク質の代わりに摂取した実験では、LDL-コレステロールが3%減少も見られた [105]。また、ソバタンパク質をラットに与えると、血中コレステロール濃度が低下する結果も報告されている [106]。及川は、日本

産キビのタンパク質の摂取が、高脂肪、高コレステロール血症を引き起こしたハムスターの血漿総コレステロール濃度、LDL-コレステロールを速やかに減少させ、又、血漿トリグリセリド濃度も減少させることを示した [107]。また、キビタンパク質濃縮物中には、難消化性の食物繊維が含まれていると考えられることから、糞中への胆汁酸の排泄量の増加も期待される。

しかし、韓国産キビの脂質代謝を研究した報告はない。そこで、本節では正常食餌条件で、高コレステロール血症を起こす目的として1.0%コレステロールを添加した高コレステロール食餌条件で、キビタンパク質濃縮物摂取がC57BL/6J系マウスの脂質代謝に及ぼす影響について検討することを目的として、カゼインと比較して検討した。

1. 方法

飼料の調製

実験試料は、Table 3-1に示した。実験飼料は第2章、第2節で調製したキビタンパク質をタンパク質源として添加した飼料を調製した。コレステロール添加食群は、飼料にコレステロール1.0%、コール酸ナトリウム0.25%を添加したものである。キビ飼料を調製する際、タンパク質以外の組成はAIN-76組成に従って調製した [108]。ただし、キビ飼料は、キビタンパク質中に含まれている脂質、タンパク質や糖質を考慮し、飼料調整時のコーン油、セルロースやコーンスターチの添加量を調整した。今回実験に用いたキビタンパク質のタンパク質含有量は、54.4%であった。

以降、正常食のコントロール飼料群をC群、キビ飼料群をPM群、コレステロール添加食のコントロール飼料群をCC群、キビ飼料群をCPM群と略して表記した。

実験動物及び飼育方法

6週齢のC57BL/6J系オスマウス(日本エスエルシー;東京) 24頭を使用した。マウスは個別のステンレスケージに入れて飼育した。動物室は、温度 $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度45-55%に調節し、明暗サイクルは午前6時と午後6時に12時間おきに切り換え、午前6時から午後6時と明期とした。購入後5日間は予備飼育期間とし、AIN-76組成カゼイン飼料と水を自由摂取させ、6日目に各群6頭ずつの計4群に群分けし、Table 3-1の飼料で21日間飼育し、飼料摂取量と体重変化を測定した。飼育開始日と一週間ごとに6時間の絶食の後、尾静脈血より血糖値の測定を行った。飼育最終日に、採血前に6時間の絶食を行い、ジエチルエーテル麻酔下で解剖した。0.1M EDTAで処理したシリンジを使用し、下大静脈から採血し、血液は試験管に移し、 4°C 、 $3,000 \times g$ で15分間の遠心分離を行い、血漿を分離した。肝臓は、生理食塩水で還流した後に採取し、重量

を測定した。精巣周囲脂肪組織を採取し、重量を測定した。分離した血漿、肝臓は、分析時まで-80°Cで保存した。

Table 3-1. Diet compositions (g/100g)

	Normal diet		Cholesterol diet	
	Casein	PMP	Casein	PMP
	(C)	(PM)	(CC)	(CPM)
Casein ¹	22.9	-	22.9	-
PMP	-	36.2	-	36.2
AIN-76 Salt mixture ²	3.5	3.5	3.5	3.5
AIN-76 Vitamin mixture ²	1.0	1.0	1.0	1.0
Corn oil	5.0	2.6	5.0	2.6
Choline bitartrate ³	0.2	0.2	0.2	0.2
Cellulose ¹	5.0	0.5	5.0	0.5
Cornstarch ¹	62.1	55.7	60.9	54.4
D, L-Met ⁴	0.3	0.3	0.3	0.3
Cholesterol ³	-	-	1.0	1.0
Cholic acid ³	-	-	0.25	0.25

¹Oriental yeast, Tokyo, Japan

²AIN-76 diet composition

³Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan

⁴Ajinomoto, Tokyo, Japan

血糖値の測定

血糖値の測定は、ムロターゼ、グルコースオキシダーゼ法によるグルコース測定用キット(グルコース CII-テストワコー、和光純薬工業(株);大阪)を用いて行った。

血中、組織成分分析方法

血漿の分析

1) 血漿中の総コレステロール濃度の測定

血漿中の総コレステロール濃度の測定は、コレステロールオキシダーゼ・DAOS法による総コレステロール測定用キット(コレステロール E-テストワコー、和光純薬工業(株))を用いて行った。

2) 血漿中のHDL-コレステロール濃度の測定

血漿中のHDL-コレステロール濃度の測定は、リンタングステン酸・マグネシウム塩沈殿法によるHDL-コレステロール測定用キット(HDL-コレステロール E-テストワコー、和光純薬工業(株))を用いて行った。これはリンタングステン酸、マグネシウム塩を含んだ試薬を加えるとHDL-コレステロール以外のリポタンパク質だけ選択的に沈殿することを利用し、上清中のコレステロール量を測定する方法である。

3) 血漿中のトリグリセリド濃度の測定

血漿中のトリグリセリド濃度の測定は、酵素法(GPO・DAOS法)によるトリグリセリド測定用キット(トリグリセリド E-テストワコー、和光純薬工業(株))を用いて行った。

肝臓の脂質分析

1) 肝臓脂質の抽出 [109]

肝臓0.2gを、あらかじめ冷やしておいたクロロホルム:メタノール=2:1(v/v)混合液4 mLを入れた遠心分離管に計り取った。ポリトロンホモジナイザー(Kinematica GmbH Steinhofhalde;Switzerland)にてホモジナイズした。この液を4°C、16,000×gで20分間遠心分離し、上清を分液ロートに移した。沈殿物にはもう一度クロロホルム:メタノール混合液4mLを加えてホモジナイズし、16,000×gで20分間遠心分離して、上清を分液ロートに移した。上清を集めた分液ロートに0.88%塩化カリウムを2mL加えて攪拌、放置した。下層のクロロホルム層を抽出液として10mLメスフラスコに集めて、クロロホルムを加えてフィルアップした。これをネジロ試験管に移して、分析時まで冷暗所に保存した。

2) 肝臓中のコレステロール濃度の測定

肝臓の脂質抽出液を試験管に取り、80°Cのブロックヒーターで完全にクロロホルムを蒸発させた。蒸発乾固物中のコレステロールの定量は、血漿総コレステロール濃度の測定と同様の方法で行った。値は、肝臓1g中のコレステロール量に換算して求めた。

3) 肝臓中のトリグリセリド濃度の測定

肝臓の脂質抽出液を試験管に取り、80°Cのブロックヒーターで完全にクロロホルムを蒸発させた。蒸発乾固物中のトリグリセリドの定量は、血漿トリグリセリド濃度の測定と同様の方法で行った。値は、肝臓1g中のトリグリセリド量に換算して求めた。

糞中脂質の抽出、胆汁酸排泄量の定量

1) 糞中の脂質の抽出 [110]

採取した糞を凍結乾燥して乾燥重量を測定した後、糞を乳鉢にて粉碎した。糞を約1gを三角フラスコに精秤し、そこにあらかじめ加温した96%エタノール25mLを加えた。60-75°Cで2時間インキュベーションした後、吸引濾過(ろ紙:ADVANTEC、No.4A 55 mm)を行った。25mLメスフラスコに回収し、96%エタノールでフィルアップした。このうち5mLを試験管に採取し、アスピレーター(IWAKI ASPIRATOR ASP-13、イワキ)及びロータリーエバポレーター(EYELA、東京理科器械)を用いて減圧乾固した。その試験管にイソプロピルアルコール2mLを加え、これを糞中脂質抽出液として、測定時まで-80°Cで暗所に保存した。

2) 糞中のコレステロール濃度の測定

糞中のコレステロールの定量は、血漿総コレステロール濃度の測定と同様の方法で行った。

3) 糞中のトリグリセリド濃度の測定

糞中のトリグリセリド定量は、血漿中トリグリセリド濃度の測定と同様の方法で行った。

4) 糞中の胆汁酸量の測定

糞中の胆汁酸の測定は、酵素比色法による総胆汁酸測定用キット(総胆汁酸-テストワコー、和光純薬工業(株))を用いて行った。測定は、一つのサンプルにつき本検と盲検を用意して行った。糞中脂質抽出液0.2mLを試験管に取り、本検には本検用酵素液を、盲検には盲検用酵素液を0.5mLずつ加えて混合した。37°Cで正確に10分間インキュベーションした後、反応停止液を0.5mL加えて反応を停止した。反応液は波

長560nmで吸光度を測定した。スタンダードとしてキット中の標準液を用い、ブランクには蒸留水を用いて同様の操作を行った。

統計処理

本実験で得られたデータの計算および整理には、MacintoshのMicrosoft office 2001 Microsoft Excel、KaleidaGraph 3.0を使用した。データは、平均値と標準偏差で表した。また、異なる群間で有意差があるかどうかを検討するために、Instat Ver. 3.0を使用し、One-way ANOVAで検定した。有意差が認められた場合、Student-Newman-Keulsにより、どの群間に有意差があるかを検定した。有意水準は、 $p < 0.05$ とした。

2. 結果

マウスにPMPをタンパク質源とした正常食を摂取させることで、以下のように血中の総コレステロール、HDL-コレステロール濃度の上昇、肝臓および糞中トリグリセリドの濃度の減少が明らかとなった。しかし、高コレステロール食を与えたマウスには有意な差が認められなかった。

体重、飼料摂取量、組織重量、糞乾燥重量

21日間の飼育による解剖時の体重と総飼料摂取量、組織重量をTable 3-2.に示した。

21日間の飼育の結果、体重増加量は、C群で 2.88 ± 0.98 g、PM群で 2.82 ± 1.46 g、CC群で 1.95 ± 1.81 g、CPM群で 1.70 ± 1.59 gと4群間有意な差は認められなかった。飼料摂取量に関しては、C群で 66.2 ± 13.2 g、PM群で 66.2 ± 12.9 g、CC群で 69.3 ± 14.2 g、CPM群で 59.8 ± 7.2 gと4群間有意な差は認められなかった。

体重100g中肝臓重量はC群で 3.83 ± 0.35 g、PM群で 4.18 ± 0.48 g、CC群で 5.02 ± 0.34 g、CPM群で 6.27 ± 0.63 gと高コレステロール食を与えた群で有意に高値を示した ($p < 0.05$)。

腎臓重量はC群で 1.11 ± 0.08 g、PM群で 1.15 ± 0.05 g、CC群で 1.05 ± 0.06 g、CPM群で 1.19 ± 0.09 gとCPM群で有意に高値を示した ($p < 0.05$)。体重100g中精巣周囲脂肪組織重量、腎臓周囲脂肪組織重量、腸間膜脂肪組織重量はそれぞれC群で 2.12 ± 0.36 g、 0.66 ± 0.11 g、 1.45 ± 0.33 g、PM群で 1.41 ± 0.38 g、 0.39 ± 0.14 g、 1.32 ± 0.32 g、CC群で 1.38 ± 0.19 g、 0.42 ± 0.17 g、 1.31 ± 0.27 g、CPM群で 1.27 ± 0.41 g、 0.38 ± 0.15 g、 1.14 ± 0.22 gと精巣周囲脂肪組織重量はC群が他の3群と比べて有意に高値を示した。腎臓周囲脂肪組織重量はPMP摂取群で有意に低値を示したが、腸間膜脂肪

組織重量には4群で有意な差は認められなかった。

また、糞乾燥重量はC群で 0.90 ± 0.18 g、PM群で 1.08 ± 0.07 g、CC群で 1.01 ± 0.10 g、CPM群で 1.02 ± 0.05 gと4群間有意な差は認められなかったが、C群と比べて他の3群で上昇する傾向が見られた。

血糖値経時変化、血中グルコース濃度

飼育期間中の血糖値の経時変化と、飼育終了日の血中グルコース濃度をFig. 3-1に示した。

飼育1、2、3週間の血糖値(Fig. 3-1A)は、C群で 125.6 ± 13.7 mg/dL、 134.6 ± 16.1 mg/dL、 121.8 ± 9.5 mg/dL、PM群で 112.8 ± 14.6 mg/dL、 127.0 ± 12.0 mg/dL、 126.8 ± 7.2 mg/dL、CC群で 113.5 ± 10.9 mg/dL、 106.0 ± 16.8 mg/dL、 102.0 ± 5.3 mg/dL、CPM群で 84.7 ± 7.8 mg/dL、 89.3 ± 6.5 mg/dL、 100.2 ± 15.7 mg/dLであり、2週間と3週間(Fig. 3-1B)に、C群、PM群、CC群と比較してCPM群で有意な血糖値の上昇抑制が認められた($p < 0.05$)。また、飼育終了日の血中グルコース濃度は、C群で 121.8 ± 9.5 mg/dL、PM群で 126.8 ± 7.2 mg/dL、CC群で 102.0 ± 5.3 mg/dL、CPM群で 100.2 ± 15.7 mg/dLであり、コレステロール無添加群間及び添加群間で有意な差はなかった (Fig. 3-1 B)。

Table 3-2. Effects of dietary PMP on body-weight gain, food intake, tissue and dried feces weights in C57BL/6J mice fed with or without cholesterol diet

	C	PM	CC	CPM
Initial weight (g)	20.04±0.92	19.65±2.07	19.82±1.52	19.80±1.81
Final weight (g)	22.92±0.69	22.47±0.69	21.77±0.99	21.50±0.54
Weight gain (g/21d)	2.88±0.98	2.82±1.46	1.95±1.81	1.70±1.59
Food intake (g/21d)	66.2±13.2	66.2±12.9	69.3±14.2	59.8±7.2
Liver weight (g)	0.87±0.07	0.94±0.12	1.09±0.09	1.34±0.12
Kidneys weight (g)	0.25±0.01 ^{ab}	0.25±0.01 ^{ab}	0.22±0.01 ^a	0.25±0.02 ^b
Adipose tissue weight (g) :				
Epididymal	0.48±0.07 ^a	0.31±0.08 ^b	0.30±0.04 ^b	0.27±0.09 ^b
Perirenal	0.15±0.02 ^a	0.09±0.03 ^b	0.09±0.03 ^b	0.08±0.03 ^b
Mesenteric	0.33±0.07 ^a	0.29±0.07 ^a	0.28±0.06 ^a	0.24±0.05 ^b
Dried feces (g)	0.90±0.18	1.08±0.07	1.01±0.10	1.02±0.05
Tissue weight/100g body weight (g):				
Liver	3.83±0.35 ^a	4.18±0.48 ^a	5.02±0.34 ^b	6.27±0.63 ^c
Kidneys	1.11±0.08 ^{ab}	1.15±0.05 ^{ab}	1.05±0.06 ^a	1.19±0.09 ^b
Adipose tissue :				
Epididymal	2.12±0.36 ^a	1.41±0.38 ^b	1.38±0.19 ^b	1.27±0.41 ^b
Perirenal	0.66±0.11 ^a	0.39±0.14 ^b	0.42±0.17 ^{ab}	0.38±0.15 ^b
Mesenteric	1.45±0.33	1.32±0.32	1.31±0.27	1.14±0.22

Value are means±SD for 6 mice.

Means with a different letter (a,b) within each diet group differ ($p < 0.05$).

See Table 3-1 for details of dietary groups.

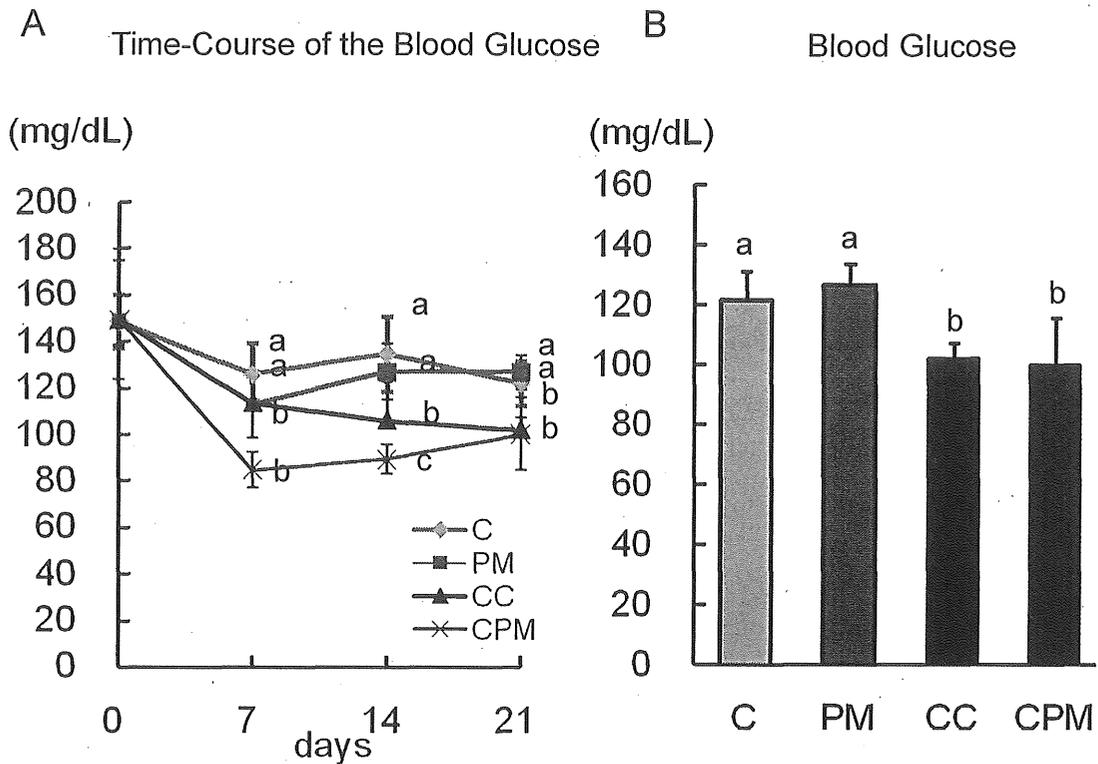


Fig. 3-1. Effect of dietary PMP on blood glucose levels in C57BL/6J mice fed with or without cholesterol diet.

Values are means±SD for 6 mice.

Means with a different letter (a,b) within each diet group differ ($p < 0.05$).

See Table 3-1 for details of dietary groups.

血漿中脂質濃度

血漿中の各脂質濃度を測定した結果を、Fig. 3-2に示した。

総コレステロール濃度(Fig. 3-2A)は、C群で 83.03 ± 12.26 mg/dL、PM群で 108.63 ± 3.00 mg/dL、CC群で 141.47 ± 24.67 mg/dL、CPM群で 135.58 ± 14.16 mg/dLと、高コレステロール群で有意に高値を示した($p < 0.05$)。HDL-コレステロール濃度(Fig. 3-2B)も同様に、C群で 26.15 ± 4.58 mg/dLに対してPM群で 31.85 ± 1.33 mg/dLと有意に高い

値を示した。コレステロール添加群のCC群で 15.43 ± 3.50 mg/dL、CPM群で 12.35 ± 1.20 mg/dLと、正常食群に比べて有意に低い値を示した($p < 0.05$)。トリグリセリド濃度(Fig. 3-2C)は同様に、C群で 70.96 ± 24.16 mg/dL、PM群で 73.08 ± 29.40 mg/dL、CC群で 44.23 ± 10.52 mg/dL、CPM群で 34.62 ± 11.65 mg/dLと正常食群に比べてコレステロール添加群で有意に低い値を示した($p < 0.05$)。逆に、LDL-コレステロール濃度(Fig. 3-2D)は、C群で 42.68 ± 8.77 mg/dL、PM群で 62.17 ± 4.99 mg/dL、CC群で 117.37 ± 29.07 mg/dL、CPM群で 116.31 ± 15.51 mg/dLと高コレステロール群で有意に高値を示した($p < 0.05$)。

肝臓中脂質濃度

肝臓中の各脂質濃度を測定した結果をFig. 3-3に示した。

肝臓のコレステロール濃度(Fig. 3-3A)は、C群で 1.57 ± 0.22 mg/g Liver wt、PM群で 2.02 ± 0.75 mg/g Liver wt、CC群で 31.01 ± 3.67 mg/g Liver wt、CPM群で 27.79 ± 2.28 mg/g Liver wt、と高コレステロール群で有意に高値を示した($p < 0.05$)。トリグリセリド濃度(Fig. 3-3B)においても、C群で 9.99 ± 3.03 mg/g Liver wtに対してPM群で 6.29 ± 2.42 mg/g Liver wtと有意に低い値を示した($p < 0.05$)。コレステロール添加群のCC群で 19.97 ± 0.88 mg/g Liver wt、CPM群で 22.76 ± 7.30 mg/g Liver wtと正常食群に比べて高コレステロール群で有意に高値を示した($p < 0.01$)。

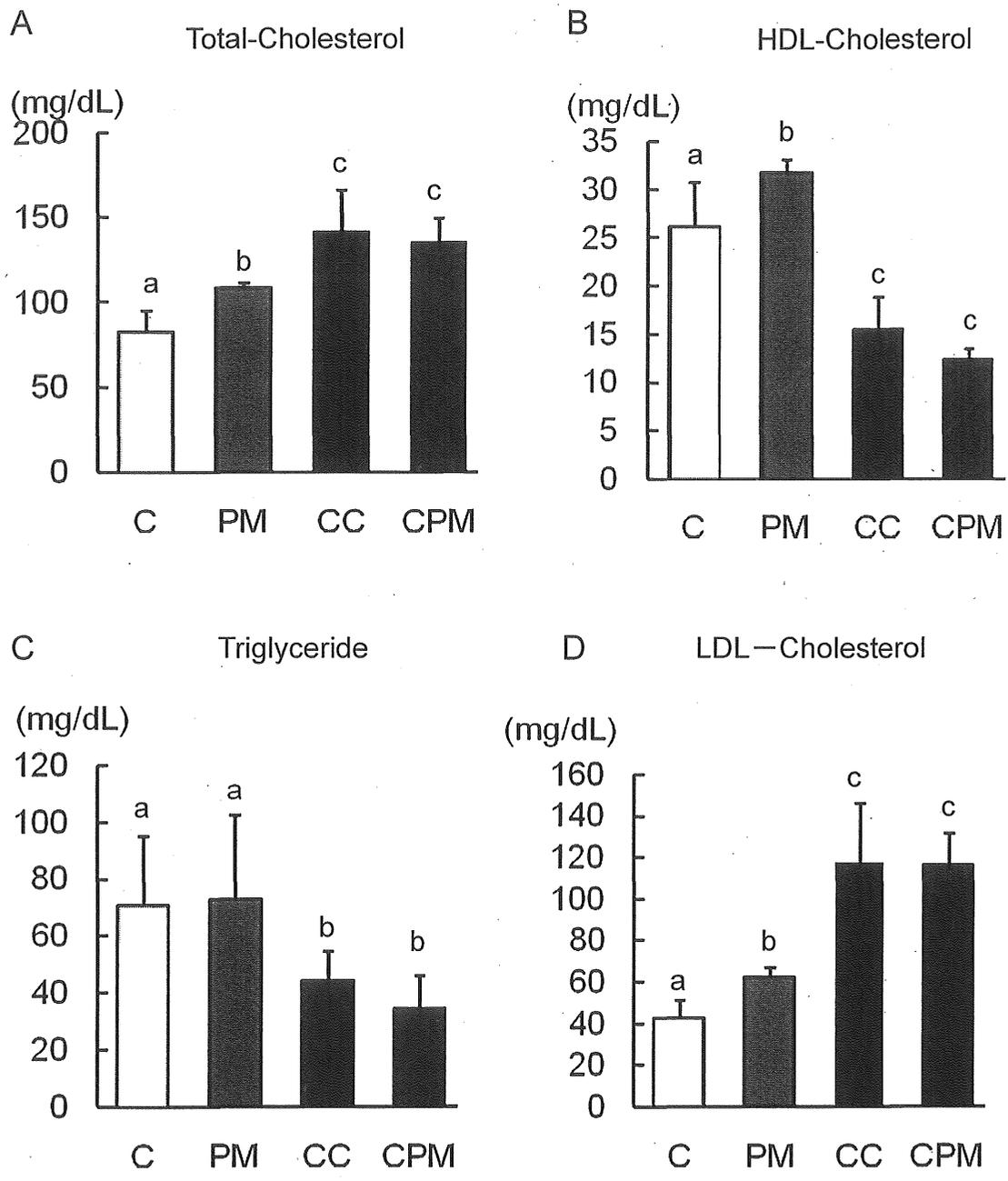


Fig. 3-2. Effect of dietary PMP on plasma lipid concentrations in C57BL/6J mice fed with or without cholesterol diet.

