

脱脂粉乳の麴菌による分解産物の糖尿病発症予防効果に関する研究

宮崎大学農学部 食品機能化学講座 教授 六車 三治男

宮崎大学医学部 応用生理学講座 教授 丸山 眞杉

株式会社ユニカフェ R&Dセンター長 中村 豊郎

宮坂醸造株式会社 相談役 宮坂 正昭

【要 約】

我々は現在まで、生活習慣病に効果のある食品の開発を目指して脱脂粉乳発酵物に関する一連の研究を行ってきた。それらの研究を通じて、脱脂粉乳を味噌の原料として添加し発酵させた新しい味噌（ミルキー味噌）には、1）アンギオテンシン転換酵素の阻害活性を持つペプチドが産生されていること、2）その味噌を高血圧ラット（SHR/izm）に経口投与すると血圧が低下すること、3）健常人によるミルキー味噌摂取実験により、日常使用する程度の味噌摂取量では血圧に影響は与えないが、血中アンギオテンシンII濃度が有意に低下することを明らかにしてきた。そこで、アンギオテンシンIIの抑制がII型糖尿病の発症を抑制するという知見に注目し、前報告では、II型糖尿病、肥満、高血圧を呈する病態モデルラットを用いて、これらの病態、特に耐糖能の低下に対して脱脂粉乳発酵物摂取が如何なる影響を与えるか検討した。その結果、2系統の病態モデルラット、SHR/NDmc-cpラットおよびZucker/fa-faラットを用いて、脱脂粉乳発酵産物の肥満、II型糖尿病、高血圧に対する影響を約3ヶ月に亘って検討した結果、SHR/NDmc-cpラットにおいて脱脂粉乳発酵産物の摂取が、耐糖能の低下を抑制する可能性が強く示唆された。

そこで本研究では、脱脂粉乳を米麴菌で発酵させた脱脂粉乳分解物をつくり、それがもたらす生活習慣病の発症進展予防効果を確認し、昇圧物質であるアンギオテンシンII抑制効果との関連を明らかにするために動物実験を含む研究を実施した。脱脂粉乳と米麴を等量混ぜ合わせ発酵させた脱脂粉乳分解物には生理活性機能として高血圧予防効果が期待できるアンギオテンシンI変換酵素（ACE）阻害活性を測定し、高いACE阻害活性が認められた。自然発症高血圧ラット（SHR/NDmc - cp）および自然発症糖尿病ラット（GK/Slc）を用いた持続投与試験を行った。麴による脱脂粉乳分解物を投与したSHRラットは投与後3週間と6週間に有意に血糖値が低下し、脱脂粉乳の麴菌による分解産物の糖尿病発症予防効果が示唆された。また、麴による脱脂粉乳分解物を投与したSHRラットおよびGKラットにおいて有意に血圧降下を示した。

以上のように、麴による脱脂粉乳分解物は*in vitro*、*in vivo*の実験で生活習慣病に対する生理活性機能を有する「新規調味料」となった。今後、さらに麴菌による脱脂粉乳分解産物の生活習慣病病態モデルラットに与える影響を検討することで、肥満や糖尿病の予防効果が認められると、脱脂粉乳分解産物の日常の摂取が、各種病気や生活習慣病の予防に貢献し、ヒトの健康増進や医療費の節減効果が大きいと期待できる。

【キーワード】

脱脂粉乳、麩分解物、血圧降下作用、ACE阻害活性、アンギオテンシンII、生活習慣病予防、糖尿病予防効果、臓器障害予防

【緒言】

近年、脱脂粉乳の過剰在庫という問題が酪農・乳業業界の大きな課題となっている。そのため、脱脂粉乳の持つ栄養成分や機能性に着目し、消費量の向上や新たな開発に努力しているが、まだ、斬新かつ有効なアイデアは見出されていなかった。そこで我々は、以前から良質な栄養素であり、特にわが国で栄養所要量にまだ達していないカルシウムを豊富に含む脱脂粉乳を利用したミルキィ味噌という名の機能性味噌を開発した¹⁻⁶⁾。この機能性味噌は*in vitro*の実験で高血圧予防効果が期待できるアンギオテンシンI変換酵素（ACE）阻害活性を有していた。また、味噌自体からもフィチン酸⁷⁾ならびにジペプチド（SW）⁸⁾がACE阻害物質として同定されているという知見があるが、一般味噌と比べ、機能性味噌の方がおよそ4倍も高いACE阻害活性を有していた。さらに、*in vivo*の動物実験で、自然発症高血圧ラット（SHR/NDmc - cpラット）を用いた経口投与試験を行った。その結果、機能性味噌を経口投与すると、顕著に血圧を降下する作用も有していた。その一方、水、通常味噌を経口投与しても血圧は変化せず、味噌と同じ食塩濃度の食塩水を経口投与すると血圧は上昇した。また、健常人による機能性味噌摂取実験により、日常使用する程度の味噌摂取量では血圧に影響は与えないが、血中アンギオテンシンII濃度が有意に低下することを明らかにしてきた⁹⁾。血圧は、神経系（主に交感神経）、血管系（血管の応答性、収縮様式の変化）、腎性因子（腎由来の昇圧・降圧物質）、内分泌性因子（アルドステロン、インスリン等）、体液性因子（水、ナトリウム等）、遺伝的因子等の因子が、複雑に絡み合って調節されている。このうち、腎性因子は、昇圧系のレニン・アンギオテンシン系および降圧系のカリクレイン・キニン系から成る（図1）。

レニン・アンギオテンシン系において、ACEによりC末端ジペプチドが切断されて、昇圧ペプチドであるアンギオテンシンIIが生成される。一方、カリクレイン・キニン系において、降圧ペプチドであるブラジキニンは、ACEにより切断され、不活性なペプチドとなる。このように、ACEは、両血圧調節系において、昇圧に働く重要な酵素である^{10, 11)}。したがって、ACE阻害剤は血圧上昇抑制に有効であるとされており、臨床的にも心臓系疾患の改善や、他の降圧剤よりも副作用が少ないことが明らかになったことや、ACE阻害剤単独で本態性高血圧患者の約70%に効果を示していることなどから、薬物療法において高血圧治療の第一選択薬のひとつとして現在広く使用されている。また、ACE阻害剤は顕著な血圧降下をもたらさないレベルでも、心血管系や腎臓を含む主要臓器の臓器障害を減弱させ、動脈硬化や心不全の防止に効果があると考えられていることから、ミルキィ味噌の摂取により血中アンギオテンシンII濃度の低下が認められたことは、ミルキィ味噌が生活習慣病に関連したこれらの疾患に対して予防効果を持っている可能性が示唆

された⁹⁾。一般的に降圧療法は過度の血圧低下、空咳、一過性の腎機能低下、発疹、目まいなどの副作用の問題も指摘されている。そのため、このミルキィ味噌のように、日々の食事成分中に天然のACE阻害物質が含まれていれば、副作用もなく自然に生活習慣病の予防や治療に結びつくことが期待される。次のステップとして、我々は、脱脂粉乳の効果を最大限に発揮するために、脱脂粉乳を直接麹菌により酵素分解した、脱脂粉乳分解物を作製した。そして、自然発症高血圧ラット（SHR/NDmc - cpラット）{高血圧症、肥満、2型糖尿病}に麹による脱脂粉乳分解物が5%入った飼料を持続投与する実験を行ったところ、麹による脱脂粉乳分解物投与群において糖化ヘモグロビンの上昇を有意に抑制することが示された。よって、この麹による分解物がII型糖尿病の進展を抑制する可能性が示唆され、生活習慣病の軽減、発症の抑制につながる期待が見出された。