Value are means±SD for 6 mice.

Means with a different letter (a,b,c) within each diet group differ ($p < 0.05$).

See Table 3-1 for details of dietary groups.

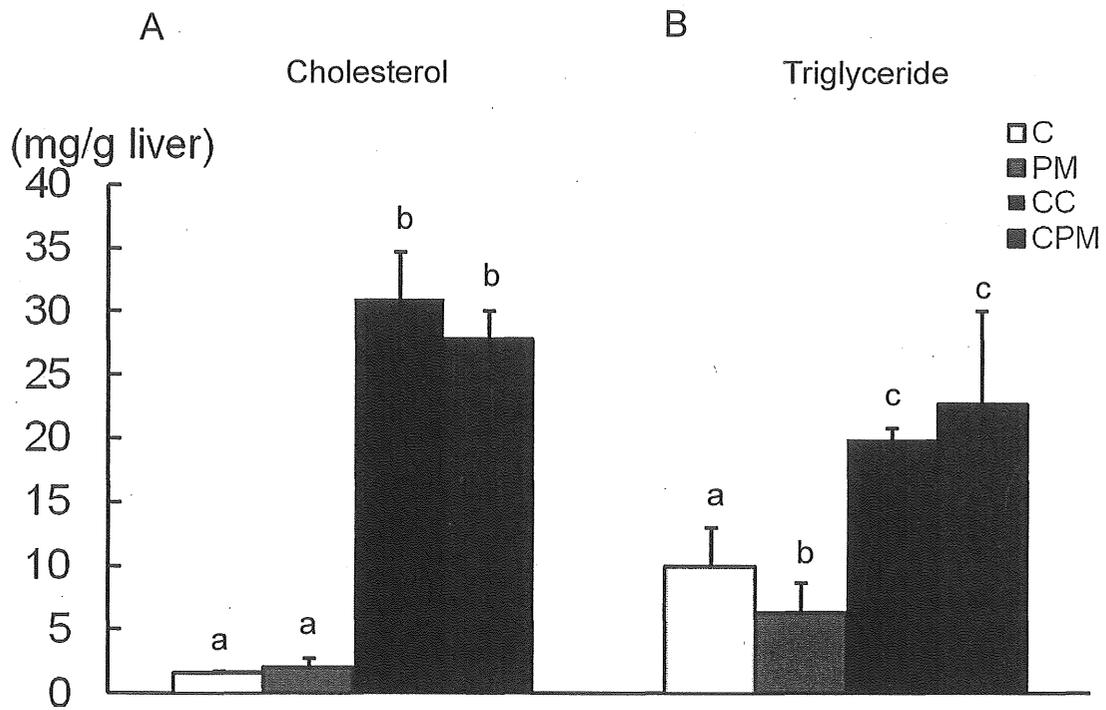


Fig. 3-3. Effect of dietary PMP on liver lipid concentrations in C57BL/6J mice fed with or without cholesterol diet.

Values are means \pm SD for 6 mice.

Means with a different letter (a,b,c) within each diet group differ ($p < 0.05$).

See Table 3-1 for details of dietary groups.

糞中脂質濃度

糞中の各脂質濃度を測定した結果をFig. 3-4に示した。

糞の胆汁酸濃度(Fig. 3-4A)は、C群で $1.01 \pm 0.25 \mu\text{mol/L}$ 、PM群で $2.49 \pm 1.57 \mu\text{mol/L}$ とキビタンパク質摂取群で有意に低い値を示した($p < 0.05$)。コレステロール添加群のCC群で $1.91 \pm 0.64 \mu\text{mol/L}$ 、CPM群で $2.74 \pm 1.11 \mu\text{mol/L}$ と群間有意な差は認められなかった。一方、糞中コレステロール濃度(Fig. 3-4B)は、C群で $5.35 \pm 0.67 \text{mg/dL}$ 、PM群で $6.87 \pm 4.11 \text{mg/dL}$ に対して、CC群で $55.04 \pm 5.64 \text{mg/dL}$ 、CPM群で $37.03 \pm 4.91 \text{mg/dL}$ と高コレステロール群で有意に高い値を示した($p < 0.05$)。トリグリセリド濃度(Fig. 3-4C)はC群で $5.67 \pm 2.77 \text{mg/dL}$ 、PM群で $1.87 \pm 0.46 \text{mg/dL}$ 、CC群で $9.04 \pm 2.66 \text{mg/dL}$ 、CPM群で $5.12 \pm 1.57 \text{mg/dL}$ とキビタンパク質摂取群で有意に低い値を示した($p < 0.05$)

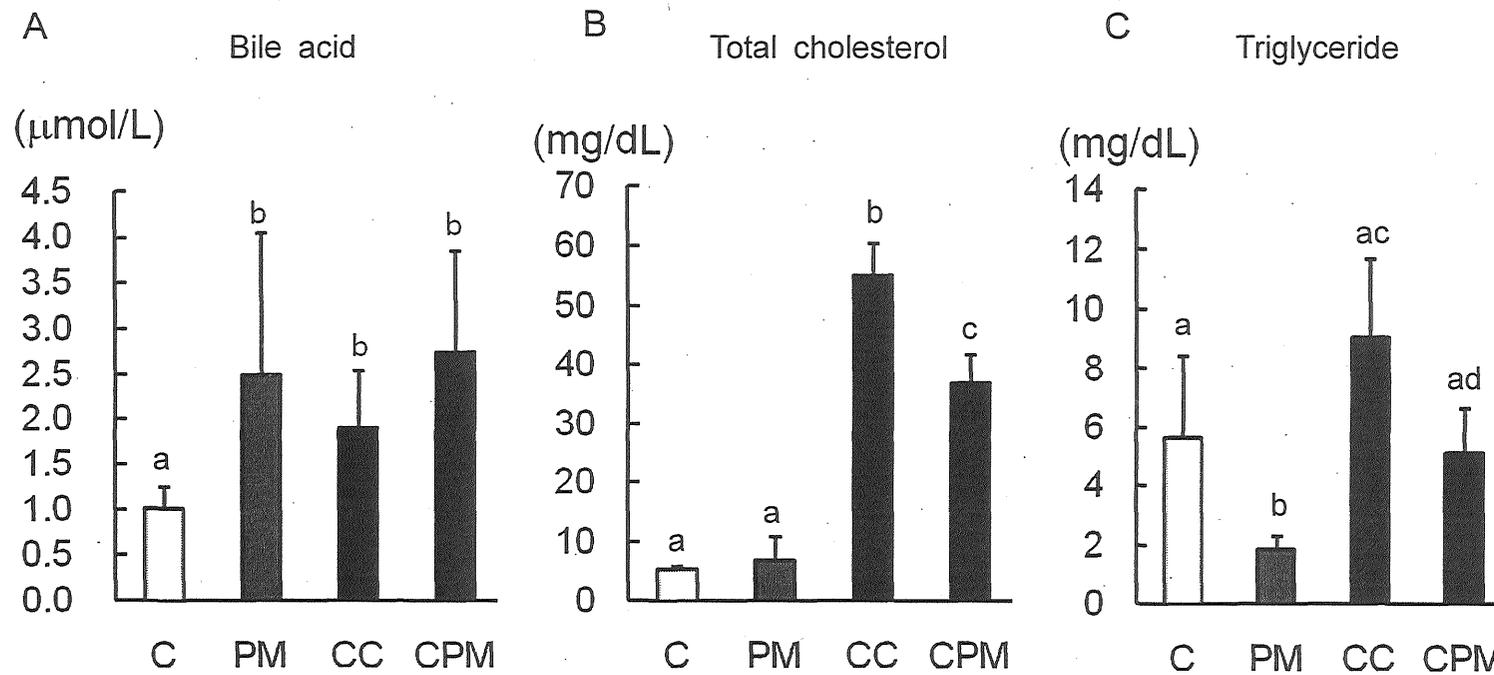


Fig. 3-4. Effect of dietary PMP on the fecal excretion of lipids in C57BL/6J mice fed with or without cholesterol diet.

Values are means \pm SD for 6 mice.

Means with a different letter (a,b) within each diet group differ ($p < 0.05$).

See Table 3-1 for details of dietary groups.

3. 考察

本節では、キビタンパク質の摂取が、コレステロール添加飼料摂取によるマウスの高コレステロール血症に対して、抑制効果を有するかを検討した。その結果、飼料摂取量、最終日体重はキビタンパク質添加群とカゼイン群間の差は見られず、同等の成長が見られた。高コレステロール血症誘導飼料の摂取により、血漿中の総コレステロール、LDL-コレステロール濃度は有意に上昇し、高コレステロール血症を誘導させることができた。コレステロール無添加食餌条件下のキビタンパク質を摂取群では、マウスの脂肪組織重量の低下、肝臓中トリグリセリド濃度の減少、血漿中総コレステロール、LDL-コレステロールの増加が見られたが、HDL-コレステロール濃度は正常群と比較して、非常に高い値を示した。これらの結果は、キビタンパク質が糞中への胆汁酸排泄を促進することで引き起こされると考えられる。

大豆タンパク質により腸管内からの胆汁酸の再吸収が阻害された場合、糞中への胆汁酸排泄量の増加と血漿中のコレステロール濃度の低下が引き起こされることが知られている [111]。本節では、キビタンパク質摂取による血漿および肝臓中コレステロール濃度の有意な差はなかったが、肝臓中トリグリセリド濃度の減少がみられ、糞中への胆汁酸排泄が促進されたため、胆汁酸の再吸収が低下して腸管循環プール内の胆汁酸量が減少、これに刺激されて肝臓での胆汁酸の合成が活性化、基質となるコレステロールの必要性が高まり、血漿リポタンパク質のコレステロールが使用されるために引き起こされると考えられる。

ソバタンパク質の肝臓のトリグリセリド濃度および脂肪組織の重量の減少作用は、肝臓脂肪合成関連酵素の活性の低下および低い消化によるものと報告されている [106]。また、大豆タンパク質によるラットで血漿および肝臓でのトリグリセリド濃度の減少は脂肪合成酵素の発現の抑制によることも報告されており [112]、キビタンパク質の摂取による脂肪組織重量の低下、肝臓中トリグリセリド濃度の減少は脂肪合成関連酵素の発現と関連がある可能性も考えられる。以上より、コレステロール無添加食餌条件下のマウスにキビタンパク質を摂取することでマウス脂質代謝を改善することができる可能性が示された。

高コレステロールを摂取することにより、血漿のVLDLが増加するとともに、HDLの主要な

アポリポタンパク質であるapo A-1の分泌量が減少することが報告されている。ApoA-1の分泌量と血漿のHDL粒子の生成量には正の相関性があるとされているため [113]、本実験ではコレステロール過剰摂取により血漿中のVLDLが増加したことで、HDL粒子の生成量が減少したことが考えられる。

動脈硬化症、とりわけ心筋梗塞や狭心症など冠状動脈疾患の危険性は、血中のLDL-コレステロールの増加によって高くなることは良く知られている [114]。一方、HDL-コレステロールは、その血漿濃度が低いほど冠状動脈疾患を増加させ高いほど改善されることを示している [115]、動脈硬化症に対して「防御因子」として働いていると考えられている。また、HDL-コレステロールが低いことはLDL-コレステロールの上昇の有無に関わらず動脈硬化症の危険を高めることが示唆されており、低HDL-コレステロールは高LDL-コレステロール以上に注目すべき「危険因子」であるといえる。これらは、HDL-コレステロールが、臓器から肝臓へコレステロールを回収するコレステロール逆転送経路の役割を演ずることと関連があると考えられている。

肝臓中のコレステロール濃度に関しては、コレステロール負荷した2群間で有意差は認められなかった (Fig. 3-3)。しかし、高コレステロール血症誘導飼料の摂取により、肝臓中のコレステロール、トリグリセリド濃度は有意に上昇した。

コレステロール摂取量と血中コレステロール濃度は相関関係があるという研究結果もあるが [116]、食事を通じて多量のコレステロールを摂取した時、コレステロール合成と総コレステロールおよびLDL-コレステロールの水準に大きく影響を受けない研究報告もある [117, 118]。

コレステロールは細胞膜の構成成分で、胆汁酸やステロイドホルモンなど生理活性物質の前駆体である。普通食で0.2-2g程度摂取され、体内でも条件によって変わるが1-1.5g程度合成される。コレステロール摂取量が増加するとコレステロール含量が高いカイロミクロンを形成され、肝臓に到達されるコレステロールの量も増加する [119]。本研究の結果では、高コレステロール食を摂取した時、血中、または肝臓中のコレステロール濃度有意に増加する結果を示した。しかし、コレステロール無添加食群と比べて、高コレステロール食を摂取した時、血中トリグリセリド濃度は有意な低下が見られたが、肝臓中のトリグリセリド濃度は高コレステロール食により高い値を示した。このような結果はSREBP-2 トランスジェニック

マウスを用いた実験で同様の結果が見られ [120]、肝臓中のSREBP-2遺伝子が関係すると考えられるが、詳細な作用メカニズムは不明である。

軽い高コレステロール血症(平均220mg/dL程度)の人に、大豆タンパク質を摂取させた研究で、大豆タンパク質の不消化高分子画分(HMF)が血清LDL-コレステロールレベルを減少させ、HDL-コレステロールレベルを増加させること、また、糞中ステロイド排泄を増すことが報告されている [121]。このメカニズムとしては、大豆タンパク質によるコレステロールや胆汁酸の吸収阻害が第一に考えられる。しかし、本研究の糞中のコレステロール濃度に関しては、HDL-コレステロールとの相関関係が見られず、高コレステロール血症誘導飼料の摂取により、糞中のコレステロール、トリグリセリド濃度が正常食群と比べて有意に上昇し、また、CPM群がCC群と比べて有意に低い値を示した (Fig. 3-4)。

今回用いた高コレステロール血症誘導飼料はコレステロール、コール酸ナトリウム含量が少ないため、キビタンパク質を摂取による血漿、肝臓中のコレステロール濃度の減少がはっきり示せなかった可能性も考えられる。また、糞中のコレステロール、トリグリセリド濃度がキビタンパク質摂取群で有意に低い値を示したことから、糞中コレステロール排泄を抑制するメカニズム、あるいはその成分の検討も必要があると思われる。

Choiらは、高コレステロール血症誘導食餌の韓国産アワタンパク質がカゼイン群に比べて、コレステロール代謝では変化が見られなかったが、血漿と肝臓のトリグリセリド濃度を有意に減少させる効果が明らかになった。しかし、同じキビ属である韓国産キビタンパク質では違い結果を示した [83]。

以上の本節の結果から、韓国産キビタンパク質は、正常食事条件下で血漿中HDL-コレステロール濃度の増加作用を示し、高コレステロール血症の改善効果を有することが示された。

第2節 高脂肪食餌投与のC57BL/6Jマウスにおけるキビタンパク質の血糖値制御及び脂質代謝に及ぼす影響

肥満は、血圧、糖尿病、脂質代謝異常症などをしばしば合併し、動脈硬化症を発症するメタボリックシンドローム症候群の重要な構成疾患である。日本人の肥満は男性の約21%、女性の約17%とされ、国民栄養調査では摂取する総カロリーはむしろ減少しているが食事の欧米化のために脂肪摂取は増加しているのが現状である [122,123]。

肥満は世界中の大きな健康課題となっており、その実能を明らかにするため、WHOにおいて“Global Database on Body Mass Index”を現在構築中である [124]。

米国の最近の調査によれば、1999-2000年における年齢調整した肥満者(BMI \geq 30:20-74歳)の割合は30.5%であり、国を挙げての健康施策である“Healthy People 2000”における最重点項目として肥満対策が挙げられていたにもかかわらず、1988-1994年のデータ(22.9%)と比べて大幅に増加している。これを、BMI25以上の過体重者(over-weight)として見ると、55.9%から64.5%に増加となっている [125]。

また、アジア諸国における韓国の状況を見るために、1990年以降各国から報告されているデータについて、20歳以上の韓国人のBMI \geq 25の者の割合は、男性15.8%(BMI \geq 30kg/m²では0.9%)、女性10.6%(同0.7%)であった [126]。

このような肥満者の増加の背景としては、食生活の変化や身体活動量の低下の影響が大きいのではないかと予想される。しかし、摂取量に関しては、少なくとも国民栄養調査では国民一人当たりの総エネルギー摂取量は1975年以降一貫して減少傾向にある。同じエネルギー摂取量下で、脂質からのエネルギー割合の相対的増加が、どの程度肥満の増加をもたらすかについては未だに議論のあるところである [127]。

最近、肥満人口の増加による肥満治療および改善方法として、生活習慣、食事療法、適切な運動および薬物投与などが挙げられている。しかし、肥満治療薬物の場合、様々な副作用が指摘されており、食事改善や運動の促進により疾患を治療、改善しようとする研究が多くなっており、食事を通じて病気の予防、健康を増進させようとする関心が高まっている。

疫学研究によると、全粒穀物、果物、野菜の摂取増加が、慢性疾患を予防し、改善させ

ることが報告されている [128]。全粒穀物食品の摂取は、心臓病と癌を減少させる効果、血中脂質濃度と血糖値制御に対する効果があるとともに、インスリン抵抗性の改善や食物繊維と微量栄養素の摂取量を高めることになる[129,130]。また水溶性繊維素が豊富なオートムギは血中コレステロール濃度を低下させることが報告されている [131]。

本論文の第3章1節の正常食餌の摂取させた時、血中HDL-コレステロールを有意に増加させる効果が示された。従って、植物性タンパク質であるキビタンパク質に肥満、糖質及び脂質代謝に影響を与える可能性があると考えられる。

そこで本節では、高脂肪食餌条件下の飼育によって、肥満、高血糖、2型糖尿病になるC57BL/6Jマウスを用いて、肥満誘導食を3週間摂取させた時に生じる肥満、脂質代謝異常症に及ぼすキビタンパク質の影響について検討した。

1. 方法

飼料の調製

実験食餌は、AIN-93組成に従って調製した [108]。正常群(C群)、C群の20%タンパク質相当量のカゼインに、ラード20%を添加したHC群、及び20%タンパク質相当量のタンパク質源としてPMPを添加した飼料群(HPM群)の3つの飼料群とした。

HPM群には制限アミノ酸であるリジンのカゼインのアミノ酸組成に合わせて添加した[78]。キビタンパク質中の含まれている脂質や食物繊維を考慮し、飼料調製時の大豆油とセルロースの添加量を調整した。

Table 3-3. Diet compositions (g/100g)

	Normal diet		High-fat diet	
	Casein (C)	Casein (HC)	Casein (HC)	PMP (HPM)
Casein ¹	22.9	22.9	-	-
PMP	-	-	-	37.7
AIN-93 Salt mixture ²	3.5	4.3	4.3	4.3
AIN-93 Vitamin mixture ²	1.0	1.2	1.2	1.2
Soybean oil ³	7.0	7.0	7.0	4.5
Choline bitartrate ³	0.2	0.2	0.2	0.2
Cellulose ¹	5.0	6.2	6.2	1.6
α -Cornstarch ¹	12.5	6.9	6.9	4.3
Cornstarch ¹	37.6	20.9	20.9	14.5
L-Lys-HCl ⁴	-	-	-	1.2
Cystine ⁴	0.3	0.3	0.3	-
Sucrose ⁵	10.0	10.0	10.0	10.0
Lard ³	-	20.0	20.0	20.0

¹Oriental yeast, Tokyo

²AIN-93G diet composition

³Wako Pure Chemical Industries, Osaka

⁴Ajinomoto, Tokyo

⁵Toyo Sugar Refining, Tokyo

実験動物および飼育方法

実験動物には、5週齢のC57BL/6J系雄マウス(日本クレア;東京) 21頭を使用した。購入後3日間は予備飼育期間とし、AIN-93組成カゼイン飼料と水を自由接收させ、各群7頭ずつ3群に群分け、Table 3-3の飼料で20日間飼育し、体重変化を測定した。飼育期間の18日目から20日目までの糞を採取し、分析時まで -20°C で保存した。21日目にマウスを8時間絶食させ、ジエチルエーテル麻酔下で次のように解剖を行った。0.1M EDTAで処理したシリンジを用いて、下大静脈から採血し、血液は試験管に移し、 4°C 、 $3000 \times g$ で15分間の遠心分離を行い、血漿を分離した。肝臓は生理食塩水で還流した後に接收し、重量を測定した。更に、精巣周囲脂肪組織を採取し、重量を測定した。分離した血漿、肝臓は、分析時まで -80°C で保存した。

血糖値の測定

血糖値の測定は、第1節と同様の方法で行った。

Oral glucose tolerance test(OGTT)

Oral glucose tolerance testは16時間絶食し、ゾンデを用いてグルコース($1.5\text{g}/\text{kg}$ 体重)を経口投与し、尾静脈をエタノールで消毒後、メスで数ミリカットし、出血させ血糖値測定チップ(オートディスクセンサー、バイオメディカル(株)、東京)に血液をつけ、血糖値を測定した。グルコース負荷後、15、30、60、90、120分後に同様に採血を行い、血中グルコース濃度を測定した。

血中、組織成分分析方法

血漿の分析

1) 血漿中の総コレステロール濃度の測定

血漿中の総コレステロール濃度測定は、第1節と同様の方法で行った。

2) 血漿中のHDL-コレステロール濃度の測定

血漿中のHDL-コレステロール濃度測定は、第1節と同様の方法で行った。

3) 血漿中のトリグリセリド濃度の測定

血漿中のトリグリセリド濃度測定は、第1節と同様の方法で行った。

4) 血漿中のインスリン及びアディポネクチン濃度の測定

血漿中のインスリン濃度は、酵素免疫測定法(Enzyme Linked Immno-Sorbent Assay; ELISA法)によるインスリン測定用キット(レビスインスリン-マウスT、シバヤギ(株);群馬)を用い、プロトコルに従って測定した。血中アディポネクチン濃度も同様に、ELISA法によるアディポネクチン測定用キット(マウス/ラットアディポネクチンELISAキット、大塚製薬(株);東京)を用い、プロトコルに従って測定した。

肝臓の脂質分析

1) 肝臓脂質の抽出

肝臓脂質の抽出は、第1節と同様の方法で行った。

2) 肝臓中のコレステロール濃度の測定

肝臓中のコレステロール濃度の測定は、第1節と同様の方法で行った。

3) 肝臓中のトリグリセリド濃度の測定

肝臓中のトリグリセリド濃度の測定は、第1節と同様の方法で行った。

糞中脂質の抽出、胆汁酸排泄量の定量

1) 糞中脂質の抽出

糞中脂質の抽出は、第1節と同様の方法で行った。

2) 糞中のコレステロール濃度の測定

糞中のコレステロール濃度の測定は、第1節と同様の方法で行った。

3) 糞中のトリグリセリド濃度の測定

糞中のトリグリセリド濃度の測定は、第1節と同様の方法で行った。

4) 糞中の胆汁酸量の測定

糞中の胆汁酸の測定は、第1節と同様の方法で行った。

統計処理

本実験で得られたデータの計算および整理は、第1節と同様の方法で行った。

2. 結果

高脂肪食餌条件下で、マウスにPMPを摂取させると、以下のように最終日血糖値の上昇を抑制させ、血中のトリグリセリド濃度が低下することが明らかとなった。

体重、飼料摂取量、組織重量、糞乾燥重量

21日間の飼育による解剖時の体重と総飼料摂取量、組織重量をTable 3-4に示した。

21日間の飼育の結果、体重増加量はC群で 5.6 ± 0.5 g、HC群で 5.8 ± 0.5 g、HPM群で 4.2 ± 1.1 gとHPM群で有意に低い値を示した ($p < 0.05$)。飼料摂取量に関しては、C群で 50.7 ± 8.2 g、HC群で 53.3 ± 4.3 g、HPM群で 44.8 ± 8.8 gとHPM群で有意に低い値を示した ($p < 0.05$)。体重100g中肝臓重量、腎臓重量はC群で 4.24 ± 0.25 g、 0.26 ± 0.06 g、HC群で 4.40 ± 0.98 g、 0.28 ± 0.05 g、HPM群で 3.95 ± 0.27 g、 0.28 ± 0.02 gと3群で有意な差は認められなかった。体重100g中精巣周囲脂肪組織重量、腎臓周囲脂肪組織重量はそれぞれC群で 1.85 ± 0.24 g、 0.61 ± 0.15 g、HC群で 2.01 ± 0.38 g、 0.63 ± 0.15 g、HPM群で 1.88 ± 0.26 g、 0.52 ± 0.09 gと3群で有意な差は認められなかった。又、糞乾燥重量はC群で 0.24 ± 0.03 g/day、HC群で 0.27 ± 0.03 g/day、HPM群で 0.33 ± 0.05 g/dayとHPM群で上昇した。

Table 3-4. Effects of dietary PMP on body-weight gain, food intake, tissue and dried feces weights in C56BL/6J mice fed high-fat diet

	C	HC	HPM
Initial weight (g)	18.3±0.7	18.6±1.1	18.6±0.8
Final weight (g)	23.8±0.8 ^a	24.4±0.8 ^a	22.8±1.3 ^b
Weight gain (g/21d)	5.6±0.5 ^a	5.8±0.5 ^a	4.2±1.1 ^b
Food intake (g/21d)	50.7±8.2 ^{ab}	53.3±4.3 ^a	44.8±8.8 ^b
Liver weight (g)	1.01±0.08 ^a	1.07±0.24 ^a	0.89±0.06 ^b
Kidneys weight (g)	0.26±0.06	0.28±0.05	0.28±0.02
Adipose tissue weight (g) :			
Epididymal	0.44±0.05	0.49±0.10	0.43±0.07
Perirenal	0.14±0.03	0.15±0.04	0.12±0.02
Dried feces (g/day)	0.24±0.03 ^a	0.27±0.03 ^a	0.33±0.05 ^b
Tissue weight/100g body weight (g) :			
Liver	4.24±0.25	4.40±0.98	3.95±0.27
Kidneys	0.26±0.06	0.28±0.05	0.28±0.02
Adipose tissue :			
Epididymal	1.85±0.24	2.01±0.38	1.88±0.26
Perirenal	0.61±0.15	0.63±0.15	0.52±0.09

Values are means ± SD for 7 mice.

Means with a different letter (a,b) within each diet group differ ($p < 0.05$).

See Table 3-3 for details of dietary groups.

Oral glucose tolerance test

Oral glucose tolerance testの結果と血糖上昇下面積(AUC)をFig. 3-5に示した。

Oral glucose tolerance test (Fig. 3-5A) の結果は、グルコース投与後120分間までに3群間で有意な血糖値の上昇抑制は認められなかった。又、血糖上昇下面積(AUC) (Fig. 3-5B)は、C群で $4.16 \pm 2.92 \text{ mg} \cdot \text{min/dL}$ 、HC群で $8.71 \pm 4.05 \text{ mg} \cdot \text{min/dL}$ 、HPM群で $10.2 \pm 3.93 \text{ mg} \cdot \text{min/dL}$ と高脂肪食群間でC群に比べて有意な高い値を示した ($p < 0.05$)。

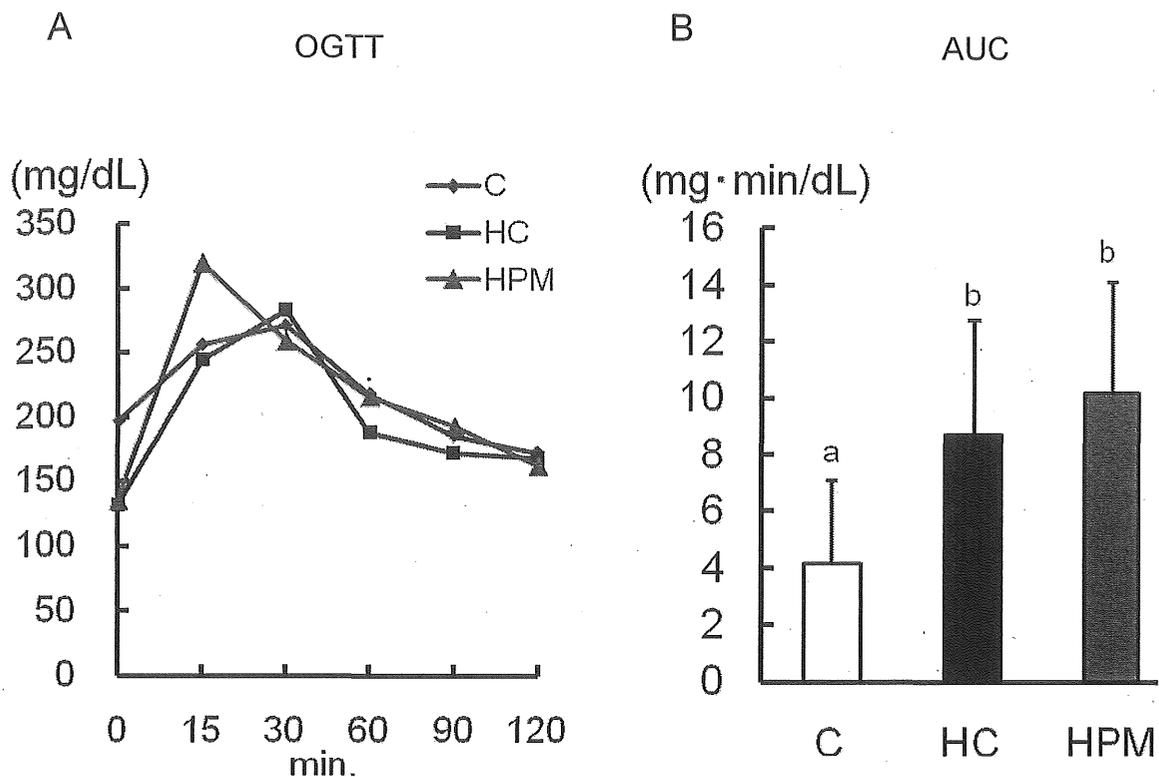


Fig. 3-5. Effect of dietary PMP on blood glucose response at OGTT and AUC in C57BL/6J mice fed normal- or high-fat diet.

Values are means±SD for 7 mice.

Means with a different letter (a,b) within each diet group differ ($p < 0.05$).

See Table 3-3 for details of dietary groups.

血糖値経時変化、血中グルコース濃度

飼育期間中の血糖値の経時変化と、飼育終了日の血中グルコース濃度をFig. 3-6に示した。

飼育1、2、3週間の血糖値 (Fig. 3-6A)は、C群で150.9±23.1mg/dL、152.3±18.6mg/dL、190.0±24.3mg/dL、HC群で219.7±32.6mg/dL、202.0±10.2mg/dL、188.1±13.0mg/dL、HPM群で177.7±15.4mg/dL、165.0±8.6mg/dL、149.1±15.2mg/dLと、HC群と比較してC群、HPM群で有意な血糖値の上昇抑制が認められた($p < 0.05$)。又、飼育終了日の血中グルコース濃度 (Fig. 3-6B)は、C群で190.0±24.3mg/dL、HC群で188.1±13.0mg/dL

に対して、HPM群で $149.1 \pm 15.2 \text{ mg/dL}$ とC群、HC群と比べて有意な血糖値の上昇抑制が認められた($p < 0.05$)。

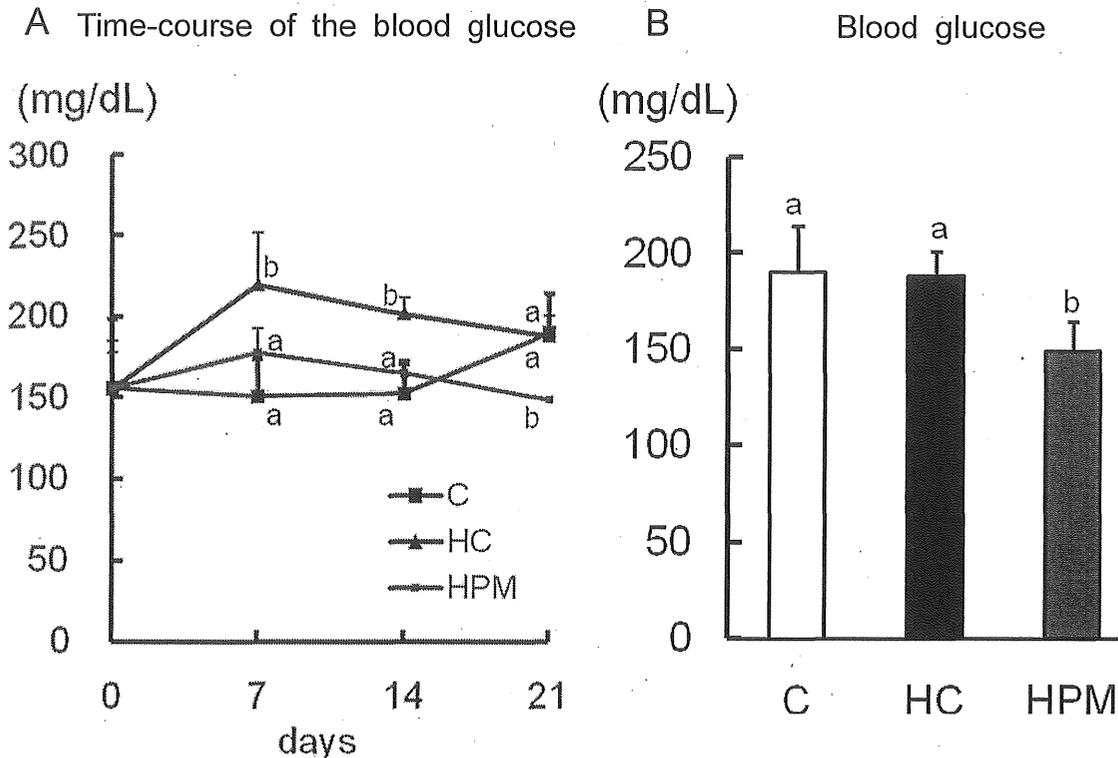


Fig. 3-6. Effect of dietary PMP on and blood glucose levels in C57BL/6J mice fed normal- or high-fat diet.

Values are means \pm SD for 7 mice.

Means with a different letter (a,b) within each diet group differ ($p < 0.05$).

See Table 3-3 for details of dietary groups.

血中インスリン及びアディポネクチン濃度

血中インスリン及びアディポネクチン濃度を測定した結果をFig. 3-7に示した。

血中インスリン濃度 (Fig. 3-7A)は、C群で $10.4 \pm 5.9 \text{ ng/mL}$ 、HC群で $9.26 \pm 1.94 \text{ ng/mL}$ 、HPM群で $8.11 \pm 3.81 \text{ ng/mL}$ と各群間有意な差は認められなかった。血中アディポネクチン濃度(Fig. 3-7B)は、C群で $34.0 \pm 4.4 \mu\text{g/mL}$ 、HC群で $32.4 \pm 3.7 \mu\text{g/mL}$ 、HPM群で $37.4 \pm 7.9 \mu\text{g/mL}$ と群間有意な差は認められなかった。

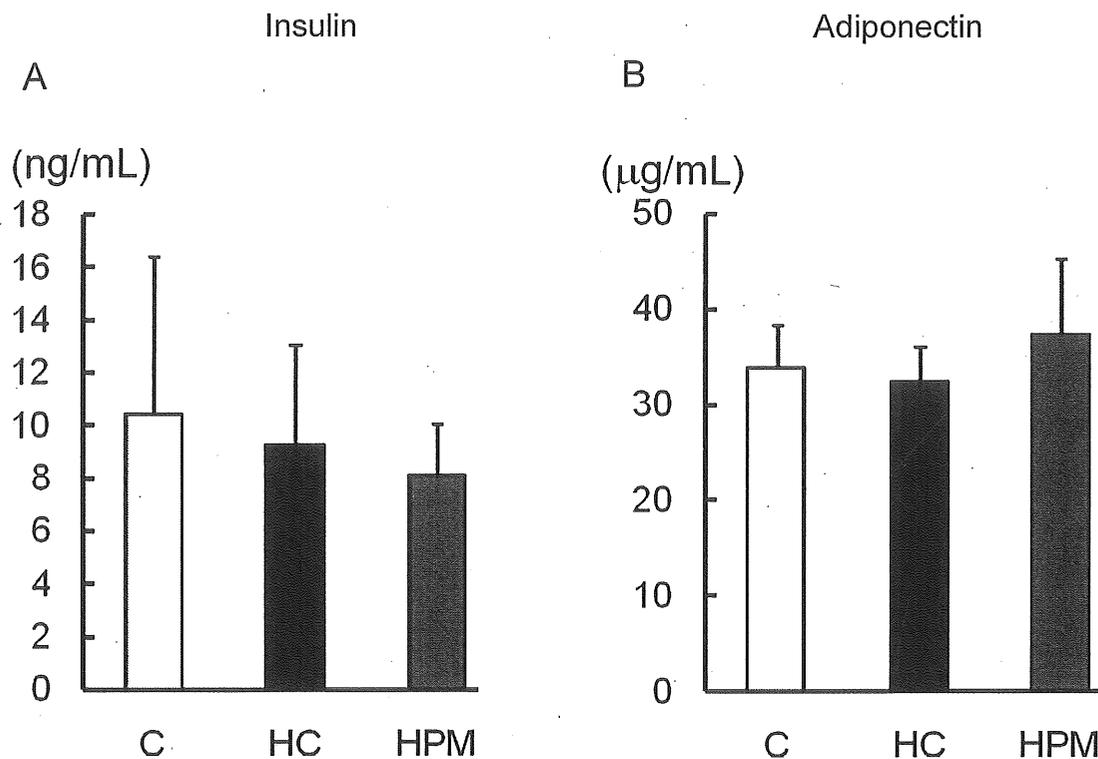


Fig. 3-7. Effect of dietary PMP on plasma insulin and adiponectin concentrations in C57BL/6J mice fed normal- or high-fat diet.

Values are means±SD for 7 mice.

See Table 3-3 for details of dietary groups.

血漿中脂質濃度

血漿中の各脂質濃度を測定した結果をFig. 3-8に示した。

総コレステロール濃度 (Fig. 3-8A)は、C群で 238.7 ± 51.7 mg/dL、HC群で 201.2 ± 43.4 mg/dL、HPM群で 190.3 ± 37.9 mg/dLと群間有意な差は認められなかった。HDL-コレステロール濃度 (Fig. 3-8B)も同様に、C群で 72.3 ± 10.9 mg/dL、HC群で 67.6 ± 16.6 mg/dL、HPM群で 68.7 ± 10.0 mg/dLと各群間有意な差は認められなかった。一方、トリグリセリド濃度 (Fig. 3-8C)は、C群で 173.8 ± 57.9 mg/dL、HC群で 65.1 ± 14.9 mg/dL、HPM群で 39.9 ± 11.5 mg/dLと、HPM群でHC群と比べて有意に低い値を示した($p < 0.05$)。

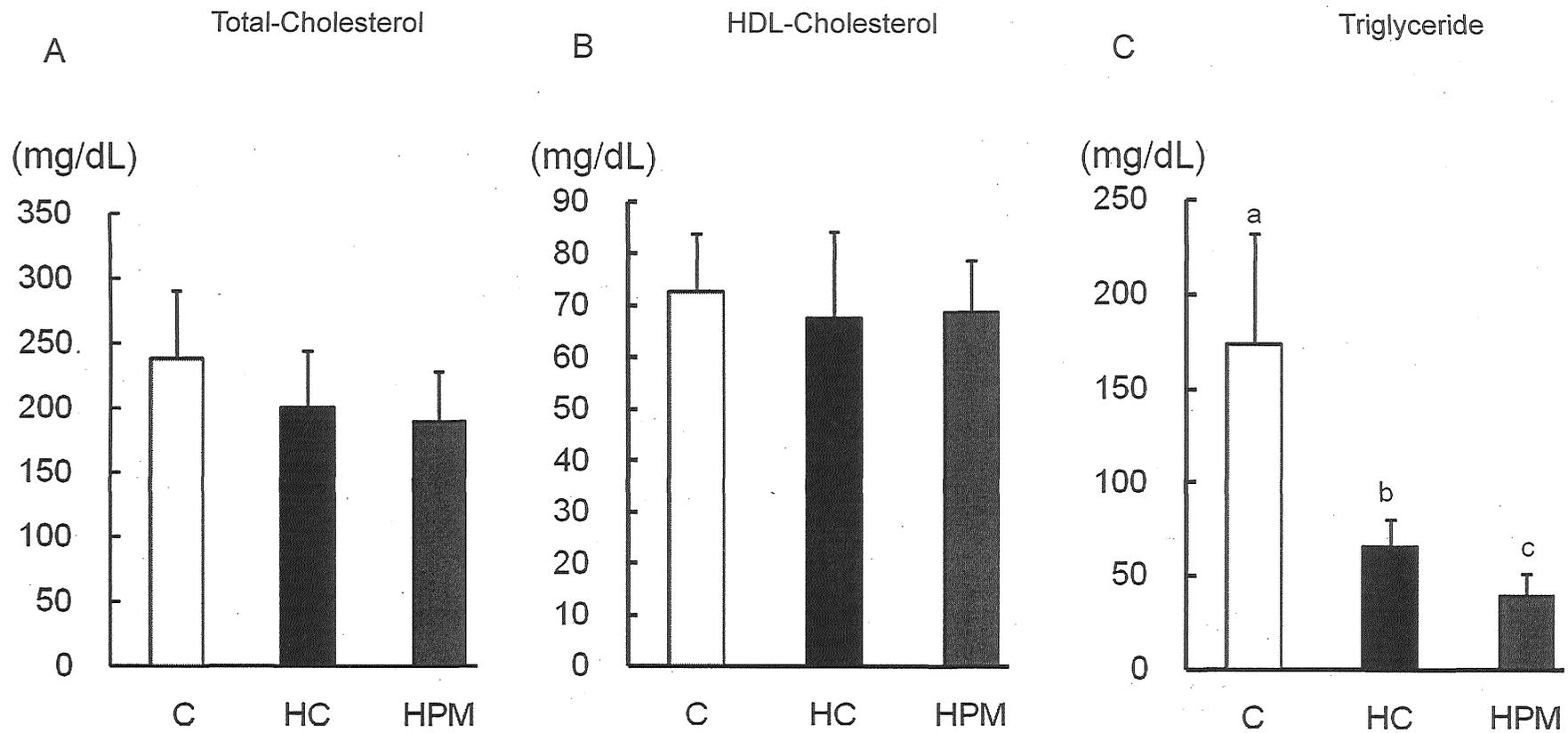


Fig. 3-8. Effect of dietary PMP on plasma lipid concentrations in C57BL/6J mice fed normal- or high-fat diet.

Values are means±SD for 7 mice.

Means with a different letter (a,b,c) within each diet group differ ($p < 0.05$).

See Table 3-3 for details of dietary groups.

肝臓中脂質濃度

肝臓中の各脂質濃度を測定した結果をFig. 3-9に示した。

肝臓のコレステロール濃度 (Fig. 3-9A)は、C群で 7.53 ± 1.71 mg/g Liver wt、HC群で 7.55 ± 2.46 mg/g Liver wt、HPM群で 4.68 ± 2.79 mg/g Liver wtとHPM群で低い傾向が見られた($p=0.07$)。トリグリセリド濃度 (Fig. 3-9B)は 7.27 ± 3.11 mg/g Liver wt、HC群で 11.38 ± 3.85 mg/g Liver wt、HPM群で 8.48 ± 3.61 mg/g Liver wtとHC群で高値を示した($p=0.06$)。

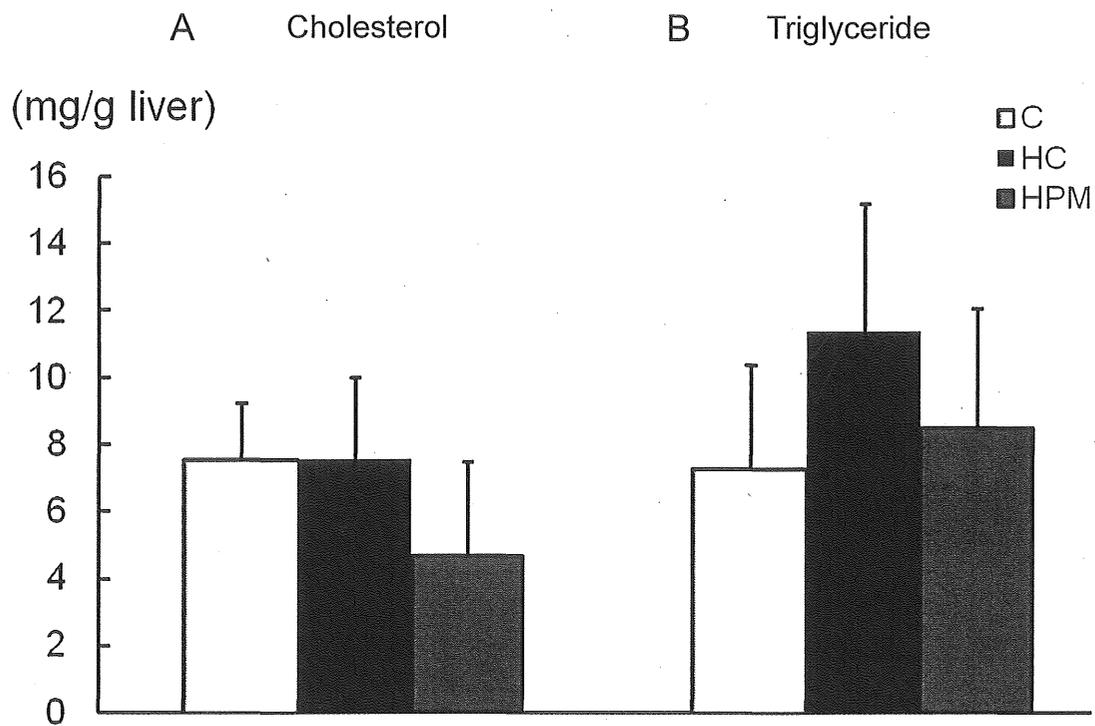


Fig. 3-9. Effect of dietary PMP on liver lipid concentrations in C57BL/6J mice fed normal- or high-fat diet.