今までの結果を受けて、今回は麹による脱脂粉乳分解物がもたらす、生活習慣病の発症進展予防効果を確認し、アンギオテンシンII抑制効果との関連を明らかにするために更なる動物実験を含む研究をすることが、本研究の目的である。

【実験材料および方法】

1. 脱脂粉乳麹分解物の調製

麹による脱脂粉乳分解物の調製方法脱脂粉乳、米麹 (*Aspergillus oryzae*) を等量入れ、さらに、食塩 (4.8%)、アルコール (5.1%) を混合したものを35℃、12日間発酵した。成分分析の結果、水分47.2%、Y値 (明度) 40.2%、AI (酸度) 8.7ml、FN (フォルモール態窒素) 0.31%、pH5.8という結果を得た。

2. ACE阻害活性測定用試料の調製

サンプルとする麹による脱脂粉乳分解物10gを量り採り、10mlの蒸留水を加え、1分間×3回、ホモジナイズした。その後、超音波によるホモジナイズを1分間×3回したものを、7,000rpm、15分間、4℃で遠心分離し、その上清を測定用試料としてタンパク質濃度測定とACE阻害活性測定に用いた。タンパク質の定量はBiuret法¹²⁾により実施した。

3. アンギオテンシンI変換酵素 (ACE) 阻害活性測定

Cushmanらの方法¹³⁾ に準じて、シグマ社製ウサギ肺由来ACEとナカライテスク株式会社製合成基質HHL (Hippuryl - L - Histidyl - L - Leucine) を用いて測定した。

すなわち、試料6μlに、60mU/ml ACE溶液20μlおよび7.6mMのHHL50μlを添加し、37℃で30分間反応させた。ACEはホウ酸緩衝液 (pH8.3) で溶解し、HHLは塩化ナトリウム (和光純薬工業製、特級)、0.25Mホウ酸緩衝液を、それぞれ最終濃度0.608M、0.1Mになるように超純水を用いて調整した溶液で溶解した。その後、0.1N塩酸554μlを加えて反応を停止した。ついで、酢酸

エチル1.5mlを加えてACEの作用によって遊離した馬尿酸を振倒抽出し、2,500rpmで15分間遠心分離を行った後、酢酸エチル層 1 mlを分取して蒸発乾固（100℃、10分間）した。酢酸エチル層を乾固したのち、馬尿酸を1 M 塩化ナトリウム溶液 1 mlで溶解させ、波長228nmにおける吸光度を測定した。阻害率は、試料を加えたものの吸光度をS、試料の変わりに超純水を加えて同様に反応させたときの値をC、予め0.1N塩酸を加えて反応させたときの値をBとして次式により求めた。

$$\text{阻害率} = \{(C-S) / (C-B)\} \times 100$$

阻害活性（IC₅₀）は、上式により求められる阻害率が50%を示すときの阻害活性物質濃度（反応液 1 mlあたりのmg数）で示した。

4. ラット用飼料の調製

実験材料 1 で調製した脱脂粉乳麩分解物を凍結乾燥させ、ミキサーで粉碎後、篩分けを行った。粉末状になった麩による脱脂粉乳分解物を 5 %、粉末状の普通飼料95%を混合し、供試験飼料とした。

普通飼料と脱脂粉乳分解物を 5 %添加した飼料の分析を日本食品分析センターに依頼し実施した。その結果を表 1 に示した。この結果から 2 種類の飼料は栄養成分的にはほぼ同等のものであると言える。

5. ラットの飼育条件および試験区分の設定

6 週齢雄性のSHR/NDmc - cpラット{自然発症高血圧ラット}（高血圧症、肥満、2型糖尿病）を24頭、6 週齢雄性のGK/Slcラット{自然発症糖尿病ラット}（非肥満、2型糖尿病）を12頭、それぞれ日本エスエルシー株式会社より購入し使用した。ラットにはオリエンタル酵母工業株式会社の粉末試料MFを与え、室温23±1℃、相対湿度50±10%、照明時間12時間/日の条件下で飼育した。飲料水は水道水を0.2mmのメンブランフィルターで自由摂取させ、飼料も自由摂取させた。1つのケージに1頭入れて飼育した。また、購入後1週間新しい環境に馴染ませ、その期間は粉末試料MFを全頭に与えた。実験期間はSHR/NDmc - cpラット（以後SHRラットと呼ぶ）は3ヶ月行い、GK/Slcラット（以後GKラットと呼ぶ）は4ヶ月行った。

SHRラット24頭を無作為に2群（A、B）に分け、A群には普通飼料を与え、B群には麩による脱脂粉乳分解物を 5 %添加した飼料を与えた。同様にGKラット12頭も無作為に2群（C、D）に分け、C群には普通飼料を与え、D群には麩による脱脂粉乳分解物を 5 %添加した飼料を給与した。

6. ラット試験に係る測定項目および方法

簡略化させた測定項目および期間の概要を図 3 に示した。

測定項目および実験期間

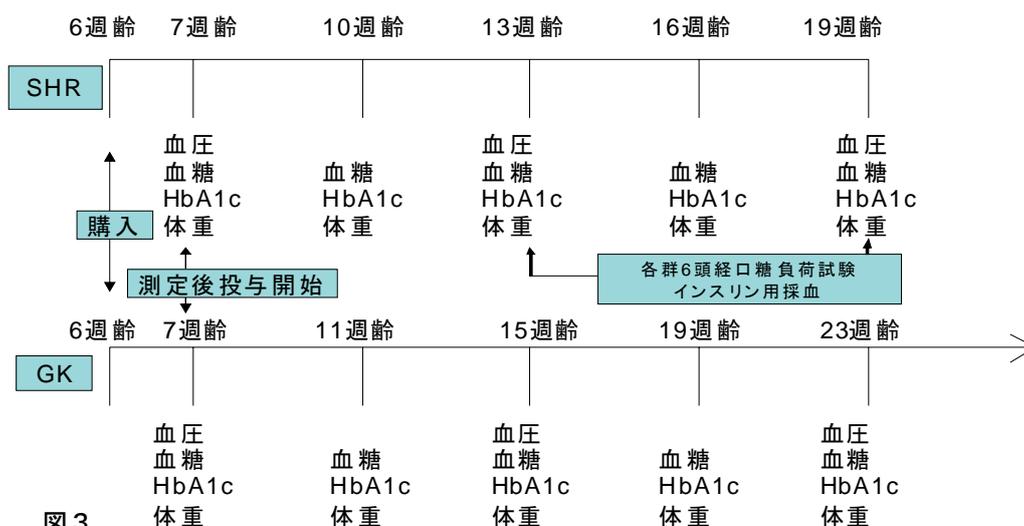


図3

1) 飼料摂取量の測定

同一時刻で測定するため、午前9時より飼料の摂取量を測定し、同量になるよう飼料を補充した。2日に一度測定した。

2) 体重測定

SHRラットは3週間に一度測定し、GKラットは4週間に一度測定した。

3) 収縮期血圧および拡張期血圧の測定

血圧は日内変動が大きいため、測定時間を一定にするために午前9時より測定を行った。測定を行う前に16時間の絶食を行った。ラットに前保温（36℃）を施した後、非観血式血圧測定装置（株ソフトロン製、BP-98A）を用いてtail-cuff法で尾動脈圧を測定した。一度に5回計測し、その平均値を測定血圧とした。SHRラットは6週間に一度測定し、GKラットは8週間に一度測定した。