Values are means \pm SD for 7 mice.

See Table 3-3 for details of dietary groups.

糞中胆汁酸 および脂質濃度

糞中胆汁酸、コレステロール、トリグリセリド濃度を測定した結果をFig. 3-10に示した。

糞中胆汁酸濃度 (Fig. 3-10A)は、C群で $0.09 \pm 0.03 \mu\text{mol/day}$ 、HC群で $0.06 \pm 0.03 \mu\text{mol/day}$ 、HPM群で $0.08 \pm 0.04 \mu\text{mol/day}$ と高脂肪摂取群で減少したが、HC群とHPM群間の有意な差は認められなかった。糞中コレステロール (Fig. 3-10B)、トリグリセリド濃度 (Fig. 3-10C)は、C群で $1.22 \pm 0.39 \text{mg/day}$ 、 $1.45 \pm 0.56 \text{mg/day}$ 、HC群で $2.20 \pm 0.49 \text{mg/day}$ 、 $6.68 \pm 2.54 \text{mg/day}$ 、HPM群で $2.47 \pm 0.99 \text{mg/day}$ 、 $7.56 \pm 2.91 \text{mg/day}$ と高脂肪食群で有意に高値を示した($p < 0.05$)。

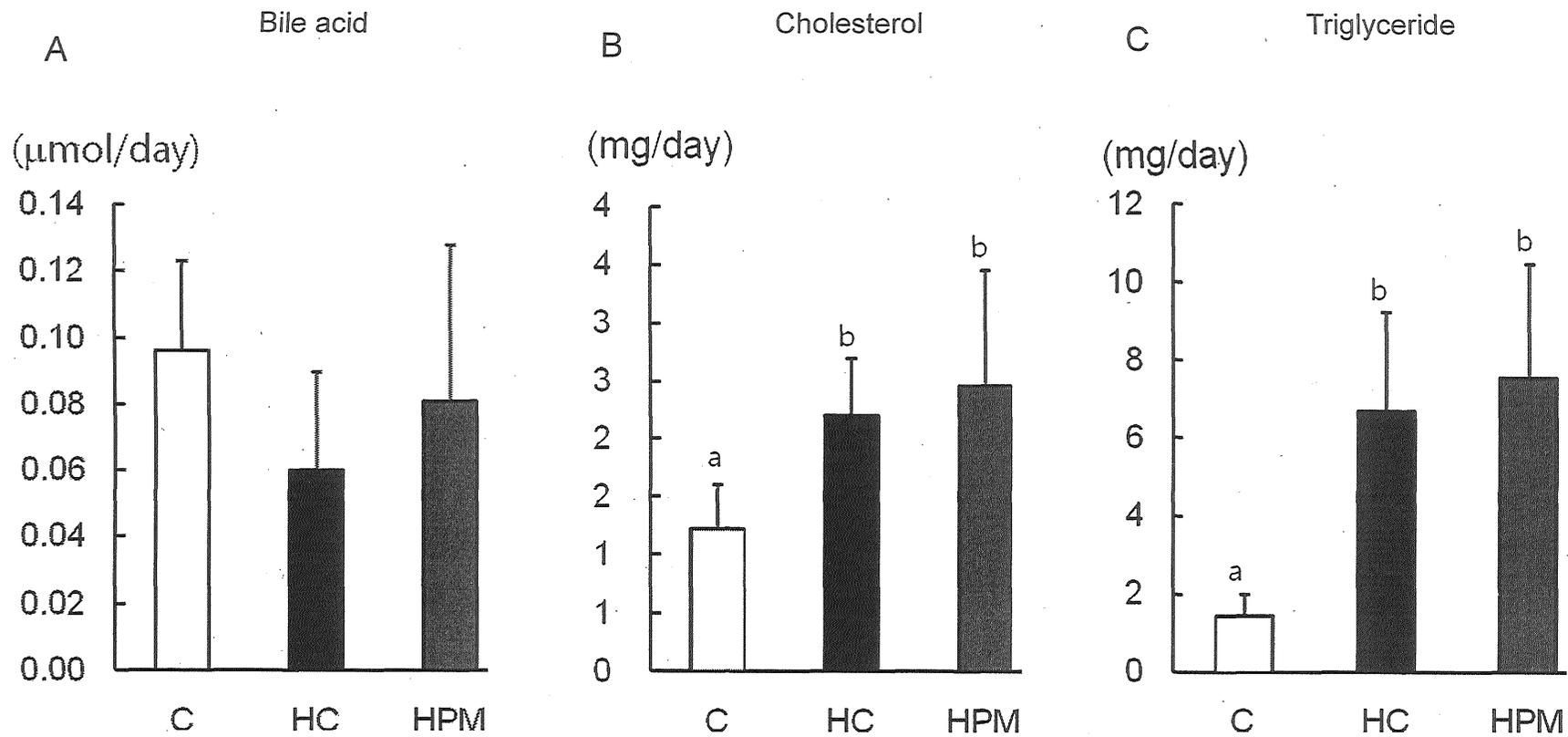


Fig. 3-10. Effect of dietary PMP on the fecal excretion of lipids in C57BL/6J mice fed normal- or high-fat diet.

Values are means±SD for 7mice.

Means with a different letter (a,b) within each diet group differ ($p < 0.05$).

See Table 3-3 for details of dietary groups.

3. 考察

本節では、肥満マウスにおける、キビタンパク質摂取の効果を検討した。その結果、キビタンパク質の摂取は、カゼインに比べて血漿中のトリグリセリドや血糖値を有意に低下させることが明らかになった。また、有意差は認められなかったものの、腎臓周囲脂肪組織の重量を減少、血漿中グルコース濃度、肝臓中の脂質濃度の低値を示した。従って、これらの結果から、キビタンパク質は、肥満防止、血糖値の上昇抑制作用を有するタンパク質であることが示された。

しかし、肥満誘導の食餌を摂取させたにも関わらず、体重増加量、食餌摂取量はキビタンパク質摂取群のみ低下、またカゼイン群の体重増加量は正常食の体重と同じ程度に維持されたことから、肥満が十分に誘導されなかったと考えられる。

Choiらは、韓国産のアワタンパク質の摂取が、高脂肪食状態で、低いエネルギー効率により、体重や脂肪重量の減少、血漿中グルコース、コレステロール、トリグリセリド濃度の減少させることを報告した [72]。

脂肪(ほとんどが中性脂肪)は、小腸で胆汁酸とミセルを作り、消化管酵素の消化作用を受ける。膵臓から分泌されるリパーゼにより中性脂肪の1、3位の脂肪酸が外れ、2-モノアシルグリセロール(グリセロールの2位の位置に一つの脂肪酸がくっついてい)と脂肪酸の形で小腸壁の細胞の中に入り、ほとんどの食事由来の脂肪は吸収される。小腸細胞の中で、脂肪酸と2-モノアシルグリセロールはmonoacylglycerol acyl transferase (MGAT)とdiacylglycerol acyltransferase (DGAT)により中性脂肪に再度組み立てられ、コレステロールやアポ蛋白と一緒に、カイロミクロンとして、リンパ管を通して血液中に放出される。血中カイロミクロンは、脂肪組織中の血管壁にあるLPLにより脂肪酸とグリセロールに分解され、組織細胞の中に入り、MGATやDGATの働きにより再度、中性脂肪に合成される。

脂肪細胞では、生成された中性脂肪がホルモン感受性リパーゼ (HSL)で脂肪酸とグリセロールに分解されても脂肪細胞自体では処理されにくく、血液中に放出される。

本節では、第1節の結果と同様に、正常食群と比べて、高脂肪食群で、血中トリグリセリド濃度は有意な低下が見られたが、その詳細な作用メカニズムは不明である。

一方、生体からの唯一のコレステロール排泄経路は、肝臓においてコレステロールを胆汁酸へと異化し、これを胆汁として分泌する経路である。小腸上部から分泌された胆汁酸の90-95%は、小腸下部において胆汁酸トランスポーターにより再吸収され、再び肝臓へと戻る [132]。これを腸管循環と言う。従って、肝臓中のコレステロールが減少することによって、HDL-コレステロールが増加、また糞中コレステロール排泄にも影響を与えると考えられるが、本実験の結果では、血漿中HDL-コレステロール濃度、糞中脂質排泄量には変化が見られなかった。しかし、キビタンパク質摂取による血漿トリグリセリド濃度と肝臓脂質濃度の低下および低下傾向は、エネルギーバランスと関係があると考えられる。

大豆タンパク質による肝臓の脂肪酸合成系の低下については Iritaniら [112]や、Suganoら [133]の研究で示されており、その結果肝臓からのVLDLの放出が抑制されて血中LDL-コレステロールが低下し、総コレステロール、トリグリセリドの低下に関与したと考察している。大豆タンパク質のコレステロール代謝への影響については、血清総コレステロールの低下作用は多くの報告がある [134]。しかし、本節で行ったキビタンパク質の実験では、血漿中コレステロール濃度、糞中胆汁酸排泄量、コレステロール排泄率は高脂肪食群間に差はなかった。コレステロールから胆汁酸合成する反応の律速酵素である7 α -ヒドロキシラーゼが関与していると知られている。キビタンパク質摂取による血漿中コレステロール濃度及び糞中胆汁酸排泄量には群間有意な差はなかったため、これらの結果は、7 α -ヒドロキシラーゼの不活性による結果と考えられる。しかし、本節では7 α -ヒドロキシラーゼの濃度は測定していなかったため、今後検討する必要があると思われる。

キビタンパク質の摂取は、高脂肪の食事条件にも関わらず、正常食より食餌摂取量、体重変化量の減少が見られた。この結果は、キビタンパク質摂取群のエネルギーバランスとの関係、または短期間の飼育期間で肥満が十分に誘導されなかったことがあると考えられる。そのため、長期間の飼育期間でのキビタンパク質の効果を検討する必要があると思われる。

以上の本節の結果から、キビタンパク質の摂取によって、カゼインに比べて血漿中のトリグリセリドや血糖値を有意に低下させ、また、有意差は認められなかったものの

腎臓周囲脂肪組織の重量を減少、血漿中グルコース濃度、肝臓中の脂質濃度の低値を示したことから、キビタンパク質は、肥満および血糖値の上昇抑制作用を有するタンパク質であることが示された。

第4章 キビタンパク質濃縮物(PMP)が肥満型2型糖尿病モデルKK-A^y系マウスに及ぼす影響

第1節 正常食餌条件におけるPMPが肥満型2型糖尿病モデルKK-A^y系マウスの血糖値制御、脂質代謝およびインスリン、アディポネクチン、脂肪組織での遺伝子発現に及ぼす影響

世界的に糖尿病患者数は多く増加し、1995年には20歳以上の成人の糖尿病発症率が4.0%だったが、2025年は5.4%に増加すると予測している。糖尿病は世界人の健康を脅かす代表的な疾病で、WHOでは2005年糖尿病で死亡した人を110万名と推定し、これは過去10年前を比べ50%増加した数である [135]。また、韓国では糖尿病による死亡率は年々増加しており、韓国人の主要死亡原因の一つである。2006年の調査によると、韓国人の死亡原因1位は癌(人口10万名当たり134.8名)、2位が脳血管疾患(61.4名)、3位が心臓疾患(41.5名)、4位が糖尿病(23.7名)の順である。糖尿病による死亡率は1996年に比べ6.3%の増加と同時に順位が6位から4位で上昇している [136]。

糖尿病には1型と2型があり、1型糖尿病が、膵β細胞の破壊的病変を呈し最終的にはインスリンの絶対的欠乏(インスリン依存状態)に陥ることが多いのに対し、糖尿病患者の90-95%を占める2型糖尿病における非インスリン抵抗性で、インスリン抵抗性とインスリン分泌障害が関連している [137]。インスリン抵抗性発症には様々な要因が挙げられており、一般的に遺伝子要因(肝、筋肉、脂肪組織の標的細胞欠陥)、環境的要因(食習慣、運動不足、薬物)および肥満がインスリン抵抗性を惹起の大きな要因と考えられている。特に、食習慣、欧米型の高脂肪食事が大きく影響することは広く認識されている。

肥満や耐糖能悪化を予防するためには、高タンパク質・低炭水化物食の摂取が推奨されているが [138]、肥満を予防する作用を有する食品タンパク質としては、古くから大豆タンパク質、タラ(鱈)のタンパク質について、多くの研究が行われている [139,140]。

本論文の第3章、第2節において肥満誘導食によって生じる肥満発症はキビタンパク質摂取により、血漿中のトリグリセリドや血糖値を有意に低下し、また、腎臓周囲脂肪組織の重量、血漿中グルコース濃度、肝臓中の脂質濃度の減少傾向を示し、抗肥満、血糖値の上昇抑制作用を有するタンパク質であることが示された。

本章の動物モデルとして用いたKK-A^yマウスは、2型糖尿病モデル動物で、肥満を呈する

KK系と、A^y系の交配により誕生した系である。このマウスは、早期に糖尿病を発症し、雄では6週齢から尿糖陽性となる [141,142]。多食、多飲、多尿、尿糖陽性、高血糖、低耐糖能、高インスリン血症、インスリン抵抗性、膵ラ氏島肥大等の2型糖尿病状態を呈し、近年、2型糖尿病に効果のある食品の研究に広く用いられている。

本節では、2型糖尿病モデル動物であるKK-A^yマウスを用いてキビタンパク質濃縮物の摂取が糖尿マウスでの血糖値制御、脂質代謝及びアディポネクチン、インスリンレベルの改善機能、脂肪組織でのアディポネクチン、TNF- α 、PPAR γ 、IL-6、adipoR1、adipoR2の遺伝子発現に及ぼす影響を調べた。

1. 方法

飼料の調製

実験食餌は、AIN-93組成に従って調製した [108]。実験群には20%タンパク質相当量のタンパク質源としてカゼインを添加したC群及び20%タンパク質相当量のタンパク質源として韓国キビタンパク質(PMP)を添加したPM群の2つの飼料群とした。PM群には、制限アミノ酸であるL-Lys-HClをカゼインのアミノ酸組成に合わせて添加した [78]。また、キビタンパク質中の含まれている脂質や食物繊維を考慮し、飼料調整時の大豆油とセルロース粉末の添加量を調整した。今回、実験に用いたPMPのタンパク質含量は48.7%であった。

Table 4-1. Diet compositions (g/100g)

	Casein (C)	PMP (PM)
Casein ¹	22.9	-
PMP	-	33.7
AIN-93 Salt mixture ²	3.5	3.5
AIN-93 Vitamin mixture ²	1.0	1.0
Soybean oil ³	7.0	4.7
Choline bitartrate ³	0.2	0.2
Cellulose ¹	5.0	0.9
α -Cornstarch ¹	12.5	15.4
Cornstarch ¹	37.6	28.9
L-Lysine-HCl ⁴	-	1.2
Cystine ⁴	0.3	-
Sucrose ⁵	10.0	10.0

¹Oriental yeast, Tokyo

²AIN-93G diet composition

³Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan

⁴Ajinomoto, Tokyo

⁵Tokyo Sugar Refining, Tokyo

実験動物及び飼育方法

実験動物には、5週齢のKK-A^y系雄マウス(日本クレア; 東京)14頭を使用し、第3章と同様の条件にして、個別のステンレスケージに入れて飼育した。購入後3日間は予備飼育期間とし、AIN-93組成カゼイン飼料と水を自由摂取させ、各群7頭ずつ2群に群分け、Table 4-1の飼料で21日間飼育し、体重変化を測定した。飼育期間の18日目から20日目までの糞を採取し、分析時まで -20°C で保存した。21日目にマウスを8時間絶食させ、ジエチルエーテル麻酔下で次のように解剖を行った。0.1M EDTAで処理したシリンジを用いて、下大静脈から採血し、血液は試験管に移し、 4°C 、 $3000 \times g$ で15分間の遠心分離を行い、血漿を分離した。肝臓は生理食塩水で還流した後に採取し、重量を測定した。更に、精巣周囲脂肪組織を採取し、重量を測定した。分離した血漿、肝臓、脂肪組織は、分析時まで -80°C で保存した。

血糖値およびOGTTの測定

血糖値の測定

血糖値の測定は、第3章、第1節と同様の方法で行った。

OGTTの測定

OGTTは、第3章、第2節と同様の方法で行った。

血漿の分析

1) 血漿中の総コレステロール濃度の測定

血漿中の総コレステロール濃度測定は、第3章、第1節と同様の方法で行った。

2) 血漿中のHDL-コレステロール濃度の測定

血漿中のHDL-コレステロール濃度の測定は、第3章、第1節と同様の方法で行った。

3) 血漿中のトリグリセリド濃度の測定

血漿中のトリグリセリド濃度の測定は、第3章、第1節と同様の方法で行った。

4) 血漿中LDL-コレステロール濃度の算出

血漿中のLDL-コレステロール濃度は、総コレステロール濃度からHDL-コレステロール濃度とVLDL-コレステロールを差し引いて算出した。

$$\text{LDL-コレステロール} = \text{総コレステロール} - (\text{HDL-コレステロール} + (\text{トリグリセリド}/5))$$

5) 血漿中のインスリン及びアディポネクチン濃度の測定

血漿中のインスリン及びアディポネクチン濃度は、第3章、第2節と同様の方法で行った。

肝臓の脂質分析

1) 肝臓脂質の抽出

肝臓脂質の抽出は、第3章、第1節と同様の方法で行った。

2) 肝臓中のコレステロール濃度の測定

肝臓中のコレステロール濃度の測定は、第3章、第1節と同様の方法で行った。

3) 肝臓中のトリグリセリド濃度の測定

肝臓中のトリグリセリド濃度の測定は、第3章、第1節と同様の方法で行った。

糞中脂質の抽出、胆汁酸排泄量の定量

1) 糞中脂質の抽出

糞中脂質の抽出は、第3章、第1節と同様の方法で行った。

2) 糞中の胆汁酸量の測定

糞中の胆汁酸の測定は、第3章、第1節と同様の方法で行った。

3) 糞中のコレステロール濃度の測定

糞中コレステロール濃度測定は、第3章、第1節と同様の方法で行った。

4) 糞中のトリグリセリド濃度の測定

糞中トリグリセリドの測定は、第3章、第1節と同様の方法で行った。

Real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (real-time PCR)

1) マウスの脂肪組織からtotal RNA抽出

脂肪組織からtotal RNAはRNeasy[®] Lipid Tissue Mini kit (Qiagen, Valencia;CA) を使って、抽出した。脂肪組織100mgを1mLのQIAzol lysis reagentを入れた適切なサイズの容器に移し、ポリロンホモジナイザー(Kinematica GmbH Steinhofhalde;Switzerland)を用いてホモジナイズした。操作は氷上で行った。ホモジェネートを室温で5分間放置し、200 μ Lのクロロホルムを加え、よくボルテックスした。その後4 $^{\circ}$ C、12000 \times gで15分間遠心分離し、RNAが溶解している上層(水層)を回収した(約600 μ L)。この際、下層(有機層)および界面にはDNAやタンパク質が溶解しているのを混入しないように注意した。回収した上層に同量の70%エタノールを加え、ボルテックス後、8000 \times g以上、室温(15-25 $^{\circ}$ C)で15秒間遠心分離した。残りのサンプルはbuffer RPEを添加して、洗浄したRNeasy mini spin columnで、30-50 μ LのRNaseフリー水を加えて溶解し、この溶液をtotal RNA溶液として実験まで-20 $^{\circ}$ Cで保存した。

2) RNAの定量

Total RNA溶液に含まれるRNA濃度は吸光光度計(HITACHI U-200A)で測定した。RNAは260nm、タンパク質は280nmに極大吸収を持ち、また1本鎖の核酸の溶液では40 μ g/mLの時に吸光度が約1.0になる [143]。このことに基づき、total RNA溶液を滅菌水で50倍に希釈し、260nmと280nmの2波長を測定し、total RNA濃度と溶液の純度を調べた。

3) Complementary DNA (cDNA) 合成

Real-time PCRを行う前、PrimeScript[™] RT reagent kit (Takara Bio, Ohtsu、

Japan)を用いてreverse transcriptionを遂行してcDNAで合成した。合成したcDNAは、10倍のnuclease free waterに希釈し、-20°Cで保存し、PCRを行う時、templateとして用いた。

「方法」

以下の試薬を混合した。

Master Mix	Final conc.	
Total RNA (500ng)	X μ l	
5X PrimeScript™ Buffer	2 μ l	
PrimeScript™ RT Enzyme mix I	0.5 μ l	
Oligo dT Primer (50 μ M)	0.5 μ l	25pmol
Random 6 mers (100 μ M)	0.5 μ l	50pmol
RNase free dH ₂ O	X μ l	
Total	10 μ l	

混合した溶液は37°Cで15分、85°Cで5秒、4°Cで反応させcDNAで合成し、-20°Cで保存した。

4) Real time PCR (quantitative assay)

Real time PCRはLightCycler real time PCR (Roche diagnostics, Mannheim, Germany)を用い、特定遺伝子発現量を測定した。Templateとして用いたcDNAは、10倍希釈し、SYBR® Premix Ex Taq™ (Takara Bio)を用いて、各遺伝子の発現を分析した。Real-time PCRによって増幅された産物はLightCycler Software(Ver. 3.5)のfit point法を用いて定量し、 β -actinの発現量で補正した。RT-PCR及びreal time PCRに用いたそれぞれの遺伝子のprimer塩基配列はTable 4-2に示した。

「方法」

以下の試薬を混合した。

Master Mix		Final conc.
cDNA	2 μ l	<100ng
1 \times SYBR [®] Premix ExTaq [™]	10 μ l	1X
PCR Forward primer (10 μ M)	0.4 μ l	0.2 μ M
PCR Reverse primer (10 μ M)	0.4 μ l	0.2 μ M
RNase free dH ₂ O	7.2 μ l	
Total	20 μ l	

混合した溶液は次の条件で反応させた。

Stage 1	95°C	10sec		1 Cycle
	20°C	1sec		
Stage 2	95°C	5sec	20°C	40 Cycle
	60°C	20sec	20°C	
Stage 3	95°C	0sec	20°C	
	65°C	15sec	20°C	
	95°C	0sec	0.1°C	