4) 血中アンギオテンシンⅡ濃度の測定

SHRラットは6週間飼育後、A群、B群それぞれ12頭ずつの中から無作為に6頭を選別した。経口糖負荷試験終了後、27Gサイズの針と1mlの注射器を使用し、ネンブタール（大日本製薬株式会社）で麻酔を行い、腹部切開後、22Gサイズの針と10mlの注射器を使用して、腹部大静脈より6mlの採血を行った。そして、EDTA、アプロチニン入り試験管（2本）に3mlずつ採取した。採取後、十分に振倒し、水中保存した。さらに、12週間飼育後に残りのA群、B群の6頭ずつから同様に採血を行った。採血後、3,000rpm、15分間、4℃で遠心分離を行い、血漿サンプルを得て、アンギオテンシンⅡの測定まで-70℃にて保存した。血中アンギオテンシンⅡの測定用サンプルを調製するために2種類のバッファーを作り、バッファーA（トリフルオロ酢酸（TFA）1%）、バッファーB（1%TFA、60%アセトニトリル）とした。そして、1ml

の血漿と1 mlのバッファーAを混ぜ合わせ、12,000×g、20分、4℃で遠心分離したものの上澄みを採取した（サンプル1）。その後、200mgのC-18を含むSEP-COLUMN（RK-SEPCOL-1）の平衡化のために、バッファーB（1 ml、1回）を加えた後、バッファーA（3 ml、3回）で内部を満たした。そして、サンプル1をSEP-COLUMNに流した後、3 mlのバッファーAで2回洗い捨て、最後にバッファーBで3 ml流したものを全て採取し、採取したものを減圧遠心濃縮器により水分を飛ばした（サンプル2）。

血中アンギオテンシンⅡの測定はELISA法にて測定を行った。まず、ウェルにサンプル2をアッセイバッファーで溶解したものを50 μl入れ、25 μlの抗血清と25 μlのペプチドを加えた。2時間室温に反応した後、300 μlのアッセイバッファーで5回洗浄し、SA-HRP溶液を100 μl加え、再び1時間室温で反応させた。その後、300 μlのアッセイバッファーで6回洗浄し、基質溶液を100 μl加え、1時間室温で反応させた。最後に2NのHCLを100 μl加え、反応を止め、450nmで吸光度を測定し検量線より、血中アンギオテンシンⅡを求めた。

5) 空腹時血糖値の測定

測定を行う前に16時間の絶食を行った。ラットに前保温（36℃）を施した後、ラットの尾静脈に27Gサイズの針を刺し、出血後、メディセーフミニ血糖セット（テルモ株式会社）にて測定した。一度に3回計測し、その平均値を測定血糖値とした。

測定原理として、血液中のグルコースが試験紙に含まれるグルコースオキシダーゼの作用により、過酸化水素とグルコン酸を生成する。更に生成した過酸化水素はペルオキシダーゼの作用により、反応試験部に含まれる4-アミノアンチピリンとN-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-m-トルイジンと反応し、キノン色素が生成される。この赤紫色の呈色を比色定量した。SHRラットは3週間に一度測定し、GKラットは4週間に一度測定した。

6) 糖化ヘモグロビン (HbA_{1c}) の測定

測定を行う前に16時間の絶食を行った。ラットに前保温（36℃）を施した後、ラットの尾静脈に27Gサイズの針を刺し、出血後、DCA2000 HbA_{1c}カートリッジ（バイエルメディカル株式会社）にて測定した。HbA_{1c}値は総ヘモグロビン (Hb) 濃度とHbA_{1c}濃度とを測定し、総Hb濃度に対するHbA_{1c}濃度の百分比から得られる。総Hbはチオシアンメトヘモグロビン法により測定しHbA_{1c} はラテックス凝集阻止反応により測定した。検体中のHbA_{1c}値は次の式で算出した¹⁵⁾。

$$\text{HbA}_{1c}\text{値}(\%) = \{(\text{HbA}_{1c}\text{濃度}) / (\text{総Hb濃度})\} \times 100$$

SHRラットは3週間に一度測定し、GKラットは4週間に一度測定した。

7) 経口糖負荷試験による血糖値の測定

SHRラットは6週間飼育後、A群、B群それぞれ12頭ずつの中から無作為に6頭ずつ選別した。

D-Glucoseの0.75g/ml溶液を作製し、体重1kg当たり2mlになるようゾンデを用いて経口投与した(1.5g/kg)。投与前、投与後30分、60分、90分、120分の計5回、血糖値の計測を行う。測定方法は5)の空腹時血糖値の測定と同じ方法で行った。測定前日より16時間の絶食をし、実験中も絶食させ、水だけを与えた。さらに、12週間飼育後に残りのA群、B群の6頭ずつを同様に血糖値の測定を行った。

8) 経口糖負荷試験によるインスリンの測定

SHRラットは6週間飼育後、A群、B群それぞれ12頭ずつの中から無作為に6頭ずつ選別した。D-Glucoseの0.75g/ml溶液を作製し、体重1kg当たり2mlになるようゾンデを用いて経口投与した(1.5g/kg)。投与前、投与後30分、60分、90分、120分の計5回、インスリン測定用に採血を行った。これは7)の血糖値の測定と並行して行った。

ラットの尾静脈に27Gサイズの針を刺し、出血後、ヘパリン処理されたテルモヘマトクリット毛細管(テルモ株式会社)にて3本ずつ採血した。採血後は水中保存した。その後、10,000rpm、5分間の遠心分離を行い、血漿サンプルを得た。また、血漿サンプルはインスリン測定まで -70°C にて保存した。さらに、12週間飼育後に残りのA群、B群の6頭ずつから同様に採血を行った。インスリンの測定は、モリナガ超高感度ラットインスリン測定キット(株式会社森永生科学研究所)にて測定を行った。

7. 有意差検定

有意差検定はチューキー検定を用いた。また、数値は全て平均値±標準誤差で示した。

【結果および考察】

麴による脱脂粉乳分解物の生理活性機能の評価として、血圧調節に関与しているレニン・アンギオテンシン系でアンギオテンシンIから昇圧物質であるアンギオテンシンIIの生成を触媒するACEの阻害活性を測定することにより、高血圧および糖尿病などの生活習慣病予防効果を検討した。

ACEはその活性中心に亜鉛を有するメタロプロテアーゼの1つで、10個のアミノ酸からなるペプチドであるアンギオテンシンIに作用し、そのC末端側2残基を切断するジペプチジルカルボキシダーゼである。ACEの作用により生体内に生成されるアンギオテンシンII(アミノ酸8残基より構成されるペプチド)は、非常に強力な昇圧物質であり、血管平滑筋の収縮や副腎から強力なナトリウム貯留ホルモンであるアルドステロン分泌を促進することなどにより血圧上昇を引き起こす(図1)。そのためACEの作用を阻害することが出来れば血圧の上昇を抑制でき、それに伴い生活習慣病の抑制につながる事が考えられる。

そこで、脱脂粉乳を麴菌で発酵させた脱脂粉乳分解物とポジティブコントロールとして使用されるカルノシンの両者のACE阻害活性を測定した。そして、50%ACE阻害活性発現に要するタン