Table 4-2. Primer sequences used for real time RT-PCR

Gene	PCR primer sequences
Adiponectin	Sense: 5'-CAGGCATCCCAGGACATC-3'
	Antisense: 5'-TCTCACCCCTTAGGACCAAGAAG-3'
TNF- α	Sense: 5'-CTGTAGCCCACGTCGTAGC-3'
	Antisense: 5'-TTGAGATCCATGCCGTTG-3'
β -actin	Sense: 5'-CCAACCGTGAAAAGATGACC-3'
	Antisense: 5'-ACCAGAGGCATACAGGGACA-3'
IL-6	Sense: 5'-GCTACCAAACCTGGATATAATCAGGA-3'
	Antisense: 5'-CCAGGTAGCTATGGTACTCCAGAA-3'
PPAR γ	Sense: 5'-TGCTGTTATGGGTGAAACTCTG-3'
	Antisense: 5'-CTGTGTCAACCATGGTAATTTCTT-3'
AdipoR1	Sense: 5'-TGCTACATGGCCACAGACCAC-3'
	Antisense: 5'-CAGCATCGTCAAGATTCCCAGA-3'
AdipoR2	Sense: 5'-ATCAGCAGCCAGACGCACTC-3'
	Antisense: 5'-TGACCAGTCCCAAAGACCTCTACTC-3'

統計処理

本実験で得られたデータの計算および整理には、第3章、第1節と同様の方法で行った。

2. 結果

タンパク質源としてPMPをマウスに摂取させることで、以下のように血漿中のHDL-コレステロール濃度が有意に高まること、肝臓中トリグリセリド濃度の有意な低下及びAdipoR1, AdipoR2遺伝子発現が高まる傾向が明らかにされた。

体重、飼料摂取量、組織重量、糞乾燥重量

21日間の飼育による解剖時の体重と総飼料摂取量、組織重量をTable 4-3に示した。

21日間の飼育の結果、体重増加量はC群で 10.5 ± 1.4 g、PM群で 10.6 ± 1.6 gと2群間で有意な差は認められなかった。肝臓重量もC群で 1.65 ± 0.16 g、PM群で 1.68 ± 0.13 gと有意な差は認められなかった。体重100g中肝臓重量、腎臓重量に関してもC群で 4.70 ± 0.44 g、 1.45 ± 0.04 g、PM群で 4.82 ± 0.28 g、 1.42 ± 0.09 gと2群間で有意差は認められなかった。体重100g中精巣周囲脂肪組織重量、腎臓周囲脂肪組織重量、腸管膜周囲脂肪組織重量はそれぞれC群で 3.31 ± 0.82 g、 1.47 ± 0.37 g、 2.59 ± 0.71 g、PM群で 3.58 ± 0.59 g、 1.47 ± 0.24 g、 2.42 ± 0.58 gと2群間で有意差は認められなかった。飼料摂取量に関しては、C群で 97.2 ± 8.6 g、PM群で 94.8 ± 4.2 gと2群間で有意差は認められなかった。糞乾燥重量はC群で 0.33 ± 0.05 g、PM群で 0.57 ± 0.06 gとPM群で有意に高い値を示した($p < 0.05$)。

Table 4-3. Effects of dietary PMP on body-weight gain, food intake, tissue and dried feces weights in KK-A^y mice fed normal diet

	C	PM
Initial weight (g)	24.9±0.59	24.9±1.59
Final weight (g)	35.1±1.56	35.0±2.17
Weight gain (g/21day)	10.5±1.4	10.6±1.6
Food intake (g/21day)	97.2±8.6	94.8±4.2
Liver weight (g)	1.65±0.16	1.68±0.13
Kidneys weight (g)	0.51±0.01	0.49±0.03
Adipose tissue weight (g) :		
Epididymal	1.16±0.29	1.26±0.25
Perirenal	0.51±0.13	0.52±0.09
Mesentric	0.91±0.27	0.86±0.25
Dried feces (g/day)	0.33±0.05	0.57±0.06*
Tissue weight/100g body weight (g):		
Liver	4.70±0.44	4.82±0.28
Kidneys	1.45±0.04	1.42±0.09
Adipose tissue :		
Epididymal	3.31±0.82	3.58±0.59
Perirenal	1.47±0.37	1.47±0.24
Mesentric	2.59±0.71	2.42±0.58

Values are means±SD for 6-7 mice.

Means with a different symbol (*) within each diet group differ ($p < 0.05$).

See Table 4-1 for details of dietary groups.

Oral glucose tolerance test

Oral glucose tolerance testの結果と血糖上昇下面積(AUC)をFig. 4-1に示した。グルコース投与後15、30、60、90、120分における血糖値(Fig. 4-1A)は、各群間有意な差は見られなかった。血糖上昇下面積(AUC, Fig. 4-1B)はC群で $19.2 \pm 5.2 \text{ mg} \cdot \text{min/dL}$ に対してPM群で $26.3 \pm 7.5 \text{ mg} \cdot \text{min/dL}$ と高値を示す傾向が認められた($p=0.062$)。

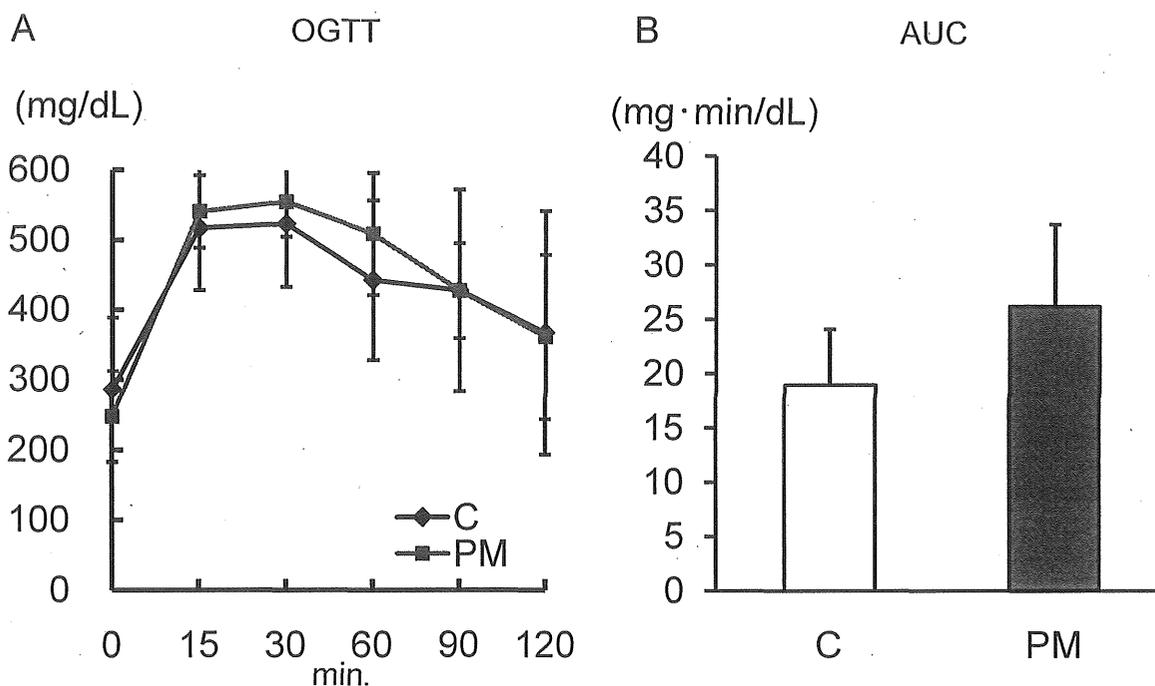


Fig. 4-1. Effect of dietary PMP on blood glucose response at OGTT and AUC in KK-A^y mice fed normal diet.

Values are means \pm SD for 6-7 mice.

See Table 4-1 for details of dietary groups.

血糖値経時変化、血中グルコース濃度

飼育期間中の血糖値の経時変化と、飼育終了日の血中グルコース濃度をFig. 4-2に示した。

飼育1、2、3週間の血糖値(Fig. 4-2A)は各群間有意な差は認められなかった。又、飼育終了日の血中グルコース濃度(Fig. 4-2B)はC群で $338.71 \pm 118.75 \text{mg/dL}$ に対して、PM群で $290.00 \pm 83.62 \text{mg/dL}$ と低い傾向がみられたが、有意な差ではなかった。

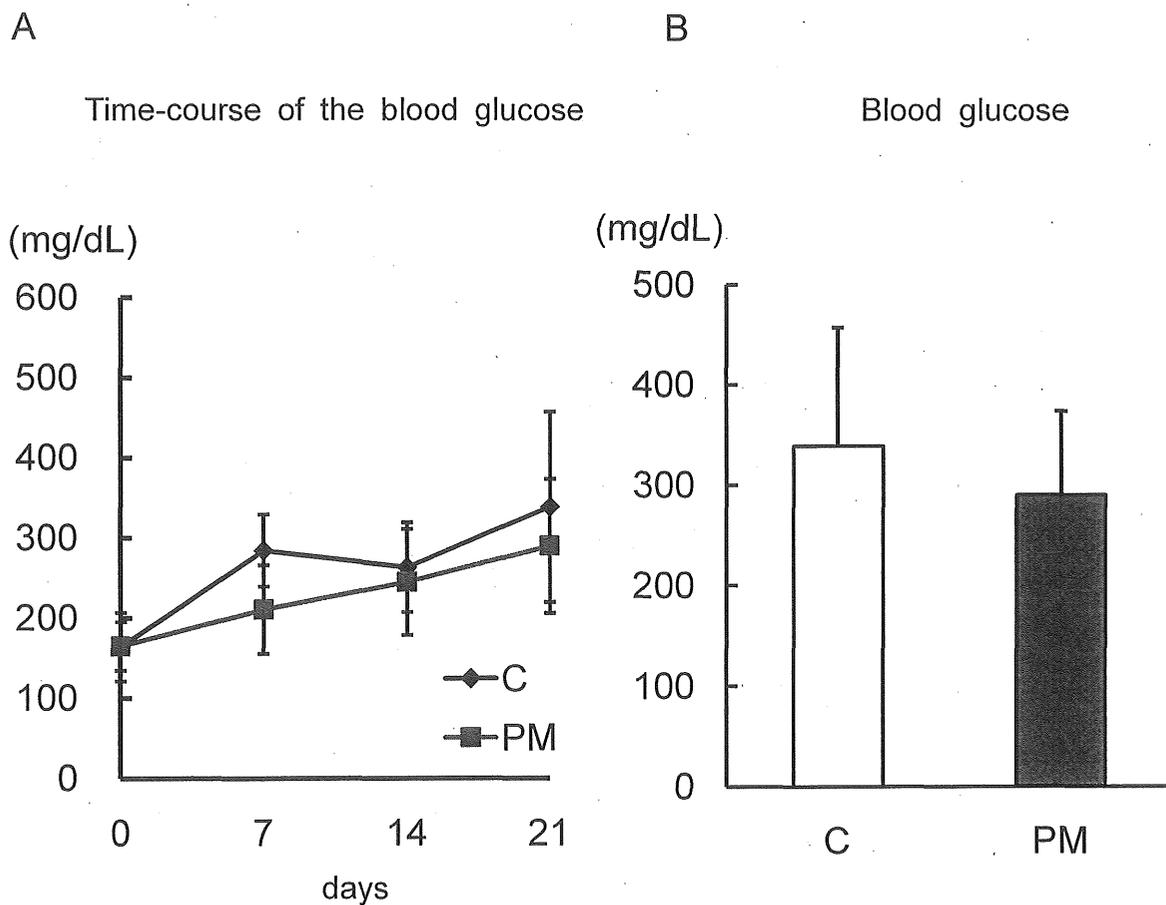


Fig. 4-2. Effect of dietary PMP on blood glucose levels in KK-A^y mice fed normal diet.

Values are means \pm SD for 6-7 mice.

See Table 4-1 for details of dietary groups.

血中インスリン及びアディポネクチン濃度

血中インスリン及びアディポネクチン濃度を測定した結果をFig. 4-3に示した。

血中インスリン濃度(Fig. 4-3A)は、C群で 9.47 ± 2.09 ng/mLに対して、PM群で 9.04 ± 3.11 ng/mLと有意な差は認められなかった。血中アディポネクチン濃度(Fig. 4-3B)は、C群で 15.60 ± 5.20 μ g/mLに対して、PM群で 16.42 ± 1.65 μ g/mLと有意な差は認められなかった。

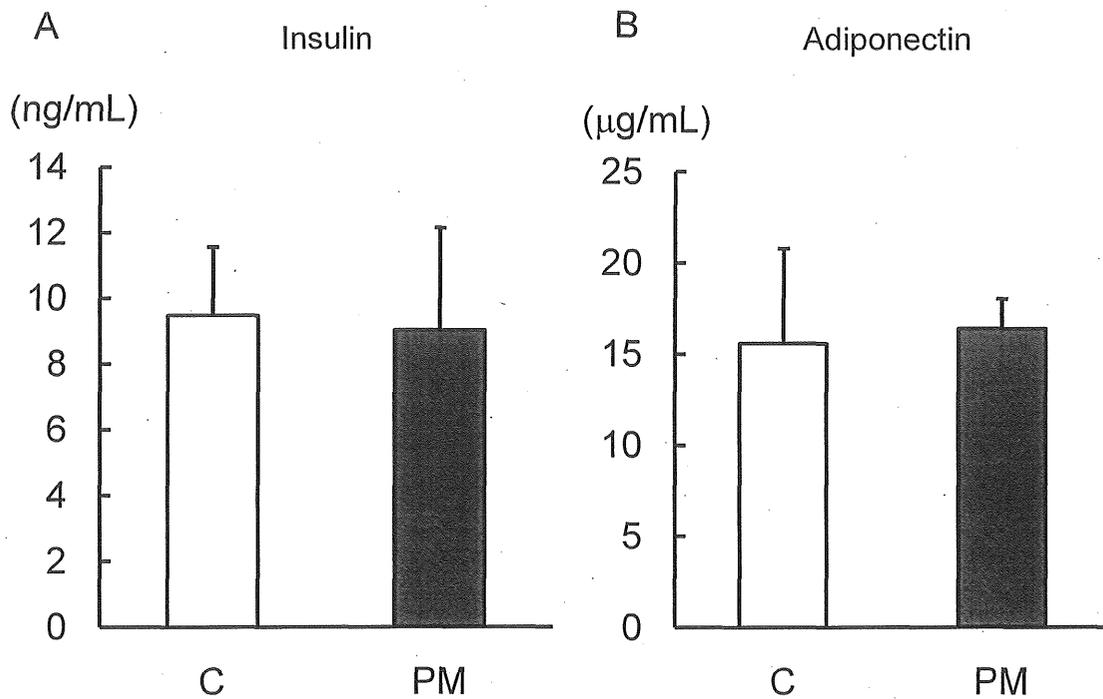


Fig. 4-3. Effect of dietary PMP on plasma insulin and adiponectin concentrations in KK-A^y mice fed normal diet.

Values are means \pm SD for 6-7 mice.

See Table 4-1 for details of dietary groups.

血漿中脂質濃度

血漿中の各脂質濃度を測定した結果をFig. 4-4に示した。

総コレステロール濃度(Fig. 4-4A)は、C群の 146.58 ± 47.17 mg/dLに対して、PM群で 157.24 ± 37.65 mg/dLと有意な差は認められなかった。しかし、HDL-コレステロール濃度(Fig. 4-4B)は、C群の 30.45 ± 12.66 mg/dLに対して、PM群で 46.29 ± 11.62 mg/dLと有意に高い値を認められた($p < 0.05$)。この結果から、LDL-コレステロール濃度(Fig. 4-4C)を算出したところ、C群で 67.31 ± 38.05 mg/dLに対して、PM群で 71.88 ± 19.03 mg/dLと有意な差は認められなかった。トリグリセリド濃度(Fig. 4-4D)は、C群で 244.05 ± 82.74 mg/dLに対して、PM群で 217.88 ± 66.52 mg/dLと有意な差は認められなかった。

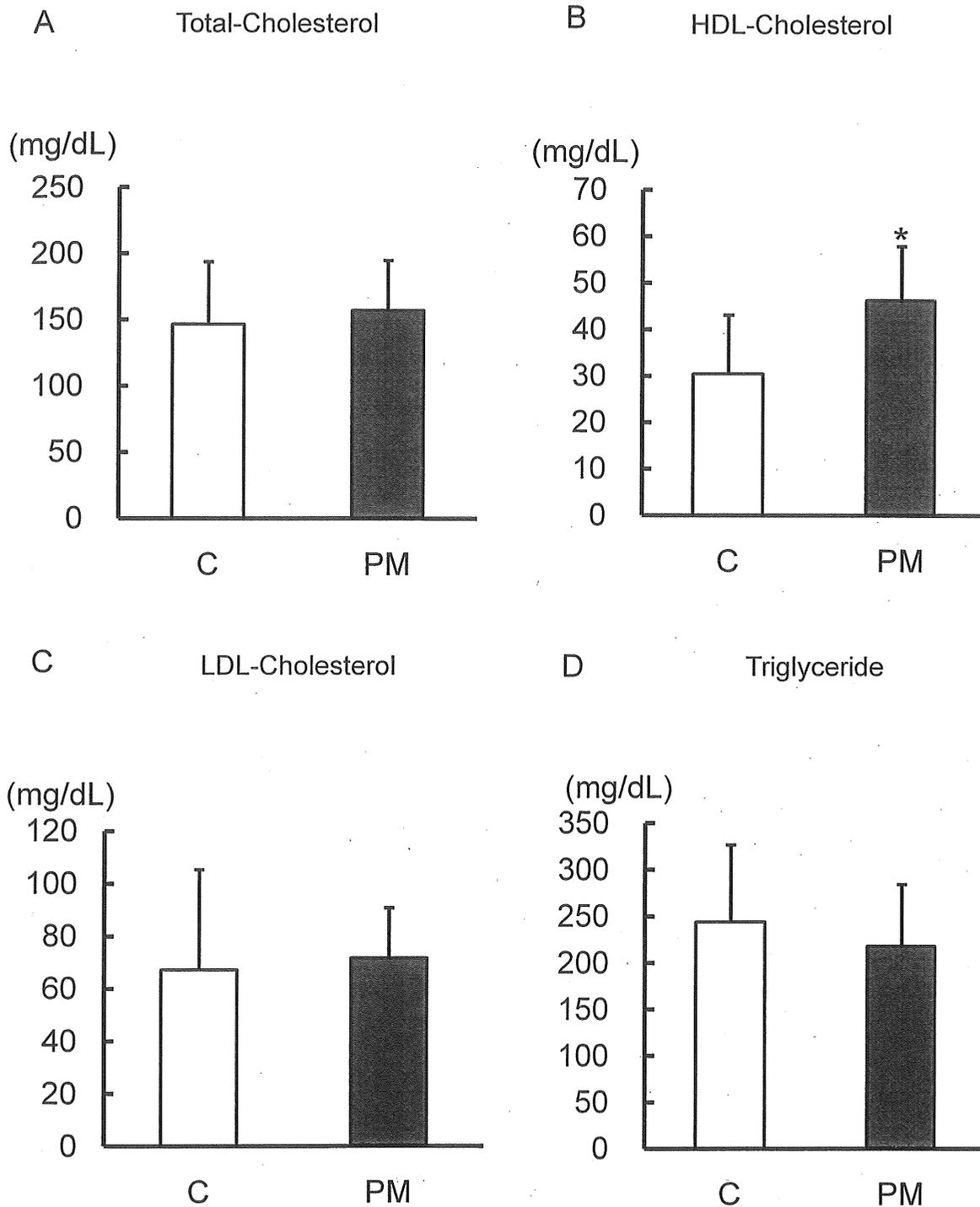


Fig. 4-4. Effect of dietary PMP on plasma lipid concentrations in KK-A^y mice fed normal diet.

Values are means ± SD for 6-7 mice.

Means with a different symbol (*) within each diet group differ ($p < 0.05$).

See Table 4-1 for details of dietary groups.

肝臓中脂質濃度

肝臓中の各脂質濃度を測定した結果をFig. 4-5に示した。

肝臓のコレステロール濃度(Fig. 4-5A)は、C群で 7.04 ± 1.01 mg/g Liver wtに対して、PM群で 5.38 ± 1.16 mg/g Liver wtとPM群で有意な減少が見られたが($p < 0.01$)、トリグリセリド濃度(Fig. 4-5B)は、C群で 19.36 ± 4.57 mg/g Liver wtに対して、PM群で 19.87 ± 10.93 mg/g Liver wtと有意な差は認められなかった。

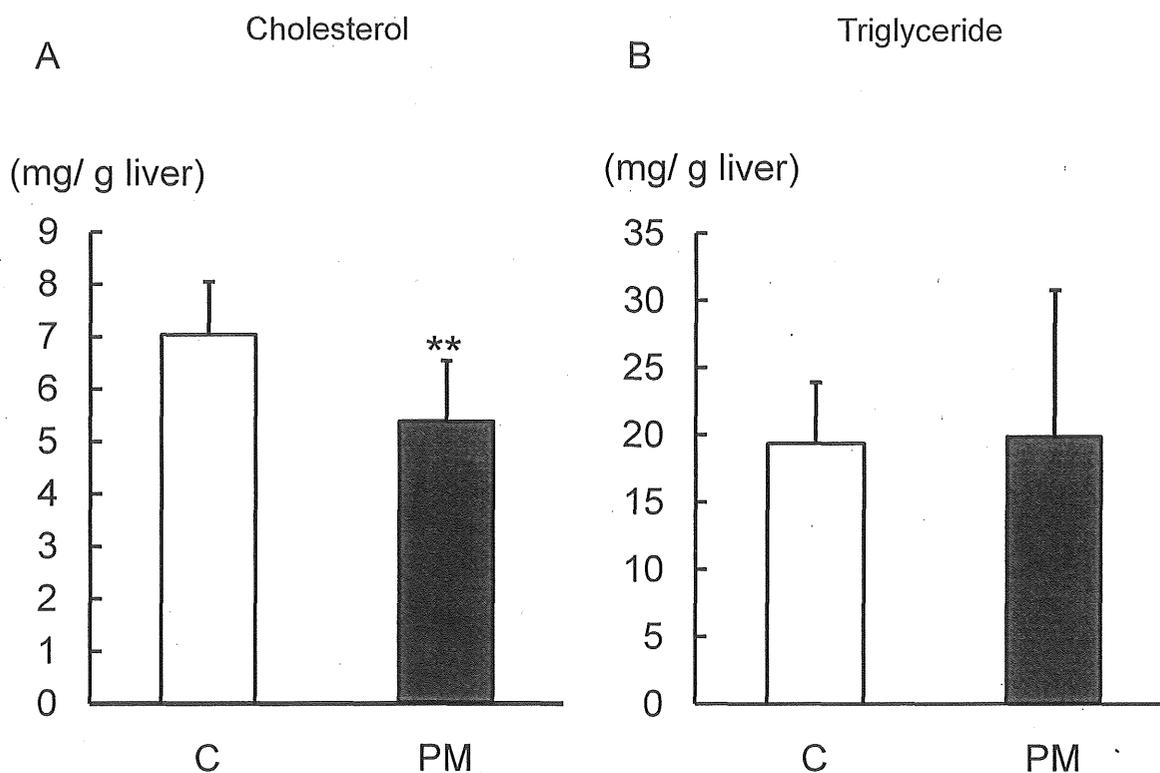


Fig. 4-5. Effect of dietary PMP on liver lipid concentrations in KK-A^y mice fed normal diet.