パク質濃度 (IC₅₀) を計算すると、麩による脱脂粉乳分解物はカルノシンの4倍以上の阻害活性があることが明らかになった (図2)。

ACEと両血圧調節系との関連図

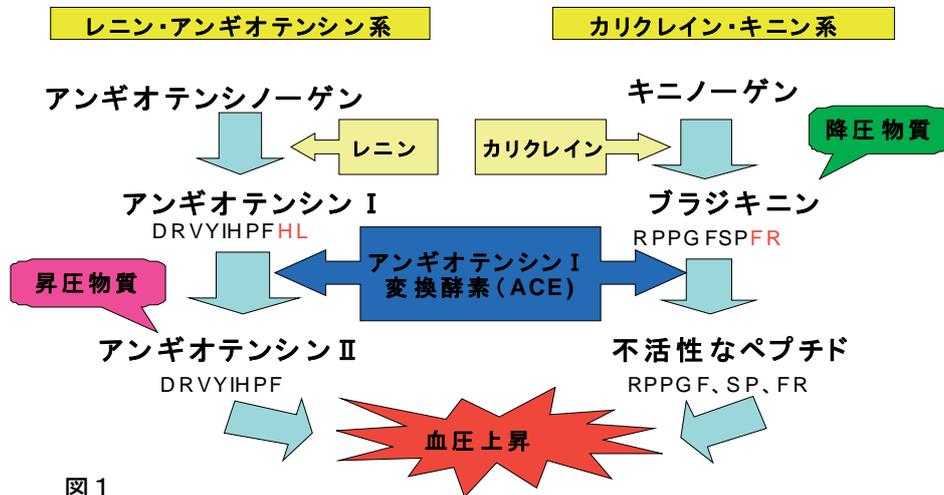


図1

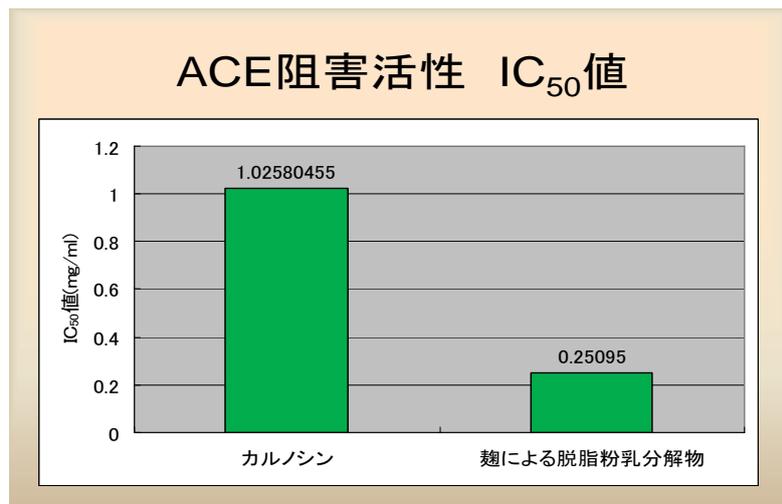


図2

逆相クロマトグラフィーを用いてイソクラティック溶出によるACE阻害活性のあるペプチドの精製を行った。これにより得られた画分のアミノ酸配列の分析結果から、分子量278.3のTyr-Pro(YP)と分子量280.3のVal-Tyr(VY)であることが確認されている。また、ホモロジー検索の結果から前者のペプチドは α s1 - カゼインの146~147番目と159~160番目の残基に相当し、後者のペプチドは α s2 - カゼインの183~184番目の残基に相当することが明らかになった¹⁴⁾。

以上のように *in vitro* の実験で麩による脱脂粉乳分解物には有意にACE阻害活性を持つことが明らかになった。この結果を受け、次の *in vivo* の動物実験への高い期待が持たれた。

麩による脱脂粉乳分解物の生理活性機能を確認するために、自然発症高血圧ラット

(SHR/NDmc - cp) および自然発症糖尿病ラット (GK/Slc) を用いて投与試験を行った。本試験において2型糖尿病患者、高血圧患者、肥満者の病態モデルとして自然発症高血圧ラット (SHR/NDmc - cp) および2型糖尿病患者の病態モデルとして自然発症糖尿病ラット (GK/Slc) を用いて麩による脱脂粉乳分解物が及ぼす影響 (血圧、血中アンジオテンシンⅡ濃度、空腹時血糖値、糖化ヘモグロビン、経口糖負荷試験による血糖値の上昇抑制効果、経口糖負荷試験によるインスリンの分泌量増加) に関する効果の検討を行った。

まず1週間毎の飼料の摂取量の変化を比較した。結果をSHRラットは図4に、GKラットは図5に示した。SHRラットはA群およびB群間に有意な差はなかった。GKラットにおいては、D群がC群より毎日1~2g程度多めに食べているが、有意差は認められなかった。

SHRラット 飼料摂取量

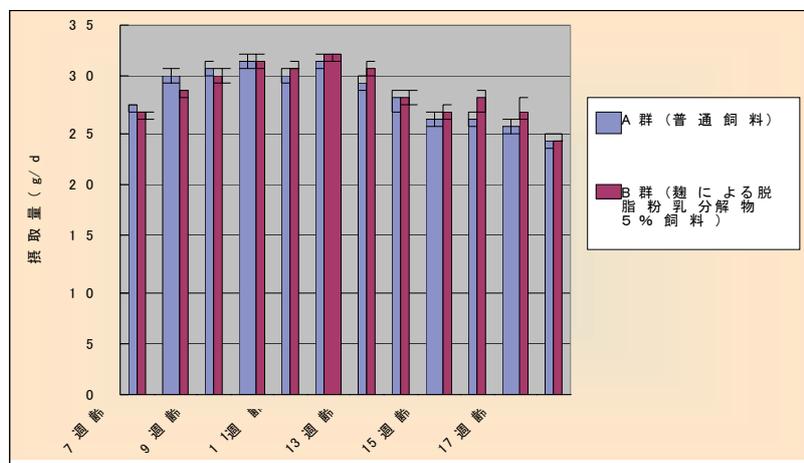


図4

GKラット 飼料摂取量

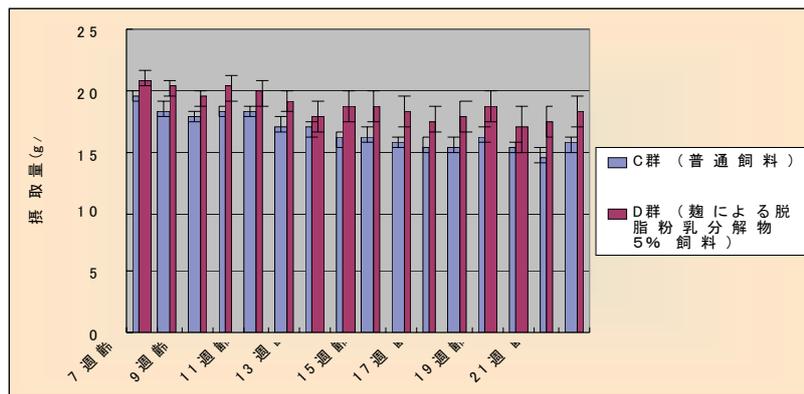


図5

次に、体重の変化を比較した。結果をSHRラットは図6に、GKラットは図7に示した。SHRラットでは飼料の摂取量の変化において、A群およびB群間に有意な差がなかったことでの推察からもわかるように、体重の変化にも有意な差は認められなかった。一方、GKラットにおいては、C群よりD群の方が飼料の摂取量がやや多かったため、体重の変化や今後の実験に影響を及

ぼす可能性が疑われたが、C群とD群に有意な差はなかった。すなわち、飼料の成分（表1）、飼料の摂取量（図4、5）、体重の変化（図6、7）に有意な差が認められなかったということは、両群共に同条件で飼育されていたことが確認され、以後の実験データが比較可能なものであると考えられる。