Values are means \pm SD for 6-7 mice.

Means with a different symbol (**) within each diet group differ ($p < 0.01$).

See Table 4-1 for details of dietary groups.

糞中胆汁酸排泄量および脂質濃度

糞中胆汁酸排泄量、脂質濃度を測定した結果をFig. 4-6に示した。

糞中胆汁酸排泄量(Fig. 4-6A)はC群で $0.99 \pm 0.15 \mu\text{mol/L}$ に対して、PM群で $0.80 \pm 0.14 \mu\text{mol/L}$ とPM群で有意に低い値を示した($p < 0.05$)。糞のコレステロール濃度(Fig. 4-6B)は、C群で $2.41 \pm 0.37 \text{mg/day}$ に対して、PM群で $2.73 \pm 0.29 \text{mg/day}$ とPM群で増加する傾向が見られた($p = 0.078$)。糞中トリグリセリド濃度(Fig. 4-6C)は、C群で $2.15 \pm 0.31 \text{mg/day}$ に対して、PM群で $4.84 \pm 1.34 \text{mg/day}$ とPM群で有意に高い値を示した($p < 0.01$)。

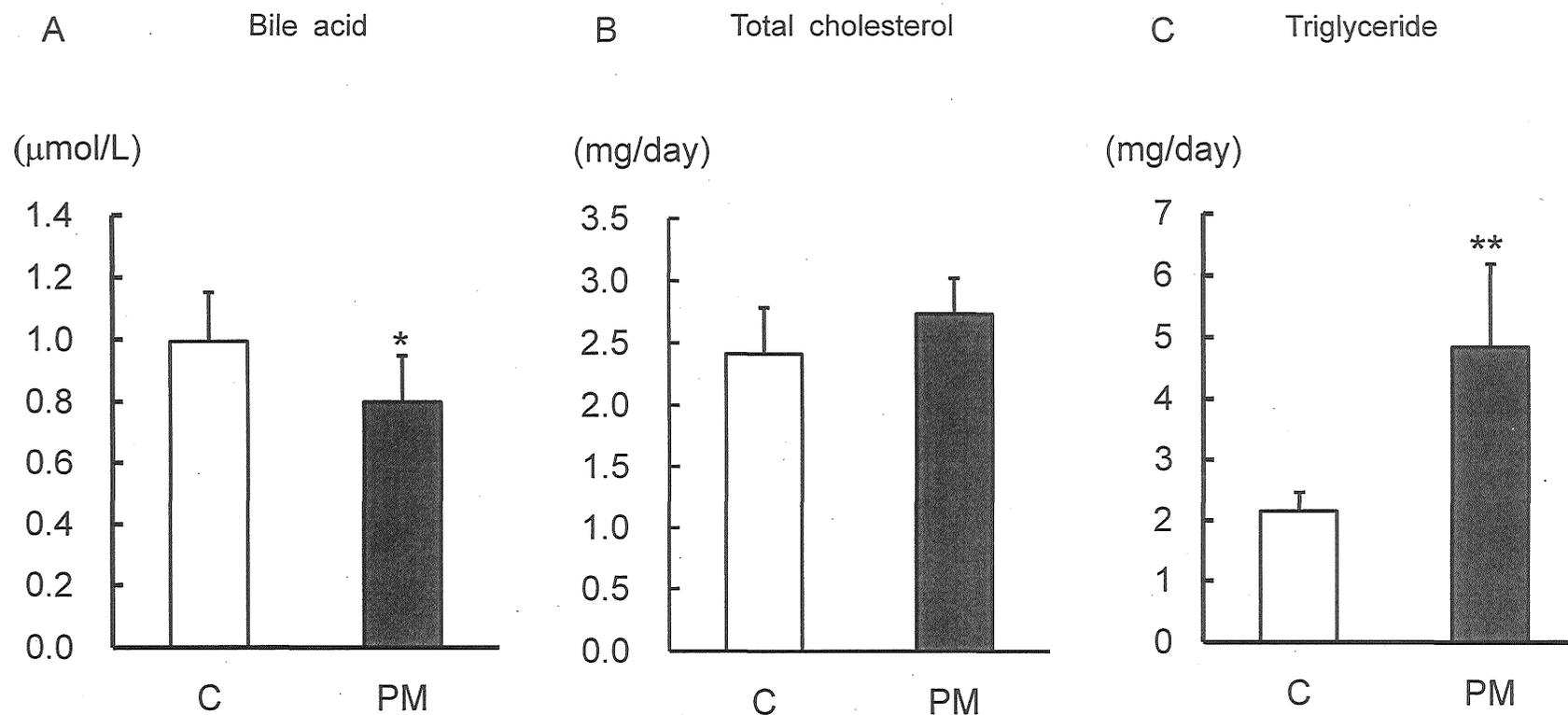


Fig. 4-6. Effect of dietary PMP on the fecal excretion of lipids in KK-A^y mice fed normal diet.

Values are means±SD for 6-7 mice.

Means with a different symbol within each diet group differ (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

See Table 4-1 for details of dietary groups.

遺伝子発現

腎臓周囲脂肪での遺伝子発現(adiponectin、TNF- α 、AdipoR1、AdipoR2、PPAR γ 及びIL-6 mRNA)を測定した結果をFig. 4-7に示した。

腎臓周囲脂肪でのadiponectin、PPAR γ mRNAの発現量(Fig. 4-7A, D)はC群とPM群間有意な差は認められなかったが、PPAR γ mRNAの発現量はPM群で増加する傾向が見られた。TNF- α 、IL-6 mRNAの発現量(Fig. 4-7B, D)はC群とPM群間有意な差は認められなかったが、PM群で減少する傾向が見られた。AdipoR1、AdipoR2 mRNAの発現量(Fig. 4-7C)は各群間有意な差は認められなかったが、PM群で増加する傾向が見られた(AdipoR1 mRNA: $p=0.066$)

Relative mRNA abundance (%) :

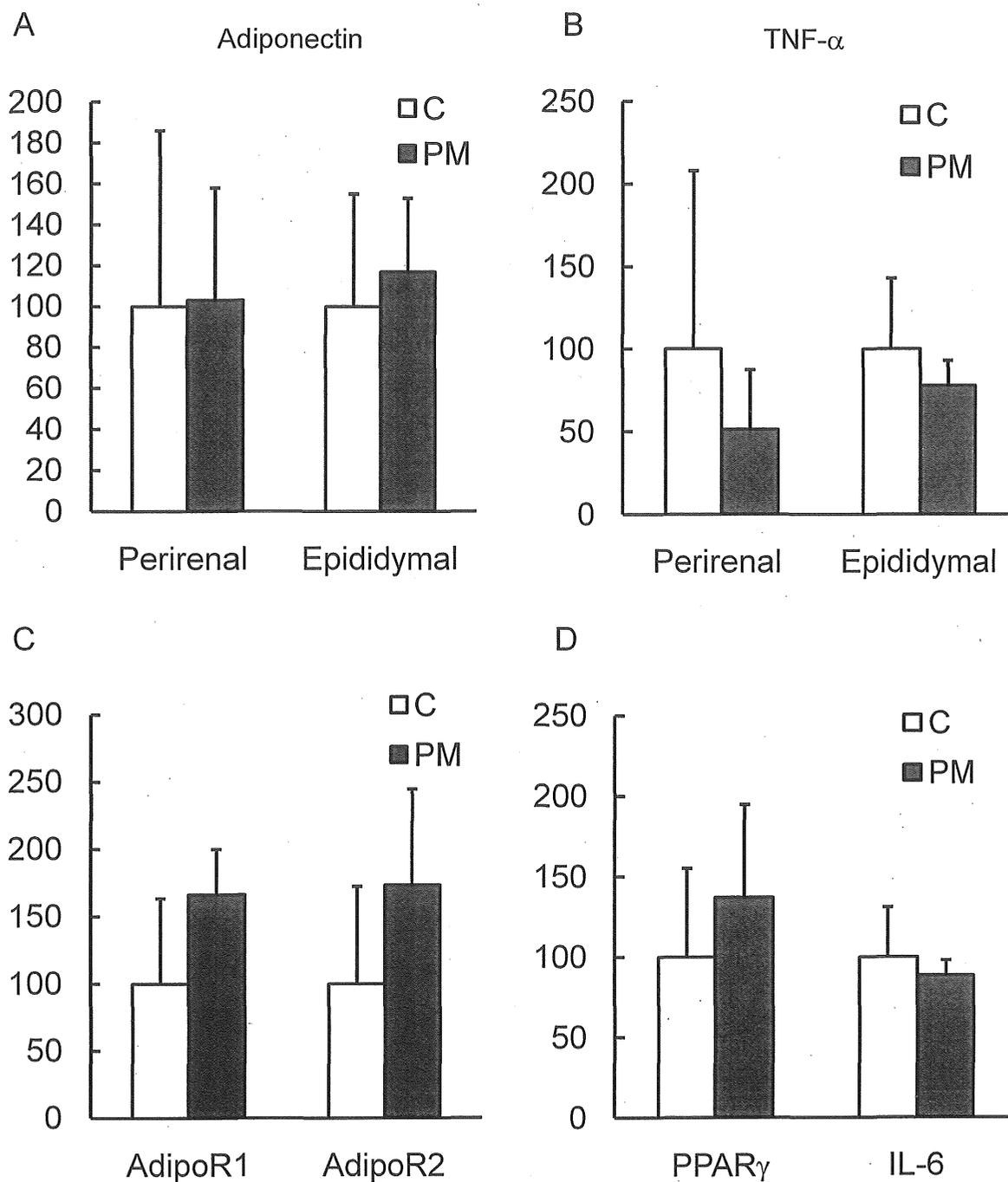


Fig. 4-7. Effect of dietary PMP on gene expressions in adipose tissue in KK-A^y mice fed normal diet.

Values are means \pm SD for 6-7 mice.

Gene expression was normalized using the expression of the β -actin gene.

See Table 4-1 for abbreviation of dietary groups.

3. 考察

食生活の変化、特に食の高脂肪化や、運動不足の生活習慣により、エネルギー過剰状態・肥満をきたし、インスリン抵抗性を有する者の数が急増している。インスリン抵抗性は代謝性疾患、内臓性肥満、高インスリン血症、耐糖能障害、高血圧などを含め、2型糖尿病の1次原因として認識されている。

高タンパク質食を摂取することによって、肥満やインスリン抵抗性が改善されることが知られている [144]。また、Nishizawaらは、KK-A^y系マウスにヒエタンパク質を摂取させることにより、血糖値上昇抑制効果、血中HDL-コレステロール、アディポネクチン濃度の有意な上昇を報告した [69]。Choiらは、韓国産アワタンパク質を与えることにより、血中インスリン濃度の減少、血中HDL-コレステロール、アディポネクチン濃度の上昇を報告している [72]。

そこで本節では、2型糖尿病モデルKK-A^yマウスに対する正常食餌におけるタンパク質含量が20%になるようにキビタンパク質を摂取させ、マウスの血糖値制御、脂質代謝およびアディポネクチン、インスリンレベル、脂肪組織での遺伝子発現について検討した。

5週齢のKK-A^yマウスを購入し3日間適応させた後、3週間実験食餌を与えた結果、食餌摂取量、体重変化量および臓器(肝臓、腎臓、脂肪組織)の重量はコントロール群と有意な差は認められなかった。しかし、糞排泄量はコントロール群と比べ、キビタンパク質群で約2倍増加した。調理加工過程で生じたあるいは食品材料の本来存在する難消化性タンパク質、ならびに糖質や脂質など他の成分と複合体を形成して難消化性となったタンパク質成分を、レジスタントタンパク質と言う。レジスタントタンパク質は、高コレステロール血症の改善、便秘や肥満の緩解、大腸がんや肝臓がんの発生抑制、腸内有機酸発酵の調節などが知られている [145]。従って、キビタンパク質で糞排泄量及び糞中トリグリセリド排泄量の増加はレジスタントタンパク質の影響だと推測される。

血糖値、血漿中のグルコース、インスリン、アディポネクチン濃度の影響は、群間有意な差は認められなかった。一般的に、2型糖尿病はインスリンの介して血糖を除去する能力が減少して高血糖症を表し [146]、このような高血糖は2型糖尿病で心血管疾患などの合併症を進行させる危険因子であると報告されている [147]。KK-A^yマウスは、糖尿病の進行によって、血漿インスリン濃度が増加し、高インスリン血症になるマウスであるが [148]、

本節のキビタンパク質の摂取ではインスリン濃度、グルコース濃度の差は見られなかった。

キビタンパク質摂取による血漿中総コレステロール、トリグリセリド、遊離脂肪酸濃度には有意な差は認められなかったが、HDL-コレステロール濃度はキビ摂取群で有意に増加した (Fig. 4-4B)。2型糖尿病では、血清遊離脂肪酸濃度、VLDL及びLDL-コレステロール濃度の増加、HDL-コレステロールの減少が見られ、このような脂質代謝異常症(dyslipidemia)の発病は正常人に比べて2-4倍高く現す [149]。また、最近の研究は、アディポネクチンと HDL-コレステロール濃度間には強い正の相関関係を示しているが [150,151]、本節の結果では、HDL-コレステロールレベルが有意な高まったものの、アディポネクチンレベルには影響を与えなかったため、アディポネクチンとHDL-コレステロールの相関関係は認められなかった。

糖尿病患者の主要死亡原因の背景にある血管合併症、つまり冠状動脈疾患および脳卒中において、冠状動脈の狭窄は、総コレステロールやLDL-コレステロールよりもトリグリセリドやHDL-コレステロールとの相関がより強く認められ、また、HDL-コレステロールが低いことはLDL-コレステロールの上昇の有無に関わらず動脈硬化症の危険を高めることが示されていることから、低HDL-コレステロールは高LDL-コレステロール以上に注目すべき危険因子であるといえる [152,153]。HDL-コレステロールは、肝組織の胆汁酸合成および分泌に利用され、コレステロールを末梢組織から肝組織へ移動させ血漿中コレステロールを除去するいわゆるコレステロールの逆転送の機能を有する [154]。本研究ではキビ摂取による血漿中総コレステロール、トリグリセリド、LDL-コレステロール、アディポネクチン濃度はコントロールと有意な差は見られなかったが、HDL-コレステロール濃度が増加したことから、キビタンパク質の機能の一つとして、心臓血管や循環系血管の硬化症の予防効果が期待される。

肝臓中の脂質濃度はキビタンパク質摂取することによって、肝臓中コレステロール濃度の有意に減少が見られた。植物性タンパク質である大豆タンパク質食を動物性のカゼイン食と比較すると、摂取量、体重には差は認めなかったが、血中中性脂肪濃度、遊離脂肪酸濃度が大豆タンパク質食を摂食した群で低下していて、肝臓の脂肪酸合成酵素の遺伝子発現が抑制されたと報告した [155]。その一因として、脂肪酸合成酵素の転写を司る SREBP-1の発見抑制が考えられる。しかし、本節では、SREBP-1の発見については検討しなかったため、今後検討する必要があると考えられる。

脂肪細胞は、体内エネルギーの貯蔵源としての脂肪の産生、貯蔵、分解代謝を行うのみだけでなく、刺激に応じてサイトカイン、ホルモンを産生・分泌する組織として機能しており、それらの機能異常は肥満、糖尿病、脂質代謝異常症等の代謝患者の発症と密接に関連することから注目されている。近年、脂肪細胞の分化あるいはその脂質・糖質代謝の制御における食事因子の働きを解明することが望まれている [26,27]。インスリン抵抗性惹起因子の一つであるTNF- α 、IL-6は、アディポネクチン、PPAR γ 遺伝子の遺伝子発現を転写レベルで抑制していることが知られているが [46-48]、アディポネクチンはAdipoRを介したAMPK及びp38 MAPKの活性化によって少なくとも一部、脂肪酸燃焼および糖取り込みを促進していることが分かっている [42]。Yamauchiらは、肥満2型糖尿病モデルのKK-A y マウスでは高脂肪食による脂肪細胞肥大、肥満に伴って、アディポネクチンの発現や分泌が著しく減少し、インスリン抵抗性が惹起されるが、そこへアディポネクチンを補充すると、インスリン抵抗性が部分的に改善することを明らかにした [41]。本節の結果では、キビタンパク質摂取によるアディポネクチン、TNF- α 、IL-6 mRNAの発見量の変化は見られなかったが、PPAR γ mRNA、AdipoR1、AdipoR2 mRNAの発現量はキビタンパク質摂取群で増加する傾向が明かにされた。

様々なアディポサイトカインが脂肪細胞から分泌されているが、本節で検討した遺伝子の有意な発現量が認められなかったことは、検討しなかった遺伝子の相関関係、またはカゼイン群とキビタンパク質摂取群間脂肪組織の重量差がなかったためと思われる。

以上の本節の結果から、キビタンパク質には、KK-A y マウスの血漿HDL-コレステロール濃度を上昇させ、また肝臓中コレステロール濃度を減少させ動脈硬化症の進行を遅延させる作用があることが示唆された。

第2節 高脂肪食餌条件における2型糖尿病モデルKK-A^yマウスにおけるキビタンパク質の血糖値制御、脂質代謝およびインスリン、アディポネクチン、脂肪組織での遺伝子発現に及ぼす影響

本章の第1節の実験では、正常食餌を与えた糖尿病モデルKK-A^y系マウスにおいて、キビタンパク質の摂取によりHDL-コレステロールが上昇し、肝臓中コレステロール濃度の減少の脂質代謝に改善が見られた。日本産二戸在来ヒエ及び黒ヒエタンパク質を摂取させた糖尿病態ラットにおいても、このような効果が見られたことから、ヒエタンパク質が、糖尿病能を緩和、改善させる可能性が示された [69]。

しかし、2型糖尿病モデルマウスにおける、一層病状に近い高エネルギー食餌条件での血糖値制御および脂質代謝、アディポサイトカイン発現に及ぼす韓国産キビの影響については明らかにされていない。本節では、前節の正常食餌条件に対して、ラードを添加し、より病的状態を起こさせる高脂肪食餌条件で実験を行った。正常食餌条件に比べて、高脂肪食餌では、エネルギーの過剰摂取をもたらし、Wistar系ラットやSD系ラット、C57BL/6J系マウスなど肥満遺伝子を持たない動物においても肥満を誘導し、インスリン抵抗性を惹起させる研究が広く行われている [100,106,139,140,156]。また、糖尿病モデル動物に高脂肪食を摂取させることにより、正常食餌条件よりも、代謝マーカーが大きくレスポンスすることが期待される。

最近、脂肪組織は単に脂肪を貯蔵する組織ではなく、様々なサイトカイン及びホルモンを分泌する内分泌器官で、脂肪組織から分泌される物質が各組織でインスリン信号伝達過程に障害を起こすことで二次的にインスリン抵抗性を発生すると報告されている [27,29]。

従って、正常食を摂取していても遺伝的に肥満、糖尿病を発症するKK-A^y系マウスに、高脂肪食を摂取させることで、一層の糖および脂質代謝及びアディポネクチン、インスリン、それらの遺伝子発現に大きな影響を及ぼすことが期待される。

そこで本節では、キビタンパク質摂取によるKK-A^y系マウスに高脂肪食を与えた時の血糖値制御、脂質代謝、血中アディポネクチン、インスリンレベル及び脂肪組織でのアディポサイトカインの遺伝子発現に及ぼす影響を調べた。

1. 方法

飼料の調製

実験食餌は、AIN-93組成に従って調製した [108]。正常群(C群)、及びC群の20%タンパク質相当量のカゼインに、ラード50%を添加したHC群、及び20%タンパク質相当量のタンパク質源としてPMPを添加した飼料群(HPM群)の3群の飼料群とした。

HPM群には制限アミノ酸であるリジンをカゼインのアミノ酸組成に合わせて添加した [78]。また、キビタンパク質中の含まれている脂質や食物繊維を考慮し、飼料調製時の大豆油とセルロースの添加量を調整した。

Table 4-4. Diet compositions (g/100g)

	Normal diet		High-fat diet	
	Casein (C)	Casein (HC)	PMP (HPM)	
Casein ¹	22.9	22.9	-	
PMP	-	-	37.6	
AIN-93 Salt mixture ²	3.5	4.3	4.3	
AIN-93 Vitamin mixtur	1.0	1.2	1.2	
Soybean oil ³	7.0	7.0	4.5	
Choline bitartrate ³	0.2	0.2	0.2	
Cellulose ¹	5.0	6.2	1.5	
α-Cornstarch ¹	12.5	6.9	4.3	
Cornstarch ¹	37.6	20.8	14.5	
L-Lys-HCl ⁴	-	-	1.2	
Cystine ⁴	0.3	0.3	-	
Sucrose ⁵	10	10	10	
Lard ³	-	20	20	

¹Oriental Yeast, Tokyo

²AIN-93G diet composition

³Wako Pure Chemical Industries,

⁴Ajinomoto, Tokyo

⁵Toyo Sugar Refining, Tokyo

実験動物及び飼育方法

実験動物には、5週齢のKK-A^y系雄マウス(日本クレア)21頭を使用し、第3章、第1節と同様の条件にして、個別のステンレスケージにいて飼育した。購入後3日間は予備飼育期間とし、AIN-93組成カゼイン飼料と水を自由摂取させ、各群7頭ずつ3群に群分け、Table 4-4の飼料で20日間飼育し、体重変化を測定した。飼育期間の18日目から20日目までの糞を採取し、分析時まで-20°Cで保存した。21日目にマウスを8時間絶食させ、ジエチルエーテル麻酔下で次のように解剖を行った。0.1M EDTAで処理したシリンジを用いて、下大静脈から採血し、血液は試験管に移し、4°C、3000×gで15分間の遠心分離を行い、血漿を分離した。肝臓は生理食塩水で還流した後に採取し、重量を測定した。更に、精巢周囲脂肪組織を採取し、重量を測定した。分離した血漿、肝臓、脂肪組織は、分析時まで-80°Cで保存した。

血糖値およびOGTTの測定

血糖値の測定

血糖値の測定は、第3章、第1節と同様の方法で行った。

OGTTの測定

OGTTは、第3章、第2節と同様の方法で行った。

血漿の分析

1) 血漿中の総コレステロール濃度の測定

血漿中の総コレステロール濃度測定は、第3章、第1節と同様の方法で行った。

2) 血漿中のHDL-コレステロール濃度の測定

血漿中のHDL-コレステロール濃度測定は、第3章、第1節と同様の方法で行った。

3) 血漿中のトリグリセリド濃度の測定

血漿中のトリグリセリド濃度測定は、第3章、第1節と同様の方法で行った。

4) 血漿中のインスリン及びアディポネクチン濃度の測定

血漿中のインスリン及びアディポネクチン濃度は、第3章、第2節と同様の方法でおこなった。

肝臓の脂質分析

1) 肝臓脂質の抽出

肝臓脂質の抽出は、第3章、第1節と同様の方法で行った。

2) 肝臓中のコレステロール濃度の測定

肝臓中のコレステロール濃度の測定は、第3章、第1節と同様の方法で行った。

3) 肝臓中のトリグリセリド濃度の測定

肝臓中のトリグリセリド濃度の測定は、第3章、第1節と同様の方法で行った。

糞中脂質の抽出、胆汁酸排泄量の定量

1) 糞中脂質の抽出

糞中脂質の抽出は、第3章、第1節と同様の方法で行った。

2) 糞中の胆汁酸量の測定

糞中の胆汁酸の測定は、第3章、第1節と同様の方法で行った。

3) 糞中のコレステロール濃度の測定

糞中のコレステロール濃度測定は、第3章、第1節と同様の方法で行った。

4) 糞中のトリグリセリド濃度の測定

糞中のトリグリセリドの測定は、第3章、第1節と同様の方法で行った。

Real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (real-time PCR)