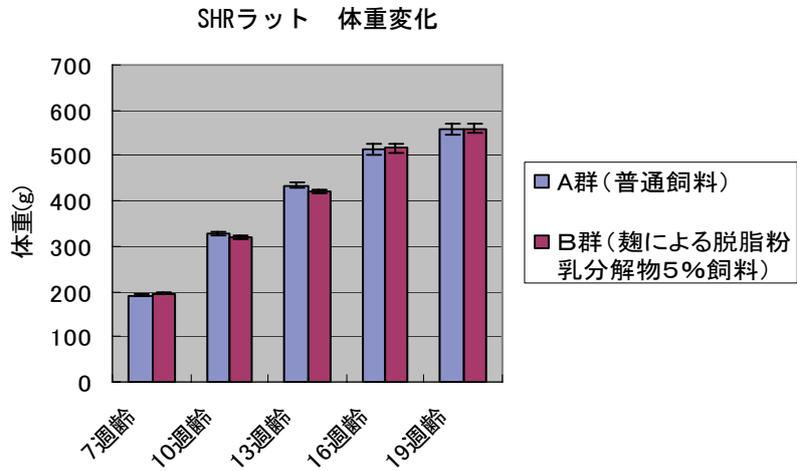


図6

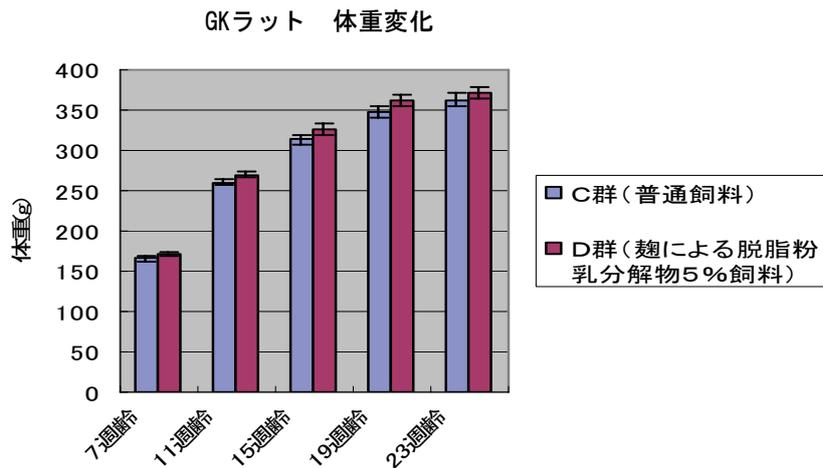


図7

表1 ラット飼料の一般成分分析

	普通飼料	麩による脱脂粉乳分解物5%添加飼料	分析方法
水分(%)	7.2	7.9	常圧加熱乾燥法
粗タンパク質(%)	23.7	23.3	ケルダール法
粗脂肪(%)	5.2	4.9	ジエチルエーテル抽出法
粗繊維(%)	2.7	2.6	ろ過法
粗灰分(%)	5.8	5.9	直接灰化法
カロリー(kcal/100g)	363.2	358.9	

続いて、収縮期血圧および拡張期血圧の測定を行った。血圧の測定結果をSHRラットは図8に、GKラットは図9に示した。SHRラットでは、7週齢、13週齢、19週齢のそれぞれの計測時にはA群およびB群間に有意な差はなかった。しかし、A群では13週齢から19週齢にかけて有意に下がってはいないが、B群では収縮期血圧の値が、 $-17.83 \pm 7.69 \text{mg/dl}$ と有意に低下していた ($P < 0.05$)。また、GKラットでは、15週齢から23週齢にかけてC群は変化がないものの、D群では収縮期血圧の値が $-13.60 \pm 4.83 \text{mg/dl}$ と有意に下がっていた ($P < 0.05$)。そして、23週齢の収縮期血圧の値をみると、C群とD群との間におよそ 10mg/dl の有意な差が認められた ($P < 0.05$)。また、D群における15週齢から23週齢にかけての拡張期血圧の値も有意な差はみられないものの低下していた。この血圧測定の実験から、SHRラット並びにGKラットに麩による脱脂粉乳分解物を投与することで、血圧を有意に低下させることが明らかになった。

SHRラット 収縮期および拡張期血圧変化

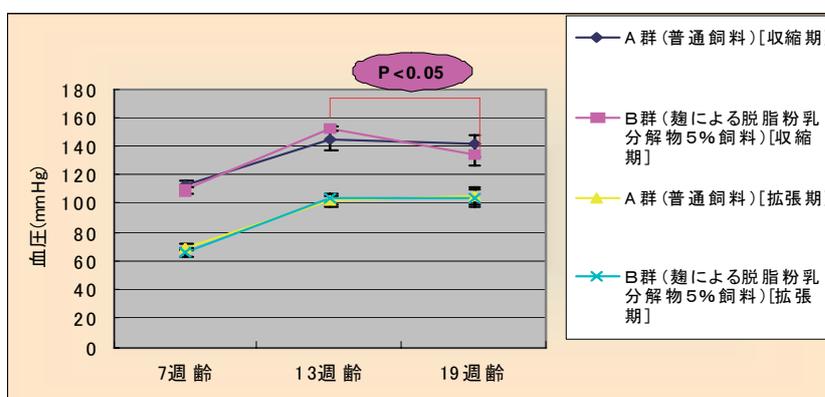


図8

GKラット 収縮期および拡張期血圧変化

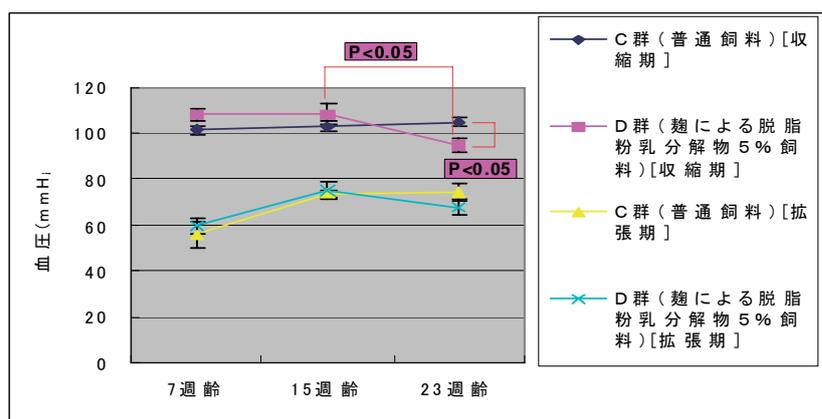


図9

高血圧とは、収縮期血圧が 140mmHg 以上、または拡張期血圧が 90mmHg 以上の状態と定義され、世界保健機関 (WHO) と国際高血圧学会 (ISH) のガイドライン¹⁶⁾や米国合同委員会第6次報告¹⁷⁾、日本高血圧学会高血圧治療ガイドライン¹⁸⁾等により、さらに細かく分類されている。WHO並

びにISHの1999年の報告によると、収縮期血圧が140mmHg、拡張期血圧が90mmHg以上の高血圧症の方は全国で約3,000万人と推定され、日本人の4人に1人、更に50歳以上では2人に1人が高血圧症とされ、まさに国民病とも言われている。

本研究で得られた、SHRラット、GKラットにおける血圧測定の結果により、ヒトの日常の食事に麩による脱脂粉乳分解物を加えることで、血圧の上昇を抑制し、生活習慣病の予防や改善に効果的であるという可能性が考えられる。