1) マウスの脂肪組織からtotal RNA抽出

マウスの脂肪組織からtotal RNA抽出は、第4章、第1節と同様の方法で行った。

2) マウスの肝臓組織からtotal RNA抽出

肝臓組織からtotal RNAはAGPC法(Acid-guanidium-phenol-chloroform法) [157]で行い、肝臓組織中のアディポネクチンレセプターの発現量を検討した。

「試薬」

・ Denaturing solution (Sol D)

4Mグアニジンチオシアン酸塩(Wako)、0.5% N-lauroyl sarcosine(ICN)になるように純水 1M (pH7.0)に溶解し、1Mグエン酸ナトリウム(pH7.0)溶液を2.5mL加え、純水で100 mLにフィルアップした。この溶液を50mL取り、使用時に2-メルカプトエタノール0.35%加えた。

「方法」

凍結していた肝臓組織約200mgを秤り取り、2mLのSol Dに加え、ポリトロンホモジナイザー(Kinematica GmbH Steinhofhalde ; Switzerland)を用いてホモジナイズした。操作は氷上で行った。ホモジェネートを2mL容遠心チューブ2本に800 μ Lずつ移し、チューブ1本につき2M酢酸ナトリウム(pH4.0) 80 μ L、水飽和フェノール800 μ L、クロロホルム:イソアミルアルコール(49:1)160 μ Lを加え、よくボルテックスし、4 $^{\circ}$ Cで15分間静置した。その後4 $^{\circ}$ C、15000rpm、10分間遠心分離し、RNAが溶解している上層(水層)を回収した(約600 μ L)。この際、下層(有機層)および界面にはDNAやタンパク質が溶解しているのを混入しないように注意した。回収した上層に2-プロパノール800 μ Lを加え、ボルテックス後-20 $^{\circ}$ Cで15分以上静置した。その後4 $^{\circ}$ C、15000rpm、10分間遠心分離し、上清を取り除き沈殿を得た。4M塩酸リチウム200 μ Lを加え、ピペティングにより沈殿を溶解させ、1本のチューブにまとめて攪拌し、4 $^{\circ}$ C、15000rpm、10分間遠心分離した。沈殿を10mM Tris/1mM EDTA/0.5% SDS 400 μ Lに溶解した後、クロロホルム:イソアミルアルコール400 μ Lを加えボルテ

ックし、4°C、15000rpm、10分間遠心分離した。

上清を回収し、2-プロパノール400 μ L、2M酢酸ナトリウム(pH4.0) 40 μ Lを加えてボルテックスし、4°C、15000rpm、10分間遠心分離して上清を取り除き、沈殿を得た。次に75%エタノールを加えてボルテックし、4°C、15000rpm、5分間遠心分離して洗浄した後、上清を丁寧に取り除いた。得られた沈殿を真空乾燥機で約2分間乾燥し、残存するエタノールを取り除いた後、100 μ Lの純水に沈殿を溶解し、この液を total RNA溶液として実験まで-20°Cで保存した。

3) RNAの定量

肝臓組織のtotal RNAの定量は、第4章、第1節と同様の方法で行った。

4) Complementary DNA (cDNA) 合成

cDNAで合成は、第4章、第1節と同様の方法で行った。

5) Real time PCR (quantitative assay)

Real-time PCRは、第4章、第1節と同様の方法で行った。

統計処理

本実験で得られたデータの計算および整理は、第3章、第1節と同様の方法で行った。

2. 結果

高脂肪食餌条件下で、KK-A^yマウスにPMPをタンパク質源として摂取させることで、以下のように血糖値の上昇を有意に抑制し、血漿中のHDL-コレステロール及びアディポネクチンレベルを有意に上昇させた。更に、脂肪細胞でのアディポクチン、PPAR γ 及びAdipoR2の遺伝子発現量を有意に高めた。また、高脂肪食餌条件下でPMPの摂取は血糖値、血漿中インスリン濃度を有意に低下させ、脂肪細胞でのTNF- α , IL-6 mRNA発現量を低下させることが明らかとなった。

体重、飼料摂取量、組織重量、糞乾燥重量

21日間の飼育による解剖時の体重と総飼料摂取量、組織重量をTable 4-5に示した。

21日間の飼育の結果、体重増加量はC群で12.4 \pm 2.3g、HC群で16.9 \pm 1.2g、HPM群で18.2 \pm 1.9gと高脂肪食を与えた2群で有意に高値を示し、高脂肪食により肥満を誘導することができた($p < 0.05$)。飼料摂取量に関しては、C群で104.4 \pm 11.6g、HC群で78.6 \pm 7.93g、HPM群で86.5 \pm 7.33gと高脂肪食を与えた2群で有意に低値を示した($p < 0.05$)。体重100g中肝臓重量はC群で5.57 \pm 0.42g、HC群で5.67 \pm 0.75g、HPM群で5.89 \pm 0.29gと3群で有意な差は認められなかった。腎臓重量はC群で1.41 \pm 0.13g、HC群で1.20 \pm 0.19g、HPM群で1.15 \pm 0.09gと高脂肪食を与えた2群で有意に高値を示した($p < 0.05$)。体重100g中精巣周囲脂肪組織重量、腎臓周囲脂肪組織重量はそれぞれC群で2.77 \pm 0.66g、1.27 \pm 0.20g、HC群で3.28 \pm 0.19g、1.16 \pm 0.23g、HPM群で3.45 \pm 0.44g、1.23 \pm 0.21gと3群間で有意な差は認められなかった。また、糞乾燥重量はC群で0.58 \pm 0.07g、HC群で0.62 \pm 0.21g、HPM群で0.99 \pm 0.05gとHPM群で有意に上昇した($p < 0.05$)。

Table 4-5. Effects of dietary PMP on body-weight gain, food intake, tissue and dried feces weights in KK-A^y mice fed high-fat diet

	C	HC	HPM
Initial weight (g)	23.6±2.3	23.3±2.2	23.3±1.9
Final weight (g)	36.0±1.6 ^a	40.3±1.2 ^b	41.6±1.9 ^b
Weight gain (g/21d)	12.4±2.3 ^a	16.9±1.2 ^b	18.2±1.9 ^b
Food intake (g/21d)	104.4±11.6 ^a	78.6±7.93 ^b	86.5±7.33 ^b
Triglyceride/HDL-cholesterol	2.84±0.29	3.16±0.81	2.79±0.59
Liver weight (g)	2.01±0.17 ^a	2.29±0.30 ^{ab}	2.46±0.20 ^b
Kidneys weight (g)	0.51±0.06	0.48±0.07	0.48±0.04
Adipose tissue wt. (g) :			
Epididymal	1.00±0.25 ^a	1.32±0.07 ^b	1.44±0.19 ^b
Perirenal	0.46±0.08	0.47±0.10	0.51±0.10
Dried feces (g)	0.58±0.07 ^a	0.62±0.21 ^a	0.99±0.05 ^b
Tissue weight/100g body wt.			
Liver weight (g)	5.57±0.42	5.67±0.75	5.89±0.29
Kidneys weight (g)	1.41±0.13 ^a	1.20±0.19 ^b	1.15±0.09 ^b
Adipose tissue wt. (g) :			
Epididymal	2.77±0.66	3.28±0.19	3.45±0.44
Perirenal	1.27±0.20	1.16±0.23	1.23±0.21
Dried feces (g)	1.60±0.31 ^a	1.55±0.54 ^a	2.40±0.12 ^b

Values are means ± SD for 6-7 mice.

Means with a different letter (a,b) within each diet group differ ($p < 0.05$).

See Table 4-4 for details of dietary groups.

Oral glucose tolerance test

Oral glucose tolerance testの結果と血糖上昇下面積(AUC)をFig. 4-8に示した。

Oral glucose tolerance test (Fig. 4-8A)は、グルコース投与後120分間まで3群間で有意な血糖値の上昇抑制は認められなかった。また、血糖上昇下面積(AUC, Fig. 4-8B)は、C群で $17.7 \pm 9.9 \text{ mg} \cdot \text{min/dL}$ 、HC群で $18.6 \pm 8.7 \text{ mg} \cdot \text{min/dL}$ 、HPM群で $12.8 \pm 4.2 \text{ mg} \cdot \text{min/dL}$ と3群間で有意な差は認められなかった。

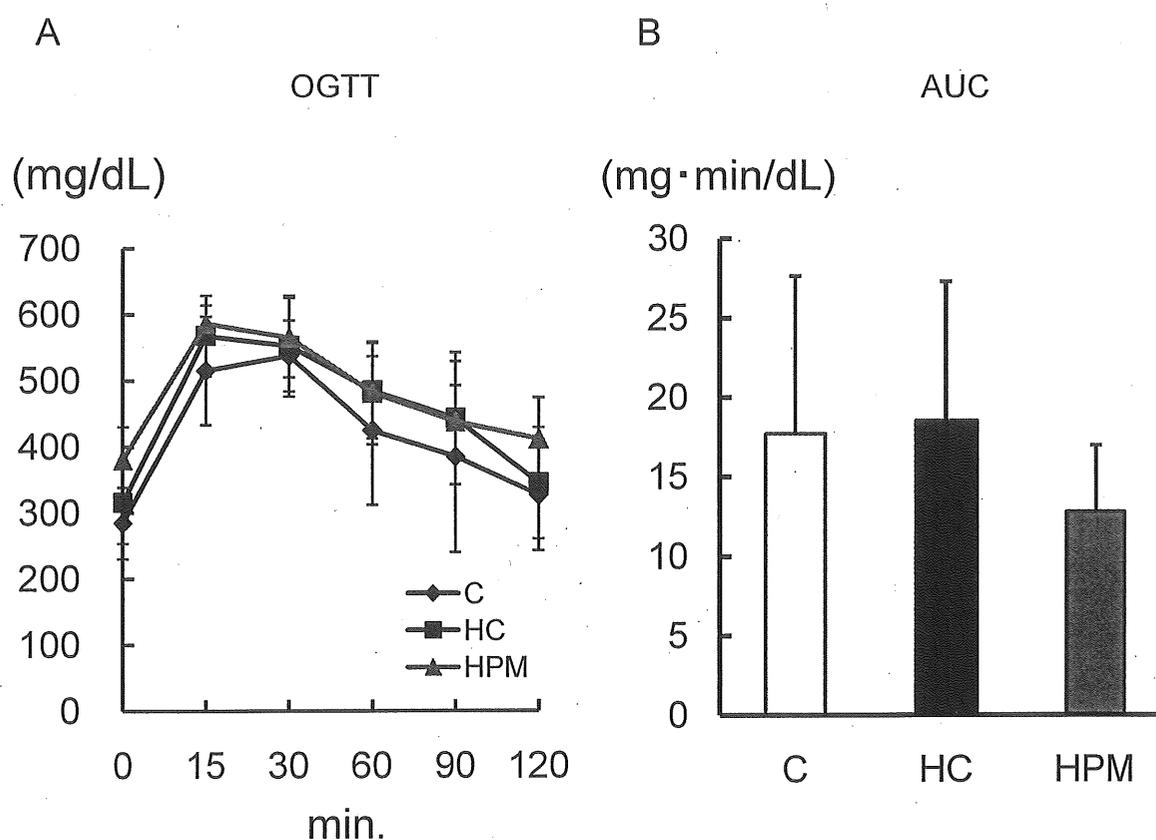


Fig. 4-8. Effect of dietary PMP on blood glucose response at OGTT and AUC in KK-A^y mice fed high-fat diet.

Values are means \pm SD for 6-7 mice.

See Table 4-4 for details of dietary groups.

血糖値経時変化、血中グルコース濃度

飼育期間中の血糖値の経時変化と、飼育終了日の血中グルコース濃度をFig. 4-9に示した。

飼育1、2、3週間の血糖値(Fig. 4-9A)は、C群で 264.57 ± 77.5 mg/dL、 283.0 ± 133.49 mg/dL、 324.2 ± 99.56 mg/dL、HC群で 403.86 ± 161.89 mg/dL、 457.86 ± 161.47 mg/dL、 505.29 ± 145.37 mg/dL、HPM群で 304.57 ± 139.25 mg/dL、 501.29 ± 42.66 mg/dL、 385.14 ± 122 mg/dLとHC群と比較してC群、HPM群で有意な血糖値の上昇抑制が認められた($p < 0.05$)。しかし、HC群とHPM群の間には有意な差はなかった。また、飼育終了日の血中グルコース濃度(Fig. 4-9B)は、HC群で 505.29 ± 145.37 mg/dLに対して、HPM群で 385.14 ± 122 mg/dLと有意な血糖値の上昇抑制が認められた($p < 0.05$)。

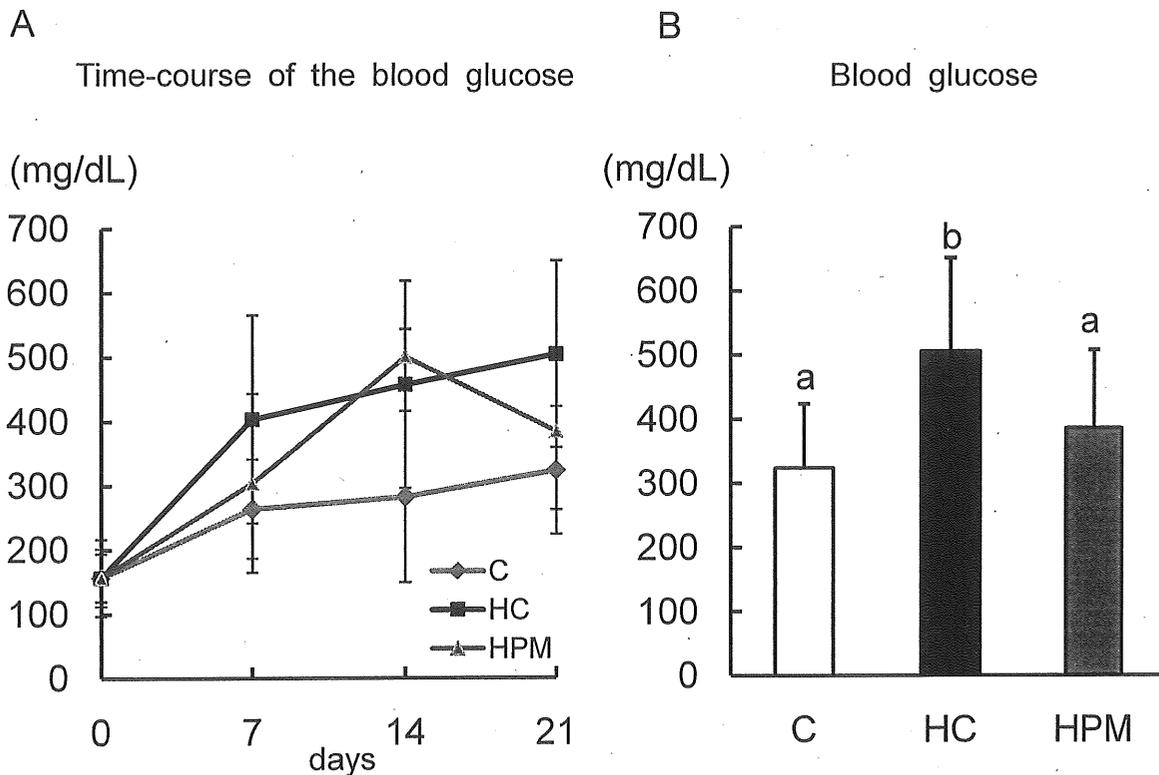


Fig. 4-9. Effect of dietary PMP on blood glucose levels in KK-A^y mice fed high-fat diet.

Values are means \pm SD for 6-7 mice.

Means with a different letter (a,b) within each diet group differ ($p < 0.05$).

See Table 4-4 for details of dietary groups.

血中インスリン、アディポネクチン濃度

血中インスリン、アディポネクチン濃度を測定した結果をFig. 4-10に示した。

PMP飼料の摂取によって、血中インスリン濃度(Fig. 4-10A)は、C群で 9.51 ± 4.51 ng/mL、HC群で 10.11 ± 2.86 ng/mLに対してHPM群で 6.33 ± 2.57 ng/mLとC群、HC群と比べてHPM群で有意に低下した($p < 0.05$)。一方、血中アディポネクチン濃度(Fig. 4-10B)は、C群で 30.9 ± 17.8 μ g/mL、HC群で 10.5 ± 2.4 μ g/mLに対してHPM群で 28.7 ± 9.2 μ g/mLと、HC群と比較してC群、HPM群で有意に高まった($p < 0.01$)。

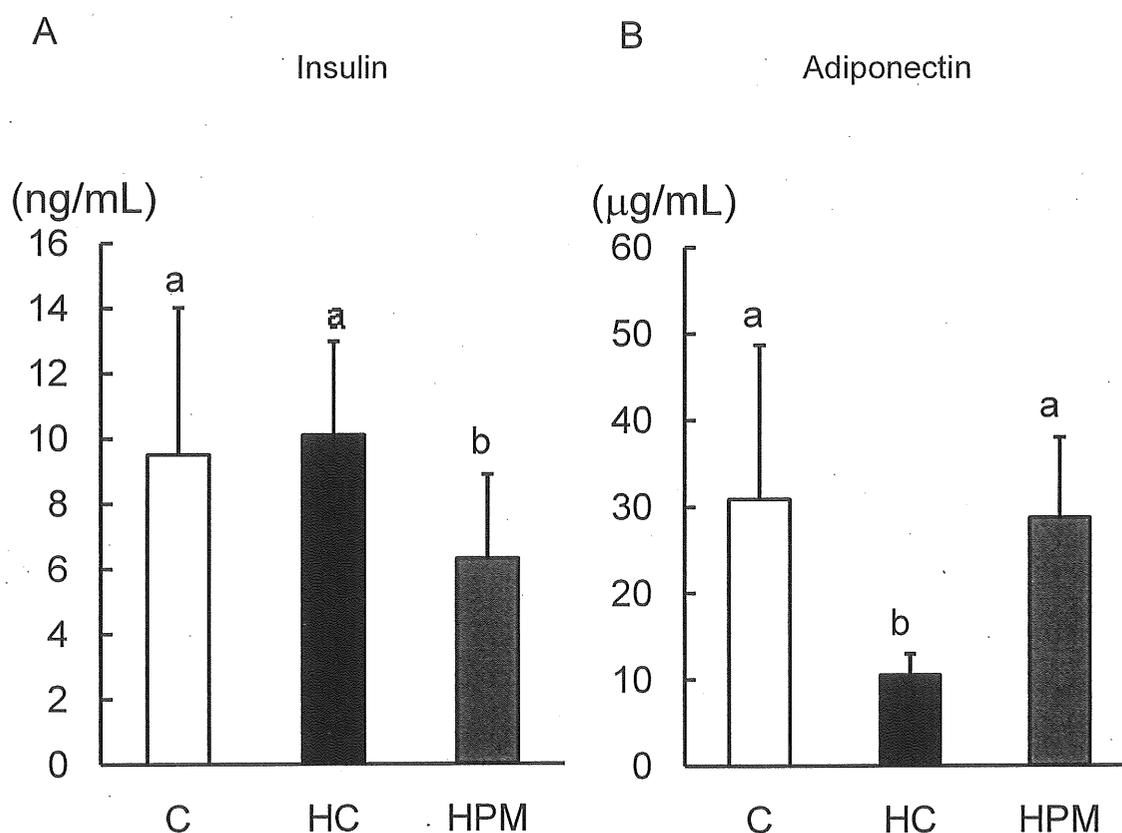


Fig. 4-10. Effect of dietary PMP on plasma insulin and adiponectin concentrations in KK-A^y mice fed high-fat diet.

Values are means \pm SD for 6-7 mice.

Means with a different letter (a,b) within each diet group differ ($p < 0.05$).

See Table 4-4 for details of dietary groups.

血漿中脂質濃度

血漿中の各脂質濃度を測定した結果をFig. 4-11に示した。

PMP飼料の摂取によって、総コレステロール濃度(Fig. 4-11A)は、C群で 173.1 ± 24.3 mg/dL、HC群で 190.9 ± 43.8 mg/dL、HPM群で 229.0 ± 55.4 mg/dLとHPM群で有意に高い値を示した($p < 0.05$)。HDL-コレステロール濃度(Fig. 4-11B)も同様に、C群で 62.18 ± 8.52 mg/dL、HC群で 56.04 ± 11.93 mg/dL、HPM群で 68.65 ± 13.53 mg/dLとHPM群で有意に高い値を示した($p < 0.05$)。トリグリセリド濃度(Fig. 4-11C)は、C群で 254.62 ± 97.21 mg/dL、HC群で 293.59 ± 138.35 mg/dL、HPM群で 225.90 ± 91.69 mg/dLと3群間で有意な差は認められなかった。

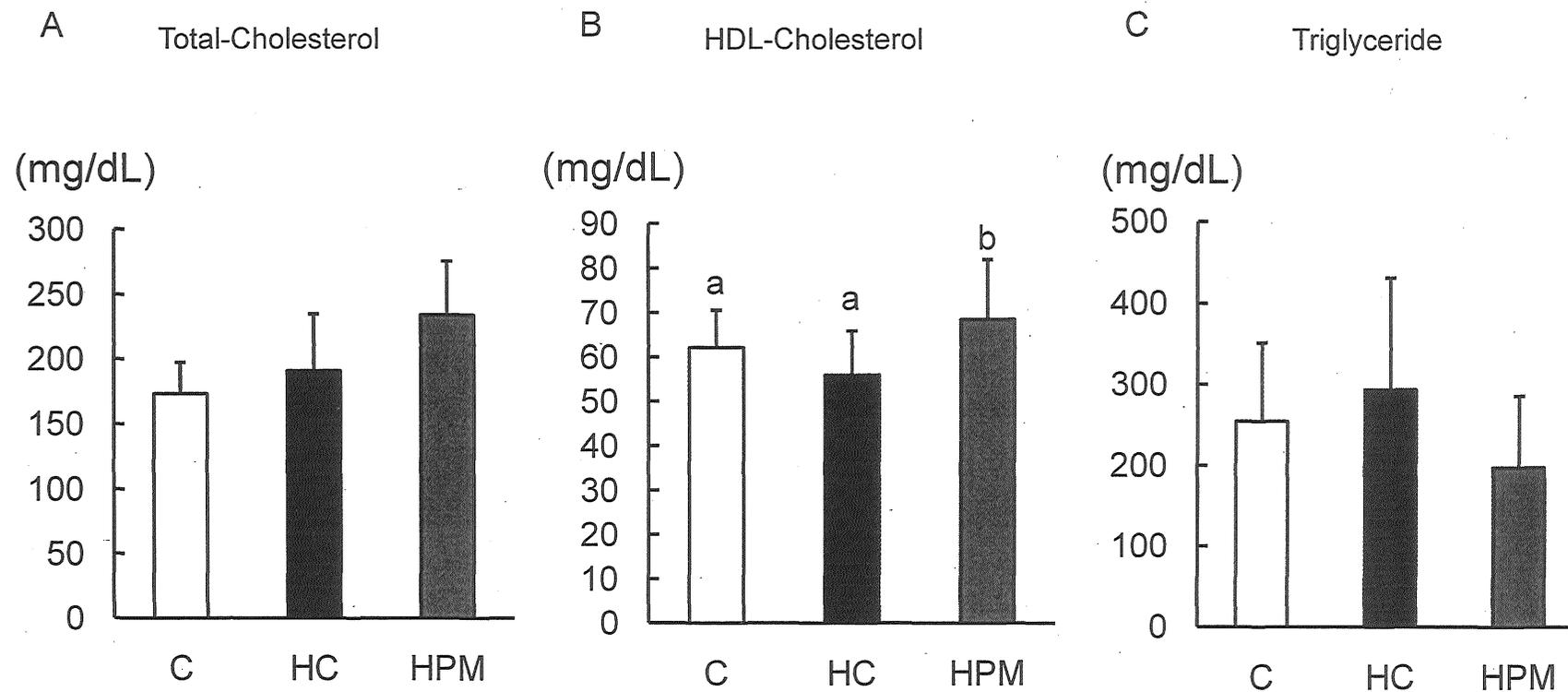


Fig. 4-11. Effect of dietary PMP on plasma lipid concentrations in KK-A^y mice fed high-fat diet.