次に、血中アンギオテンシンⅡ濃度の測定を行った。アンギオテンシンⅡは図1で説明したように強力な昇圧物質であり、ACE阻害剤は降圧薬として医療に広く使用されている。*in vitro*の実験により麩による脱脂粉乳分解物中にACE阻害物質が大量に含まれていたことがわかっているので、血中アンギオテンシンⅡ濃度を測定することにより、麩による脱脂粉乳分解物の効果がどのくらい反映されているのかがわかる。測定結果を図10に示した。13週齢、19週齢におけるA群の結果がB群（13週齢、19週齢）に比べ有意に低かった（ $P<0.05$ ）。これは期待とは反する結果となった。今後の課題として、高脂肪の飼料や塩分を添加することによるアンギオテンシンⅡ濃度の促進や、別の病態モデルラットを用いて実験をするなどの必要が考えられる。今回、麩による脱脂粉乳分解物を摂取することで血圧の上昇抑制が認められたことは、以前機能性味噌を用いて行った、SHRラットでの経口投与試験による血圧降下の有益な確認となった。今回、血中アンギオテンシンⅡ濃度の測定において期待とは反する結果が出たことは、非常に残念なことであり、ヒトの持続摂取試験によるアンギオテンシンⅡ濃度低下の結果の有益な確認とはならなかった。しかし、緒言でも述べたように、血中のアンギオテンシンⅡ濃度が低下することで、血圧の上昇が抑制されるということが立証される結果にはならなかったが、血圧は有意に低下することが確認された。さらに、ACE阻害剤に関する大規模な試験で、2型糖尿病患者の発症抑制効果ははっきりと確認されている。理由は未だ不明であるが、アンギオテンシンⅡの抑制による腓ランゲルハンス島の機能障害の軽減が要因であるという報告がある。

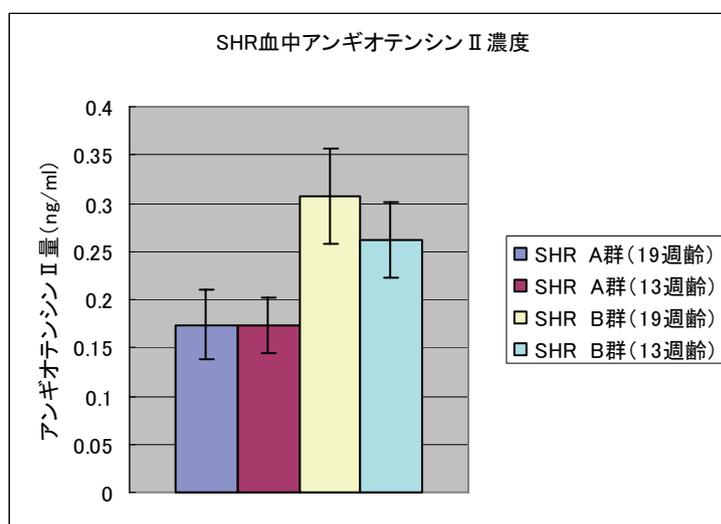


図10

続いて空腹時血糖値を測定した。世界保健機関（WHO）によると、2006年の時点で世界には少なくとも1億7,100万人の糖尿病患者がいると報告されている。患者数は急増しており、2030年までにこの数は倍増すると推定されている。日本にも740万人の患者がいて、さらに予備軍と呼ばれる患者は880万人に上ると言われている。

得られた結果をSHRラットは図11に、GKラットは図12に示した。空腹時血糖値の測定は実際の糖尿病患者に対しても導入されている測定項目である。図11を見てわかるように、SHRラットの10週齢と13週齢時の測定において、麩による脱脂粉乳分解物群（B群）が有意に低下していた（ $P < 0.05$ ）。この結果から、麩による脱脂粉乳分解物がSHRラットの糖尿病発症を抑制することが示唆された。しかし、16週齢と19週齢で、A群およびB群間に有意な差はなく共に血糖値が低下した。これは、普通飼料が糖尿病発症予防に効果的だったと考えるのは難しい。原因としては、図4のSHRラットの飼料摂取量のグラフを見ると、12週齢で最大に摂取した後、少しずつ摂取量が減少していた。血糖値が下がったのは原因不明であるが、この飼料摂取量の低下が血糖値の低下の原因であると考えられる。

SHRラット 空腹時血糖値変化

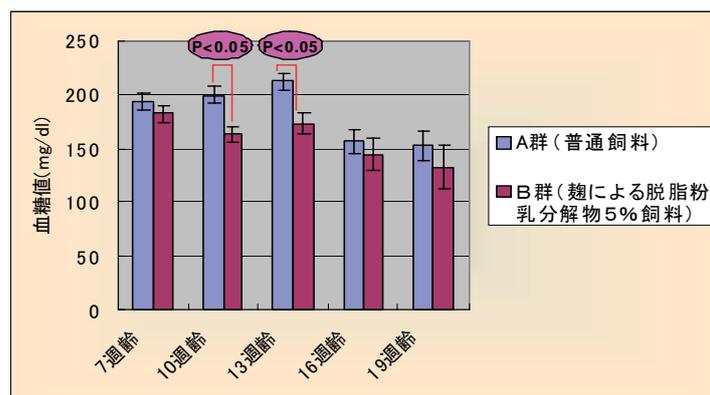


図11

GKラット 空腹時血糖値変化

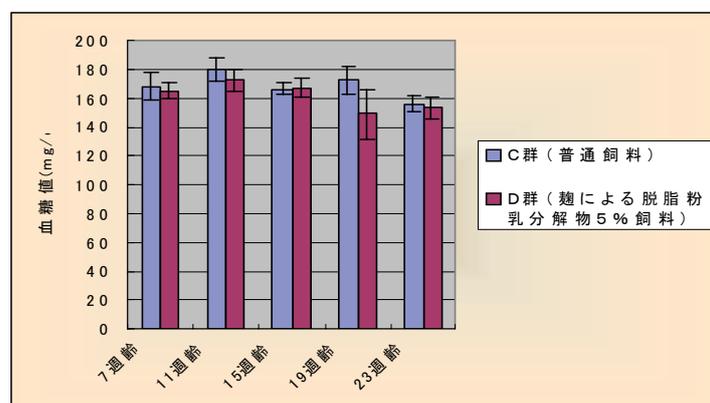
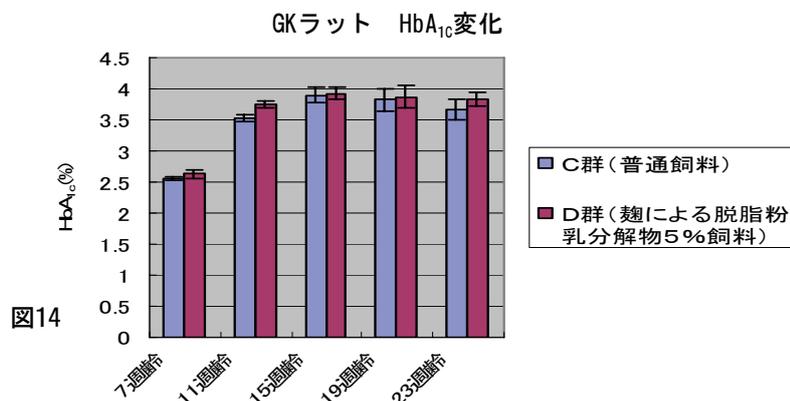
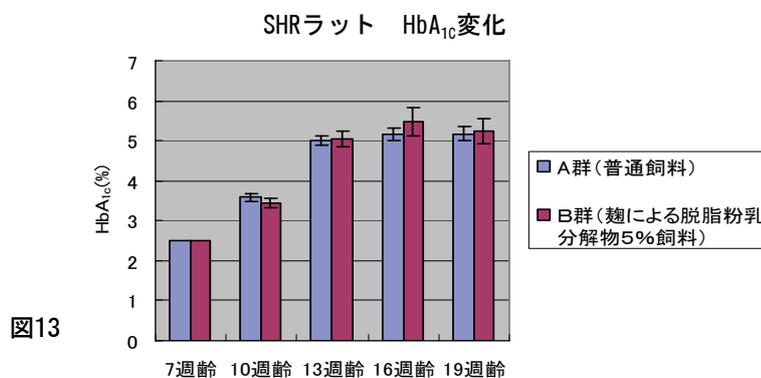


図12

今後の課題として、高脂肪の飼料や塩分を添加することによる血糖値上昇の促進や、別の病態モデルラットを用いて実験をするなどの必要が考えられる。また、GKラットにおいては、19週齢のときにC群に比べD群はおよそ23.28mg/dl下がっていたが、ばらつきがあったため有意な差は生じなかった。19週齢以外の週齢でも有意な差がなかったことから、飼育期間を延長して効果があるかどうか、さらに観察する必要がある。

本研究で得られたSHRラットの結果により、麩による脱脂粉乳分解物を食べることで、断定はできないものの血糖値が有意に低下することが明らかになった。すなわち、ヒトの日常の食事摂取により麩による脱脂粉乳分解物を食べることで、血糖値の上昇を抑制し、生活習慣病の予防や治療に効果的である可能性が示唆された。

次に、糖化ヘモグロビン (HbA_{1c}) を測定した。HbA_{1c}は赤血球のヘモグロビンにブドウ糖が結合したもので、検査を受けるときから約1～2ヶ月前の平均的な血糖状態を反映し、血糖値に比例すると言われている。また、血糖値が高値でも、HbA_{1c}が基準値であれば、糖尿病の可能性は低いと言われていることにより、HbA_{1c}の測定結果に有意な差が出れば、麩による脱脂粉乳分解物の生理活性機能は効果的であるという結論に結びつくことが期待される。SHRラットの結果を図13に、GKラットの結果を図14に示した。SHRラットに関しては、前回の実験で麩による脱脂粉乳分解物摂取群が普通飼料摂取群と比べて、有意に下がっていた (P<0.05) という結果が出ており、非常に期待されていたが、今回の実験では統計的に有意な差はないという結果になった。また、GKラットでも有意な差は認められず、飼育期間の延長による効果に期待したい。



SHRラット 経口糖負荷試験による血糖値の測定（13週齢）

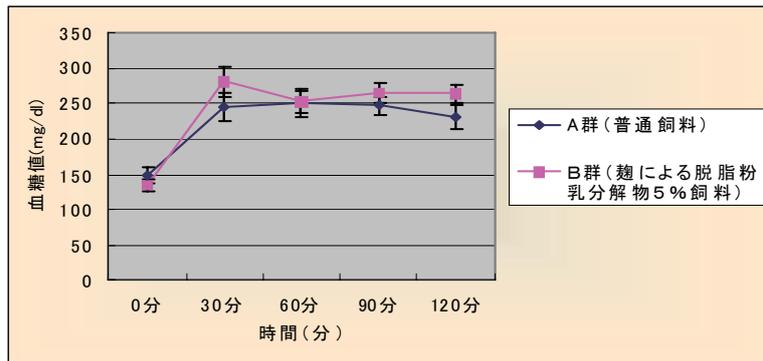


図15

SHRラット 経口糖負荷試験による血糖値の測定（19週齢）

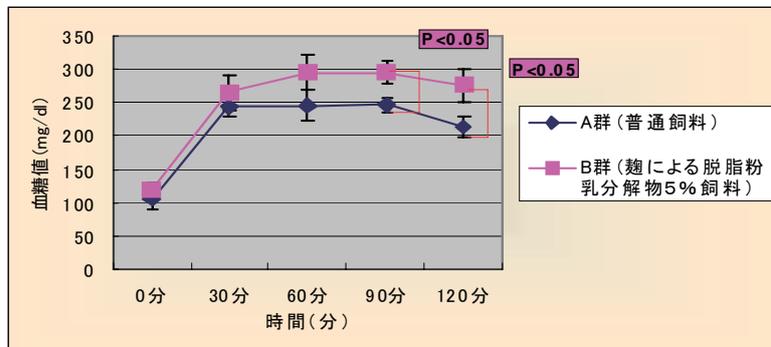


図16

さらに、経口糖負荷試験による血糖値の測定を行った。経口糖負荷試験とは空腹時にブドウ糖を摂取し、その後、決められた時間に血糖値の測定を行い、血糖値の変動により糖尿病か否かがわかる、糖尿病の診断に有効な試験である。糖尿病はインスリン分泌能低下とインスリン抵抗性の2つが、相対的あるいは絶対的な原因として血糖値の降下不全により起こる病気と考えられている。今回は、麩による脱脂粉乳分解物摂取により、インスリン分泌能低下の改善あるいは抵抗性因子の抑制により、血糖値の上昇抑制が期待される。SHRラットによる6週間飼育後の経口糖負荷試験の血糖値の測定の結果を図15に、12週間飼育後の結果を図16に示した。6週間後の試験では、有意差は見られなかったが、12週間後の試験では、投与後、90分、120分後の計測で、B群に比べA群の方が有意に血糖値が低下する結果が得られた ($P < 0.05$)。

今後、空腹時血糖値の測定結果同様、高脂肪の飼料や塩分を添加することによる血糖値上昇の促進や、別の病態モデルラットを用いて実験をすることが緊急の課題であると考えられる。

最後に、経口糖負荷試験による血糖値の測定と並行してインスリンの測定を行った。インスリンは膵臓のランゲルハンス島から分泌される物質で、主に骨格筋・脂肪・肝臓で血液からの糖吸収を促し、エネルギーとして利用する作用がある。ゆえにインスリンは血糖値の上昇を抑制する重要な物質である。麩による脱脂粉乳分解物摂取により、血中アンギオテンシンⅡ濃度低下との関連で、インスリン分泌能低下の改善あるいは抵抗性因子の抑制が期待されることから、インス

リンの測定は重要であると考えられる。

SHRラットによる6週間飼育後の経口糖負荷試験のインスリンの測定の結果を図17に、12週間飼育後の結果を図18に示した。6週間飼育後の結果では、経口投与前に比べると全ての測定時間においてインスリンの分泌量が増加していた。特にB群においては0分の測定に比べ残り全ての時間の測定で有意に増加していた ($P<0.05$)。また、A群とB群間に有意な差は生じなかった。12週間飼育後の結果ではA群のインスリン量が0分から30分にかけて有意に増加していた ($P<0.05$)。また、有意な差はないものの全体的に、B群に比べA群の方がインスリンを多く分泌していた。その結果が図16にも示したように、A群の方がB群より血糖値を有意に降下させたという期待とは反対の結果につながった要因の一つと考えられる。今回のインスリンの測定ではA群とB群間に有意な差は生じなかった。糖尿病はインスリンの分泌能低下もしくはインスリン抵抗性によって血糖値が下がらず、高い血糖状態を維持する病気である。今回、D-Glucose溶液を経口投与したことに対して、インスリンが正常に分泌されていたことがわかったことから、インスリン抵抗性がSHRラットの糖尿病の原因ではないかと想定される。今後、膵臓を摘出し、ランゲルハンス島の観察をすることで、インスリン抵抗性の度合いを調査することが必要と考えられる。