Values are means±SD for 6-7 mice.

Means with a different letter (a,b) within each diet group differ ($p < 0.05$).

See Table 4-4 for details of dietary groups.

肝臓中脂質濃度

肝臓中の各脂質濃度を測定した結果をFig. 4-12に示した。

肝臓のコレステロール濃度(Fig. 4-12A)は、C群で 4.80 ± 1.47 mg/g Liver wt、HC群で 5.62 ± 1.39 mg/g Liver wt、HPM群で 4.44 ± 1.39 mg/g Liver wtとC群、HC群と比べてHPM群で低い傾向が認められた($p=0.069$)。

トリグリセリド濃度(Fig. 4-12B)は、C群で 43.65 ± 11.62 mg/g Liver wt、HC群で 133.45 ± 54.78 mg/g Liver wt、HPM群で 157.56 ± 31.46 mg/g Liver wtと高脂肪食群で有意に高値を示したが($p < 0.01$)、HCとHPMの飼料群間には有意な差は見られなかった。

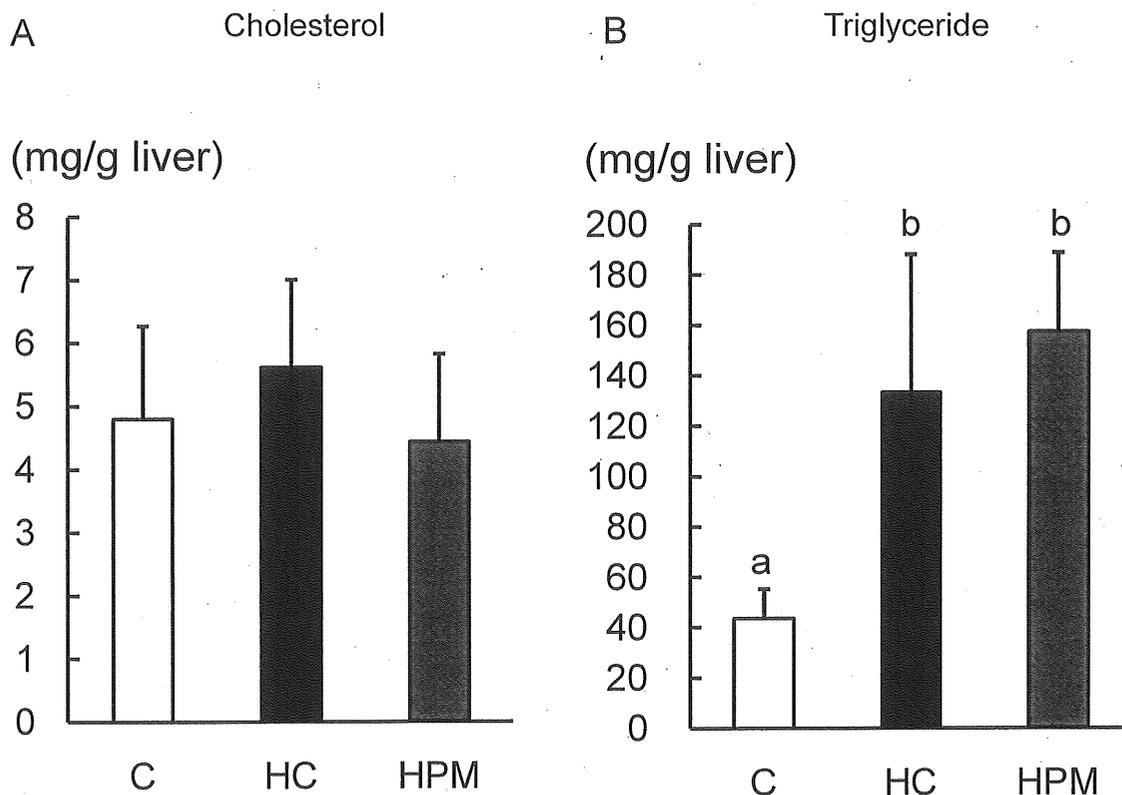


Fig. 4-12. Effect of dietary PMP on liver lipid concentrations in KK-A^y mice fed high-fat diet.

Values are means \pm SD for 6-7 mice.

Means with a different letter (a,b) within each diet group differ ($p < 0.01$).

See Table 4-4 for details of dietary groups.

糞中胆汁酸濃度

糞中の胆汁酸濃度を測定した結果をFig. 4-13に示した。

糞の胆汁酸濃度は、C群で $0.63 \pm 0.21 \mu\text{mol/L}$ 、HC群で $0.49 \pm 0.19 \mu\text{mol/L}$ 、HPM群で $0.55 \pm 0.13 \mu\text{mol/L}$ と各群間有意な差は認められなかった。

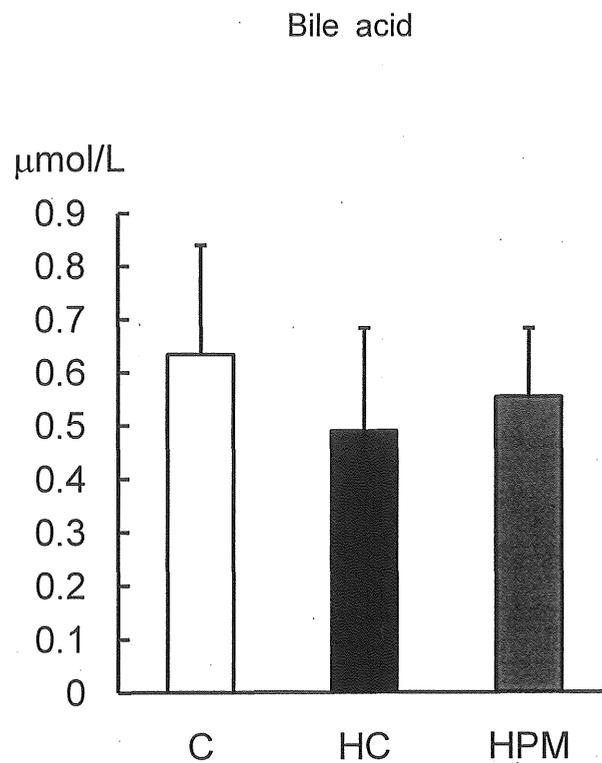


Fig. 4-13. Effect of dietary PMP on the fecal bile acid in KK-A^y mice fed high-fat diet.

Values are means \pm SD for 6-7 mice.

See Table 4-4 for details of dietary groups.

脂肪組織での遺伝子発現

腎臓周囲脂肪での遺伝子発現(adiponectin, TNF- α , AdipoR1, AdipoR2, PPAR γ , IL-6 mRNA)を測定した結果を、Fig. 4-14に示した。

腎臓周囲脂肪でのadiponectin mRNAの発現量 (Fig. 4-14A)は、C群とHPM群間有意な差は認められなかったが、HPM群でHC群と比べてadiponectin mRNAの発現量が有意に亢進した ($p < 0.05$)。AdipoR1, AdipoR2 mRNAの発現量 (Fig. 4-14B, C)はC群と比べて高脂肪群で有意に減少したが、AdipoR1 mRNAの発現量はHC群と比べてHPM群で有意に増加した ($p < 0.05$)。TNF- α 、IL-6 mRNAの発現量 (Fig. 4-14D、F)はHPM群で有意な減少が見られた ($p < 0.05$)。PPAR γ mRNAの発現量 (Fig. 4-14E)は、C群と比べて高脂肪食群で、有意に減少したが、HC群と比べてHPM群で有意に増加した。

Relative mRNA abundance (%) :

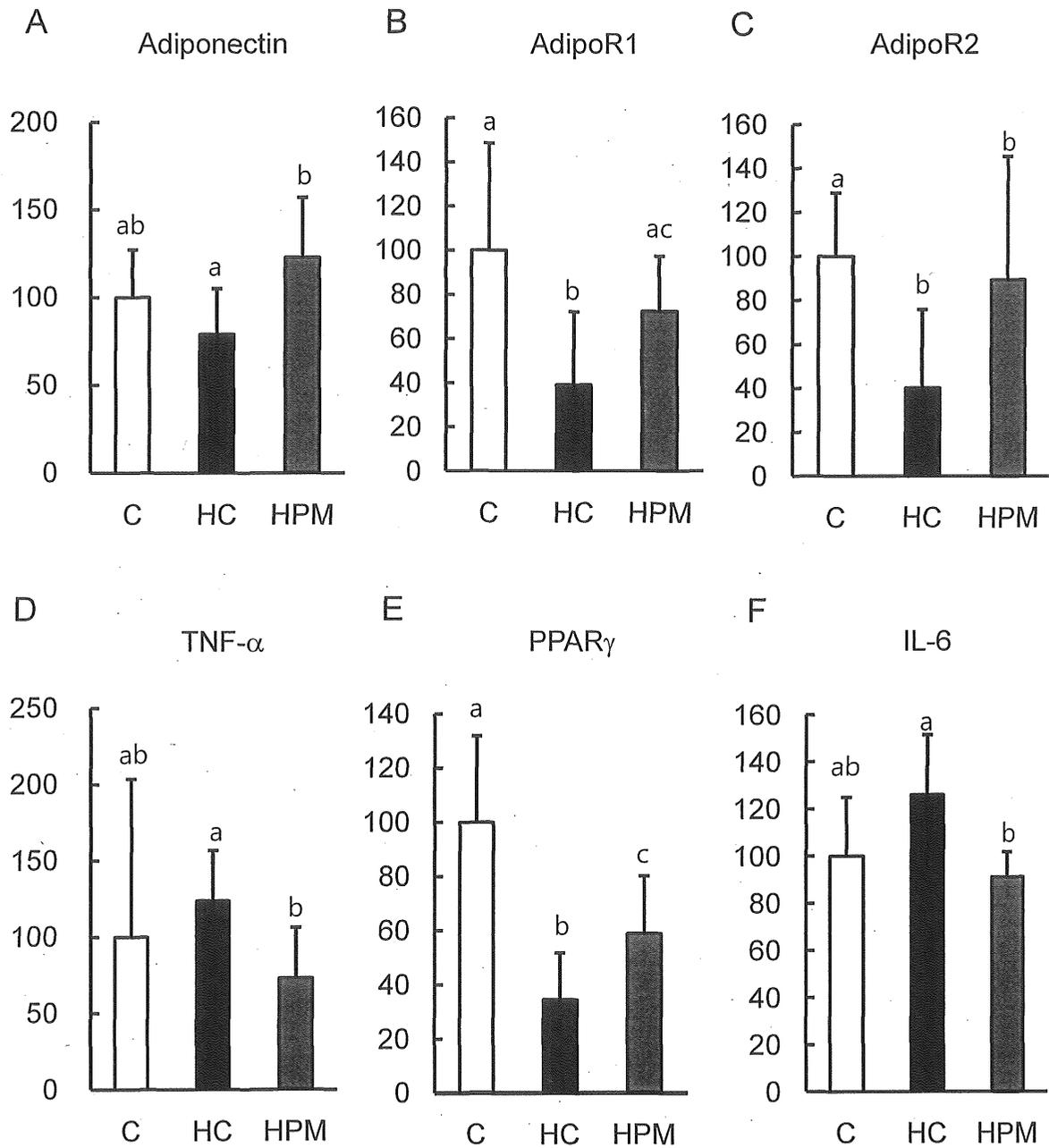


Fig. 4-14. Effect of dietary PMP on gene expressions in adipose tissue in KK-A^y mice fed high-fat diet.

Values are means \pm SD for 6-7 mice.

Means with a different letter (a,b) within each diet group differ ($p < 0.05$).

Gene expression was normalized using the expression of the β -actin gene.

See Table 4-4 for details of dietary groups.

肝臓組織での遺伝子発現

肝臓での遺伝子発現(AdipoR1, AdipoR2 mRNA)を測定した結果をFig. 4-15に示した。

肝臓でのAdipoR1及びAdipoR2 mRNAの発現量は、各群間有意な差は認められなかったが、HC群でC群およびHPM群と比べてAdipoR1、AdipoR2の発現量(Fig. 4-15)が低下する傾向が見られた($p=0.08$)。

Relative mRNA abundance (%) :

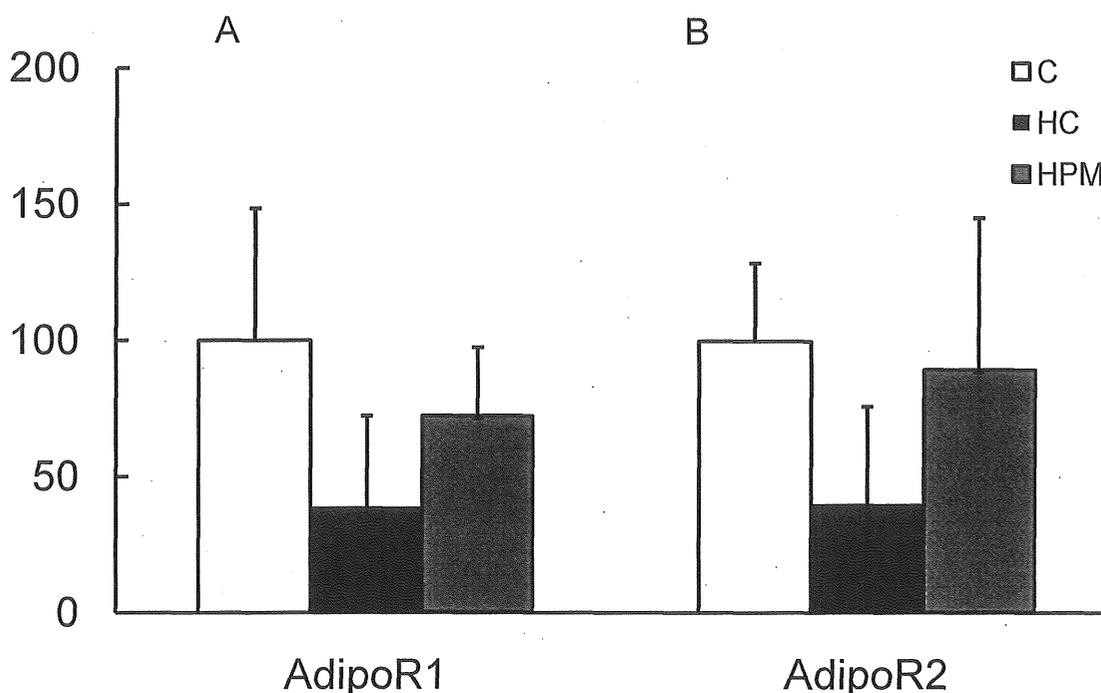


Fig. 4-15. Effect of dietary PMP on gene expressions in liver in KK- A^y mice fed high fat diet.

Values are means \pm SD for 6-7 mice.

Gene expression was normalized using the expression of the β -actin gene.

See Table 4-4 for details of dietary groups.

3. 考察

肥満は、過食、エネルギーの摂取過剰、運動不足などのエネルギー消費のアンバランスで生じ、インスリン抵抗性惹起させ、様々な代謝異常を引き起こすことが広く認められている [158]。

本節では、第1節の正常食餌条件とは異なり、2型糖尿病モデルであるKK-A^yマウスを用いて、2型糖尿病モデル動物にとって、一層病状を惹き起しやすい高脂肪食餌を与え、重度の糖尿病の状態に対するキビタンパク質の血糖値制御、脂質代謝改およびアディポネクチン、インスリンレベル、遺伝子発現について検討した。KK-A^y系マウスは、遺伝的に2型糖尿病を自然発症するため、正常食下でも肥満2型糖尿病を発症するモデル動物である。高脂肪食はエネルギー過剰状態をもたらし、C57BL/6JマウスやWistar系ラットなど、肥満遺伝子を持たないモデルにも、肥満や糖、脂質代謝異常を惹起することが知られている。また、KK-A^y系マウスに高脂肪食を与えることで病態が増悪化し、正常食を与えた食餌条件よりも、一層大きなレスポンスで反応を見ることができていることが報告されている [72,83]。

本節で、このような高脂肪食餌条件下で実験を行った結果、キビタンパク質の摂取は、血糖値および血漿中インスリン濃度を有意に低下させ(Fig. 4-9,10)、更にHDL-コレステロール、アディポネクチン濃度(Fig. 4-10,4-11)および脂肪組織でのアディポネクチン、PPAR γ 、AdipoR1, AdipoR2遺伝子発現量を高める結果を示した (Fig. 4-14)。

本節では、高脂肪食により、脂肪の過剰摂取とそれに伴うエネルギー過剰状態を招くことから、正常食群と比べて、高脂肪食で飼料摂取量が減少したが、体重増加量は高まった。このような高脂肪食餌条件でのOGTTの結果は、高脂肪食による耐糖能の悪化は観察されなかったが、最終日血糖値はキビタンパク質摂取により有意に低下した (Fig. 4-9B)。

本節の結果と同様に、韓国産アワタンパク質濃縮物を肥満型2型糖尿病モデルKK-A^y系マウスに与えることにより、血中インスリン濃度の減少、血中HDL-コレステロール、アディポネクチン濃度が上昇することが報告されており [72]、更に日本産ヒエのタンパク質濃縮物を摂取させることにより、血糖値上昇抑制効果および血中HDL-コレステロール、アディポネクチン濃度が高まることが示されている [69]。本節で観察された上記の結果は、これらの韓国産アワや日本産ヒエタンパク質の効果を支持していることがわかった。

植物性タンパク質がコレステロール代謝に対して改善効果があることはよく知られている

が [100-102]、Wistarラットに大豆タンパク質を与えた時、血漿中アディポネクチン濃度と脂肪細胞でのアディポネクチン遺伝子発現が増加したが、血漿中グルコース、インスリン濃度には変化が見られなかったことが報告されている [53]。また、タラのタンパク質および大豆タンパク質をラットに与えた時、カゼインと比べて血漿中グルコースとインスリン濃度の減少が見られ、インスリン感受性が改善されることが報告されている [54]。

しかし、本節のキビタンパク質摂取は、カゼイン摂取に比べて、血漿中アディポネクチンおよびHDL-コレステロール濃度が同時に上昇しており、かつインスリン分泌の強い抑制を示した(Fig. 4-10, 11)。これらの結果は、インスリン抵抗性が改善されていることを示唆していると思われる。

HDL-コレステロールは、肝組織での胆汁酸合成および分泌に利用され、コレステロールを末梢組織から肝臓に輸送させ血漿コレステロールを除去させるコレステロール逆転送の機能を有する [154]。血中中性脂質濃度の増加によって血中HDL-コレステロール濃度が低下し、コレステロール逆転送のカイロミクロンレムナントの含量を増加させることによる冠状動脈疾患の主要原因になると報告されている [159]。また、HDL-コレステロールレベルの低下は、インスリン非依存性糖尿病である2型糖尿病における中性脂肪血症を惹起されることは良く知られている [116]。

HDL-コレステロールとアディポネクチン濃度には相関性があることが良く知られている。アディポネクチン濃度の上昇はHDL-コレステロール濃度を上昇させ、2型糖尿病患者での心血管疾患を改善し予防することが報告されている [150,160]。血中トリグリセリド/HDLコレステロール比は、インスリン抵抗性の有用な指標として知られており [161]、本節では高脂肪食群間の有意な差は認められなかったが、キビタンパク質摂取群で低下傾向が観察されており、高脂肪食餌条件下におけるインスリン抵抗性が緩和されていることを示している(Table 4-5)。

高脂肪の食餌条件下で、脂肪細胞での遺伝子発現に対する影響を調べた結果、キビタンパク質の摂取は、アディポネクチン、adipoR1, PPAR γ mRNAの発現を有意に高め、TNF- α 、IL-6 mRNAの発現を有意に減少させることがわかった(Fig. 4-14)。AdipoR1もしくはAdipoR2の培養細胞への発見は、globularアディポネクチンおよび全長アディポネクチンの特異的結合を増加させ、アディポネクチンによるAMPK、p38MAPKおよびPPAR α の活性化を高め、脂肪酸燃焼および糖取り込みの促進することが知られている [42,43]。イ

インスリン抵抗性惹起因子の一つであるTNF- α は、アディポネクチンの遺伝子発現を転写レベルで抑制することが知られており [35]、肥満者における血中アディポネクチン低下の機序の一つとして、このTNF- α のアディポネクチン抑制作用を挙げることができる。本節のキビタンパク質摂取は、アディポネクチン mRNAの発現を有意に高め、TNF- α mRNAの発現を有意に減少させることによって、血中のアディポネクチンレベルを上昇させることになる。

アディポネクチンやTNF- α mRNAレベルの影響は、脂肪細胞の肥大化による分泌機能の変化が知られているが [35]、本節では脂肪組織の重さは各群間有意な差は認められなかったため、キビタンパク質が脂肪細胞の大きさと分化に及ぼす影響を検討する必要があると考えられる。

以上の本節における実験結果から、キビタンパク質の摂取は、KK-A^yマウスの血漿HDL-コレステロール、アディポネクチン濃度を高め、脂肪細胞での善玉アディポサイトカインであるアディポネクチン、PPAR γ 、AdipoR2 mRNA発現量の上昇、また、血糖値、血漿中インスリン濃度、悪玉アディポサイトカインであるTNF- α 、IL-6 mRNA発現量を低下させることが明らかにされた。従って、高脂肪食餌条件下におけるより病態の増悪化状態においては、キビタンパク質は、血糖値コントロールを改善し、動脈硬化症の進行、また2型糖尿病、インスリン抵抗性改善、緩和、遅延させる機能が有することが示唆された。