SHRラット 経口糖負荷試験によるインスリンの測定 (13週齢)

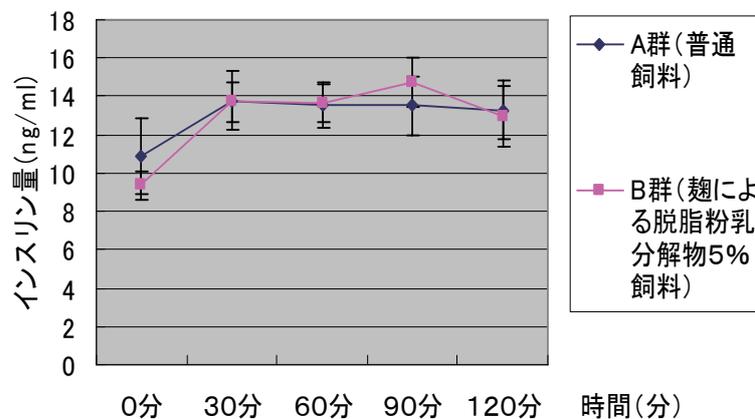


図17

SHRラット 経口糖負荷試験によるインスリンの測定 (19週齢)

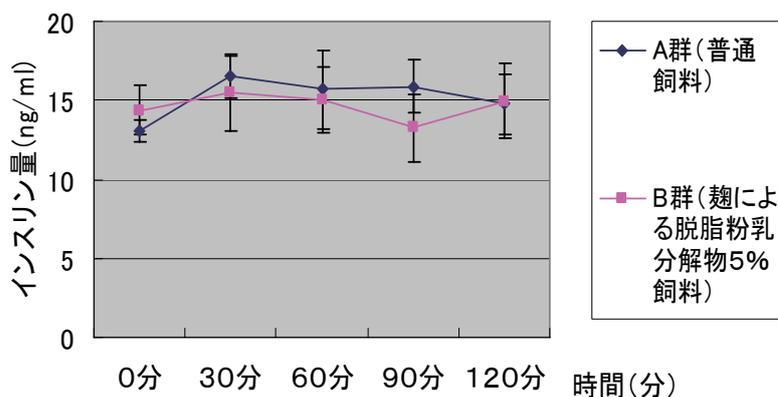


図18

以上のように、今回開発された麴による脱脂粉乳分解物は、*in vitro*の実験で生活習慣病予防効果が期待できるACE阻害活性を有していた。また、*in vivo*の実験でも、空腹時血糖値降下作用、血圧降下作用などの生理活性機能も認められ、生活習慣病の予防や進展を抑制できる、非常に商品価値の高い「新規調味料」であることが確認された。しかし、血中アンギオテンシンⅡ濃度やHbA_{1c}、経口糖負荷試験による血糖値の試験において有意な結果が得られなかった。

今後の課題としては、麴による脱脂粉乳分解物を摂取することでの膵臓のランゲルハンス島の機能障害の軽減等の観察をすること、さらに、飼料の改善や他の病態モデルラットに投与することでの影響の確認、また、ヒトにおける血糖・血圧降下作用、生活習慣病の発症や進展の抑制作用を確認するとともに、それらの生理活性機能を引き起こす詳細なメカニズムの解明、そして商品化ができるように研究を進めることが必要である。

参考文献

- 1) 六車 三治男、森 栄裕、河原 聡、山内 清、工藤真豪、久寿米木 一裕、中出浩二、中村豊郎：脱脂粉乳を利用したニュータイプの機能性味噌について 日本畜産学会第103回大会講演要旨、 P161 (2004)
- 2) 六車 三治男：脱脂粉乳の新しい用途開発に成功 –脱脂粉乳を利用したニュータイプの機能性みその開発–；畜産コンサルタント、476(8), 57-63 (2004)
- 3) 六車 三治男、森 栄裕、河原 聡、丸山眞杉、工藤真豪、久寿米木 一裕、大谷啓一、脇能広、菱沼 毅、中村豊郎：スキムミルクを利用したニュータイプの機能性みその動物試験について 日本畜産学会第104回大会講演要旨、P164 (2005)
- 4) 六車 三治男、丸山眞杉、中村豊郎、久寿米木 一裕：「脱脂粉乳を利用した機能性ミルクィー・みそ」のヒトによる試験について 平成16年度脱脂粉乳の新規需要開拓に関する情報収集・研究報告書、 P143-153 (2005)
- 5) 久寿米木 一裕、中村豊郎、菱沼 毅、六車 三治男：日本醸造協会誌、100, 216-223 (2005)
- 6) 六車 三治男、河原 聡、丸山眞杉、久寿米木 一裕、菱沼 毅、中村豊郎：脱脂粉乳を利用した機能性みそのヒトによる試験について日本畜産学会第105回大会講演要旨、 P100 (2005)
- 7) 寺中毅頼、江澤真、松山惇、海老根英雄、清澤功；米味噌、麦味噌、および豆味噌抽出液のアンギオテンシン I 変換酵素抑制効果、農化、69(9), 1163-1169 (1995)
- 8) A.Takahama, A.Iwashita, M.Matsuzawa, H.Takahashi, M.Nakatsuka, and S.Yahata; Anti-hypertensive peptides derived from fermented soybean paste-miso. *Int. News on Fats Oils Relat. Mater.*, 4, 525 (1993)
- 9) 六車 三治男、丸山眞杉、中村豊郎、久寿米木 一裕：「脱脂粉乳を利用した機能性ミルクィー・みそ」のヒトによる試験–アンギオテンシン II 抑制効果– 平成17年度脱脂粉乳の新規需要 開拓に関する情報収集・研究報告書、P116-124 (2006)

- 10) H.Y.T.Yang, E.G.Erdos, and Y.Levin; A dipeptidyl carboxypeptidase that converts angiotensin I and inactivates bradykinin. *Biochim. Biophys. Acta*, 214, 374-376 (1970)
- 11) H.Y.T.Yang, E.G.Erdos, and Y.Levin; Characterization of a dipeptide hydrolase (kininase II : angiotensin I converting enzyme). *J.Pharmacol. Exp. Ther.*, 177(1), 291-300 (1971)
- 12) A. G.Gornall, C.J. Bardawill, and M. M. David; Determination of serum protein by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.*, 177, 751-766 (1949)
- 13) D.W.Cushman, and H.S.Cheung; Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochemical Pharmacology*, 20, 1637-1648 (1971)
- 14) 六車 三治男、森 栄裕、河原 聡、丸山真杉、中山建男、久寿米木 一裕、菱沼 毅、中村豊郎：「脱脂粉乳を利用した機能性味噌の開発」；*食品工業*、48(23), 2-15 (2005)
- 15) 高加国夫、武田裕子、渥美義仁、他：HbA_{1c}測定用DCA2000システムの概要と標準化への対応—JDS Lot2変更の検証— *医療と検査機器・試薬*、26, 485-489 (2003)
- 16) Guidelines Subcommittee; 1999 World Health Organization-International Society of Hypertension guidelines for the management of hypertension. *J.Hypertens.*, 17, 151-183 (1999)
- 17) The sixth report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and treatment of High Blood Pressure. *Arch Intern. Med.*, 157, 2413-2445 (1997)
- 18) 日本高血圧学会高血圧治療ガイドライン作成委員会；高血圧治療ガイドライン 2000年版 (JSH2000) 日本高血圧学会. (2000)